

CONFIRMAÇÃO MOLECULAR DO TESTE DE KNOTT MODIFICADO (TKM) NO DIAGNÓSTICO DE MICROFILÁRIAS EM CÃES

Hanna Salomon Ribeiro, Faiane Reila Sousa Centenaro Duarte, Amanda Martins Ungri,
Larissa Vieira Mazzucco, Rafaela Gil Bossle, Thayná Fiorentin Moreira, Larissa Américo,
Felipe Rieth de Lima, Ana Paula Remor Sebolt, Andreas Lazaros Chryssafidis

INTRODUÇÃO

Os filarídeos *Acanthocheilonema reconditum* e *Dirofilaria immitis* acometem cães no Brasil e são transmitidos por vetores hematófagos. Embora pertençam à mesma família (Onchocercidae), diferem quanto ao ciclo biológico, local de parasitismo e impacto clínico (Genchi; Kramer, 2020). *A. reconditum* utiliza pulgas e piolhos como hospedeiros intermediários e parasita tecidos subcutâneos e gorduras viscerais. Já *D. immitis*, transmitida por mosquitos, pode gerar grave enfermidade devido às alterações causadas pelo parasitismo em artérias pulmonares e câmaras cardíacas (Hanh, 1999). O diagnóstico diferencial é fundamental, pois erros podem levar a terapias inadequadas e risco à saúde dos animais (Carli, 2007). Nesse contexto, o teste de Knott modificado (TKM), adaptado da descrição por Newton e Wright (1956), constitui técnica clássica de concentração de microfilárias sanguíneas, baseada na hemólise das hemácias seguida de centrifugação, o que permite a recuperação e visualização das larvas e suas estruturas morfológicas. Trata-se de um método de fácil execução, baixo custo e elevada sensibilidade, possibilitando a mensuração das microfilárias e a avaliação de parâmetros morfométricos, como comprimento, largura e características das extremidades cefálica e caudal (Magnis et al., 2013). O presente estudo faz parte de um projeto que avalia a ocorrência destes filarídeos em cães do município de Lages por TKM, realizando-se aqui a confirmação da identidade dos parasitos por técnica de biologia molecular (PCR).

DESENVOLVIMENTO

Foram utilizadas amostras de sangue total de cães (N = 7), provenientes de diferentes áreas do município de Lages – Santa Catarina, sendo cinco identificadas como positivas por meio do TKM, e duas negativas (Duarte, 2024), além de um controle positivo e um controle negativo por reação. A extração do DNA foi realizada com Kit QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), conforme as instruções do fabricante. Após a extração, o DNA foi quantificado por espectrofotometria, avaliando-se concentração e pureza (NanoDrop, Thermo Fischer Scientific, Estados Unidos). Para a detecção molecular por PCR, foram empregados primers específicos para *A. reconditum* e para *D. immitis* (Mar et al., 2002), que geram amplicons de 348 pb e 302 pb, respectivamente. Os produtos amplificados foram revelados em eletroforese em gel de agarose 1,5%.

RESULTADOS

Nas cinco amostras positivas pelo TKM para *A. reconditum*, foram observadas bandas nítidas de 348 pb, enquanto que, para *D. immitis*, não houve amplificação em nenhuma das cinco amostras (Figura 1). As duas amostras negativas no TKM também não apresentaram amplificação para nenhum dos dois parasitos. Os controles positivos apresentaram bandas nos tamanhos esperados, enquanto os controles negativos não exibiram amplificação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os achados demonstraram concordância de 100% entre os dois métodos utilizados nas amostras testadas, confirmando a confiabilidade e especificidade do TKM. Além de ser uma técnica de fácil execução, baixo custo e alta sensibilidade, o TKM foi confirmado e validado como padrão-ouro para o diagnóstico e a distinção morfométrica entre *D. immitis* e *A. reconditum*. A PCR corroborou os resultados obtidos previamente, reforçando a precisão diagnóstica e evidenciando que o TKM é referência para a triagem em estudos epidemiológicos e na rotina laboratorial.

Palavras-chave: filarídeos; PCR; microfilárias; cães; diagnóstico parasitológico.

ILUSTRAÇÕES

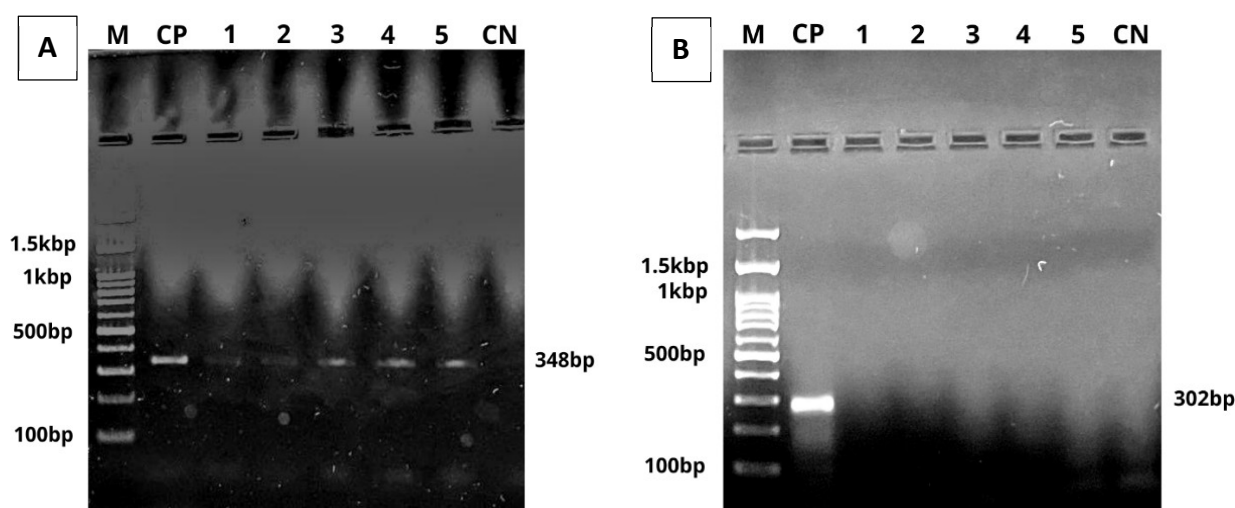


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose (1,5%): (A) amplicons de 348 pb para *Acanthocheilonema reconditum*. (B) ausência de amplicons de 302 pb para *Dirofilaria immitis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARLI, G. DE A. DE. **Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas.** 2ª ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2007.

DUARTE, F. R. S. C. et al. Prevalência da infecção por *Acanthocheilonema reconditum* em cães no município de Lages, Santa Catarina. 2024. – Dados não publicados.

GENCHI, C.; KRAMER, L. H. **The prevalence of *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in the Old World.** *Veterinary Parasitology* Elsevier B. V., 1 abr. 2020

HAHN, N. E. Parasitas do sangue. In: SLOSS, M. W.; ZAJAC, A. M.; KEMP, R. L. Parasitologia Clínica Veterinária. 6ª edição. São Paulo: Manoele, 1999. p. 101-120

MAGNIS, J. et al. **Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis.** Parasites & Vectors, 6(1), 48. 2013.

DADOS CADASTRAIS

BOLSISTA: Hanna Salomon Ribeiro

MODALIDADE DE BOLSA: PIBIC/ AF/CNPq

VIGÊNCIA: 09/2024 a 08/2025 – Total: 12 meses

ORIENTADOR: Andreas Lazaros Chryssafidis

CENTRO DE ENSINO: CAV

DEPARTAMENTO: Medicina Veterinária

ÁREAS DE CONHECIMENTO: Ciências Agrárias/ Medicina Veterinária/ Medicina Veterinária Preventiva/ Doenças Parasitárias dos Animais

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA: Investigação da ocorrência de *Acanthocheilonema reconditum* em cães no município de Lages – SC.

Nº PROTOCOLO DO PROJETO DE PESQUISA: NPP4272-2023