AVANÇOS E DESAFIOS NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA DIROFILARIOSE CANINA

Autores: Beatriz Brasilio Vilela[1], Maria Aparecida da Silva[1], Ana Carolini Montebeller[1], Leonardo Demier Cardoso[2], Jéssica de Crasto Souza Carvalho Reis[1], Isabella Vilhena Freire Martins[1]

[1]Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Medicina Veterinária, Alto Universitário, S/N, Guararema – 29500-000 – Alegre, Brasil, biabvilela24@gmail.com, maria.silva.4@ufes.br, vetcarolini@gmail.com, jessica.s.reis@ufes.br, isabella.martins@ufes.br
[2]Instituto Federal do Espírito Santo, Rua Augusto Costa de Oliveira, 660, Centro – 29285-000 – Piúma-ES, Brasil, leonardo.demier@ifes.edu.br

Resumo
A dirofilariose canina, causada por *Dirofilaria immitis*, representa uma das parasitoses pulmonares de maior relevância clínica na medicina veterinária de pequenos animais, com distribuição cosmopolita e impacto na saúde pública pelo seu potencial zoonótico. Seu diagnóstico é essencial para o manejo terapêutico adequado e a prevenção de complicações graves. Esta revisão objetivou comparar os principais métodos diagnósticos disponíveis, abrangendo técnicas microscópicas (teste de Knott modificado e esfregaço sanguíneo), técnicas sorológicas (ELISA e testes imunocromatográficos rápidos) e técnicas moleculares (PCR, qPCR e LAMP). A análise dos estudos incluídos evidenciou que nenhuma técnica isolada é suficiente para garantir diagnóstico confiável em todos os cenários clínicos e que a combinação de ao menos dois métodos complementares aumenta a acurácia diagnóstica.

Palavras-chave: PCR, teste de antígeno, teste de Knott, *Dirofilaria immitis*, verme do coração.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde, Medicina Veterinária.

Introdução

A dirofilariose canina é uma enfermidade parasitária causada pelo nematódeo *Dirofilaria immitis*, transmitido por mosquitos hematófagos, principalmente dos gêneros *Culex* e *Aedes*, que atuam como hospedeiros intermediários obrigatórios. A doença afeta predominantemente cães, podendo acometer outras espécies e, em casos acidentais, seres humanos, configurando uma zoonose (Pietrzak *et al*., 2024). A dinâmica dessa transmissão e a ocorrência de formas ocultas da infecção estão diretamente atreladas às fases do ciclo biológico de *D. immitis*. Segundo *American Heartworm Society* (AHS, 2024), o ciclo biológico de *D. immitis* envolve cinco estágios. As microfilárias (L1) circulam no sangue periférico do hospedeiro definitivo e são ingeridas pelo mosquito vetor durante o repasto sanguíneo. Após desenvolvimento para larvas infectantes (L3) no organismo do inseto, a transmissão para o cão ocorre pela picada. A migração larval culmina na chegada dos parasitos às artérias pulmonares, onde atingem a maturidade sexual em aproximadamente seis meses após a inoculação.

No Brasil, estudos epidemiológicos têm demonstrado a circulação ativa de *D. immitis* em diferentes regiões, com destaque para os municípios litorâneos devido ao clima quente e úmido, que favorece a proliferação e a atividade do vetor. Regiões litorâneas, como o município de Cabo Frio, Rio de Janeiro, apresentaram elevada prevalência (30,1%) de dirofilariose canina (Trancoso *et al*., 2020). Por outro lado, a constatação de uma prevalência de 17,5% de dirofilariose canina em Sousa, no Sertão da Paraíba (Silva *et al*., 2022), revelou dados importantes sobre a ocorrência da doença em regiões não litorâneas. Esses resultados reforçam a necessidade de investigar a presença da dirofilariose em regiões interioranas, impulsionados por fatores como a falta de controle de hospedeiros reservatórios, o trânsito de animais entre cidades e o surgimento de vetores adaptados às mudanças climáticas (Silva *et al*., 2022).

Dado o exposto, o ciclo biológico do parasito impõe desafios diretos ao diagnóstico precoce na rotina. Foi demonstrado experimentalmente, em cães inoculados com 50 larvas L3, que o antígeno de *D. immitis* somente se tornou detectável mesmo com tratamento térmico prévio após 20 semanas da inoculação, enquanto a PCR foi positiva em 24 semanas e as microfilárias só foram evidenciadas

microscopicamente a partir da 28ª semana, reiterando a importância do período pré-patente na interpretação de resultados negativos (Murillo *et al*., 2024a). A diversidade de métodos diagnósticos disponíveis atualmente para a dirofilariose canina, que inclui técnicas microscópicas, sorológicas e moleculares, impõe ao clínico a necessidade de compreender as características operacionais de cada abordagem e suas limitações. Portanto, esta revisão foi conduzida com o objetivo de reunir, analisar e comparar esses métodos, fornecendo subsídios técnicos para decisões clínicas mais embasadas e para o aprimoramento dos protocolos de triagem em cães no Brasil.

Metodologia

O estudo foi realizado por meio de uma revisão bibliográfica de caráter descritivo, utilizando diretrizes da *American Heartworm Society* (AHS, 2024), livros e artigos científicos selecionados de bases de dados como SciELO, PubMed e Google Acadêmico. Os critérios de inclusão focaram em estudos publicados nos últimos 10 anos (2016-2026), priorizando materiais que abordassem a comparação técnica entre métodos. Utilizou-se as palavras-chaves "*Dirofilaria immitis*", "*heartworm*", "*knott test*", "PCR" e "*antigen test*", combinados com os operadores boleanos *AND* e *OR*. Foram excluídos estudos que não abordassem diretamente o diagnóstico da infecção e trabalhos duplicados.

Resultados

O teste de Knott modificado (TKM) constitui o método microscópico padrão-ouro para a detecção de microfilárias de *D. immitis* no sangue periférico, uma vez que inclui uma etapa de concentração que aumenta sua sensibilidade (AHS, 2024). O procedimento baseia-se na lise de eritrócitos por solução de formalina a 2%, seguida de centrifugação e análise microscópica do sedimento para identificação morfométrica das microfilárias, permitindo diferenciação principalmente entre *D. immitis* e *Acanthocheilonema reconditum*, parasito não patogênico de morfologia distinta (Zajac *et al*., 2021). Em estudo realizado no Espírito Santo com cães microfilarêmicos, foi constatada predominância de *D. immitis* (69,44%) em relação a *A. reconditum* (15,27%), além de alertarem para a ocorrência de coinfecções em 12,5% das amostras analisadas (Peroba *et al.,* 2022).

Outras técnicas microscópicas, como o esfregaço sanguíneo fino, o esfregaço sanguíneo espesso e a técnica de Woo, embora de execução rápida e custo reduzido, apresentam sensibilidade inferior ao TKM, especialmente em amostras com baixa microfilaremia (Panarese *et al.*, 2020). Isso pode ser justificado pela ausência de uma etapa de concentração e pela variação do volume utilizado em cada teste, além disso, não são métodos quantitativos confiáveis e não permitem a diferenciação morfológica da espécie (Smith *et al*., 2024). Registrou-se uma concordância perfeita entre o esfregaço espesso e o TKM (kappa = 1,0), porém ambos identificaram apenas 19,4% dos 103 cães infectados, valor inferior ao ELISA (29,1%), evidenciando a limitação da microscopia como única ferramenta de triagem (Trancoso *et al*., 2020).

A principal restrição compartilhada pelas técnicas microscópicas é a incapacidade de detectar infecções ocultas, nas quais vermes adultos estão presentes, porém a microfilaremia é suprimida por resposta imunológica do hospedeiro, por infecção exclusivamente masculina ou por uso prévio de terapia microfilaricida (Panarese *et al*., 2020). Observou-se uma alta porcentagem de infecção oculta, o que destaca o valor diagnóstico do teste de antígeno na detecção de cães amicrofilarêmicos (Monteiro *et al*., 2026). Em contrapartida, a positividade exclusiva no TKM em alguns animais foi atribuída a infecções por outras espécies de filarídeos, baixas cargas parasitárias ou à formação de imunocomplexos (Panarese *et al*., 2020). Nesse contexto, abordagens alternativas têm emergido para mitigar esses desafios, especialmente no campo da pesquisa (Murillo *et al.,* 2024a).

Os testes de detecção de antígeno de *D. immitis*, baseados na identificação de proteínas, representam a abordagem de melhor relação custo-benefício e de uso mais difundido na clínica veterinária de pequenos animais. Disponibilizados como kits imunocromatográficos rápidos (*point-of-care*, POC) ou como ensaios ELISA, esses testes são recomendados pela AHS (2024) como método de triagem em cães em conjunto com a pesquisa de microfilárias, sendo considerados indispensáveis ao protocolo de diagnóstico anual (Pietrzak *et al*., 2024).

Dentre as opções comerciais disponíveis, destaca-se o *SNAP® 4Dx® Plus* (*IDEXX Laboratories*, Westbrook, Estado Unidos), que realiza a detecção combinada do antígeno de *D. immitis* e de anticorpos contra *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* e *Ehrlichia* spp. No entanto, uma limitação

inerente ao teste consiste na detecção específica de uma proteína uterina secretada por fêmeas adultas, o que impede a detecção em infecções exclusivas por espécimes machos ou quando a fêmea ainda não atingiu a fase adulta (Pietrzak *et al*., 2024).

Em contrapartida, o kit *Uranotest*® Dirofilariose (Uranovet, Barcelona, Espanha) identifica um antígeno de 14 Kda independente do sistema reprodutor feminino, permitindo a positividade no teste com a presença de parasitos de ambos os sexos e em diferentes estágios de maturação. Segundo os dados do fabricante, o ensaio apresenta sensibilidade de 94% e especificidade de 100% em relação ao exame necroscópico. Embora seja amplamente utilizado na Europa, sua disponibilidade no Brasil ainda é limitada.

O fenômeno do bloqueio de antígeno, no qual complexos imunes circulantes se ligam ao antígeno parasitário e o tornam inacessível aos anticorpos do teste, é um dos principais responsáveis pela ocorrência de resultados falso-negativos (Gruntmeir *et al*., 2020). Demonstrou-se que o tratamento térmico (*heat treatment*, HT) resultou no aumento de 64,4% na taxa de detecção positiva (de 7,3% para 12,3% em 616 cães) (DiGangi *et al*., 2017). Da mesma forma, esses achados foram confirmados ao serem analisados 3.253 cães aparentemente saudáveis nos EUA, verificando aumento na prevalência de 3,8% (sem HT) para 7,3% (com HT), com ampliação da distribuição geográfica de 32 para 39 estados (Murillo *et al*., 2024b).

Resultados ainda mais discrepantes foram observados em área de alta endemicidade na Itália, com o TKM detectando 44,4% dos cães infectados e 58,1% por meio do ELISA, valores que subiram para 79,6% quando o HT foi utilizado (Panarese *et al.,* 2020). Sugere-se que o aquecimento prévio das amostras de soro atua na quebra dos imunocomplexos e liberação de antígenos, consequentemente, aumenta a precisão do teste (DiGangi *et al*., 2017). Entretanto, essa prática ainda não está incluída nas instruções de nenhum teste de antígeno comercialmente disponível para *D. immitis* (Pietrzak *et al*., 2024).

Foram avaliados comparativamente três testes comerciais (*Witness*® *HW*, *SNAP*® *Heartworm RT* e *DiroCHEK*®) em 150 amostras de plasma canino (50 positivas, 50 borderline e 50 negativas), encontrando sensibilidade de 97,0% para o *Witness*® *HW* e de 90,9% para o *SNAP*® *RT* (diferença estatisticamente significativa, p = 0,003), com especificidades acima de 96% para ambos os testes (Starkey *et al.,* 2017). As discordâncias se concentraram no grupo borderline (18% de discordância), reforçando que amostras de baixa carga antigênica também são um desafio para os testes POC.

Avaliou-se a presença de antigenúria utilizando o teste comercial *DiroCHECK*® a partir de amostras pareadas de sangue e urina em cães infectados experimentalmente e cães com status de infecção desconhecido (Brown *et al*., 2025). Os resultados confirmaram a excreção do antígeno de *D. immitis* pela via urinária e a técnica apresentou alta especificidade, porém, demonstrou limitações quando aplicada à rotina devido à sensibilidade inferior às obtidas em amostras sanguíneas. Portanto, embora promissora, a detecção de antigenúria ainda carece de validação e refinamento técnico, não sendo recomendada para a rotina de triagem diagnóstica na prática clínica atual.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variantes representam a abordagem de maior acurácia para identificação e diferenciação de espécies de *Dirofilaria*, com a vantagem adicional de detectar material genético em amostras nas quais antígenos ou microfilárias não são evidenciados pelos métodos convencionais. Em 300 cães de abrigo no Texas, comparou-se o qPCR *probe-based* com o TKM e o *DiroCHEK*® com e sem tratamento térmico. O qPCR identificou 20,7% dos cães como positivos (62/300), em contraste com 18,3% pelo TKM (55/300) e 24,7% pelo *DiroCHEK*® sem HT, com concordância excelente entre qPCR e TKM (kappa = 0,92) (Negron *et al*., 2022). A combinação qPCR + *DiroCHEK*® pós-HT elevou a detecção para 29,3%, resultado idêntico ao obtido com TKM + *DiroCHEK*® pós-HT, sugerindo que o qPCR pode substituir funcionalmente o Knott quando combinado ao teste de antígeno tratado termicamente.

A qPCR apresenta vantagens sobre o TKM por não apresentar reação cruzada com *A. reconditum*, que seria uma diferenciação relevante do ponto de vista clínico, porém exige infraestrutura laboratorial especializada e custo mais elevado. Foi desenvolvido um protocolo de qPCR multiplex para detecção simultânea de marcadores de *D. immitis* e de seu endossimbionte *Wolbachia*, obtendo eficiência de 90-100% e concordância perfeita (kappa = 1,0) para o marcador específico de *D. immitis* em comparação ao TKM, com o marcador de *Wolbachia* apresentando kappa = 0,93, reforçando a utilidade dessa abordagem em estudos de prevalência e no monitoramento de tratamentos adulticidas (Lau *et al.*, 2024).

O LAMP (*Loop-mediated Isothermal Amplification*) surge como alternativa promissora aos métodos de PCR convencional, dispensando o uso de termociclador e permitindo realização em campo ou em laboratórios de infraestrutura básica (Avendaño & Patarroyo, 2020). Avaliou-se o LAMP como substituto do TKM combinado ao teste de antígeno como triagem e encontraram desempenho comparável ao qPCR para detecção de microfilaremia por *D. immitis*, com vantagem de rapidez de execução (60 minutos) e menor custo por reação (Cho *et al.*, 2024). Considera-se o LAMP, juntamente com o ddPCR (*digital droplet* PCR) e a detecção de microRNAs circulantes, como tecnologias emergentes que poderão transformar o diagnóstico da dirofilariose nas próximas décadas, embora ainda não estejam disponíveis comercialmente de forma padronizada para uso veterinário (Pietrzak *et al.,* 2024).

Discussão

A análise comparativa dos métodos diagnósticos avaliados confirma que nenhuma técnica isolada reúne, de forma simultânea, todos os atributos desejados: Alta sensibilidade, alta especificidade, baixo custo, simplicidade técnica, disponibilidade no mercado, adequação a diferentes cenários clínicos e epidemiológicos (Negron *et al.*, 2022; Lane *et al.*, 2021). Esse consenso é amplamente documentado na literatura e fundamenta a recomendação do uso combinado de métodos como estratégia diagnóstica de referência (AHS, 2024).

O tratamento térmico prévio das amostras emerge como a intervenção de maior impacto sobre a sensibilidade dos testes de antígeno, com redução expressiva de resultados falso-negativos causados pelo bloqueio de antígeno por complexos imunes. Os estudos de Murillo *et al.* (2024b) e DiGangi *et al.* (2017) demonstraram aumento de 64,4% e de quase o dobro na detecção, respectivamente, sem comprometimento da especificidade dos testes. Apesar dessas evidências, o HT ainda não é prática comum nos laboratórios veterinários brasileiros, representando uma oportunidade de exploração científica para validar a eficácia dessa técnica frente às particularidades epidemiológicas locais.

As técnicas microscópicas, em especial o TKM, continuam sendo ferramentas valiosas quando há necessidade de identificação morfológica de microfilárias para diferenciação de espécies e quando o monitoramento da microfilaremia faz parte do plano terapêutico. Embora o TKM seja reconhecido por sua maior sensibilidade na identificação de baixas microfilaremias em comparação às técnicas mais rápidas, sua incapacidade de diagnosticar a dirofilariose oculta inviabiliza seu uso como método exclusivo de triagem (Smith *et al.*, 2024).

No contexto brasileiro, os dados de Monteiro *et al.* (2026) e Trancoso *et al.* (2020) indicam que a dirofilariose canina é uma doença emergente ou em expansão em diversas regiões do país, com prevalências que superam 30% em municípios do litoral fluminense e da Bahia. Esse cenário reforça a urgência de protocolos de triagem conforme recomendado pela AHS (2024). Embora as técnicas moleculares ofereçam máxima acurácia, seu uso na rotina laboratorial ainda é restrito devido ao custo elevado e infraestrutura complexa. Apesar dessa limitação, o diagnóstico molecular desempenha um papel indispensável na confirmação de resultados ambíguos.

Conclusão

Esta revisão evidenciou que as técnicas microscópicas, sorológicas e moleculares são complementares entre si. O tratamento térmico de amostras sanguíneas antes dos testes de antígeno mostrou ser uma intervenção de impacto na sensibilidade diagnóstica. O qPCR *probe-based* constitui alternativa válida ao teste de Knott modificado quando associado ao teste de antígeno, que continua sendo uma ferramenta eficaz e de baixo custo, considerada padrão-ouro para pesquisa de microfilárias.

Referências

AMERICAN HEARTWORM SOCIETY. American Heartworm Society canine guidelines for the prevention, diagnosis, and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. **American Heartworm Society**, Wilmington, DE, 2024.

AVENDAÑO, C.; PATARROYO, M. A. Loop-mediated isothermal amplification as point-of-care diagnosis for neglected parasitic infections. **International Journal of Molecular Sciences,** v. 21, n. 21, p. 7981, 2020. DOI: 10.3390/ijms21217981

BROWN, A. C. et al. Dirofilaria immitis antigen detection in the urine of dogs with known and unknown infection status. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 37, n. 4, p. 584-591, 2025. DOI: 10.1177/10406387251327415
.

CHO, J. *et al*. Loop-mediated isothermal amplification polymerase chain reaction in place of a modified Knott test in screening dogs for heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection combined with antigen detection test. **American Journal of Veterinary Research**, v. 85, n. 9, 2024. DOI: 10.2460/ajvr.24.02.0027.

DIGANGI, B. A. *et al*. Impact of heat treatment on *Dirofilaria immitis* antigen detection in shelter dogs. **Parasites & Vectors**, v. 10, supl. 2, n. 483, p. 1-10, 2017. DOI: 10.1186/s13071-017-2443-7.

GRUNTMEIR, J. M. *et al*. Canine heartworm and heat treatment: An evaluation using a well based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and canine sera with confirmed heartworm infection status. **Veterinary parasitology**, v. 283, p. 109169, 2020.

LANE, J. N. *et al*. Optimizing heartworm diagnosis in dogs using multiple test combinations. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 224, p. 1-12, 2021. DOI: 10.1186/s13071-021-04715-4.

LAU, D. C. W.; POWER, R. I.; SLAPETA, J. Exploring multiplex qPCR as a diagnostic tool for detecting microfilarial DNA in dogs infected with *Dirofilaria immitis*: a comparative analysis with the modified Knott's test. **Veterinary Parasitology**, v. 325, p. 110097, 2024. DOI: 10.1016/j.vetpar.2023.110097.

MONTEIRO, A. C. M. P. *et al*. Emergence of *Dirofilaria immitis* in humid coastal zones: epidemiological predictors and molecular characterization. **The Veterinary Journal**, v. 317, p. 106676, 2026. DOI: 10.1016/j.tvjl.2026.106676

MURILLO, D. F. B.; MOYE, A.; WANG, C. Heat treatment augments antigen detection of *Dirofilaria immitis* in apparently healthy companion dogs (3.8% to 7.3%): insights from a large-scale nationwide survey across the United States. **Pathogens**, v. 13, n. 56, p. 1-14, 2024b. DOI: 10.3390/pathogens13010056.

MURILLO, D. F. B; CAMPBELL, E. J.; MOORHEAD, A. R.; WANG, C. Evaluation of diagnostic techniques for early detection of heartworm in experimentally infected dogs: identification of *Dirofilaria immitis*-derived microRNA in the initial 28 weeks post-inoculation. **Parasites & Vectors**, v. 17, n. 258, p. 1-14, 2024a. DOI: 10.1186/s13071-024-06337-y.

NEGRON, V. *et al*. Probe-based qPCR as an alternative to modified Knott's test when screening dogs for heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in combination with antigen detection tests. **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 306, p. 1-13, 2022. DOI: 10.1186/s13071-022-05372-x.

PANARESE, R. *et al*. Comparison of diagnostic tools for the detection of *Dirofilaria immitis* infection in dogs. **Pathogens**, v. 9, n. 499, p. 1-14, 2020. DOI: 10.3390/pathogens9060499.

PEROBA, S. C.; SPERANDIO, N. C.; MARTINS, I. V. F. Identificação e diferenciação morfológica de microfilárias no sangue de cães do Espírito Santo. **Pubvet**, v. 16, n. 03, 2022. DOI: 10.31533/pubvet.v16n03a1075.1-6

PIETRZAK, D.; LUCZAK, J. W.; WISNIEWSKI, M. Detecting *Dirofilaria immitis*: current practices and novel diagnostic methods. **Pathogens**, v. 13, n. 950, p. 1-24, 2024. DOI: 10.3390/pathogens13110950.

SMITH, R. C.; TOMLINSON, T. D.; BOWLES, J. V.; STARKEY, L. A. Comparative performance analysis of different microfilaria testing methods for *Dirofilaria immitis* in canine blood. **Parasites &**

Vectors, v. 17, n. 460, p. 1-10, 2024. DOI: 10.1186/s13071-024-06537-6.

SOARES, L. A. *et al.* Prevalence and factors associated with *Dirofilaria immitis* infection in dogs in Sertão Paraibano, Northeast Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 42, p. e07041, 2022. DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-7041

STARKEY, L. A.; BOWLES, J. V.; PAYTON, M. E.; BLAGBURN, B. L. Comparative evaluation of commercially available point-of-care heartworm antigen tests using well-characterized canine plasma samples. **Parasites & Vectors**, v. 10, supl. 2, n. 475, p. 1-7, 2017. DOI: 10.1186/s13071-017-2447-3.

TRANCOSO, T. A. L. *et al*. Detection of *Dirofilaria immitis* using microscopic, serological and molecular techniques among dogs in Cabo Frio, RJ, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 29, n. 1, p. e017219, 2020. DOI: 10.1590/S1984-29612020009.

ZAJAC, A. M.; CONBOY, G. A.; LITTLE, S. E.; REICHARD, M. V. **Veterinary clinical parasitology**. 9. ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2021.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.