

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO

DIFERENCIAÇÃO HISTOQUÍMICA EM MICROFILÁRIAS DE

Dipetalonema reconditum E *Dirofilaria immitis*

EM CÃES (*Canis familiaris*)

JULIANA SOLOZABAL MARTINS DA ROCHA

2006



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**DIFERENCIAÇÃO HISTOQUÍMICA EM MICROFILÁRIAS DE
Dipetalonema reconditum E *Dirofilaria immitis* EM CÃES
(*Canis familiaris*)**

JULIANA SOLOZABAL MARTINS DA ROCHA

Sob a Orientação do Professor
Gilberto Garcia Botelho

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de *Mestre em Ciências* em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Clínica e Cirurgia Veterinária.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2006

636.708969652 R672d T	<p>Rocha, Juliana Solozabal Martins da 1976- Diferenciação histoquímica em microfilárias de Dipetalonema reconditum e Dirofilaria immitis em cães (Canis familiaris) / Juliana Solozabal Martins da Rocha – 2006. 42 f.: il</p> <p>Orientador: Gilberto Gracia Botelho. Dissertação (mestrado) – Universidade federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária. Bibliografia: f. 31-36.</p> <p>1. Cão – Parasito – Teses. 2. Cão – Doenças – Diagnóstico – Teses. 4. Dipetalonema – Teses. 5. Patologia Veterinária – Teses. 6. Histoquímica – Teses. I Botelho, Gilberto Garcia, 1946 II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Veterinária. III. Título</p>
-----------------------------	---

Bibliotecário: _____

Data: ___ / ___ / _____

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JULIANA SOLOZABAL MARTINS DA ROCHA

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Clínica e Cirurgia Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de *Mestre em Ciências* em Medicina Veterinária.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 09/02/2006

Prof. Gilberto Garcia Botelho. MV, Ph.D. UFRRJ
Orientador

Prof. Marcílio Dias do Nascimento. MV, MSc. UFF

Profª. Rita de Cássia Botteon. MV, Ph.D. UFRRJ

Haverá um dia em que o homem
conhecerá o íntimo dos animais,
neste dia um crime contra um animal
será considerado um crime contra a
humanidade.

Leonardo Da Vinci

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo amor e vitórias. Sem Ele nada somos.

Aos meus avós, Luiz Solozabal (*in memoriam*) e Luiza F. Solozabal, por toda a vivência, amor, educação e ensinamentos; a toda minha família, o meu refúgio, que possamos compartilhar amor, alegria, saúde e vida, pela eternidade.

Ao amor da minha vida, Teilor Cerqueira Gomes, por todo o carinho, paciência e incentivo.

Ao meu orientador, Prof Gilberto Garcia Botelho, por acreditar em mim e aceitar orientar-me sem me conhecer previamente. Pela confiança, carinho e amizade que ao longo dos dois anos de convivência se consolidaram;

À pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela verdade e sinceridade de seu concurso de mestrado, o qual possibilitou meu ingresso; e à coordenadora Rita de Cássia Botteon pela paciência, amizade e incentivos.

Ao Prof. Miguel Peribanez pela ajuda e auxílio, inestimáveis, na realização deste trabalho.

Aos amigos de turma da graduação do Centro Universitário Plínio Leite (UNIPLI), pós-graduação da Fundação de Ensino Octávio Bastos (FEOB) e mestrado da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFFRJ), pela intensa troca de conhecimentos.

Aos meus amigos, Érica Mateus Toledo Accetta e José Luis Accetta, pelos ensinamentos, incentivos e confiança.

Aos amigos do Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) do UNIPLI, Janh Carlo de Amorin Ferreira, Luciane Vargas, Priscilla Fonseca e Robson André Souza de Azevedo, pelo companheirismo. Aos amigos da Pet Chic Assistência Veterinária pela oportunidade e confiança.

Ao corpo docente do UNIPLI, pelos incentivos e auxílios na busca e vitória de mais este obstáculo.

Às Professoras Norma Volmer Labarthe e Rosângela Rodrigues e Silva pela disposição a esclarecimentos.

Aos professores, funcionários (Regina e Otacílho) e amigos do curso de mestrado, pelos ensinamentos e amizade.

SUMÁRIO

1. Introdução	01
2. Revisão de Literatura	03
2.1. Prevalência Mundial da Filariose Canina	04
2.2. Métodos Diagnósticos	08
2.2.1. Diferenciação histoquímica	12
2.3. Terapia Microfilaricida	16
3. Material e Métodos	17
3.1. Coleta de Amostras	17
3.2. Processamento das Amostras	17
3.3. Marcação Histoquímica	18
3.3.1. Material utilizado	18
3.3.2. Preparo da solução	20
4. Resultados e Discussão	25
5. Conclusões	30
6. Referências Bibliográficas	31

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Espécies de filarídeos descritos mundialmente em cães e gatos, principais hospedeiros, vetores, localizações, distribuição geográfica, localização e tamanho das microfilárias de diferentes espécies de <i>Dirofilaria</i> e <i>Dipetalonema</i> .	05
Quadro 2: Características morfológicas para a classificação das microfilárias não encapsuladas segundo Scherey & Trautvetter (1998).	09
Quadro 3: Comparação entre <i>Dirofilaria immitis</i> e <i>Dipetalonema reconditum</i> .	10

INDICE DE TABELAS

Tabela 1. Demonstração da periodicidade de microfilaremia por Korkejian & Edeson (1978) (em duas contagens.)	08
Tabela 2. Resultados da comparação de quatro testes para detecção e diferenciação de filariose canina	12

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Padrões de marcação histoquímica da atividade da fosfatase ácida nas microfilárias sem cápsula (representação gráfica).	15
Figura 2: Padrões de marcação histoquímica da atividade da fosfatase ácida nas microfilárias sem cápsula (fotomicrografia).	15
Figura 3. Kit Leucognost-SP.	19
Figura 4. Reagentes utilizados.	19
Figura 5. 60ml de água destilada.	20
Figura 6. Adicionando 2ml do reagente I.	21
Figura 7. Adicionando 0,8g do reagente II.	21
Figura 8. Adicionado 4 gotas do reagente III.	22
Figura 9. Adicionando 5 gotas do reagente IV.	22
Figura 10. Estado após adicionar o conteúdo do tubo à solução.	23
Figura 11. Filtração da solução final.	24
Figura 12. Potes de citologia contendo as lâminas na solução.	24
Figura 13. Microfilária demonstrada na Técnica Gota Espessa.	25
Figura 14. Microfilária demonstrada no teste de Knott modificado corada pelo NAM (novo azul de metileno).	26
FIGURA 15. <i>D. immitis</i> marcada histoquimicamente.	27
FIGURA 16. <i>D. immitis</i> marcadas histoquimicamente.	28
Figura 17. <i>D. reconditum</i> marcado histoquimicamente	28
Figura 18. Infecção mista por <i>D. immitis</i> e <i>D. reconditum</i> e marcação histoquímica.	29

RESUMO

ROCHA, Juliana Solozabal Martins da. **Diferenciação histoquímica em microfilárias de *Dipetalonema reconditum* e *Dirofilaria immitis* em cães (*Canis familiaris*)** – Itaboraí, RJ. Seropédica: UFRRJ, 2006. 51p. (Dissertação, Mestrado em Medicina Veterinária, Clínica e Cirurgia veterinária)

As microfilárias quando encontradas devem ser identificadas corretamente, para realização de um diagnóstico preciso, já que o *Dipetalonema* é apatogênico e a infecção não requer tratamento, enquanto a Dirofilariose, conhecida como Doença do Verme do Coração, pode levar o cão à morte. Este trabalho teve como objetivo contribuir ao diagnóstico pela diferenciação histoquímica em doze amostras sanguíneas de cães microfilarêmicos e auxiliar no reconhecimento das espécies identificadas por essa marcação, baseada na atividade da fosfatase ácida individual, confirmando a utilização de um kit comercial para este procedimento. Foram identificadas histoquimicamente, *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum*, possibilitando esta técnica na taxonomia dessas espécies.

Palavras-Chave - *Dirofilaria immitis*, *Dipetalonema reconditum*, Microfilária, diferenciação, marcação histoquímica.

ABSTRACT

ROCHA, Juliana Solozabal Martins da. Histochemical **Differentiation in microfilariae of *Dipetalonema reconditum* and *Dirofilaria immitis* in dogs (*Canis familiaris*)**. Itaboraí, RJ. Seropédica: UFRRJ, 2006. 51p. (Dissertation, Master Science in Veterinary Medicine, Clinic and Surgery).

The microfilariae when found should be identified correctly, for obtaining a correct diagnosis, since *Dipetalonema* is apathogenic and the infection doesn't request treatment, while Dirofilariosis, known as Heartworm Disease, it can take the dog to the death. This work had as objective to contribute to the diagnosis using histochemical differentiation in twelve sanguine samples of microfilaremic dogs and aid in the recognition of the identified species with that staining, based on the individual acid fosfatase activity and to confirm the use of a commercial kit for this procedure. They were identified *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum*, making possible this technique in the taxonomy of those species.

Key-Words: *Dirofilaria immitis*, *Dipetalonema reconditum*, Microfilariae, diferenciation, histochemical staining.

1. INTRODUÇÃO

Os cães, como outros animais domésticos, podem ser infectados por inúmeros parasitas que podem causar doenças debilitantes. Estes parasitas podem instalar-se em vários órgãos, porém, os mais pesquisados são os gastrointestinais e o verme do coração (Dirofilariose). Dirofilariose é uma doença debilitante, amplamente distribuída pelo mundo e potencialmente fatal para cães.

A maioria dos parasitas do sangue pode estar presente na corrente sangüínea de seus hospedeiros, como parte de seu ciclo vital.

Destes parasitas, larvas de nematóides que penetram na corrente sanguínea podem ser reconhecidas facilmente, graças ao seu grande tamanho, sendo sua identificação de grande importância clínica.

A filariose canina tem como agentes etiológicos, representantes da família Onchocercidae, dos gêneros: *Dirofilaria sp.*, *Dipetalonema sp.*, helmintos da classe Nematoda, com ampla distribuição geográfica, e *Brugia sp.* encontrada em cães da África e Índia.

A Dipetalonemose é uma doença pouco evidenciada pelos médicos veterinários brasileiros, porém, de grande importância no diagnóstico diferencial com a dirofilariose. Existem relatos de sua prevalência, mundialmente, ocorrendo nas mesmas áreas da Dirofilariose. Esta muito melhor abordada na literatura devido ao seu caráter patogênico e epidemiológico.

No Brasil, foram assinaladas as espécies *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens*, *Dipetalonema reconditum* e *Dipetalonema grassi*, como causadoras da filariose canina.

A *Dirofilaria immitis*, transmitida por mosquitos, localiza-se principalmente no ventrículo direito e artéria pulmonar.

Várias espécies de *Dipetalonema* são transmitidas por carrapatos, piolhos e pulgas. Neste gênero, as filárias estão preferencialmente alojadas nos tecidos subcutâneos, tecido peri-renal e cavidade peritoneal. Suas microfilárias (mf) podem ser encontradas na corrente sanguínea do cão, sendo, portanto, diagnóstico diferencial para a dirofilariose, a qual é extremamente patogênica para o animal.

O diagnóstico da infecção por filarídeos em cães é extremamente importante para clínica médica. As mf quando detectadas no sangue, devem ser identificadas para realização do prognóstico, uma vez que *Dipetalonema sp.* não é patogênica.

A presença de microfilaremia no cão pode ser detectada pela técnica de Gota Espessa (Exame Direto) e Teste do Tubo Capilar, porém, para maior precisão, o tratamento do sangue pelo método de Knott, é necessário para matar as microfilárias e, assim, facilitar a identificação. Embora existam muitos relatos acerca da diferença dos dois gêneros, o diagnóstico usual ainda é por meio da técnica de Knott, que determina apenas a infecção do animal por filarídeos. Os gêneros podem ser identificados por características morfológicas, mas necessita conhecimento individualizado e habilidade específica na técnica laboratorial, o que demanda um procedimento mais demorado.

Normalmente a diferenciação se baseia em características morfológicas, na forma da cauda (em “gancho” ou reta), presença de gancho cefálico no gênero *Dipetalonema* e na motilidade.

Considerando a frequência com que microfilárias são encontradas em amostras sanguíneas de cães e a importância da diferenciação entre as microfilárias, desenvolveu-se o presente estudo que teve por objetivo a Marcação Histoquímica para diferenciação

e identificação das espécies de microfilárias de *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum* presentes na corrente sanguínea de cães.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O sangue dos animais domésticos pode ser infectado por vários parasitas, sejam estes patogênicos ou não. A maioria destes parasitas é carregada por artrópodes e está presente na corrente sanguínea de seus hospedeiros mamíferos, como parte de seu ciclo vital. A transmissão dos organismos circulantes ocorre durante a alimentação dos artrópodes hematófagos (HAHN, 1999).

Parasitas sanguíneos incluem larvas de nematóides que penetram na corrente sanguínea dos hospedeiros alcançando, determinados órgãos e tecidos, aonde irão se desenvolver e atingir a maturidade. Os parasitas geralmente permanecem na corrente sanguínea por alguns minutos ou horas, e assim raramente são encontrados no sangue periférico. Algumas larvas de nematóides (microfilárias), no entanto, são freqüentemente encontradas no sangue periférico. O estágio microfilaríode destas espécies parasitas permanece na circulação até serem ingeridas, por sucção, pelos hospedeiros intermediários (HAHN, 1999).

Dos organismos extracelulares que podem aparecer no sangue, as microfilárias (mf) são reconhecidas facilmente, graças ao seu grande tamanho (REAGAN *et al.*, 1999).

Espécies de filarídeos caninos têm sido descritas em várias partes do mundo, no entanto, duas têm sido reportadas com maior freqüência: a *Dirofilaria immitis* e o *Dipetalonema reconditum*, que apresentam microfilárias com aspectos morfológicos semelhantes, porém, com diferenças que os individualizam (HAHN, 1999).

Várias espécies de *Dipetalonema* são transmitidas principalmente por carrapatos e pulgas. Neste gênero as filárias estão preferencialmente alojadas nos tecidos subcutâneos.

O *Dipetalonema reconditum* encontra-se freqüentemente nas mesmas áreas endêmicas da *Dirofilaria immitis*. A diferenciação dessas espécies é importante, uma vez que a infecção por *Dirofilaria immitis* em cães pode resultar em doença e morte. O *Dipetalonema reconditum* causa no hospedeiro, somente uma infecção transitória, sem conseqüências patológicas, exceto por causar ulcerações cutâneas e abscessos subcutâneos ocasionais (URQUHART *et al.*, 1996).

Dipetalonema reconditum aparentemente é apatogênico e não há sintomas característicos (LEVINE, 1980; FORTES, 1987). Embora lesões focais no sistema nervoso central tenham sido descritas (FREITAS, 1977), E, ainda, um caso de transmissão ao homem tenha sido reportado recentemente (HUYNH *et al.*, 2003) elucidando a presença de uma larva de *Dipetalonema reconditum* no fundo de olho direito de um homem.

Por outro lado, a infecção causada por *Dirofilaria immitis* é bastante severa, podendo ser transmitida para o homem, tendo como conseqüência a dirofilariose pulmonar. A transmissão, neste caso, ocorre através de um ciclo errático (URQUHART *et al.*, 1996).

Uma vez detectadas microfilárias, é imperativo diferenciá-las em nível de espécie, já que, somente, *D. immitis* é patogênica. *Dipetalonema reconditum*, *Dipetalonema dracunculoides* e *Dipetalonema grassi* não são considerados patogênicos. E *Dirofilaria repens* é levemente patogênica (SCHREY & TRAUTVETTER, 1998). *Dipetalonema grassi* é extremamente raro e há poucos dados biológicos confiáveis.

Ulcerações cutâneas difusas em um cão de 6 anos foi atribuída ao *Dipetalonema dracunculoides* (GIANNETTO *et al.*, 2003).

1.1. Prevalência Mundial da Filariose Canina

Microfilárias foram frequentemente encontradas no sangue de cães examinados com este propósito. Duas espécies são mais frequentes nos Estados Unidos da América: *D. immitis* e *D. reconditum*, que quando encontradas são diferenciadas visando evitar o erro no diagnóstico. Sua identificação é realizada pela técnica de concentração Knott modificado que é definitiva (GLENN, 1970).

Em Atlanta, Geórgia, pesquisaram-se dois grupos de cães: o primeiro com 273 amostras de sangue pela técnica de Knott modificada. *Dipetalonema reconditum* estava presente em 14,6% dos cães, enquanto 5,4% dos animais estavam infectados por *Dirofilaria immitis*. A dupla infecção estava presente em 0,7% dos casos. No segundo grupo com 40 cães, *Dirofilaria immitis* estava presente em 12,5%, enquanto *Dipetalonema reconditum* em 37,5% e dupla infecção em 7,5% dos animais (THRASHER *et al.*, 1968).

No Texas, Joiner & Jardine (1970) examinaram 700 cães em 2 anos de estudo, em busca de microfilaremia. Trinta e cinco (5%) albergavam microfilárias de *Dirofilaria immitis* e 97 (14%) de *Dipetalonema sp.* Apenas cinco cães albergavam microfilárias de ambos os parasitos.

Ao norte da Califórnia, McGreevy *et al.* (1970) contribuíram com estudos em 515 cães, determinando uma ocorrência de 5% para *Dipetalonema reconditum* e afirmaram que apenas *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum* são filarídeos conhecidos nos Estados Unidos. Após 11 anos, Walters *et al.* (1981) fizeram a mesma análise em 97 cães, determinando 5,1% de infecção por microfilárias de *Dipetalonema reconditum* e 2,1% por *Dirofilaria immitis*. Sem dupla infecção nos animais estudados.

A prevalência de filariose no Nordeste do Kansas foi analisada em 288 amostras pesquisadas no verão de 1972 revelaram 16,7% de infecção por *Dirofilaria immitis* e 7,6% por *Dipetalonema reconditum*, sem dupla infecção detectada (GRAHAM, 1974).

Infecção por *Dipetalonema reconditum* e *Dirofilaria immitis* em cães foram observadas ainda, no estado de Oklahoma, onde 15% dos cães pesquisados tinham microfilárias de *Dipetalonema reconditum*, mas não de *Dirofilaria immitis* (KOCAN & LAUBACH, 1976).

Pratt *et al.* (1981) estudaram a prevalência de filariose canina em Missouri em 11.823 cães. Desta amostra total, 447 (3,8%) tinham microfilárias de *Dirofilaria immitis*, 14 (0,1%) de *Dipetalonema reconditum* e oito, menos que 0,1%, infecção por ambas microfilárias.

Uma prevalência de 19% para Dirofilariose e 6% para Dipetalonemose em 100 cães estudados nas cidades da Virginia e Carolina do Norte foi observada por Falls & Platt, em 1982.

Pappas & Lunzman (1985) examinaram uma população de cães domésticos, coiotes (*Canis latrans*) e raposas vermelhas (*Vulpe fulva*) provenientes do Sudeste de Nebraska. Microfilárias foram detectadas em 21,4% (22 de 103) dos cães domésticos. Destes, nove (40,91%) eram positivos para *Dipetalonema reconditum*.

Seis mil novecentos e setenta e sete cães foram examinados no experimento de Patton & Faulkner (1992) na Universidade do Tennessee, no Colégio de Medicina Veterinária, de janeiro de 1980 a dezembro de 1989 para analisar e determinar a prevalência de filariose canina. Usando o teste de Knott em 805 (11,54%) cães positivos para microfilária, identificou-se *Dirofilaria immitis* em 430 (6,16%) e *Dipetalonema reconditum* em 375 (5,37%) do total de cães examinados.

A prevalência da filariose canina foi analisada em 21.583 casos entre 1981 a 1991. *Dipetalonema sp.* teve uma tendência descendente de 4% em 1981 para menos de 1% em 1990. Prevalência de *Dirofilaria sp.* diminuiu de 12% em 1982 para 6% em 1985, mas até 1990, era de 11% (JORDAN *et al.*, 1993).

Não houve registros de microfilariose no Canadá (LEVINE, 1980).

Atualmente, nove espécies de filarídeos, são descritos em cães de diversas partes do mundo (Quadro 1) (ALMEIDA & VICENTE, 1982). Os dados relativos à distribuição geográfica, espécies acometidas, hospedeiros, vetores, localização da forma adulta e das microfilárias, bem como algumas características morfológicas foram resumidos e estão representados no Quadro 1.

Quadro 1: Espécies de filarídeos descritos mundialmente em cães e gatos, principais hospedeiros principais, vetores, localizações, distribuição geográfica, localização e tamanho das microfilárias de diferentes espécies de *Dirofilaria* e *Dipetalonema*.

ESPÉCIE	HOSPEDEIROS PRINCIPAIS	VETOR	LOCALIZAÇÃO	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	LOCALIZAÇÃO MICROFILÁRIAS	TAMANHO*
<i>Dirofilaria immitis</i>	Cão, gato	Mosquito	Vent. Dir. e artéria Pulmonar	Cosmopolita	sangue	286-340 (314)
<i>D. repens</i>	Cão, gato	Mosquito	Tecido subcutâneo	Rússia, Europa, Índia, Brasil e Argentina	Sangue	290
<i>Dipetalonema reconditum</i>	Cão	Pulga, piolho	Tecido subcutâneo	América, Itália, África e Austrália	Sangue	258-292 (270)
<i>D. dracunculoides</i>	Cão	“Piolho Voador”	Membranas peritoneais	África e Portugal	Sangue	195-230
<i>D. grassi</i>	Cão	Carrapato	Tecido subcutâneo	Itália, Kênia e Brasil	Pele, raramente no sangue	570

*em micrômetros - Fonte: ALMEIDA & VICENTE, 1982.

No Brasil foi assinalada a ocorrência de quatro espécies: *Dirofilaria immitis* (SILVA- ARAÚJO, 1878 *apud* ALMEIDA & VICENTE, 1982), *Dirofilaria repens* (LENT & FREITAS, 1937 *apud* ALMEIDA & VICENTE, 1982), *Dipetalonema reconditum* (COSTA & FREITAS, 1962 *apud* ALMEIDA & VICENTE, 1982; LANGENER *et al.*, (1962) *apud* ALMEIDA & VICENTE, 1982) e *Dipetalonema grassi* (COSTA & FREITAS, 1962 *apud* ALMEIDA & VICENTE, 1982).

Almeida & Vicente (1982) contribuíram para o reconhecimento das espécies de filarídeos na cidade do Rio de Janeiro. Amostras de sangue de 187 cães de várias raças e seus mestiços, sendo 72 capturados nas ruas e 115 de residências. Todos os animais tiveram suas amostras de sangue examinadas para microfilárias, pelo método de Knott modificado. Nestes animais foram encontradas apenas microfilárias de *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum*. Todos os cães de rua foram necropsiados, à procura do helminto adulto no tecido subcutâneo, segundo a técnica descrita por Dunn (1931) *apud* Almeida & Vicente (1982), sendo anotados os dados morfométricos observados. Helmintos adultos foram coletados na frequência de 8,33% de *Dirofilaria immitis*, 43,06% de *Dipetalonema reconditum* e 19,49% de *Dipetalonema grassi*.

Labarthe *et al* (1998) detectaram uma prevalência variando de 15 a 37% de Dirofilariose nos cães pesquisados da cidade de Niterói-RJ. Em 2002, Labarthe *et al.* realizaram um levantamento bibliográfico e determinaram uma prevalência nacional de 7,9% para Dirofilariose canina (GUERRERO *et al.* 1989 *apud* Labarthe *et al.* 2002).

Porém, quando abordaram a sua distribuição regional, verificaram maiores índices nas localidades costeiras.

Ainda no Rio de Janeiro, foram estudados 150 cães, onde 22% foram considerados infectados por *Dipetalonema reconditum* (LANGENEGGER, 1962 *apud* BRITO, 2000). Já Souza (2003), com intuito de avaliar a atual situação da dirofilariose em cães de residência, examinou 426 cães provenientes dos municípios de Itaguaí, Mangaratiba, Rio de Janeiro, Nova Iguaçu, Volta Redonda, Pirai, Barra do Pirai e Paracambi, no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Foram realizados exames diretos e do sedimento sanguíneo (Knott modificado); imunodiagnóstico em plasma (CITER/AgriTech Systems e DiroChek/Synbiotics Corp.); hemogramas; anamnese e exame clínico geral. Microfilárias de *Dirofilaria immitis* e de *Dipetalonema reconditum* foram identificadas pelo método de Knott modificado em 51 (11,97%) e 19 (4,46%) cães, respectivamente. Resultados positivos nos testes imunológicos foram observados em 108 (25,35%) e dirofilariose oculta foi observada em 57 animais (52,78%). As alterações hematológicas foram discretas, sendo eosinofilia (31,82%) a mais prevalente. Um total de 68 cães (62,96%) infectados por *Dirofilaria immitis* foram considerados assintomáticos. Labarthe *et al* (2002) constataram na região alta prevalência tanto nas regiões costeiras (21,3%) (GUERREIRO *et al.* 1992) quanto nas regiões serranas de Petrópolis e Teresópolis (25,6%). A flutuação rápida da prevalência não foi compreendida mas determina a necessidade de uma vigilância epidemiológica e prevenção constantes.

No Espírito Santo, Costa (1980) *apud* Brito (2000) determinou uma prevalência de 2,9% para *Dipetalonema reconditum*.

No Estado do Paraná, pesquisas realizadas por Reifur *et al* (2001), em 256 cães, forneceram importantes subsídios para comprovação da existência de no mínimo dois gêneros de filarídeos no litoral paranaense: *Dipetalonema reconditum* e *Dirofilaria immitis*.

Brito (2000) estimou a prevalência da Dipetalonemose em cães domiciliados na área urbana da cidade de Maceió-AL e em duas áreas litorâneas localizadas ao Norte e ao sul do Estado. Foram examinadas 1519 amostras de sangue, onde a prevalência variou segundo a área estudada. A dipetalonemose foi detectada apenas nos distritos de Maceió, com 1,3 % de cães infectados. *Dirofilaria immitis* foi detectada na mesma área, com 1,3% de cães, e no litoral sul estimou-se 12,7%. No litoral norte, nenhum cão microfilarêmico foi detectado.

Alves *et al.* (1999) fizeram notar que a prevalência em Recife-PE, para *Dipetalonema reconditum* foi 6,9% (42 em 611 animais estudados).

Em Cuba, a filariose canina só reconhecia uma espécie, a *Dirofilaria immitis*, informada por Finlay, 1881 *apud* Ripoll *et al.* (1986). Até que Bouza-Suarez & Del-Valle (1984), descreveram a primeira informação de *Dipetalonema reconditum* no país. Ripoll *et al.* (1986) realizaram uma pesquisa em 78 cães, onde 29 (37,2%) foram positivos para Dirofilariose e três (3,8%) para *Dipetalonema reconditum*. Encontrou-se um caso (1,28%) de infecção mista.

Dipetalonema dracunculoides teve seu primeiro relato na Espanha por Ortega-Mora & Rojo-Vásquez (1988) *Apud* Olmeda-García *et al.* (1993) e é considerado agente da filariose canina mais difundida no país. Uma pesquisa foi realizada para determinar a prevalência de filarídeos na população canina. Amostras de sangue de 293 cães foram testadas para presença de microfilárias, usando a técnica de Knott modificada. Para correto diagnóstico das espécies identificadas, foi realizada marcação histoquímica para demonstração da distribuição da atividade da fosfatase ácida em cada espécie. A pesquisa reconheceu uma prevalência de 12,3% para *Dirofilaria immitis*, 0,3% para *Dirofilaria repens* e 2,1% para *Dipetalonema reconditum*. Provavelmente, *Dirofilaria*

repens, *Dipetalonema reconditum* e *Dipetalonema dracunculoides* também estão presentes em cães na Espanha, mas nenhuma pesquisa foi empreendida até recentemente.

A distribuição de *Dipetalonema reconditum*, a presença de *Dirofilaria repens* em cães na Itália e *Dipetalonema dracunculoides* em cães de Portugal mereciam averiguação até 1989 (PEREZ-SANCHEZ *et al.*).

Na Itália, a prevalência de microfilaremia em cães e os fatores de risco foram pesquisados em 51 municípios contíguos, no Sul da Itália, para somar dados a uma informação epidemiológica limitada a filarídeos nesta zona. Entre maio de 1999 e junho de 2000, amostras de sangue foram coletadas de 351 cães assintomáticos e examinadas pelas técnicas de knott modificada e marcação histoquímica, para detectar e identificar microfilárias que foram encontradas em 63 de 351 cães pesquisados, constituindo um total de 17,9% de prevalência de filariose canina. Em particular, 56 cães (15,9%) mostraram somente microfilárias de *Dipetalonema reconditum*; três cães (0,8%) somente microfilárias de *Dirofilaria repens*; dois cães (0,6%) com microfilárias de *Dirofilaria immitis* e *Dirofilaria repens*; dois cães (0,6%) com microfilárias de *Dipetalonema reconditum* e *Dirofilaria repens*. As espécies comuns de filárias conhecidas parasitando cães na Itália são *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens*, *Dipetalonema reconditum* e *Dipetalonema grassii* (CRINGOLI *et al.*, 2001). Recentemente, um caso de infecção em cão por *Dipetalonema dracunculoides* foi reportado no país, pela primeira vez (GIANNETTO *et al.*, 2003).

Na Austrália, um total de 339 cães de todas as idades, foram examinados e a incidência global de *Dirofilaria immitis* foi 3,2%, enquanto a incidência de microfilaremia de *Dipetalonema reconditum* foi 3,8% (HOLMES & KELLY, 1973). Watson *et al.* (1973) também realizaram uma pesquisa em Sydney. Dos 40 cães examinados, quatro (10%) tinham microfilaremia por *Dipetalonema reconditum* e três (7,5%) microfilaremia por *Dirofilaria immitis*. E ainda, Martin & Collins (1985), estabeleceram uma prevalência de *Dipetalonema reconditum* de 3,6% e de *Dirofilaria immitis* de 10,9%, em cães da raça Greyhound.

Pelo menos oito espécies de filarídeos dos gêneros *Dirofilaria*, *Brugia* e *Dipetalonema* acontecem em cães ao longo do mundo, mas só *Dirofilaria immitis* foi registrada no Iran (NIAK & KHATIBI, 1971).

No oeste do Paquistão, Durrani (1965) *et al.* *apud* Wolfe *et al.* (1971) fizeram o primeiro relato de filariose por *Dirofilaria immitis* e descreveram dados de uma pesquisa realizada em 255 cães, onde a presença de *Dipetalonema dracunculoides* foi constatada.

No Líbano foi realizado um estudo da ocorrência natural da filariose canina, onde se buscou elucidar as diferenças morfológicas entre as microfilárias. *Dipetalonema reconditum* foi citado numa prevalência de 3% em 194 cães estudados (KORKEJIAN & EDESON, 1978).

No Marrocos, Pandey *et al.* (1987) realizaram uma pesquisa onde 18 parasitos diversificados foram identificados. *Dipetalonema dracunculoides* foi observado em 10,5%, e, *Dirofilaria immitis* em 12,3% dos animais.

O Kênia teve a ocorrência de *Dipetalonema dracunculoides* demonstrada por Lightner & Reardon (1983), onde em vários distritos a prevalência para este agente variou de 87 a 100% em cães machos e 53 a 100% em fêmeas.

Os resultados clínicos e de estudos de periodicidade em um cão com 4 anos e meio de idade, com alta microfilaremia devido a *Dipetalonema reconditum* foram relatados na Nigéria. Os resultados clínicos principais foram dermatopatia e emaciação. A microfilaremia exibiu uma variação cíclica noturna. Relatos de filariose canina na Nigéria são muito escassos (VEEN & BLOTKANP, 1975 *apud* BOBADE *et al.*, 1981).

Bobade *et al.* (1981) informaram a presença de *Dirofilaria repens* e *Dipetalonema dracunculoides* em cães nigerianos, havendo apenas um relato prévio da presença de microfilaria de *Dipetalonema reconditum* em sangue de cão nigeriano.

No Sri Lanka, Jayewardene, 1962 *apud* Levine (1980) descreveu a identificação do *Dipetalonema sp.* a partir de fragmentos de extremidades posteriores de dois vermes machos encontrados (aparentemente nos linfonodos) em um cão.

2.2. Métodos Diagnósticos

A demonstração da presença de microfilaria na circulação sanguíneas tem sido considerada o método mais satisfatório para confirmar a presença da filariose canina (WATSON, 1973 *apud* BRITO, 2000). Contudo, devido a diferenças de patogenicidade entre as espécies de microfíliarias, tão logo sejam detectadas, em exames laboratoriais, é necessária a diferenciação das espécies (JONES *et al.*, 2000), uma vez que a infecção por *Dirofilaria immitis* em cães pode resultar em doença e morte e a infecção por *Dipetalonema reconditum* é transitória e sem conseqüências patológicas (URQUHART *et al.* 1996; KNIGHT, 1987 *apud* BRITO, 2000).

Lindsey (1962) *apud* Brito (2000) e Hahn (1999) consideram que *Dipetalonema sp.* deve ser distinguido de *Dirofilaria sp.* prontamente.

Há uma tendência em achar uma alta microfíliarémia em cães ao final da tarde (CRINGOLI *et al.*, 2001). Em 1978, Korkejian & Edeson mostraram a concentração de microfíliarias de *Dipetalonema reconditum* em 20mm³ de sangue periférico, em 24 horas de pesquisa, no Líbano, demonstrada a seguir, na tabela 1, onde a porcentagem máxima de microfíliarémia encontrada se deu no período noturno.

Tabela 1. Demonstração da periodicidade de microfíliarémia por Korkejian & Edeson (1978) (em duas contagens).

HORA	NÚMERO DE MICROFILÁRIAS	PORCENTAGEM MÁXIMA	NÚMERO DE MICROFILÁRIAS	PORCENTAGEM MÁXIMA
09:30	6	17	5	31
11:30	9	25	9	56
13:30	17	47	5	31
15:30	10	28	6	38
17:30	16	44	9	56
19:30	5	14	12	68
21:30	17	47	16	100
23:30	11	31	13	69
01:30	11	31	5	31
03:30	12	33	6	38
05:30	36	100	13	69
07:30	17	47	5	31

Fonte: Korkejian & Edeson (1978).

Contraditoriamente, uma periodicidade para microfíliarias de *Dipetalonema dracunculoides* maior no período matutino foi descrita por Wolfe *et al.* (1971). Neste estudo as maiores concentrações foram registradas entre 8 e 12 horas.

Farnell & Faulker (1978) demonstraram periodicidade variável em um cão estudado.

A microfíliarémia não pôde ser considerada precisa para indicar a presença ou ausência da infecção patente ou o número de adultos fêmeas presentes (JACKSON, 1969 *apud* KELLY, 1973).

As mfs circulam no sangue, normalmente em baixas densidades. Entretanto, as microfíliarémias substanciais são ocasionalmente observadas em dipetalonemose, não sendo seguro afirmar que, por causa de muitas mf estarem presentes, deve-se

necessariamente seguir este padrão com os vermes adultos (FARNELL & FAULKER, 1978; LINDEMANN & McCALL, 1984).

Herd (1978) detectou uma alta densidade de mf de *Dipetalonema reconditum*: 932 mf/ml e 509 mf/ml de sangue em dois cães, respectivamente. Este fato foi atribuído a um estado de imunossupressão. Já Brito (2000) demonstrou que nenhum animal infectado por *Dipetalonema reconditum* apresentou microfilaremia maior que 100 mf/ml de sangue.

Um aspecto ainda não esclarecido e de fundamental importância para o diagnóstico da dirofilariose é a distribuição das mfs na circulação periférica, sendo a diferença de densidade de mfs no sangue capilar e venoso ainda um assunto controverso. Segundo alguns autores, parece existir diferença de concentração de mfs em pequenos capilares de extremidades e em amostras de sangue venoso, obtidas de vasos de maior calibre. Parece que as mfs não estão uniformemente distribuídas no sistema sanguíneo, sendo as concentrações mais elevadas no sangue capilar periférico que no sangue venoso. Este fato poderia facilitar a transmissão do parasito para vetores no momento do repasto sanguíneo (BRITO, 2000).

As dimensões dos parasitas sanguíneos podem ser determinadas por intermédio de uma ocular micrométrica. Se a ocular não estiver disponível, o tamanho do parasita pode ser determinado num esfregaço sanguíneo, de modo aproximado, pela comparação com as dimensões dos eritrócitos, que no cão apresenta um diâmetro aproximado de 7,0 µm de diâmetro (HANH, 1999). Algumas características morfológicas, como longitude, forma e dimensão podem distinguir as espécies de mfs detectadas (REAGAN *et al.*, 1999). Boreham & Atwell (1985) afirmam que a diferenciação pode ser baseada apenas nas diferenças morfológicas das espécies.

As mfs de *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum* são relativamente bem conhecidas, o que não ocorre com as de *Dipetalonema grassi*, que por não serem encontradas no sangue, geralmente não chamam a atenção do pesquisador (ALMEIDA & VICENTE, 1982). As diversas características diferenciais entre espécies de microfilárias foram resumidas e estão listadas a seguir, nos quadros 2 e 3.

Quadro 2: Características morfológicas para a classificação das microfilárias não encapsuladas segundo Scherey & Trautvetter (1998).

	<i>D. immitis</i>	<i>D. repens</i>	<i>D. reconditum</i>	<i>D. dracunculoides</i>
Densidade	variada	moderada	baixa	baixa
Tamanho (µm)	262,1-338,2	274,6-361,9	241,2-286,9	190,8-211,8
média± de	303,8 ± 18,8	308,9 ± 46,6	263,3 ± 9,9	201,4 ± 9,3
Largura (µm)	4-6,2	5,8-7,3	3,8-5	4,8-5,8
média± de	5,5 ± 0,7	6,4 ± 0,8	4,3 ± 0,3	5,4 ± 0,5
Espículas rostrais	ausentes	ausentes	presentes	ausentes
Extremidade anterior	cônica	Ângulo reto	Rombo	cônica
Extremidade posterior	reta	reta	forma de “gancho”	Reta
Motilidade	local	local	progressiva	local

Os principais aspectos a serem considerados para diferenciação destas espécies são as dimensões e forma da cauda (JONES *et al.*, 2000).

Quanto ao agente de transmissão das mf, há mais de 70 espécies de mosquitos conhecidas como possíveis vetores na Dirofilariose (LUDLAN *et al.*, 1970 *apud* LABARTHE *et al.*, 2002). E pulgas, piolhos e carrapatos, na Dipetalonemose.

Os adultos de *D. immitis* geralmente estão alojados no Ventrículo direito e artéria pulmonar, enquanto que as formas adultas de *D. reconditum* são encontradas no tecido subcutâneo e cavidade peritoneal de seus hospedeiros (JONES *et al.*, 2000).

Quadro 3: Comparação entre *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum*.

<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>Dipetalonema reconditum</i>
Microfilárias	Microfilárias
Comprimento: 307-322µm	Comprimento: 269-283µm
Diâmetro: 6,7-7,1µm	Diâmetro: 4,3-4,8µm
Caudas: na maioria das vezes retas	Caudas: curvas em “gancho”
Desenvolvimento em mosquitos (<i>Anopheles quadrimaculatus</i>)	Desenvolvimento em pulgas (<i>Ctenocephalides canis</i>)
Adultos encontrados no ventrículo direito e artéria pulmonar.	Adultos encontrados no subcutâneo

Fonte: Jones *et al.* (2000).

Para maior precisão na detecção, e na identificação das mfs é aconselhado o tratamento do sangue pelo método de Knott, para matá-las e fixá-las. As mfs de *Dirofilaria immitis* medem 286 a 340µm de comprimento; o corpo se apresenta reto. As mfs de *Dipetalonema* medem 258 a 292µm; o corpo se apresenta em curva (FREITAS, 1977). Segundo Brito (2000), as mfs de *Dipetalonema reconditum* medem 249,2µm de comprimento e 4,4µm de largura. Já Bouza-Suarez & Del-Valle (1984), compararam as medidas de mf, e determinaram comprimento de 259,6-284,4µm e largura 3,8-5,04µm para *Dipetalonema reconditum*.

Normalmente a diferenciação tem como base a motilidade, número de mf presentes, forma da cauda (em “gancho” ou reta) e outras características morfológicas, como presença de gancho cefálico no gênero *Dipetalonema* (EWING, 1986). E considera a técnica de Knott modificada, o método mais preciso para diagnóstico de rotina.

As mfs de *Dipetalonema reconditum* são dotadas de movimentos rápidos para frente e desaparecem do campo microscópico. Nas infecções por *Dipetalonema reconditum* nunca são encontradas mais de três a quatro mfs em 20 a 40 ml de sangue. As mfs apresentam estrutura grande e interna ao nível do ponto da região média com a posterior. Possuem ainda um acúleo cefálico (FORTES, 1987).

O método mais simples de identificação, por meio de esfregaços sanguíneos frescos, é satisfatório quando o número de mfs é grande. As mfs de *Dirofilaria immitis* são ativamente móveis e ficam ondulando, mais ou menos no lugar, enquanto que as mfs de *Dipetalonema reconditum* tendem a migrar pela lâmina de microscopia. As características mais diferenciadoras entre, a *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum*, são que as mfs de *Dirofilaria immitis* são mais longas, mais calibrosas e possuem uma cauda retilínea, em contraste com as mfs de *Dipetalonema reconditum*, que são mais curtas, mais delgadas e possuem uma cauda em gancho (JONES *et al.*, 2000).

Dipetalonemose frequentemente ocorre nas mesmas áreas endêmicas de *Dirofilaria immitis* e a presença de suas mfs pode levar a um falso diagnóstico ao exame

de sangue. As diferenças morfológicas entre as mfs devem ser identificadas para um correto diagnóstico (URQUHART, 1996). A evidenciação do gancho cefálico, característico do gênero *Dipetalonema* é um método seguro e eficiente para diferenciação das espécies encontradas nos cães (ALMEIDA & VICENTE, 1982).

Nas regiões em que ocorrem *Dipetalonema sp.* e *Dirofilaria sp.*, os clínicos veterinários têm necessidade de fazer um diagnóstico diferencial. O método mais simples consiste no exame microscópico de uma gota de sangue, comprimida entre lâmina e lamínula. A mf de *Dirofilaria immitis* apresenta movimento ondulante, deslocando-se vagarosamente no campo microscópico; a mf de *Dipetalonema reconditum* se move erráticamente e se desloca no campo microscópico com maior rapidez (FREITAS, 1977).

Entre as técnicas utilizadas, estão incluídas a gota espessa (exame direto), preparada com até 100µl de sangue, a técnica de Knott modificada e a filtração em membrana de policarbonato Nucleopore (Nucleopore Corporation, pleasanton, CA, USA). Estas duas últimas proporcionam uma avaliação quantitativa e auxiliam o diagnóstico parasitológico específico. Além disso, os testes sorológicos (pesquisa de antígenos de verme adulto de *Dirofilaria immitis*) e a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) também estão sendo utilizados para detecção do parasito em amostras sanguíneas ou em vetores infectados (BRITO, 2000).

Nos casos de baixas densidades de mf na circulação, pode-se utilizar técnicas de concentração, como Knott modificada (NEWTON & WRIGHT, 1956 *apud* BRITO, 2000) e a filtração, citadas anteriormente, nas quais são examinados maiores volumes de sangue (1-10 ml). O primeiro método é baseado na centrifugação do sangue após processo de hemólise em solução de formol a 2%, o que favorece a diferenciação morfológica das mf (GRIEVE, 1986 *apud* BRITO, 2000). No entanto, tem menor sensibilidade que a filtração em membranas, sendo um método alternativo quando as membranas com poros de 3µm ou 5µm não estão disponíveis. A técnica de filtração é mais cara e normalmente usada para diagnóstico individual e avaliações de tratamento (controle de cura) (DREYER & ROCHA, 1996 *apud* BRITO, 2000). Dickerson *et al.* (1990) *apud* Brito (2000) descreveram uma técnica para preservar amostras de sangue em uma mistura de formalina e detergente aniônico, possibilitando utilizar a conveniência e sensibilidade da técnica de filtração em membrana, eliminando a necessidade de realização do teste imediatamente após o sangue ser colhido.

O hemograma não é conclusivo mas pode revelar uma eosinofilia, acompanhada ou não de basofilia em alguns casos. Calvert (1998) afirma que a eosinofilia nas infecções por *Dipetalonema reconditum* é equivalente ou maior que a associada a dirofilariose. A eosinofilia periférica pode resultar da infiltração na pele por estes parasitas (PAGE, 1998). A eosinofilia tem um papel importante nas moléstias atópicas, como nas invasões pelo helminto pesquisado. Os eosinófilos têm citotoxicidade dos alvos não-fagocitáveis, particularmente parasitos helmintos. Como ele é incapaz de fagocitar o parasito, ele trabalha como leucócito citotóxico reconhecendo seu alvo, depois que este estiver revestido pelo complemento (C3b), igG, ou mesmo IgE, por meio de receptores específicos. Em seguida, ocorre a aderência entre o alvo e o eosinófilo, mediante essas interações entre receptor-ligante. Assim, o alvo é exterminado por desgranulação eosinofílica no local de aderência e, de acordo com o material contido nos grânulos relacionados ao eosinófilo (MBP, proteína catiônica eosinofílica, e neurotoxina derivada do eosinófilo) é diretamente citotóxico para algumas células e parasitos (KNOLL, 2000; JONES *et al.*, 2000).

Em 1973, Schneider & Montaron, fizeram diagnóstico sorológico pela imunofluorescência em ovos de *Dipetalonema dracunculoides*.

A maioria dos testes de detecção de antígenos usados para diagnóstico das infecções por *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum*, é capaz de distinguir entre as infecções com esses dois parasitas (FARNELL & FAULKER, 1978; LINDEMANN & McCALL, 1984).

Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) gera sondas clonadas de DNA específico proporcionando um método altamente específico para a diferenciação de mf, mas esse procedimento ainda não é de uso geral (JONES *et al.*, 2000). Em 2002, pesquisadores conseguiram clonar a seqüência gênica do *Dipetalonema reconditum*, como na *Dirofilaria immitis* e realizaram o diagnóstico através de primers espécie-específicos (MAR *et al.*, 2002).

Steim & Lawton (1973) compararam quatro métodos de diagnóstico para diferenciação nas duas filarioses caninas em 400 cães. Usando o método de Knott modificado, a taxa de detecção das mfs foi de 83,5 a 87,5% na precisão para *Dirofilaria immitis* e 89,3% para *Dipetalonema reconditum*. O exame direto, a técnica de filtração e a técnica de tubo capilar foram menos satisfatórias no diagnóstico e diferenciação das duas mfs caninas.

Tabela 2. Resultados da comparação de quatro testes para detecção e diferenciação de filariose canina.

TESTE	CÃES TESTADOS	FILARIA-POSITIVOS	FILARIA POSITIVO PARA CADA TESTE	(%)
DIRETO	400	28	19	68
KNOTT MODIFICADO	400	28	25	89,3
FILTRAÇÃO	200	18	1	5,5
HEMATÓCRITO	211	10	1	10

Fonte: Steim & Lawton (1973).

Brito (2000) relata a importância da técnica direta e afirma que quando comparada às outras, é tão precisa quanto. As investigações sobre diferentes técnicas de diagnósticos parasitológico, imunológico e molecular são necessárias, a fim de indicar um método sensível, ou um conjunto deles, a serem utilizados no diagnóstico diferencial.

Rawlings (1986) determinou erros técnicos que podem acontecer com os testes de filtro e possibilitou a técnica de concentração de Knott modificada como a mais eficaz e indicada para a diferenciação entre as espécies de mfs.

Existe ainda um método de marcação histoquímica baseado na atividade da fosfatase ácida em cada espécie de mf. Esta marcação é individual para cada espécie, o que, auxiliária, ao diagnóstico correto e preciso (CHALIFOUX & HUNT 1971; PERIBÁNES *et al.*, 2001).

2.2.1. Diferenciação histoquímica

Os termos histoquímica e citoquímica são usados, geralmente para indicar os métodos para a localização de diferentes substâncias nos cortes de tecidos. Estes métodos têm por base reações químicas específicas, ou a interação macromolecular de alta afinidade. Nos dois casos, o resultado final, é usualmente, a produção de compostos insolúveis, corados, ou elétron-densos, que possibilitam a localização de substâncias específicas. Muitas moléculas orgânicas podem ser identificadas, uma delas a fosfatase ácida (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995).

Há um método de marcação histoquímica baseado na atividade da fosfatase ácida em cada espécie de mf. Esta marcação é individual para cada espécie, o que auxiliaria o diagnóstico correto e preciso. A localização da coloração da atividade da fosfatase ácida, descrita por Chalifoux & Hunt (1971), representa um método preciso para diferenciação das espécies (figuras 1 e 2).

Muitos estudos foram realizados e receberam atenção, após a descoberta por Petithory (1966) *apud* Vanveen & Blotkamp (1978), que descreveu as diferenças de localização das atividades enzimáticas nas mf.

Chalifoux & Hunt (1971) demonstraram a atividade enzimática da fosfatase ácida em espécies de mf, representando um método preciso para diferenciação das espécies encontradas. Este método foi aplicado em mf de *Dirofilaria immitis*, onde a atividade da fosfatase ácida ficou limitada a faixas estreitas nos poros excretor e anal, enquanto que nas mf de *Dipetalonema reconditum* a atividade enzimática fica uniformemente distribuída em todo o parasito. A técnica comumente empregada para a demonstração da atividade da fosfatase ácida está no método Barka (CHALIFOUX & HUNT 1971), o qual se fundamenta no sedimento sanguíneo, usando Naftol-AS-TR-fosfato como substrato e Pararosanilina como cromógeno. De qualquer maneira, a grande desvantagem deste procedimento é o curto período de estocagem dos reagentes (4 semanas para Naftol-AS-TR-fosfato e 6 meses para pararosanilina e nitrato de sódio 4%), sendo freqüentemente necessário o preparo de novos reagentes.

Coletaram amostras de sangue de 73 cães para pesquisa de microfilaremia; centrifugavam as amostras sanguíneas com água destilada em partes iguais (5ml) a 1000 r.p.m por 5 minutos; descartavam o sobrenadante e estendiam o sedimento em lâminas para secar ao ar; após, fixavam as lâminas em acetona a 4°C por 1 minuto, secas ao ar para demonstração posterior da atividade da fosfatase ácida. Dezesete cães encontravam-se microfilarêmicos. Dois tipos distintos de mf foram encontradas, de acordo com a atividade da fosfatase ácida. Em treze amostras, visualizaram precipitados avermelhados em duas áreas restritas nas mf: o poro anal e o poro excretor. As áreas apareceram como duas bandas ou pontos de cor vermelho brilhoso. Em quatro amostras encontraram mf uniformemente coradas no corpo, em vermelho ou uniformemente no corpo, com áreas menos intensas na parte cranial ao poro excretor. A identificação inicial baseou-se nas características dimensionais e morfológicas dos parasitas e finalizaram com a comparação da diferenciação histoquímica encontrada (CHALIFOUX & HUNT, 1971).

Em 1972, Simpson & Laurence, realizaram estudos histoquímicos mais elaborados em mf de *Brugia pateri* e *B. pahangi* em sangue de gatos, e em mf de *Loa loa* e *Wulchereria bancrofti* em sangue de humanos.

Em 1973, Chalifoux *et al.* conseguiram identificar 11 espécies de mf em primatas com a mesma técnica.

A distribuição da atividade da fosfatase ácida em estágios larvais de *W. bancrofti*, *Brugia malayi*, *B. pahangi* e *Dirofilaria immitis* em mosquitos foi realizada por Omar (1977), que encontrou diferenças nas marcações histoquímicas de mf encontradas no sangue de hospedeiros mais evoluídos. Justificando os dados encontrados pelas diferenças de estágio de desenvolvimento larval no mosquito.

Terwedow (1976) *apud* Yen & Mak (1978) sugeriu que esta marcação fosse adotada na taxonomia para identificação das mf. A distribuição somática da atividade da fosfatase ácida ofereceu facilmente uma característica reconhecível, na marcação histoquímica, para diferenciação das microfilárias. Esta marcação indicou que esta distribuição enzimática fosse espécie-específica (YEN & MAK, 1978).

Vanveen & Blotkamp (1978) diferenciaram histoquimicamente mf de *Dipetalonema sp.*, *Dirofilaria sp.*, *Onchocerca sp.* e *Setaria sp.* em humanos e animais domésticos na Nigéria.

Esta diferenciação histoquímica possibilitou identificar espécies de mf de *Wulchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Brugia pahangi* (OMAR, 1977; YEN & MAK, 1978), *Dirofilaria immitis* (CHALIFOUX & HUNT 1971; OMAR, 1977; YEN & MAK, 1978), *Dirofilaria repens* (YEN & MAK, 1978) *Dipetalonema reconditum* (CHALIFOUX & HUNT 1971), *Breinlia booliati* e *Breinlia sergenti* (YEN & MAK, 1978).

Kelly (1973), Ewing (1986) e Acevedo *et al.* (1981) consideram este método muito elaborado para uso de rotina na maioria das clínicas. Porém, Peribáñez *et al.* (2001), propuseram, baseados na técnica descrita por Chalifoux & Hunt (1971), uma modificação, onde conseguiram chegar aos mesmos resultados, através do kit comercial Leucognost-SP® (Merk, Alemanha), com maior rapidez e simplicidade. Neste trabalho, compararam a técnica padrão, com o uso do kit leucognost-SP comumente empregado na detecção da reação da fosfatase ácida em leucócitos no diagnóstico para leucemia em humanos. Este Kit tem o mesmo princípio e reagentes similares, com as vantagens do preparo fácil e estocagem por pelo menos dois anos.

D. immitis *D. repens* *D. reconditum* *D. dracunculoides*

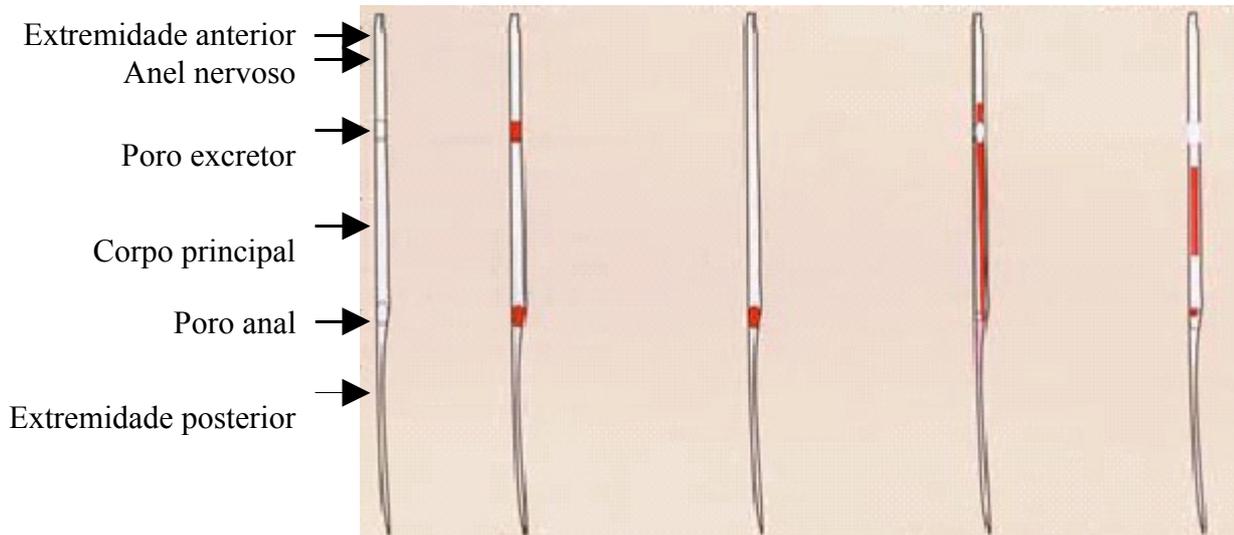


Figura 1: Padrões de marcação histoquímica da atividade da fosfatase ácida nas microfírias sem cápsula (representação gráfica). Fonte: Schrey & Trautvetter (1998).

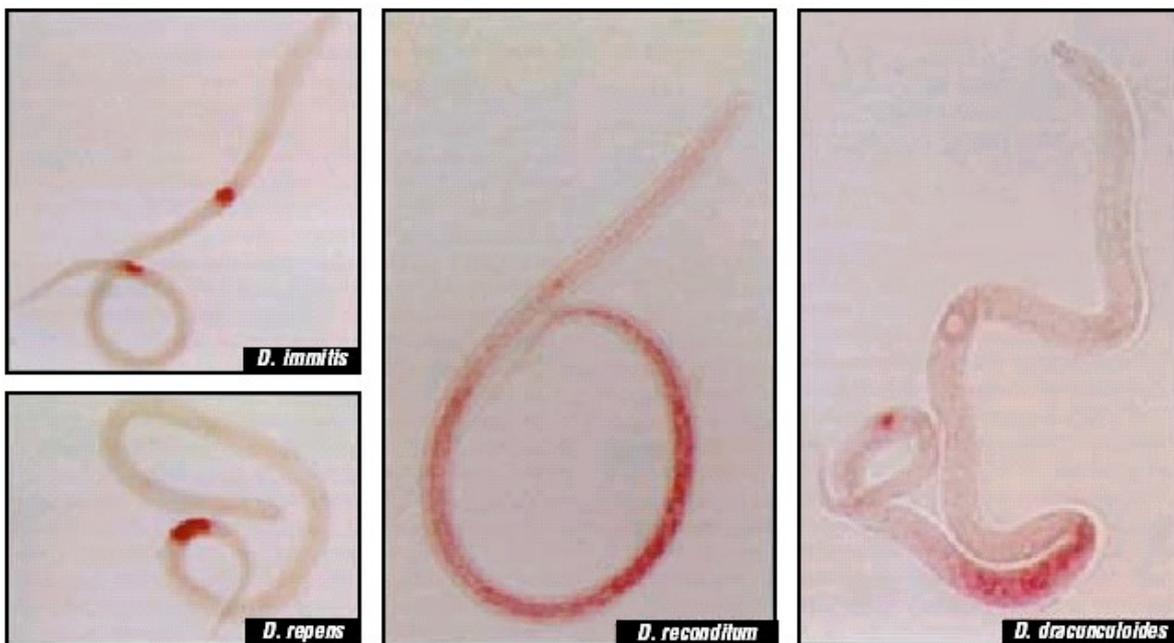


Figura 2: Padrões de marcação histoquímica da atividade da fosfatase ácida nas microfírias sem cápsula (fotomicrografia). Fonte: Schrey & Trautvetter (1998).

a) Princípio

A fosfatase ácida é uma das hidrolases do lisossomo facilmente demonstrada citoquimicamente. Sua atividade enzimática é sensível a temperatura e ao pH básico. É encontrada, primariamente, na próstata e no sêmem dos seres humanos, e em menor medida, no fígado, baço, hemácias, medula óssea e plaquetas. Está presente nos lisossomos das células e por isso é denominada marcadora de lisossomos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995).

Esta enzima cataliza a hidrólise de ésteres de fosfato em meio ácido. Com o teste adequado, a partir de naftol-AS-OL-fosfórico se libera naftol-AS-BI e um sal de diazônio é acoplado para dar um azocorante pardo avermelhado que precipita na célula.

Ela libera fosfato inorgânico, um metabólito chave para o desenvolvimento celular, a partir de ésteres de fosfato.

Segundo Schrey & Trautvetter (1998) este padrão de marcação espécie-específico habilita o examinador a identificar as espécies de microfilaria com facilidade.

2.3. Terapia Microfilaricida

Por não ser patogênica, dipetalonemose não necessita de terapia (FREITAS, 1977; LEVINE 1980; ALMEIDA & VICENTE, 1982; CORRÊA, 1983; BOREHAM & ATWELL, 1985).

O consumo de glicogênio pelos parasitos é grande, mormente em condições de anaerobiose. A reserva dos nematóides mantidos em jejum esgota-se em pouco tempo. Por isso, a ditiazanina, um anti-helmíntico que interfere na absorção e transporte de glicose, causa uma queda na produção de ATP e por último a morte dos parasitos (REY, 2003).

Na dirofilariose, Ivermectina e milbemicina oxima são macrolídeos utilizados mensalmente para reduzir e eliminar a microfilaremia por comprometimento da função reprodutiva da fêmea e possivelmente dos vermes machos. A maioria dos cães tratados com tais medicamentos torna-se amicrofilarêmico por volta da sexta dose mensal. A administração única de ivermectina ou de milbemicina oxima é altamente eficiente contra as mf de terceiro e quarto estágio. A dose recomendada de ivermectina (0,05mg/kg) está muito abaixo da dose crítica para os collies e seus mestiços (0,12mg/kg), alguns autores recomendam levamisol para estas raças como tratamento alternativo. Uma complicação adicional após o tratamento microfilaricida é a reação anafilática contra o antígeno liberado da mf em animais, seguida de morte. O risco é alto nas raças pequenas (<16kg) com densidade alta de mf (>10.000 mf por ml de sangue). Outra complicação seria o colapso circulatório por morte súbita das mf (NELSON & COUTO, 1994; CALVERT, 1998; SCHEREY & TRAUTVETTER, 1998; DUNN *et al.* 2001; LABARTHE *et al.*, 2002).

Dosagem profilática de ivermectina (6 a 12µg/Kg/mês) também é microfilaricida (BOWMAN *et al.* 1992 *apud* LABARTHE *et al.* 2002; LOK *et al.* 1992 *apud* LABARTHE *et al.* 2002). Nessa dosagem, a eliminação completa das microfílarias pode requerer até seis meses de tratamento mensal, eliminando as mf gradualmente. Com isso, sendo mais segura e causando menos efeitos colaterais (KNIGHT 1992 *apud* LABARTHE *et al.* 2002).

Lindeman & Mccall (1984) realizaram um experimento para avaliar a atividade microfilaricida da ivermectina, onde foi altamente efetiva, também contra microfílarias de *Dipetalonema reconditum*. A atividade adulticida também foi altamente eficaz.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário do Centro Universitário Plínio Leite (HCV/ UNIPLI), no município de Itaboraí, leste do Estado do Rio de Janeiro.

3.1. Coleta de Amostras

Amostras sanguíneas de 150 cães com idade superior a oito meses de idade e sem uso de medicamento microfilaricida há mais de seis meses foram obtidas através de venopunção cefálica, com seringas de 3ml e agulhas 25x7, descartáveis, e acondicionadas em tubos contendo EDTA (Etileno Diamino Tetracetato de Sódio) e avaliadas quanto à presença de microfilárias. Alíquotas positivas foram enviadas ao HCV/UNIPLI para diferenciação histoquímica.

Posteriormente, uma amostra proveniente de Vargem Grande, Rio de Janeiro, cedida pelo Professor Marcílio Dias do Nascimento, e nove amostras procedentes do Município de Cabo Frio, Rio de Janeiro, foram igualmente encaminhadas ao HCV/UNIPLI, para marcação histoquímica.

3.2. Processamento das Amostras

As amostras de sangue foram processadas imediatamente após a coleta. Uma vez detectadas, as mf foram diferenciadas em gêneros pela motilidade na técnica de Gota Espessa e Tubo Capilar, e, características morfológicas, como presença de gancho cefálico e/ou cauda em gancho, no Knott modificado, como descrito por Kelly (1973); Ewing (1986); Rawlings (1986); E Peribanez *et al.* (2001).

3.2.1. Gota Espessa: Uma vez homogeneizada a amostra, colocamos uma gota de sangue entre lâmina e lamínula com a ajuda de uma pipeta e observamos ao microscópio óptico, qualquer movimento entre os eritrócitos, justificado pela movimentação da mf, buscando sua presença.

3.2.2. Tubo Capilar: Obteve-se por capilaridade o preenchimento de um tubo de microhematócrito com o sangue a ser pesquisado, que após fechamento em chama foi centrifugado. Após centrifugar, como na técnica de avaliação do Volume Globular, examina-se ao microscópico (aumento de 100X) na porção plasmática do tubo, próximo à linha leucocitária, presença ou não de mf em movimento.

3.2.3. Teste de Knott modificado: Com auxílio de uma pipeta de Pasteur, toma-se 1ml de sangue e transfere-se para um tubo de centrifugação. Adiciona-se 10ml de formol a 2%. Mistura-se para que se mesquem o sangue e o formol. Deixa-se repousar por 20 minutos (para que se produza bem a hemólise) e posteriormente centrifuga-se 10 minutos a 1500 rotações por minutos (r.p.m.).

De cada tubo, uma vez eliminado o sobrenadante, toma-se metade do sedimento e coloca-se sobre 3-4 lâminas. Cobre-se com uma lamínula de 24x60 mm e observa-se ao microscópio (aumento de 100X). Seguidamente aponta-se o resultado (positivo/negativo) obtido.

3.3. Marcação Histoquímica

Amostras positivas pelos testes citados anteriormente, foram identificadas e separadas. As mf foram diferenciadas em espécies, pela marcação histoquímica, através da atividade da fosfatase ácida, pelo Kit Comercial Leucognost-SP¹, já descrito por Peribáñez *et al.* (2001) cujo fundamento e reagentes são similares aos empregados na técnica descrita por Chalifoux & Hunt em 1971, resultando em uma realização menos laboriosa.

Nos casos em que os resultados dos testes de Knott Modificados foram positivos prepararam-se os sedimentos que haviam sobrado, para serem estendidos em lâminas. Nos casos dos Testes dos Tubos Capilares positivos, quebravam-se os Tubos Capilares na altura da linha leucocitária e colocava-se uma gota da porção plasmática imediata a esta localização em uma lâmina, para confecção de um esfregaço, para posterior marcação histoquímica.

Após confeccionar os esfregaços, estes foram secos ao ar e as lâminas submersas por dois a três minutos em acetona (previamente resfriada a -20 °C). Após a fixação, as lâminas foram novamente secas à temperatura ambiente, e acondicionadas em uma caixa em freezer, a -20°C onde eram mantidas até o momento de suas marcações histoquímicas.

3.3.1 Material utilizado:

Os reagentes I (Ácido naftol-AS-OL-fosfórico), II (Acetato de Sódio), IIIa (Solução de Pararosanilina em HCL) e IIIb (Solução de nitrito, 4%) do kit Leucognost-SP¹ foram utilizados para marcação histoquímica das amostras.

¹ Merk, Alemanha.



Figura 3. Kit Leucognost-SP.



Figura 4. Reagentes utilizados.

3.3.2. Preparo da solução

Em 60ml de água destilada (figura 5) se dissolveram 2ml de reagente I (Figura 6) e 0,8g do reagente II (figura 7), nesta ordem. Misturaram-se quatro e cinco gotas do reagente IIIa e IIIb, respectivamente, em tubo de ensaio pequeno (figuras 8 e 9). Esperou-se um minuto para adição na solução e continuação do processo (figura 10). Em seguida filtrou-se a solução com filtro rápido em cubeta de coloração (figura 11). A coloração própria da solução reativa é rosa pardo, que rapidamente se torna turva. A turbidez não influencia na qualidade da marcação.

Considerando que a solução dos reagentes é estável por no máximo 3 horas e meia, os testes para marcação histoquímica foram realizados em tempo estimado de no máximo três horas.

Para a marcação histoquímica, as lâminas fixadas em acetona foram imersas na solução corante em recipientes próprios para citologia (figura 12), onde permaneceram por 2 horas e meia, em câmara escura. Passado este tempo foram retiradas e lavadas com água destilada e cobertas nos potes de citologia, mantendo-se assim por 15 minutos, sendo novamente lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente.

Quando enxutas, meio de montagem de lâminas, Entelan, auxiliou na conservação e observação das lâminas ao microscópio.

Foram realizadas três repetições da técnica em cada amostra positiva



Figura 5. 60ml de água destilada.



Figura 6. Adicionando 2ml do reagente I.



Figura 7. Adicionando 0,8g do reagente II.

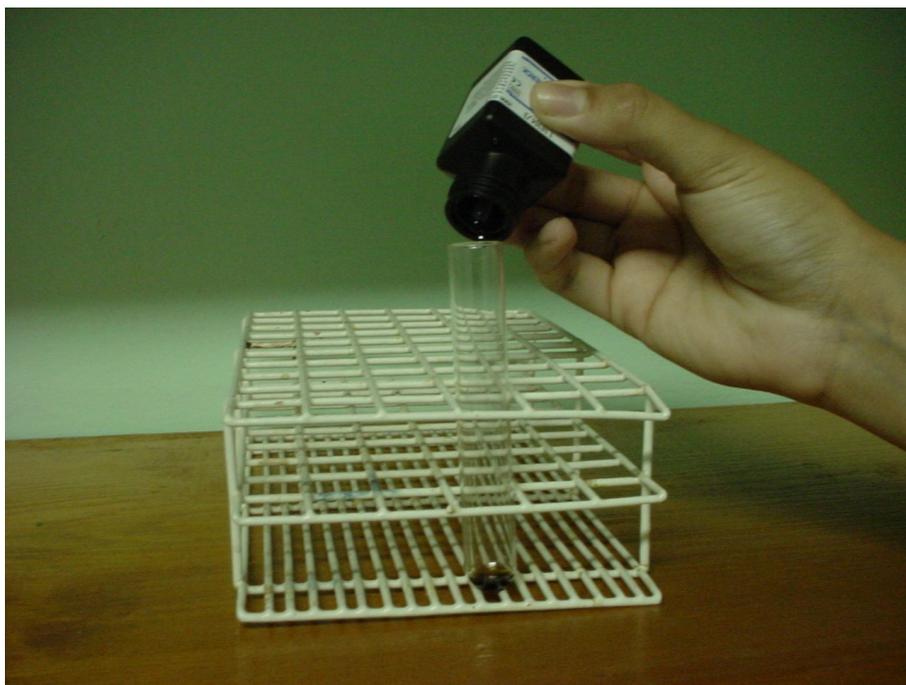


Figura 8. Adicionadas quatro gotas do reagente IIIa em tubo separado.

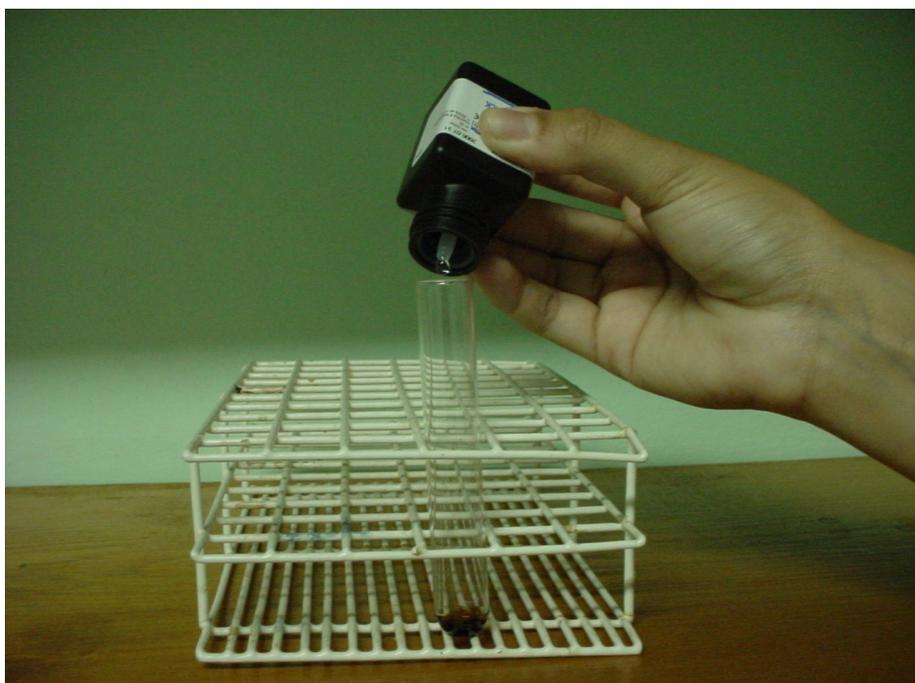


Figura 9. Adicionando cinco gotas do reagente IIIb no mesmo tubo.

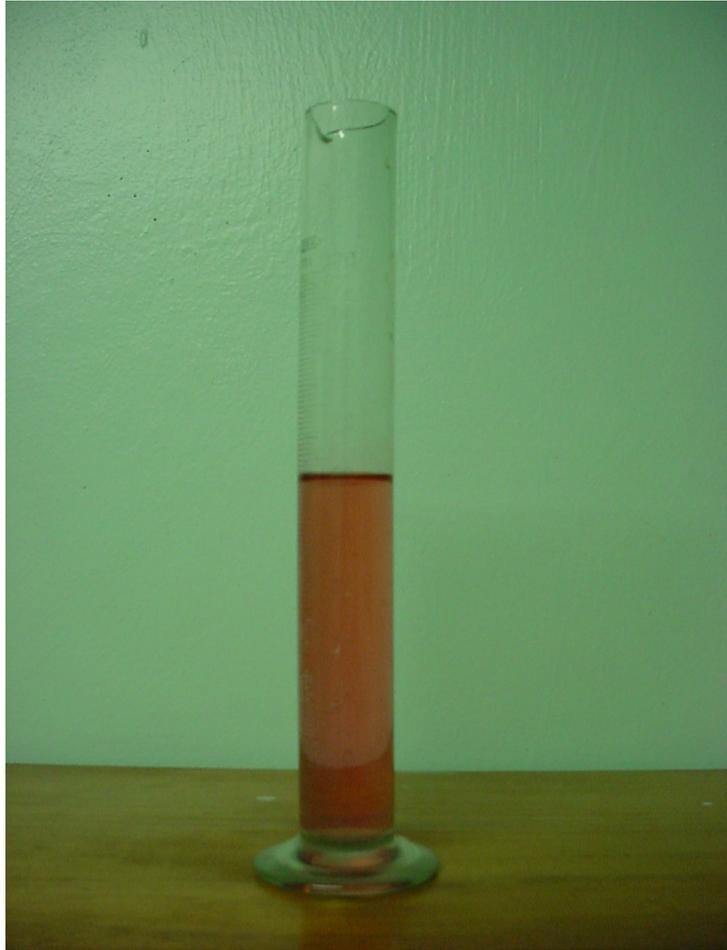


Figura 10. Coloração após adição do conteúdo do tubo.



Figura 11. Filtração da solução final.



Figura 12. Potes de citologia contendo as lâminas na solução.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 150 amostras coletadas no HCV/UNIPLI em Itaboraí, duas foram positivas para microfilárias pelos métodos de gota espessa (figura 13) e Knott modificado (figura 14). Outras dez amostras positivas doadas pelos Professores Marcílio Dias no Nascimento e Norma Volmer Labarthe foram incluídas no estudo. Essas doze amostras positivas foram utilizadas para análise e identificação pela marcação da atividade da fosfatase ácida pelo kit Leucognost-SP.

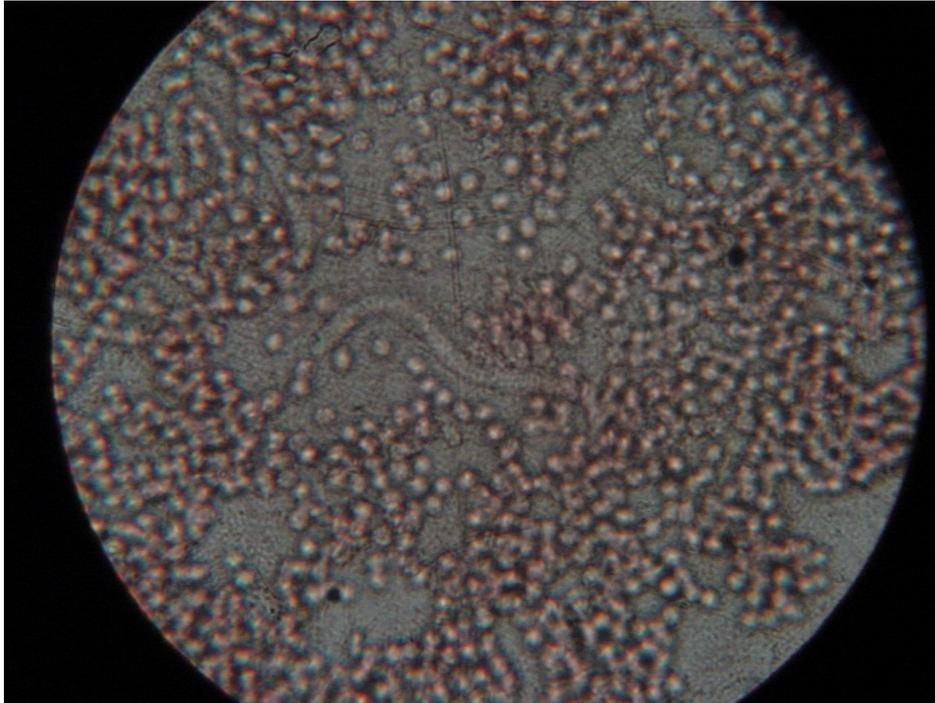


Figura 13. Microfilária demonstrada na Técnica Gota Espessa (100X)



Figura 14. Microfilária demonstrada no teste de Knott modificado, corada pelo NAM (novo azul de metileno) (100X).

Das amostras analisadas para microfilaremia, dez amostras foram positivas para *D. immitis*, uma amostra positiva para *D. reconditum* e uma amostra positiva para ambas as espécies, determinando uma infecção mista, identificada histoquimicamente como descoberto por Petithory (1966) *apud* Vanveen & Blotkamp (1978); sugerido por Chalifoux & Hunt (1971); Peribanez *et al.* (2001); e ilustrado por Schrey & Trautvetter (1998).

As mf de *D. immitis* demonstraram marcação da atividade da fosfatase ácida limitada a dois locais, no poro anal e no poro excretor, como citado por Chalifoux & Hunt (1971); Omar (1977); Vanveen & Blotkamp (1978); Yen & Mak (1978); Schrey & Trautvetter (1998); e Peribáñez *et al.* (2001). As áreas apareceram como duas bandas ou pontos de cor vermelha brilhosa (figuras 15 e 16).

Já as mf de *D. reconditum* comprovaram o que Chalifoux & Hunt (1971); Vanveen & Blotkamp (1978); Schrey & Trautvetter (1998); e Peribáñez *et al.* (2001) informaram em suas pesquisas, confirmando que a marcação da atividade da fosfatase ácida nesta espécie se mostrou uniformemente corada pelo corpo em vermelho, ou, uniformemente corada no corpo com áreas menos intensas na parte cranial ao poro excretor (figura 17).

Em uma das amostras com infecção mista, pode-se evidenciar as diferenças na marcação da atividade da fosfatase ácida nas duas espécies, descartando possíveis erros de técnica (figura 18).

As diferenças morfológicas entre as espécies coincidiram com os dados informados por Freitas, (1977); Almeida & Vicente, (1982); Bouza-Suarez & Del-Valle, (1994); Schrey & Trautvetter, (1998); Brito, (2000); e Jones *et al.*, (2000); como forma da extremidade anterior e posterior, tamanhos e dimensões da larva, sendo observado a variação das dimensões entre as espécies.

Quanto a microfilaremia, um animal com infecção por *D. reconditum* demonstrou densidade moderada a alta como Herd (1978); Farnell & Faulker, (1978); Veen & Blotkanp (1975) *apud* Bobade *et al.* (1981); Lindemann & Mccall, (1984) e não baixa,

como citado por Fortes (1987); Schrey & Trautvetter (1998); Brito (2000). As demais mf foram encontradas em quantidades variáveis na corrente sanguínea dos cães parasitados.

Concordamos com Terwedow (1976) *apud* Yen & Mak (1978) de que esta marcação possa ser adotada na taxonomia para diferenciação das mfs, já que os resultados reforçaram esta indicação.

O animal analisado com Dipetalonemose se apresentou assintomático desde 2003 até a presente data. O início do quadro poderia ter sido confundido com outras patologias, já que durante histórico e anamnese, o proprietário do animal relatou cansaço e tosse. Este fato poderia, junto com o achado laboratorial da microfilaria em esfregaço sanguíneo, determinar um diagnóstico precoce e incorreto de dirofilariose, se não fosse realizada a correta pesquisa elucidada. Após realização de outros exames, verificou-se quadro de estenose traqueal, correspondendo à sintomatologia apresentada, inicialmente. Com isto, evidenciou-se o quadro não patogênico da doença como citado por Leitão (1965); Freitas (1977); Levine (1980); Almeida & Vicente (1982); Corrêa (1983); Borehan & Atwell (1985); Fortes (1987); e Schrey & Trautvetter (1998). Não sendo preciso terapia microfilaricida (FREITAS, 1977; LEVINE, 1980; ALMEIDA & VICENTE, 1982; CORRÊA, 1983; BOREHAM & ATWELL, 1985). O mesmo animal demonstrou que a infecção foi transitória como descrito por BRITO (2000).

Os esfregaços confeccionados a partir das amostras avaliadas pelo teste de knott modificado demonstraram mf melhores marcadas do que as do teste de microhematócrito. Porém a marcação diferenciadora foi adequadamente visualizada em ambos os procedimentos.

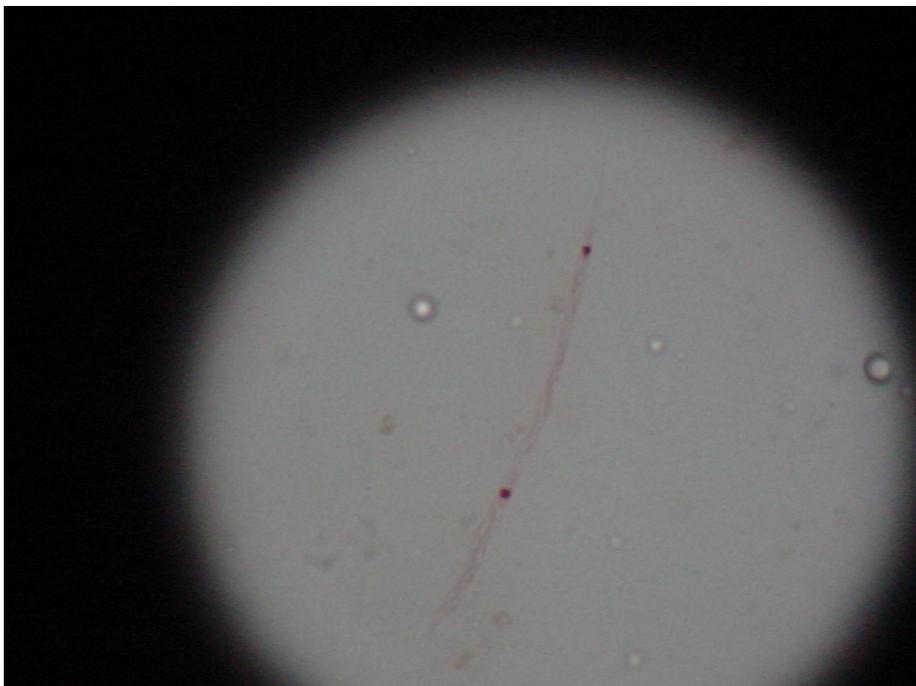


FIGURA 15. *D. immitis* histoquimicamente marcada pela atividade da fosfatase ácida (400X).

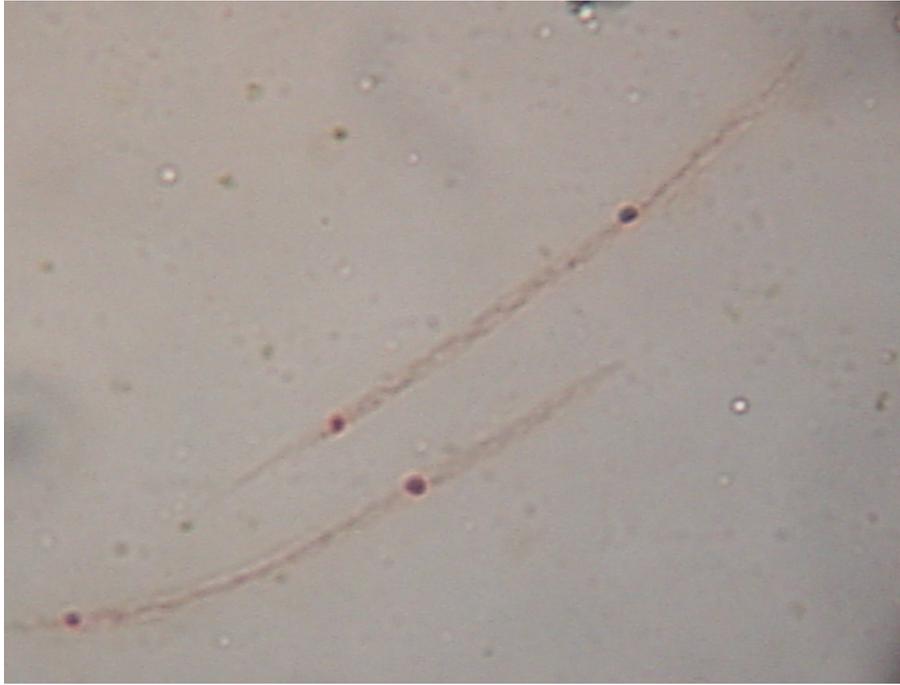


FIGURA 16. *D. immitis* marcadas histoquimicamente pela atividade da fosfatase ácida (400X).



Figura 17. *D. reconditum* marcado histoquimicamente pela atividade da fosfatase ácida (400X).

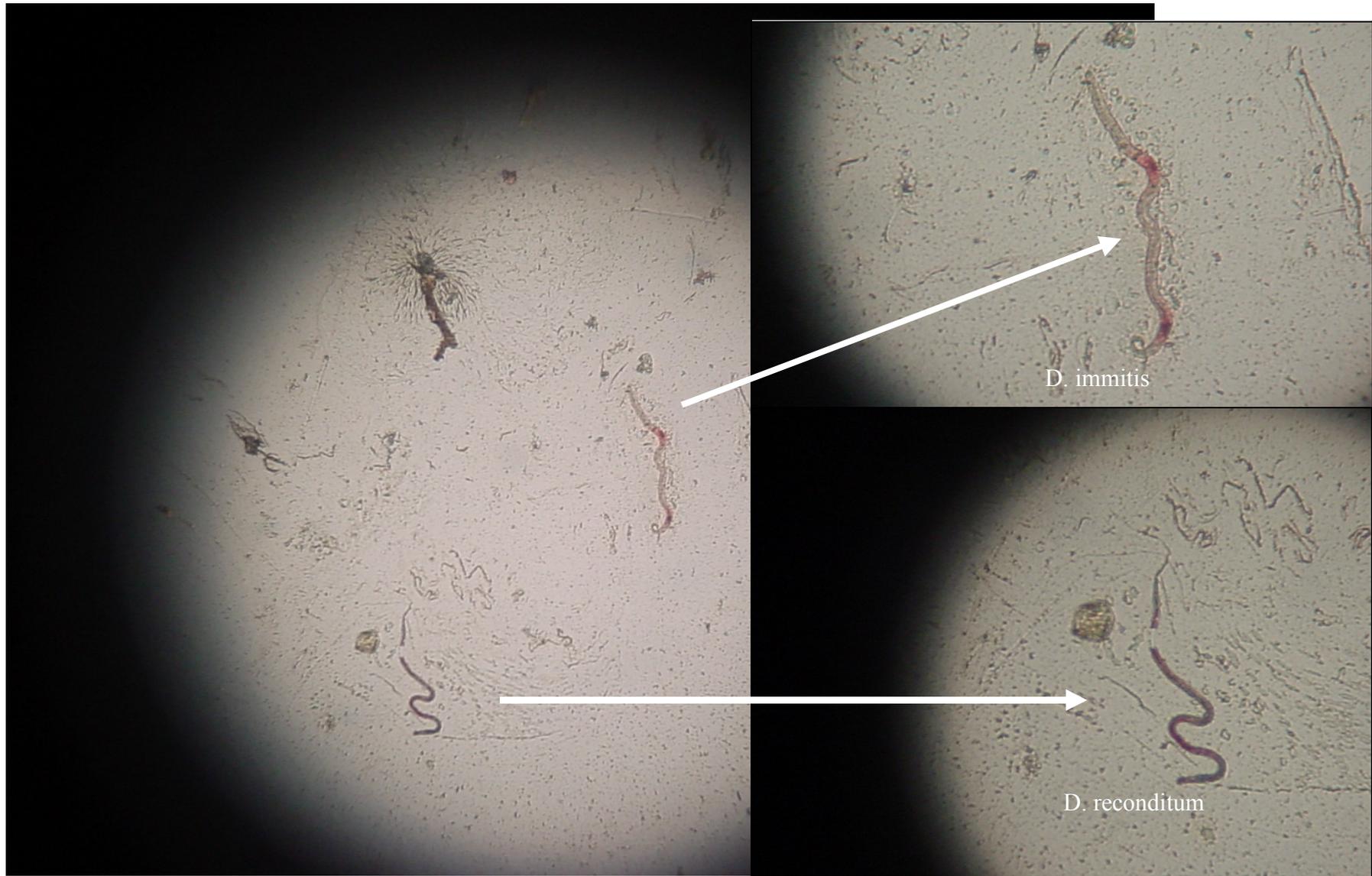


Figura 18. Marcação histoquímica pela atividade da fosfatase ácida demonstrando infecção mista por *D. immitis* e *D. reconditum* (400X)

5. CONCLUSÕES

O kit Leucognost-SP se mostrou capaz de marcar histoquimicamente as microfilárias, permitindo a diferenciação segura das espécies.

As diferenças morfológicas podem ser utilizadas para diagnóstico laboratorial da microfilaremia, porém, exigem adequado conhecimento técnico para reconhecimento dos gêneros microfilarídeos.

A concentração de microfilaremia não pode ser critério para diagnóstico como a movimentação das larvas ao Exame Direto, o qual se mostrou confiável em infecções individuais e na caracterização do gênero microfilaríode presente.

Esta marcação pode ser adotada na taxonomia para correta identificação das várias espécies de microfilárias.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, R. A.; THEIS, J. H.; KRAUS, J. F.; LONGHURST, W. M. Combination of filtration and histochemical stain for detection and differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* in the dog. **Am J Vet Res**, v.42, n.3, p.537-40, Mar, 1981.

ALMEIDA, G. L. G.; VICENTE, J.J. *Dipetalonema reconditum*, *Dipetalonema grassi* e *Dirofilaria immitis* em cães na cidade do Rio de Janeiro. **Atas Soc. Biol. Rio de Janeiro**, v. 23, p. 9-12, 1982.

ALVES, L. C.; ALMEIDA, L. V. S.; FAUSTINO, M. A.; McCALL, J. W.; SUPAKONDERJ, P; LABARTHE, N. W. Survey of canine heartworm in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, p. 587-90, Sep-Oct. 1999.

ANDERSON, R. C. **Nematodes Parasites of Vertebrates Their Development and Transmission**. Department of Zoology. University of Guelph, Ontario. Canadá: CAB International, 1993. 384 p.

BAIN, O.; AESCHLIMANN, A.; CHATELANAT, P. Présence chez des tiques de la region de Gêneve, de larves infestantes qui pourraient se rapporter a la filaire de chien *Dipetalonema grassii*. **Annales de Parasitologie (Paris)**, v. 57, n. 6, p. 643-46, 1982.

BOBADE, P. A.; OJEBUOBOH, P. B.; AKINBOADE, O. A case of canine filariasis to *Dipetalonema reconditum* (Grassi, 1889) in Nigerian. **J Small Anim Pract**, v. 22, p. 201-206, 1981.

BOREHAM, R. F.; ATWELL, R. B. *Dipetalonema reconditum* in dogs with microfilaraemia. **Aust Vet J**, v. 62, n. 1, p. 27-8, Jan, 1985.

BOUZA-SUAREZ, M.; DEL-VALLE, M. T. Comparison between the microfilariae of *Dipetalonema reconditum* (Grassi, 1890) and *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) (Nematoda: Filaroidea). **Rev Cubana Med Trop**, v. 36, n. 2, p. 160-4, May-Aug, 1984.

BRITO, A. C. **Filariose canina causada por *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum* em Maceió-Alagoas**. 2000. 113p. Tese (Doutorado em Ciências, Biologia Celular e Molecular) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

BRITO, A. C.; VILA-NOVA, M. C.; ROCHA, D. A. M.; COSTA, L.G.; ALMEIDA, W. A. P.; VIANA, L. S.; LOPES, R. JR. R.; FONTES, G.; ROCHA, E. M.; REGIS, L. Prevalence of canine filariasis by *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* in Maceió, Alagoas, Brazil. **Cad Saúde Pública**, v. 17, n. 6, p.1497-504, Nov-Dec, 2001.

CALVERT, C. A. Dirofilariose. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders Clínica de Pequenos Animais**. 2ª ed, São Paulo: Roca, 1998. p. 552-56.

CHALIFOUX, L.; HUNT, R. D. Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum*. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 158, n. 5, p. 601-5, Mar, 1971.

CHALIFOUX, L.; HUNT, R. D.; GARCIA, F. G.; SEHGAL, P. K.; COMISKEY, J.R. Filariasis in New World monkeys: histochemical differentiation of circulating microfilariae. **Lab Anim Sci.** v. 23, n. 2, p. 211-20, 1973.

CORRÊA, O. **Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos**. 4ª edição. Porto Alegre: Sulina, 1983. 370p.

CRINGOLI, G.; RINALDI, L.; VENEZIANO, V.; CAPELLI, G. A prevalence survey and risk analysis of filariasis in dogs from the Mt. Vesuvius area of southern Italy. **Vet Parasit**, v. 102, p. 243-52, 2001.

DENHAM, D. A. A review of methods for testing compounds for microfilarial activity. **J Helminthol**, v.53, n. 2, p. 175-87, Jun, 1979.

DUNN, J. K.; ELLIOTT, J.; HERRTAGE, M. E. Doenças do Sistema Cardiovascular. In: DUNN, J.K. *Tratado de Medicina de Pequenos Animais*. São Paulo: Roca. 2001 p. 300-05.

EWING S. A. Examinations for parasites. In: COLES, E. H. **Veterinary Clinical Pathology**. 4ª ed. Philadelphia: W. B. Saunders. 1986. p. 385-6.

FALLS, R. K.; PLATT, T. R. Survey for heartworm, *Dirofilaria immitis*, and *Dipetalonema reconditum* (Nematoda: Filarioidea) in dogs from Virginia and North Carolina. **Am J Vet Res**, v.43, n. 4, p. 738-9, 1982.

FARNELL, D. R.; FAULKNER, D. R. Prepatent period of *Dipetalonema reconditum* in experimentally-infected dogs. **J Parasitol**, v. 64, n. 3, p. 565-7, Jun, 1978.

FELDMAN B.F.; ZINKL J.G.; JAIN N. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2000. 1344 p.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. Porto Alegre: Sulina, 1987. 643p.

FREITAS, M. G. **Helmintologia Veterinária**. 3ª ed. Belo Horizonte: Rabelo & Brasil, 1977. 360 p.

GEORGI, J. R. **Parasitologia Veterinária**. 4ª ed. São Paulo: Manole, 1988. 379p.

GIANNETTO, S.; POGLAYEN, G.; GAGLIO, G.; BRIANTE, E.; FERLAZZO, M.; GIUDICE, E. *Dipetalonema dracunculoides* (Nematoda: Onchocercidae): first report in dog in Italy. **Parasite.**, v. 10, p. 188, 2003.

GLENN, B. L. Diagnosis of Parasitic Diseases in Blood of Small Animals. **JAVMA**, v. 157, n. 11, p. 1681-85, Dec, 1970.

- GRAHAM, J. M. Canine Filariasis in Northeastern Kansas. **J Parasit**, v. 60, n. 2, p. 322-26, 1974.
- HAHN, N. E. Parasitas do sangue. In: SLOSS, M. W.; ZAJAC, A. M.; KEMP, R. L. **Parasitologia Clínica Veterinária**. 6ª edição. São Paulo: Manole, 1999. p. 101-120
- HERD, R. High *Dipetalonema reconditum* Microfilarial Counts in Two dogs. **JAVMA**, v. 172, n. 12, p. 1430-31, 1978.
- HOLMES, P. R.; KELLY, J. D. The incidence of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* in dogs and cats in Sydney. **Aust Vet J**, v.49, p. 55, Jan, 1973.
- HUYNH, T.; THEAN, J.; MAINI, R. *Dipetalonema reconditum* in the human eye. BJO on line: British Journal of ophthalmology. Disponível em: <<http://bjo.bmjournals.com/cgi/content/full/85/9/DC1>> acesso em: 29 de julho de 2003.
- JOINER, G. N.; JARDINE, J.H. Canine Filariasis in a Central Texas County. **JAVMA**, v. 157, n. 12, p. 2100-3, 1970.
- JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**. 6ª ed. São Paulo: Manole, 2000, 1415p.
- JORDAN, H. E.; MULLINS, S. T.; STEBBINS, M. E. Endoparasitism in dogs: 21.583 cases (1981-1990). **JAVMA**, v. 203, n. 4, p. 547-49, 1993.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. 433p.
- KELLY, J. D. Detection and differentiation of microfilariae in canine blood. **Aust Vet J**, v. 49, n. 1, p. 28-30, Jan, 1973
- KNOLL, J. S. In: FELDMAN B.F.; ZINKL J.G.; JAIN N. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2000. p. 3.
- KOCAN, A. A.; LAUBACH, H. E. *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* infections in Oklahoma Dogs. **JAVMA**, v. 168, n. 5, p. 419-20, 1976.
- KORKETJIAN, A.; EDESON, J. F. B. Studies on naturally occurring filarial infections in dogs in Lebanon. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 72, n. 1, p. 65-78, 1978.
- LABARTHE, N.; SERRÃO, M. L.; MELO, Y. F.; de OLIVEIRA, S. J.; LOURENÇO DE OLIVEIRA, R. Mosquito frequency and feeding habitats in an enzootic canine dirofilariasis area in Niterói, State of the Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 2, p. 145-54, 1998.
- LABARTHE, N. V.; ALVES, L. C.; SERRÃO, M. L. Dirofilariose em Pequenos Animais e como Zoonose. In: ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em Pequenos Animais e como zoonoses**. Rio de Janeiro: LF livros, 2002. p. 112- 126

LEVINE, N. D. **Nematode Parasites of Domestic Animals and of Man**. 2^a ed. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1980. 477p.

LIGHTNER, L. K.; REARDON, M. J.; *Dipetalonema dracunculoides* in dogs and Spotted Hyena (*Crocuta crocuta*) in the Turkana District of Kenya. **Proc. Helminthol.Soc. Wash.**, v. 50, n. 2, p., 333-5, 1983

LINDEMANN, B. A.; EVANS, T. L.; McCALL, J. W. Clinical responses of dogs to experimentally induced *Dipetalonema reconditum* infection. **Am J Vet Res**, v. 44, n. 11, p. 2170-72, Nov, 1983.

LINDEMANN, B. A.; McCALL, J. W. Experimental *Dipetalonema reconditum* infections in dogs. **J Parasitol**, v. 70, n. 1, p. 167-8, Feb, 1984.

MAR, P.H.; YANG, I.C.; CHANG, G.N.; FREI, A. C. Specific polymerase chain reaction for differential diagnosis of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* using primers derived from internal transcribed spacer region 2 (ITS2). **Vet Parasitol**, v. 106, n. 3, p. 243-52, 2002.

MARTIN, T.E.; COLLINS, G. H. Prevalence of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* in greyhounds. **Aust. Vet. J**, v. 62, n. 5, p. 159-62, 1985.

McGREEVY, P. B.; CONRAD, R. D.; BULGIN, M. S.; STITZEL, K. A. Canine Filariasis in Northern California. **Am J Vet Res**, v. 31, n. 7, p. 1325-28, 1970.

NELSON, R. W.; COUTO, G. C. **Fundamentos de medicina interna em pequenos animais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 129.

NIAK, A.; KHATIBI, S. A record of *Dipetalonema (Acanthocheilonema)* (Filariata: Setariidae) in dogs in Iran. **Vet Rec**, v. 89, n. 16, p. 449-50, Oct, 1971.

OLMEDA-GARCÍA, A. S.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUES, J. A.; ROJO-VÁSQUEZ, F. A. Experimental transmissions of *Dipetalonema dracunculoides* (Cobbold 1870) by *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille 1806). **Vet Parasit**, v. 47, p. 339: 342, 1993.

OMAR, M.S. Distribution of Acid Phosphatase Activity in the Larval Stages of *Wulkereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *B. Pahangi* and *Dirofilaria immitis* in the mosquito. **Tropenmed. Parasit.** v. 28, p. 100-08, 1977.

PAGE, R.L. Hematologia / Oncologia In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders Clínica de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 1998. p. 179.

PANDEY, V. S.; DAKKAK, A.; ELMAMOUNE, M. Parasites of stray in the Rabat region, Marocco. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 81, n. 1, p. 53-55, 1987.

PAPPAS, L.G.; LUNZMAN, A. T. Canine heartworm in the domestic and wild canids of southeastern Nebraska. **J. Parasitol**, v.71, n. 6, p. 828-30, 1985.

PATTON, S.; FAULKNER, C. T., Prevalence of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* in dogs: 805 cases (1980-1989). **JAVMA**, v. 200, n. 10, p. 1533-34, 1992.

PEREZ-SANCHEZ, R.; GOMES-BAUTISTA, M.; GRANDES, A. E. Canine filariasis in Salamanca (northwest Spain). **Ann Trop Méd Parasitol**, v. 83, n. 2, p. 143-50, Apr, 1989.

PERIBÀNEZ, M. A.; LUCIENTES, J.; ARCE, S.; MORALES, M.; CASTILLO, J. A.; GRACIA, M. J. Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Acanthocheilonema dracunculoides* microfilariae by staining with a commercial kit, Leucognost-SP®. **Vet. Parasit**, v. 102, p. 173-75, 2001.

PRATT, S. E.; CORWIN, R. M. SELBY, L. A.; RHOADES, J.D. Prevalence of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* Infections in Missouri dogs. **JAVMA**, v. 179, n. 6, p. 592-3, 1981.

RAWLINGS, C. A. **Heartworm Disease in Dogs and Cats**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1986. 329p.

REAGAN, W. J.; SANDERS, T. G.; DeNICOLA, D. B. **Hematología Veterinaria. Atlas de las Especies Domésticas Comunes**. Madrid: Harcourt Brace de España, 1999, p. 59-62.

REIFUR, L.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MONTIANI-FERREIRA, F. **Biologic factors in the existence and spread of heartworm disease**. **Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR**, v.4, n. 1, p. 65-70, 2001.

REY, L. **Parasitologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 130, 555, 740.

RIPOLL, B. D.; SUAREZ, M. B.; HERNÁNDEZ, A. M. E.; ORELLANA, M. D. *Dipetalonema reconditum* (Gras, 1890) (Nematoda: Filarioidea). Primer Informe en la Isla de la Juventud. **Rev Cub Med Trop**, v. 38, n. 3, p. 271-73, 1986.

SCHREY, C. F.; TRAUTVETTER, E. *Dirofilariosis canina y felina – diagnóstico y tratamiento*. **Waltham Focus**, v. 8, n. 2, p. 23-30, 1998.

SCHENEIDER, R.; MONTARON, J. M. Diagnostic Sérologique des filarioses par immunofluorescence sur ceufs de *Dipetalonema dracunculoides*. **Arch Inst Pasteur Alger**, v. 50-51, p. 107-14, 1972-73.

SIMPSON, M. G.; LAURENCE, B. R. Histochemical studies on microfilariae. **Parasitology**, v. 64, n. 1, p. 61-88, 1972.

SOUZA, S. H. V. C. disponível em: <<http://www.ufrrj.br/posgrad/cpmv/tese/me/rem-102.htm>>. Acesso em: 21 jun. 2003.

STEIM, F. J.; LAWTON, G. W. Comparison of methods for diagnosis and differentiation of canine filariasis. **J Am Vet Med Assoc**, v. 163, n. 2, p. 140-1, Jul, 1973.

THRASHER, J.P.; GOULD, B.; LYNCH, M. J.; HARRIS, C.C. Filarial Infections of Dogs in Atlanta, Georgia. **JAVMA**, v. 153, n. 8, p.1059-63, 1968.

THEIS, J. H.; STEVENS, F.; LAW, M. Distribution, prevalence, and relative risk of filariasis in dogs from the State of Washington (1997-1999). **J Am Anim Hosp Assoc**, v. 37, p.339-47, Jul-Aug. 2001

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. J.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 273p.

VANVEEN, T. W.; BLOTKAMP, J. Histochemical differentiation of microfilariae of *Dipetalonema*, *Dirofilaria*, *Onchocerca* and *Setaria spp.* Of man and domestic animals in the Zaria area (Nigeria). **Tropenmed Parasitol**, v. 29, n. 1, p. 33-5, Mar, 1978.

WALTERS, L. L.; LAVOPIERRE, M. M. J.; TIMM, K. I., JAHN, S. E. Endemicity of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* in dogs of Pleasants Valley, Northern California. **Am J Vet Res**, v. 42, n. 1, p. 151-54, 1981.

WANG, L. C. Canine filarial infections in north Taiwan. **Acta Trop**, v. 68, n. 1, p. 115-20, Oct, 1997.

WATSON, A. D.; TESTONI, F. J.; PORGES, W. L. A comparison of microfilariae isolated from canine blood by the modified Knott test and a filter method. **Aust Vet J**, v. 49, n. 1, p.28-30, Jan, 1973.

WOLFE, M. S.; ASLAMKHAN, M.; SHARLF, M.; PERVEZ, E. *Acanthocheilonema dracunculoides* (Cobbold, 1870) in dogs in Lahore, west Pakistan. **J Helminthol**, v. 45, n. 2, p. 171-176, 1971.

YEN, P. K. F.; MAK, J. W. Histochemical differentiation of *Brugia*, *Wulkereria*, *Dirofilaria* and *Breinlia* microfilariae. **Annals of tropical Medicine and Parasitology**. v. 72, n. 2, p. 157-62, 1978.