

ESTUDO DA VARIAÇÃO DA MICROFILAREMIA EM CÃES INFESTADOS POR *Dirofilaria immitis**

STUDY OF THE MICROFILAREMIC VARIATION IN DOGS WITH *Dirofilaria immitis*

Maria Helena Matiko Akao LARSSON¹; Marcia Cecilia MENG²; Archivaldo RECHE JÚNIOR³;
Carlos Eduardo LARSSON¹; Masao IWASAKI⁴; Luiz Fernando DUTRA⁵

RESUMO

Utilizaram-se 15 cães adultos, de ambos os sexos, com e sem definição racial, todos positivos para a presença de microfilárias na circulação periférica, para a observação da periodicidade das mesmas. A contagem das microfilárias foi realizada conforme ANGUS¹ (1981). A variação da microfilaremia foi observada durante um período de 24 horas, com amostras colhidas a intervalos de duas horas. Seis dos 15 cães foram submetidos a duas colheitas de material, uma em dia quente (temperatura ambiente média de 23°C) e outra em dia frio (temperatura ambiente média de 16°C). Analisando os resultados obtidos pode-se afirmar que as microfilárias de *Dirofilaria immitis* apresentam uma periodicidade, porém esta é muito variável, não obedecendo a um padrão fixo. Pode-se afirmar, também, que, uma vez presente, a microfilaremia não desaparece numa ou noutra colheita subsequente, não dificultando o diagnóstico da parasitose.

UNITERMOS: Dirofilaria; Cães; *Dirofilaria immitis*; Microfilaria

INTRODUÇÃO

A *Dirofilaria immitis* é um nematóide que parasita as cavidades cardíacas direitas e artérias pulmonares, acometendo, principalmente, os espécimes caninos. A dirofilariose canina pode manifestar-se de várias maneiras, sendo a mais freqüente a forma cardiopulmonar. Entretanto, independente da forma clínica do processo, o diagnóstico definitivo baseia-se na detecção de microfilárias no sangue periférico⁹.

MANSON¹¹ (1879) observou que as microfilárias de *Wuchereria bancrofti*, em pacientes infectados, eram numerosas durante a noite e mais raras, ou mesmo ausentes, durante o dia. Este fenômeno de alternância do número de microfilárias no decorrer de um período de 24 horas é denominado e conhecido como periodicidade das microfilárias. Segundo HAWKING⁶ (1960), a periodicidade das microfilárias está vinculada à transmissão da doença por artrópodes vetores; portanto, o período do aumento da concentração de microfilárias no sangue periférico coincide, habitualmente, com a hora do dia em que o vetor hematófago costuma se alimentar.

Na prática da Clínica Médica, tem-se observado, com certa freqüência, a ocorrência de casos de cães com sintomatologia compatível com dirofilariose, mas que

não apresentam microfilaremia periférica^{2,9,18,21}.

A pesquisa da literatura relativa ao assunto revela a existência de alguns trabalhos pertinentes à periodicidade das microfilárias^{1,4,6,7,10,16}.

A maioria dos pesquisadores tem-se referido ao fato de que a concentração de microfilárias de *Dirofilaria immitis* é mais elevada à noite^{4,6}, embora^{5,15}, tenham observado picos diurnos de microfilaremia e, ainda, de acordo com OTTO et al.¹⁷ (1976), as microfilárias podem ser encontradas no sangue periférico várias vezes ao dia e a periodicidade das mesmas variar conforme a localização geográfica.

Outros trabalhos fazem crer que existam fatores adicionais que interferem na periodicidade das microfilárias, como a magnitude da microfilaremia (isto é, animais com microfilaremia elevada e moderada exibiriam pico maior às 16 horas e aqueles com microfilaremia leve apresentariam picos mais evidentes às 24 horas)¹ e a temperatura ambiente (isto é, a periodicidade das microfilárias de *Dirofilaria immitis* seria diretamente proporcional à temperatura ambiente)¹⁰.

1 - Professor Associado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP-SP

2 - Médico Veterinário - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP-SP

3 - Pós-Graduando - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP-SP

4 - Professor Titular - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP-SP

5 - Médico Veterinário - São Paulo - SP

* Trabalho apresentado no XI Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias realizado em Lima, Peru, 14 a 20 de agosto de 1988

Trabalho realizado sob os auspícios da FAPESP

O escopo deste trabalho foi estudar a periodicidade das microfíliarias de *Dirofilaria immitis* em cães de nosso meio; em caso positivo, ou seja, de existir(em) realmente pico(s) de microfíliarêmia, caracterizá-lo(s) com a finalidade de indicar o(s) período(s) do dia mais propício(s) para a colheita de sangue de animais suspeitos, aumentando assim as possibilidades diagnósticas. Pretendeu-se também correlacionar a(s) periodicidade(s) a variações de temperatura ambiente.

MATERIAL E MÉTODO

O grupo experimental foi constituído por 15 animais adultos, de ambos os sexos, com e sem definição racial, procedentes dos municípios paulistas de Guarujá, Bertioga e Cubatão.

Os animais incluídos no presente trabalho foram selecionados por meio da pesquisa de microfíliarias circulantes [Método da Gota Espessa; Técnica de KNOTT modificada e Técnica de MELLO; MAUGE¹³ (1983)] e/ou manifestações clínicas e/ou exames complementares como exames radiográfico e eletrocardiográfico.

Para a observação da periodicidade das microfíliarias circulantes utilizou-se a contagem das mesmas, segundo ANGUS¹ (1981).

Exceção feita a três animais (domiciliados), os demais receberam tratamento anti-helmíntico (Mebendazole, na dose de 30 mg/kg/dia, durante três dias) e foram vacinados contra Cinomose, Hepatite Infecciosa Canina, Leptospirose e Parvovirose, respectivamente, 40 e 30 dias antes do início do experimento.

Durante todo o período de experimentação, os animais não domiciliados foram mantidos em canis individuais do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, recebendo, diariamente, ração comercial**.

Colheita de Material

O material (sangue, na quantidade de 3 ml) destinado à pesquisa e contagem de microfíliarias foi obtido por punção das veias radiais e/ou safenas e/ou jugulares, a intervalos de duas horas, durante um período de 24 horas, e acondicionado em frascos contendo 0,03 ml de EDTA (sal sódico do ácido etilenodiaminotetracético a 10%) para posterior análise.

A colheita de material dos animais (domiciliados) foi realizada numa clínica particular, na cidade de Guarujá, ao passo que o material referente aos demais foi colhido nos próprios do

Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP.

Seis cães (n^{os} 3, 4, 5, 6, 7 e 8) foram submetidos a duas colheitas de material, uma em dia quente (temperatura ambiente média de 23°C) e outra em dia frio (temperatura ambiente média de 16°C).

Método de Gota Espessa

Uma gota de sangue com anticoagulante é examinada entre lâmina e lamínula; as larvas são vistas, neste método, indiretamente pela movimentação das hemácias. As microfíliarias de *Dirofilaria immitis* são dotadas de movimentos serpentiformes⁹.

Técnica de KNOTT modificada

Consiste na técnica padrão (NEWTON; WRIGHT¹⁴, 1956) é processada da seguinte forma: 1 ml de sangue é hemolisado em 10 ml de formol 2%; após centrifugação por cinco minutos a 1500 rpm, o sedimento é misturado com igual quantidade de Azul de Metileno (1:1000) e examinado ao microscópio óptico para observação, principalmente, das características morfológicas das microfíliarias.

Técnica de MELLO; MAUGE¹³ (1983)

- Colocam-se, em tubo de centrifuga, 8-10 ml da seguinte solução:

Potassa 10%.....	2 ml
Detergente comercial	2 ml
Água destilada	1000 ml

adicionar 0,2 ml de sangue e hemolisar;

- centrifuga-se a 3000 rpm durante 10 minutos;

- adicionam-se uma a duas gotas de glicerina corada pelo Azul de Metileno (glicerina 100 ml + Azul de Metileno 200 mg); haverá deslocamento da gota de glicerina para o fundo do tubo;

- centrifuga-se novamente por cinco minutos a 3000 rpm;

- retira-se o sobrenadante até o nível superior da gota de glicerina corada, com o auxílio de bomba de vácuo (trompa d'água), ligada a uma torneira de água corrente. O tubo plástico da extremidade da bomba deve ter aberturas laterais para evitar a sucção do sedimento;

- retira-se todo o sedimento com o auxílio de uma pipeta Pasteur e coloca-se entre lâmina e lamínula para ser feita a observação.

** Gentilmente cedida pela Mogiana Alimentos.

Interpretação

Para a diferenciação das microfilárias podem-se levar em conta as seguintes características morfológicas:

	D. immitis	D. reconditum
Extremidade posterior em gancho	ausente	presente
Presença de gancho cefálico	ausente	presente

Estas características morfológicas tornam-se bastante visíveis quando coradas pelo Azul de Metileno.

Método para contagem de microfilárias (ANGUS¹, 1981)

Dilui-se 1 ml de sangue em 6,6 ml de líquido estromalizante (8 g de bicarbonato de sódio; 5 ml de Triton detergente e água destilada qsq 1000 ml). Preenche-se a câmara de McMaster com mistura sangue-líquido estromalizante e contam-se as microfilárias em aumento de 100 vezes.

O resultado final, isto é, o número de microfilárias por ml de sangue, é obtido multiplicando-se o número de parasitas pelo fator 50,66:

Área da câmara de McMaster	0,15 ml
Diluição do sangue no fluido	1:7,6
Área de sangue na câmara	$7,6 \cdot 0,15 = 50,66$

Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas consideradas, para a triagem dos animais domiciliados, foram as que se seguem: intolerância ao exercício, tosse, dispnéia, ascite e edema subcutâneo. Obviamente, os animais também foram submetidos aos exames laboratoriais para a pesquisa de microfilárias circulantes.

Exames Radiográfico e Eletrocardiográfico

O animal nº 3 (domiciliado) foi avaliado também por meio de exames radiográfico e eletrocardiográfico.

O exame radiográfico foi realizado na disciplina de Radiologia do Departamento de Cirurgia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. As radiografias foram efetuadas em aparelhos de raios-X, modelo Tridoros 4, de capacidade para 1000 mA, equipado com grade antidifusora Potter-Bucky***.

A técnica radiográfica empregada foi a que relaciona miliamperagem-segundo e quilovoltagem à espessura da região torácica³.

O traçado eletrocardiográfico foi realizado com os animais, sem anestesia, mantidos em decúbito lateral direito; registraram-se as derivações bipolares I, II, III e as unipolares aumentadas aVR, aVF, aVL^{8,20}. Utilizou-se eletrocardiografo FUNBEC modelo ECG-3.

RESULTADOS

Os resultados obtidos acham-se dispostos sob a forma de tabelas (Tab. 1, 2).

Ainda, para uma melhor visualização dos resultados, dispuseram-se na Fig. 1 os representados pelas médias, em diferentes tempos de colheita de sangue.

COMENTÁRIOS

Analisando os resultados obtidos no presente trabalho e conceituando periodicidade, segundo SASA; TANAKA¹⁹ (1972), como “uma elevação e diminuição cíclicas do número de microfilárias no decorrer do tempo”, pode-se afirmar que os animais naturalmente infectados por *Dirofilaria immitis* ap. apresentam periodicidade de microfilárias; porém, esta periodicidade é muito variável de animal para animal, não obedecendo a um padrão fixo.

Ao contrário do que foi afirmado por HAWKING⁶ (1960) e por GLUBER⁴ (1966), não se observou periodicidade noturna marcante na maioria dos animais. Nossos resultados também discordam daquele de KUME¹⁰ (1974), que referiu ser o número de microfilárias circulantes diretamente proporcional à temperatura ambiente.

O que se pode afirmar é que, uma vez presente, a microfilaremia não desaparece numa ou noutra colheita subsequente, facilitando assim o diagnóstico da parasitose cardíaca. Se ocorrer microfilaremia negativa em associação com manifestações compatíveis com dirofilariose deve-se pensar na possibilidade de se tratar de um caso oculto da referida parasitose, não havendo necessidade de preconizar novas colheitas de sangue, em horários variados, para a detecção das microfilárias na circulação.

Nossos resultados são parcialmente semelhantes àqueles obtidos por ANGUS¹ (1981), que afirma que as microfilárias de *Dirofilaria immitis* podem ser encontradas no sangue periférico em várias ocasiões, durante todo o dia. No presente trabalho, de 15 animais estudados, alguns com duas colheitas, totalizando 21 colheitas durante as 24 horas do dia, observamos picos de contagem, ora noturnos, ora diurnos,

*** Siemens

TABELA 1

Contagem do número de microfílaras de 15 cães segundo horário de colheita e temperatura ambiente. São Paulo, 1988.

Número de microfílaras de <i>Dirofilaria immitis</i> no sangue periférico													
Animal nº	Tempo Colheita	2h	4h	6h	8h	10h	12h	14h	16h	18h	20h	22h	24h
1	A	30.258	23.883	43.566	40.378	39.012	34.964	55.052	41.694	37.342	31.119	57.835	43.617
2	A	15.180	11.992	16.495	12.397	9.968	16.040	13.459	15.281	18.772	12.650	16.799	13.662
3	A	115.671	156.961	881.972	93.002	171.331	57.886	29.955	83.287	198.048	133.584	81.769	199.667
4	A	1.669	2.074	5.262	3.643	4.452	8.045	4.452	4.098	2.479	5.060	2.530	2.125
5	A	3.643	1.214	22.125	2.277	2.125	1.518	2.175	1.771	2.833	2.327	3.440	2.833
6	A	910	2.024	1.113	4.048	3.187	2.327	2.277	3.137	3.542	2.327	1.619	1.922
7	A	6.628	11.486	13.813	18.924	24.035	11.638	15.382	18.418	9.259	14.168	8.096	16.596
8	A	27.981	26.818	23.984	29.904	34.610	22.264	46.552	28.639	37.089	25.401	19.076	31.878
9	A	24.841	17.982	20.845	24.109	19.047	29.637	40.492	16.050	28.238	27.639	25.308	20.179
10	A	88.711	54.412	62.937	62.470	62.271	26.709	51.548	66.067	28.704	75.591	64.069	45.487
11	A	13.386	22.377	13.519	9.257	15.251	12.720	8.458	8.258	9.457	8.458	17.049	8.591
12	A	23.243	20.579	9.457	18.914	14.052	11.521	14.585	16.317	19.047	21.045	32.634	15.251
13	A	10.456	6.726	8.658	6.793	15.318	8.325	8.391	7.525	10.989	11.854	11.388	8.924
14	A	42.424	24.175	17.982	35.431	29.304	15.138	13.986	18.914	23.367	23.709	30.169	28.638
15	A	1.065	1.065	1.198	1.598	1.531	1.598	1.665	1.332	999	1.665	666	666
Média		27.071	25.585	76.195	24.210	29.700	17.355	20.562	22.053	28.678	26.440	24.830	29.336
Desvio Padrão		32.139	37.623	215.918	24.712	41.086	14.613	18.349	23.347	46.807	33.732	24.024	47.636

A = Dias quentes

TABELA 2

Contagem do número de microfílaras de seis cães segundo horário de colheita e temperatura ambiente. São Paulo, 1988.

Número de microfílaras de <i>Dirofilaria immitis</i> no sangue periférico													
Animal nº	Tempo Colheita	2h	4h	6h	8h	10h	12h	14h	16h	18h	20h	22h	24h
3	B	101.706	100.997	91.484	101.351	106.715	60.770	110.662	144.564	75.596	95.026	101.908	69.828
4	B	3.744	1.315	6.426	5.060	3.592	2.226	2.125	2.074	1.214	2.732	1.518	1.922
5	B	1.720	1.771	1.315	1.821	1.973	1.467	1.416	1.872	354	1.016	1.315	1.568
6	B	2.378	3.440	2.681	2.175	8.956	1.669	1.366	2.277	2.074	2.428	2.428	2.226
7	B	8.555	13.156	9.917	7.843	8.096	6.021	9.006	8.804	13.156	13.004	5.161	5.414
8	B	31.827	37.646	49.486	31.878	17.204	24.186	17.001	56.064	73.117	23.377	34.711	29.246
Média		24.988	26.388	26.885	25.021	24.423	16.057	23.596	35.943	27.585	22.931	24.507	18.367
Desvio Padrão		35.838	35.659	33.241	35.653	37.121	21.514	39.336	52.251	33.352	33.179	36.568	24.992

B = Dias frios

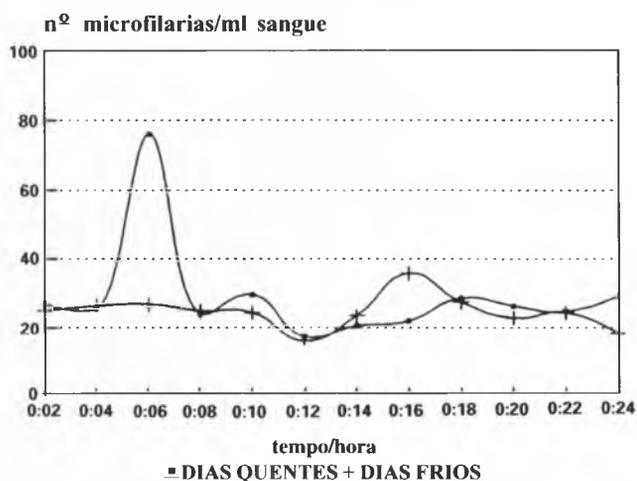


FIGURA 1

Periodicidade das microfírias do *Dirofilaria immitis* no sangue periférico de 15 cães. São Paulo, 1988.

mas em nenhuma ocasião as microfírias deixaram de ser detectadas no período de observação de 24 horas. Observação semelhante à nossa foi feita por MATOLA¹² (1991), que estudou a periodicidade das microfírias de *Dirofilaria immitis* durante cinco dias, realizando colheitas de hora em hora em um único animal.

SUMMARY

The periodicity of *Dirofilaria immitis* microfilariae was studied in 15 adult dogs, purebred or crossbred, males and females. The circulating microfilariae counting was performed according to ANCUS¹ (1981). The variation of the microfilaremia was observed during a period of 24 hours, being the blood samples collected with 2 hour intervals. Six of them were submitted to two material collections, one on a warm day, with mean temperature of 23°C, and the other one on a cool day, with mean temperature of 16°C. Analyzing the obtained results it is possible to state that the microfilariae of *Dirofilaria immitis* present an oscillation, however it is variable and there is not a fixed pattern. It is also true that once present the microfilaremia does not disappear in a subsequent collection, making it not difficult to diagnose this parasitosis.

UNITERMS: *Dirofilaria*; Dogs; *Dirofilaria immitis*; Microfilariae

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-ANGUS, B.W. Periodicity exhibited by microfilariae of *D. immitis* in Southeast Queensland. *Australian Veterinary Journal*, v.57, p.101-2, 1981.
- 2-CASTLEMAN, W.L.K.; WONG, M.M. Light and electron microscopic lesions associated with retained microfilariae in canine occult dirofilariosis. *Veterinary Pathology*, v.19, p.355-64, 1982.
- 3-DE MARTIN, B.W.; IWASAKI, M. *Noções de radiodiagnóstico veterinário*. São Paulo, 1976.
- 4-GLUBER, D.J. A comparative study on the distribution, incidence and periodicity of the canine filarial worms *Dirofilaria immitis* Leydi and *Dipetalonema reconditum* Grassi in Hawaii. *Journal of Medical Entomology*, v.3, p.159-67, 1966.
- 5-GRIEVE, R.B.; LAURIA, S. Periodicity of *Dirofilaria immitis* microfilariae in canine and murine hosts. *Acta Tropica*, v.40, p.121-7, 1983.
- 6-HAWKING, F. Periodicity of microfilariae. *Indian Journal of Malariology*, v.14, p.567-73, 1960.
- 7-HAWKING, F.; THURSTON, J.P. The periodicity of microfilariae. I. Distribution of microfilariae in the body. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.45, p.307-28, 1951.
- 8-HILL, J.D. Electrocardiographic diagnosis of right ventricular enlargement in dogs. *Journal of Electrocardiology*, v.4, p.347-57, 1971.
- 9-KNIGHT, D.H. Heartworm heart disease. *Advances in Veterinary Science*, v.21, p.107-47, 1971.

10-KUME, S. Experimental observations on seasonal periodicity of microfilariae. In: HEARTWORM SYMPOSIUM, 74, **Proceedings**, 1974. p.26-31.

11-MANSON, 1879 apud HAWKING, F.⁶, 1960. p. 567.

12-MATOLA, Y.G. Periodicity of *Dirofilaria immitis* microfilariae in a dog from Muheza district, Tanzania. **Journal of Helminthology**, v.65, p.76-8, 1991.

13-MELLO, E.B.F.; MAUGE, G.C. Nova técnica para diagnóstico e contagem de microfíliarias. In: CONGRESSO DA FEDERACIÓN LATINO AMERICANA DE PARASITÓLOGOS. 6., São Paulo, 1983. **Anais**. p. 115.

14-NEWTON, W.L.; WRIGHT, W.H. The occurrence of a dog filariid other than *Dirofilaria immitis* in the United States. **Journal of Parasitology**, v.42, p.246-58, 1956.

15-NEWTON, W.L.; WRIGHT, W.H. A reevaluation of the canine filariasis problem in the United States. **Veterinary Medicine**, v.52, p.75-8, 1957.

16-OTTO, G.F.; JACKSON, R.F. Heartworm disease. In: ETTINGER, S.J. **Textbook of veterinary internal medicine: diseases of dog and cat**. 2. ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1975. v.2, p.1014-38.

17-OTTO, G.F.; JACKSON, R.F.; BAWMAN, P.M.; PEA-

COCK, F.; RICHS, W.L.; MAITBY, J.H. Variability in the ratio between the numbers of microfilariae and adult heartworms. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.168, p.605-7, 1976.

18-RAWLINGS, C.A.; DAWE, D.L.; McCALL, J.W.; KEITH, J.C.; PRESTWOOD, A.K. Four types of occult *Dirofilaria immitis* infection in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.180, p.123-61, 1982.

19-SASA, M.; TANAKA, H. Studies on the methods for statistical analysis of the microfilarial periodicity survey data. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.4, p.518-36, 1972.

20-TILLEY, L.P. **Essentials of canine and feline electrocardiography**. Saint Louis, C.V. Mosby, 1979.

21-WONG, M.M.; SUTER, P.F.; THODE, E.A.; GUEST, M.F. Dirofilariasis without circulating microfilariae: a problem in diagnosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.163, p.133-9, 1973.

Recebido para publicação em 17/07/93
Aprovado para publicação em 07/11/94