FACULTADE DE MEDICINA E ODONTOLOXIA

Departamento de Psiquiatría, Radioloxía e Saúde Pública

Tese de Doutoramento

SEROPREVALÊNCIA DE DIROFILARIOSE (*DIROFILARIA IMMITIS*) NA POPULAÇÃO CANINA E FELINA DO CONCELHO DA FIGUEIRA DA FOZ, PORTUGAL. UM RISCO PARA A SAÚDE HUMANA?

Ana Luísa Nobre de Matos Pereira Vieira

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2015

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

FACULTADE DE MEDICINA E ODONTOLOXIA

Departamento de Psiquiatría, Radioloxía e Saúde Pública

Tese de Doutoramento

SEROPREVALÊNCIA DE DIROFILARIOSE (*DIROFILARIA IMMITIS*) NA POPULAÇÃO CANINA E FELINA DO CONCELHO DA FIGUEIRA DA FOZ, PORTUGAL. UM RISCO PARA A SAÚDE HUMANA?

Asdo. .....

Ana Luísa Nobre de Matos Pereira Vieira

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2015

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

D. JUAN JESÚS GESTAL OTERO, catedrático de Medicina Preventiva e Saúde Pública da Universidade de Santiago de Compostela

e

D. PABLO DÍEZ BAÑOS, catedrático de Sanidade Animal, da Universidade de Santiago de Compostela, Faculdade de Medicina Veterinária, Campus de Lugo.,

CERTIFICAN

Que Dona **Ana Luísa Nobre de Matos Pereira Vieira**, Licenciada en Medicina Veterinária, realizou baixo a sua dirección o traballo: *Seroprevalência de Dirofilariose (Dirofilaria immitis) na população canina e felina do concelho da Figueira da Foz, Portugal: um risco para a saúde humana?*, para obter o grao de Doutor.

Unha vez revisado, consideran reúne condicións para ser presentado e defendido publicamente ante o tribunal, polo que autorizan a súa presentación.

Santiago de Compostela, 19 de Xuño de 2015.

Asdo: Juan Jesús Gestal Otero

Asdo: Pablo Díez Baños

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

”Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante”

(Antoine de Saint-Exupéry)

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

O Programa de Doutoramento foi realizado no contexto de uma Bolsa de Doutoramento (SFRH/BD/64692/2009) financiada pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) e o programa POPH/FSE.

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Aos meus pais, Dora e Fernando,
pelo exemplo e pela ajuda

Ao meu marido João e à minha filha Mariana,
pela energia e amor que me oferecem
diariamente

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMENTOS

Os meus mais sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador, Professor Doutor Juan Gestal Otero, da Universidade de Santiago de Compostela, pela confiança manifestada e por ter acreditado neste projeto. Pela sua disponibilidade, ajuda e apoio na realização desta dissertação.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor Pablo Diez Banos, da Universidade de Santiago de Compostela, Faculdade de Medicina Veterinária, Campus de Lugo, pela disponibilidade manifestada para colaborar neste trabalho e pelas sugestões muito úteis para a sua evolução. Agradeço todo o apoio na preparação dos artigos científicos resultantes deste estudo e na elaboração da tese.

À Fundação para a Ciências e a Tecnologia (FCT), pelo apoio financeiro prestado, que permitiu a realização deste projecto.

A toda a equipa da Clinicão – Hospital Veterinário da Figueira da Foz por todo o apoio e paciência demonstrada na realização deste trabalho. Sem eles teria sido impossível a sua execução.

A toda a equipa da Associação Protectora dos Animais da Figueira da Foz por terem permitido e ajudado na recolha de amostras e por proporcionarem condições de vida mais dignas a todos os canídeos abandonados na Figueira da Foz .

À MINHA FAMÍLIA:

Aos meus pais, Fernando Vieira e Dora Matos, pelo apoio incondicional na perseguição dos meus sonhos e pelo estímulo constante.

À minha irmã Maria João Vieira por desbravar o caminho e dar-me sempre o seu apoio.

Ao meu cunhado João Oliveira pelas imensas noites passadas a tentar tornar os meus hieróglifos em algo legível.

À minha tia Vera Lúcia e à minha avó Maria Helena Carrilho por todo o apoio, carinho, amor e paciência constante, durante toda a minha vida e essencialmente na realização deste trabalho. Ao meu avô Chico pelas brincadeiras e carinho e por estar sempre presente.

Aos meus sogros, Júlia Esteves e Mário Machado, e aos meus cunhados Rui Machado e Catarina Diz, por todo o carinho sempre demonstrado.

Aos meus sobrinhos, Joãozinho, Inês, Maria e Francisca por todos os sorrisos e carinhos.

AOS MEUS AMIGOS, por compreenderem as minhas ausências e por continuarem a ser meus amigos.

Ao meu marido João Machado pela paciência, carinho, disponibilidade incondicional, por compreender as minhas ausências, pelas sugestões e pela permanente colaboração ao longo deste trabalho.

À Mariana, por ser parte de mim.

A todos os que de alguma forma possibilitaram ou tornaram mais simples a realização deste trabalho

RESUMO

A dirofilariose é uma doença parasitária causada por um nemátode da espécie *Dirofilaria immitis* (Leidy 1856), considerada uma antropozoonose pela Organização Mundial de Saúde desde 1979. A *Dirofilaria immitis* tem como vetores mosquitos dos géneros: *Culex, Aedes, Anopheles, Mansonia,* para completar o seu ciclo de vida. Os canídeos são os principais hospedeiros definitivos, mas também estão descritos felídeos, mustelídeos, primatas e até mesmo o homem. As dirofilárias adultas localizam-se na artéria pulmonar, podendo também afetar o coração direito e as microfilárias circulam no sangue.

Apesar da sua longa história e da existência no mercado de métodos de profilaxia eficazes, a *D.immitis* continua a disseminar-se e a instalar-se em zonas consideradas não endémicas. Fatores como o aquecimento global, o aumento da população de mosquitos, o movimento de animais hospedeiros entre países e a abundância de reservatórios em animais selvagens têm contribuído para essa disseminação.

Devido ao risco para a Saúde Pública é de extrema importância conhecer a prevalência e distribuição da doença. Portugal é considerado um país enzóotico para a *D.immitis* e o concelho da Figueira da Foz, na região centro de Portugal, reúne as condições climatéricas e atividades sócio-económicas que permitem o desenvolvimento do vetor e a disseminação da doença.

O presente trabalho teve como objetivo determinar a prevalência e os fatores de risco da infeção por *D. immitis* em cães e gatos do concelho da Figueira da Foz e avaliar o seu possível impacto na Saúde Pública.

No período de Novembro de 2009 a Julho de 2012, foram recolhidas amostras de sangue de 304 cães e 100 gatos, obtidas de animais com mais de 1 ano de idade, que habitavam na Figueira da Foz, e sem história prévia de prevenção ou diagnóstico de dirofilariose.

As amostras de sangue canino foram analisadas mediante exame direto de sangue, microhematócrito, técnica Knott modificada, teste de pesquisa de antigénio ELISA Snapp ® Idexx. Quando se detetou microfilaremia foi realizada a técnica de coloração histoquímica por fosfatase ácida para identificar a espécie de microfilária.

No caso de gatos, além das técnicas mencionadas, foi utilizado o teste de pesquisa de antigénio Snap® Feline Triple® Idexx e teste de pesquisa de anticorpo Heska Solo Step FH®. Sempre que se obteve um resultado positivo nos testes, foi realizada uma radiografia torácica, e quando possível, uma ecocardiografia e necrópsia.

Constatou-se uma prevalência de *D.immitis* em 27.3% dos cães testados, sendo 74,7% das infeções microfilaremicas e 25,3% infeções ocultas. Através da técnica de coloração histoquímica pela fosfatase ácida, identificou-se 96,4% das amostras microfilaremicas como pertencentes à espécie *D.immitis.* Verificou-se ainda que 64% dos animais parasitados eram assintomáticos.

Foram determinados os seguintes factores de risco: cães entre os 4 e 9 anos, de raça média e grande, que vivam em zonas rurais, e que habitem no exterior, e cães de guarda e de caça.

Constatou-se uma prevalência de *D.immitis* em 16% dos gatos testados, dos quais 16 obtiveram um resultado positivo no teste de pesquisa de anticorpos, e apenas dois foram positivos no teste de pesquisa de antigénio e em quatro gatos identificou-se o parasita adulto atráves da ecocardiografia. Não foram identificadas microfilárias pelo

exame microscópio directo de sangue fresco e pela técnica de Knott modificada. O estudo também determinou que os gatos não esterilizados e com menor peso tinham maior risco de infeção.

Os resultados deste estudo demonstraram, pela primeira vez, a prevalência elevada de dirofilariose canina e felina, na Figueira da Foz. Estes resultados reforçam a importância de um rastreio sistemático da doença, assim como a necessidade de prevenção dos cães e gatos desta área geográfica. Enfatiza ainda a necessidade de sensibilizar tanto os proprietários como os médico veterinários e profissionais de saúde, de modo a evitar a disseminação da doença parasitária delo país, minimizando o risco para a Saúde Pública e a necessidade de implementação de programas de controlo da parasitose.

Palavras Chave
Cão, *Dirofilaria immitis*, ELISA, epidemiologia, Figueira da Foz, gato, Knott, Portugal, seroprevalência

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RESUMEN

La dirofilariosis es una enfermedad parasitaria causada por un nematodo de la especie *Dirofilaria immitis* (Leidy 1856), considerada desde 1979 una zoonosis por la Organización Mundial de la Salud. *D. immitis* para completar su ciclo vital tiene como vectores mosquitos de los géneros: *Culex, Aedes, Anopheles, Mansonia,* siendo los cánidos sus principales huéspedes definitivos, pero también están descritos felinos, mustélidos, primates e incluso los humanos. Las dirofilarias adultas se localizan en la arteria pulmonar, pudiendo también afectar el corazón derecho circulando las microfilarias por la sangre.

A pesar de su larga historia y de la existencia en el mercado de métodos eficaces de profilaxis, *D. immitis* continua diseminándose e instalándose en zonas consideradas no endémicas, a lo que han contribuido factores como el calentamiento global, el aumento de la población de mosquitos, el movimiento de animales hospedadores entre países y la abundancia de reservorios silvestres.

Debido al riesgo que supone para la Salud Pública, es importante conocer la prevalencia y distribución de la enfermedad en Portugal, país considerado enzoótico para *D. immitis.* El municipio de Figueira da Foz, en la región centro de Portugal, reúne las condiciones climáticas y actividades socio-económicas que permiten el desarrollo del vector y la diseminación de la enfermedad.

El presente estudio tiene como objetivo determinar la prevalencia y los factores de riesgo de la infección por *D. immitis* en perros y gatos del municipio de Figueira da Foz, y evaluar su posible impacto en la Salud Pública.

Durante el período comprendido entre noviembre de 2009 y julio de 2012, se recogieron muestras de sangre de 304 perros y 100 gatos de más de un año de edad sin historia previa de prevención ni diagnóstico de dirofilariosis, que vivían en Figueira da Foz.

Las muestras de sangre canina fueron analizadas mediante examen directo de sangre, microhematócrito, técnica de Knott modificada y ELISA Snapp ® Idexx para la detección de antígeno. En los casos de microfilaremia se realizó la técnica de coloración histoquímica por fosfatasa ácida para identificar la especie de microfilaria.

En los gatos, además de las técnicas antes citadas, se utilizó el test Snap® Feline Triple® Idexx, para la detección de antígeno, y el test Heska Solo Step FH® para la detección de anticuerpos. Cuando se obtuvo un resultado positivo en dichos tests se realizó una radiografía torácica, e cuando sea posible una ecocardiografía y necropsia.

Observamos una prevalencia de *D. immitis* del 27.3% de los perros investigados, siendo el 74,7% de las infecciones microfilarémicas y el 25,3% infecciones ocultas. Con la técnica de coloración histoquímica por la fosfatasa ácida, comprobamos que el 96,4% de las muestras microfilarémicas pertenecían a la especie *D. immitis,* y que el 64% de los animales parasitados eran asintomáticos.

Se determinaron los siguientes factores de riesgo: perros entre 4 y 9 años, de raza mediana y gran e, que viven en zonas rurales, al aire libre, y perros guardianes y de caza.

En los gatos observamos una prevalencia de *D. immitis* del 16%. En 16 fue positivo el test de anticuerpos, y solo en 2 el test de antígeno, identificándose el parásito adulto a través de ecocardiografía en 4 gatos. No se identificaron microfilarias mediante microscopía directa en sangre fresca ni con la técnica de Knott modificada. El estudio

también mostró que los gatos no esterilizados y con menor peso tenían mayor riesgo de infección.

Los resultados de este estudio, demuestran por primera vez, la elevada prevalencia de dirofilariosis canina y felina en Figueira da Foz, y refuerzan la importancia del rastreo sistemático de la enfermedad así como la necesidad de su prevención en los perros y gatos de este área geográfica. También revelan en la necesidad de sensibilizar tanto a los propietarios de animales como a los veterinarios y profesionales de la salud sobre el modo de evitar la diseminación de esta enfermedad parasitaria en el país, minimizando el riesgo para la Salud Pública, así como la necesidad de implementar programas de control de esta parasitosis.

Palabras clave:
Dirofilaria immitis, ELISA, epidemiología, Figueira da Foz, gato, Knott, perro Portugal, seroprevalencia

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

SUMMARY

Dirofilariasis is a parasitic disease caused by a nematode of the species *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856), which is considered to be a zoonosis by the World Health Organization since 1979. It's also known as heartworm disease. *D. immitis* depends on mosquito vectors of the genera *Culex, Aedes, Anopheles, Mansonia,* to complete its life cycle. Canine are the main definitive hosts, but also feline, mustelidae and primates, including humans, have been affected by this disease. Adult heartworms are located mainly in the pulmonar artery, but can also affect the right heart cavities; microfilariae circulate on the bloodstream.

Despite their long history and the existence of efficacious preventive methods on the market, *D.immitis* keeps spreading and installing itself in areas which were considered to be non-endemic. Several factors such as global warming, increasing mosquitoes populations, migration of host animals between countries and emergence of several wild hosts have been decisive for this global dissemination of the disease.

It is extremely important to acknowledge this disease's prevalence and distribution, mainly because of the Public Health hazards. Portugal is considered to be an enzootic country for this disease and the city of Figueira da Foz in its central region has both the ideal climate and socio-economic activity that allow the development of the vector and the disease.

The present work had the main goal to determine the prevalence and risk factors of *D. immitis* infection in dogs and cats of the city of Figueira da Foz, as well as to assess its possible Public Health implications.

On the period between November 2009 and July 2012, blood samples were taken from 304 dogs and 100 cats, with age over one year old, living in Figueira da Foz and without previous history of prevention or diagnosis of heartworm disease.

The canine blood samples were analyzed by direct blood examination, microhematocrit, modified Knott technique and modified antigen test (Idexx ELISA Snapp®). When microfilaremia was detected, an histochemical technique with acid phosphatase was applied to identify the species of microfilaria present.

Blood samples taken from cats were additionally tested with the test for antigen detection Idexx Snapp® Feline Triple® and an antibody detection test Heska Solo Step FH®. Whenever a positive result was obtained, an additional thoracic radiograph and, when possible, an echocardiography and necropsy were obtained.

We identified a prevalence of 27.3% in dogs. Of all the positive dogs, 74,7% had microfilaremia and 25,3% were occult infections. Histochemical technique using acid phosphatase allowed for the classification of 96,4% of the microfilaremic samples as belonging to *D. immitis* species. We also verified that 64% of the positive animals were asymptomatic.

The following risk factors were identified: age between 4 and 9 years old; medium and large breed dogs; rural habitat; dogs living outdoors; dogs used for house guard and/or hunting.

In cats we found a total prevalence of 16%. Of the total 16 cats that tested positive on the antibody detection test, only two were positive also by antigen testing. In 4 cats we were also able to identifiy adult parasites on the echocardiography. We weren't able to identify any microfilariae, either by direct microscopic visualization or by modified Knott's technique. The study suggested that non sterilised cats and cats with lower weight were at higher risk of infection.

The results of this study have shown, for the first time, the high prevalence of both canine and feline heartworm disease in Figueira da Foz, Portugal. These results highlight the importance of systematic screening for this disease, as well as the absolute need to use preventive strategies both in dogs as in cats inhabiting this region. They also emphasize the need for animal owners, veterinarians and human healthcare providers to join efforts in the prevention of this parasitic disease, minimizing Public Health risks.

Keywords
Cat, *Dirofilaria immitis,* dog, ELISA, epidemiology, Figueira da Foz, Knott, Portugal. seroprevalence

LISTA DE PUBLICAÇÕES

A) Artigos Científicos

- Vieira, A.L., Vieira, M.J., Oliveira, J.M., Simões, A.R., Diez-Baños, P., Gestal, J. (2014). Prevalence of canine heartworm (Dirofilaria immitis) disease in dogs of central Portugal. *Parasite*. **21**(5). doi:10.1051/parasite/2014003.

- Vieira, A.L., Vieira, M.J., Oliveira, J.M, Simões, A.R., Diez-Baños, P., Gestal, J. (2014). Seroprevalence of heartworm (*Dirofilaria immitis)* disease in canine and feline population central Portugal. *Acta Parasitológica Portuguesa*. **20** (1/2): 145.

B) Comunicações em Congressos Nacionais e Internacionais

- Vieira, A.L., Vieira, M.J., Oliveira, J.M., Simões, A.R., Diez-Baños, P., Gestal, J. (2014). Seroprevalence of feline heartworm (*Dirofilaria immitis)* disease in cats of central Portugal. *Fourth European Dirofilaria and Angiostrongylus Days (FEDAD) –ESDA*. Budapeste. Hungria. (**Comunicação oral)**

- Vieira, A.L., Vieira, M.J., Oliveira, J.M., Simões, A.R., Diez-Baños, P., Gestal, J. (2014). Seroprevalência de Dirofilariose (*Dirofilaria immitis)* na população canina e felina da região centro de Portugal. *XVII Congresso Português de Parasitologia*. Coimbra, Portugal. **(Comunicação oral)**

- Vieira, A.L., Vieira, M.J., Oliveira, J.M., Simões, A.R., , Otero, J. G. (2012). Seroprevalence of heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) in the canine population of Figueira da Foz, Portugal. *Third European Dirofilaria Days – EDIS*. Parma, Itália. ISBN-13:978-88-903582-6-5. (**Comunicação oral).**

- Vieira, A.L., Vieira, M.J., Oliveira, J.M., Simões, A.R., Gestal, J. (2012). Seroprevalência de dirofilariose (*Dirofilaria immitis*) na população canina do concelho da Figueira da Foz, Portugal. *VIII Congresso Hospital Veterinário Montenegro*. Santa Maria da Feira, Portugal. (**Comunicação oral**).

- Vieira, A.L., Pinto, I., Oliveira, J.M., Simões, A.R., Carrilho, J., Pereira, C., Olivério, P, Vieira, M.J.(2012). Extracção de *Dirofilaria immitis* intracardíaca por venotomia da jugular. *VIII Congresso Hospital Veterinário Montenegro*. Santa Maria da Feira, Portugal. (**Poster**).

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Percentagem
<	Menor
>	Maior
2D	Duas dimensões
A. dranculoides	*Acanthocheilonema dranculoides*
A. reconditum	*Acanthochleinema reconditum*
Ab	*Ancylostoma brasiliense*
Abr	Abril
Ac	Anticorpo
ADN	Ácido desoxirribonucléico
Ae.	*Aedes spp.*
Ag	Antigénio
Ago	Agosto
AHS	Sociedade Americana de Dirofilariose
ALT	Alanina aminotransferase
An.	*Anopheles spp*
Anc	*Ancylostoma caninum*
APAFF	Associação Protetora Animais da Figueira da Foz
AST	Aspartato aminotransferase
At.	*Ancylostoma Tubeforme*
Ausc.	Auscultação
B	Coeficiente estimado
BID	A cada 12 horas
BWBP	Plestimógrafo barométrico do corpo
C. grassi	*Cercopthifilaria grassi*

Card –Resp	Cardiorespiratório
Card.	Cardíaca
CC	Condição corporal
Cf	*Ctenocephalides felis*
CID	Coagulação intravascular disseminada
CK	Creatinina quinase
CK-MB	Isoezima MB da creatinina quinase
Cm	Centímetros
Cm^3	Centímetro cúbico
CmH_2O	Centímetro de água
CMV	Centro medicina veterinária
Comp	Comprimento
Cox	Subunidade da oxidase do citocromo C da mitocôndria
Crea	Creatinina
Cs.	*Coiquellettidia spp.*
Cvbd	Center vetor and borne disease
Cx.	*Culex spp.*
D	Precisão absoluta
D. ailure	*Dirofilaria ailure*
D. freitasi	*Dirofilaria freitasi*
D. immitis	*Dirofilaria immitis*
D. lutrae	*Dirofilaria lutrae*
D. repens	*Dirofilaria repens*
D. spectans	*Dirofilaria spectans*
D. tenuis	*Dirofilaria tenuis*
D. ursi	*Dirofilaria ursi*
Dc.	*Dypilidium caninum*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

DD	D-dímero
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
Dez	Dezembro
Dfel	Dirofilaria felina
Di	*Dirofilaria immitis*
DiE/S	Antigénio excretor/secretor da *Dirofilaria immitis*
Dipp	Péptido de *Dirofilaria immitis*
DiSA	Antigénio somático da *Dirofilaria immitis*
dl	Decilitro
DP	Desvio padrão
Dr	*Dirofilaria repens*
Dx.	*Demodex canis*
Eco	Ecografia
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Eg	*Echinococcus granulosus*
ELISA	"Enzyme linked immunosorbent assay"
Em	*Echinococcus multilocularis*
EP	Erro padrão
ERI	Taxa de infeção estimada
ESCCAP	Concelho Científico Europeu de Parasitas em Animais de Companhia
EUA	Estados Unidos da América
Ex.	Exemplo
Fa.	*Felicola substrata*
FAS	Fosfatase alcalina
FC	Frequência cardíaca
FDA	Food and Drugs Administration

FeLV	Vírus da Leucose felina
Fev	Fevereiro
FIV	Vírus da imunodeficiência felina
fl	Fentolitro
FN	Falso negativo
FP	Falso negativo
FR	Frequência respiratória
G	Grama
GB	Glóbulos Brancos
GGT	Gammaglutamiltransferase
GI.	Gastrointestinal
GIS	Sistema de informação geográfica
GLOB	Globulinas
GV	Glóbulos Vermelhos
H	Hora
Ha	Haplótipo
Hab	Habitante
HARD	Heartworm associated respiratory disease
Histo	Histopatologia
IC	Intervalo de confiança
ICAM	Molécula de adesão intercelular
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
IDP	Índice de distribuição das plaquetas
IECA	Inibidor da enzima conversora da angiotensina
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IM	Intramuscular

Int. Exer	Intolerância ao exercício
ITS2	Internal transcribed spacer region 2
IV	Intravenoso
Jan	Janeiro
Jul	Julho
Jun	Junho
Kg	Kilograma
Km	Quilómetro
km^2	Quilometro quadrado
L	Litro
l	Forma imatura
L1	Primeiro estado larvar
L2	Segundo estado larvar
L3	Terceiro estado larvar
L4	Quarto estado larvar
L5	Quinto estado larvar
LI	Limite inferior
LS	Limite superior
LtB	Leucotrieno
M	Média
m	Metro
Mai	Maio
Mar	Março
mARN	Ácido ribonucleico mensageiro
MCCH	Concentração média de hemoglobina
mcg	Micrograma
MCH	Hemoglobina corpuscular média

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Mf	Microfilária
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetros
mm^3	Milímetro cúbico
Ms.	*Mesecestoides spp*
mv	Milivolt
N	Norte
n	Amostra total
Necr.	Necrópsia
Neg.	Negativo
Neurol.	Neurológico
NO	Óxido nítrico
NOs	Noroeste
Nov	Novembro
ºC	Graus Celsius
Oc.	*Otodectes cynotis*
Oc.	*Ochleratatus spp.*
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	"Odds ratio"
Out	Outubro
p	Valor –p
P	Prevalência verdadeira
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
Palp.	Palpação
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pexp.	Prevalência esperada

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

pg	Picograma
PG	Prostaglandina
Plaq.	Plaquetas
PO	Por via oral
Pos.	Positivo
PT	Proteinas toais
Pulm.	Pulmonar
QUOD	A cada 48 horas
REVIVE	Rede de vigilância de vetores culicídeos em Portugal
Rpm	Rotações por minuto
Rx	Radiografia
S	Sul
SC	Subcutânea
Se	Sensibilidade
Sem	Semanas
Set	Setembro
SID	A cada 24 horas
Sint.	Sintomas
Sp	Especificidade
Spp.	Espécie
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
Ss.	*Sarcoptes scabiei*
SVC	Síndrome da veia cava
Tae.	*Taenia spp.*
Tc.	*Toxocara canis*
TcT.	*Toxocara catis*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Temp	Temperatura
Th	Linfócito T helper
TID	A cada 8 horas
TMI	Taxa mínima de infeção
TNF	Factor necrose tumoral
TRC	Tempo de repleção capilar
Trc.	*Trichodetes canis*
Tv.	*Trichuris vulpis*
TxB	Tromboxano
UDD	Unidade de desenvolvimento dia
UI	Unidade Internacional
Us	*Uncinaria stenocephala*
VCAM	Molécula de adesão celular vascular
VCM	Volume corpuscular médio
VEGF	Factor de crescimento vascular endotelial
VIN	Veterinary Network Information
VMP	Volume plaquetário médio
VN	Verdadeiro negativo
VP	Verdadeiro positivo
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
W	Oeste
WSP	Proteína de superfície da *Wolbachia spp.*
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrómetro

ÍNDICE GERAL

CAPITULO I – INTRODUÇÃO..... 1

1. DIROFILARIOSE CANINA..... 3
1.1. História..... 3
1.2. Etiologia..... 4
1.2.1. Taxonomia..... 4
1.2.2. Morfologia da *Dirofilaria immitis*..... 4
1.3. Ciclo de Vida..... 7
1.3.1. Hospedeiro invertebrado..... 8
1.3.2. Desenvolvimento da *Dirofilaria immitis* no hospedeiro invertebrado..... 14
1.3.3. Hospedeiro vertebrado..... 16
1.3.4. Desenvolvimento da *Dirofilaria immitis* no hospedeiro vertebrado. 16
1.3.5. Outras possibilidades de transmissão..... 18
1.4. Epidemiologia..... 18
1.4.1. Prevalência de *Dirofilaria immitis*..... 22
1.4.1.1 Fatores de Risco..... 22
1.4.1.2. Prevalência de dirofilariose no Mundo..... 24
1.4.1.3. Prevalência de dirofilariose em Portugal..... 30
1.5. Patogenia..... 31
1.5.1. Patologia..... 33
1.5.2. Imunologia..... 36
1.5.3. Endossimbiose – *Wolbachia spp.*..... 37
1.6. Sinais Clínicos..... 41
1.7. Diagnóstico..... 44
1.7.1. Diagnóstico imagiológico..... 45
1.7.1.1. Radiografia..... 45
1.7.1.2. Electrocardiografia..... 46
1.7.1.3. Ecocardiografia..... 47
1.7.2. Diagnóstico por análise clínicas..... 48
1.7.2.1. Marcadores cardiopulmonares..... 49
1.7.3. Diagnóstico laboratorial..... 50
1.7.3.1. Pesquisa de microfilária circulantes..... 51
1.7.3.1.1. Exame direto de sangue fresco..... 51
1.7.3.1.2. Exame do microhematócrito..... 52
1.7.3.1.3. Técnicas de concentração de microfilárias..... 52
1.7.3.1.3.1. Técnicas de filtração..... 52
1.7.3.1.3.2. Técnica de Knott modificado..... 52
1.7.3.1.4. Técnica de coloração histoquímica por fosfatase ácida..... 53
1.7.3.1.5. Métodos moleculares..... 54
1.7.3.2. Pesquisa de antigénio de Dirofilaria immitis no sangue..... 55
1.7.3.2.1. Métodos serológicos..... 55
1.7.3.2.1.1. Factores a considerar na seleção de um teste de antigénio de D. immitis..... 57
1.7.4. Necrópsia..... 60
1.8. Rastreio..... 61

1.9. Profilaxia 62
1.9.1. Falta de eficácia 64
1.9.2. Profilaxia do vetor 68
1.10. Tratamento 68
1.10.1. Terapias alternativas 73
1.10.1.1. Administração contínua de lactonas macrocíclicas 73
1.10.1.2. Terapias naturais 73
1.10.2. Remoção cirúrgica 73
1.10.3. Confirmação da eficácia do adulticida 74
1.10.4. Eliminação das microfilárias 74
1.11. Complicações da dirofilariose 75
1.11.1. Tromboembolismo pulmonar 75
1.11.2. Pneumonite eosinofílica e granulomatose eosinofílica 75
1.11.3. Glomerulonefrite 76
1.11.4. Hipertensão pulmonar e insuficiência cardíaca congestiva 77
1.11.5. Síndrome da veia cava 77
1.11.6. Migrações aberrantes 78
1.12. Prognóstico 78

2. DIROFILARIOSE FELINA 79
2.1. Ciclo de vida 79
2.2. Epidemiologia 80
2.2.1. Fatores de risco 83
2.3. Patogenia 84
2.3.1. Fase da chegada dos parasitas aos pulmões 84
2.3.2. Fase da morte dos parasitas adultos 85
2.3.3. Lesões histolopatológicas 86
2.3.4. Endossimbiose – *Wolbachia spp.* 87
2.4. Sinais clínicos 88
2.5. Diagnóstico 89
2.5.1. Diagnóstico imagiológico 90
2.5.1.1. Radiografia 90
2.5.1.2. Angiografia 91
2.5.1.3. Electrocardiografia 91
2.5.1.4. Ecocardiografia 91
2.5.2. Diagnóstico por análises clínicas 92
2.5.2.1. Lavagem transtraqueal ou broncoalveolar 92
2.5.3. Diagnóstico laboratorial 93
2.5.3.1. Pesquisa de microfilárias circulantes 93
2.5.3.2. Métodos serológicos 93
2.5.3.2.1. Pesquisa de antigénio de Dirofilaria immitis no sangue 93
2.5.3.2.2. Pesquisa de anticorpo anti-Dirofilaria immitis no sangue 95
2.5.4. Necrópsia 97
2.5.5. Diagnósticos diferenciais 97
2.6. Profilaxia 98
2.7. Tratamento 99
2.7.1. Remoção cirúrgica 100
2.7.2. Monitorização 100

2.8. Prognóstico..... 100

3. DIROFILARIOSE HUMANA..... 103
3.1. O que é a dirofilariose humana..... 103
3.2. Ciclo de vida..... 103
3.3. Epidemiologia..... 104
3.3.1. Dirofilariose humana em Portugal..... 106
3.4. Patogenia..... 107
3.5. Sinais clínicos..... 108
3.6. Diagnóstico..... 109
3.7. Tratamento..... 110
3.8. Conclusão..... 111

CAPITULO II – PLANEAMENTO DO TRABALHO..... 113
1. PLANEAMENTO DO TRABALHO..... 115
1.1. Objetivos específicos..... 115

CAPITULO III – MATERIAL E MÉTODOS..... 117
1. MATERIAL E MÉTODOS..... 119
1.1. Área de Estudo..... 119
1.2. Amostras..... 120
1.3. Caracterização da população de estudo..... 121
1.3.1. População canina..... 121
1.3.2. População felina..... 124
1.4. Recolha de material e produtos biológicos..... 126
1.5. Métodos diagnóstico..... 127
1.5.1. Técnicas para deteção de microfilárias no sangue..... 127
1.5.1.1. Exame direto de sangue fresco..... 127
1.5.1.2. Técnica do tubo microhematócrito..... 127
1.5.1.3. Técnica de Knott modificado..... 128
1.5.2. Pesquisa de antigénio de *Dirofilaria immitis*..... 128
1.5.2.1. Teste imunodiagnóstico ELISA semiquantitativo canino..... 128
1.5.2.2. Teste imunodiagnóstico ELISA felino..... 129
1.5.3. Pesquisa de anticorpo de *Dirofilaria immitis*..... 130
1.5.3.1. Teste imunodiagnóstico ELISA felino..... 130
1.5.4. Diferenciação histoquímica das espécies de microfilárias..... 130
1.5.4.1. Técnica de coloração histoquímica por fosfatase ácida..... 130
1.5.5. Análises sanguíneas..... 132
1.5.6. Radiografia..... 132
1.5.7. Ecocardiografia..... 132
1.5.8. Histopatologia..... 133
1.6. Protocolo de diagnóstico laboratorial de *Dirofilaria immitis*..... 133
1.6.1.Protocolo de diagnóstico laboratorial canino..... 133
1.6.2.Protocolo de diagnóstico laboratorial felino..... 134
1.7. Classificação da severidade da doença nos cães com infeção por *Dirofilaria immitis* de acordo com os sinais clínicos apresentados..... 134
1.8. Questionário aos proprietários..... 134
1.9. Análise dos dados..... 135

CAPITULO IV – RESULTADOS 137
1. RESULTADOS 139
1.1. DIROFILARIOSE CANINA 139
1.1.1. Prevalência da *Dirofilaria immitis* 139
1.1.1.1. Prevalência de D. immitis por freguesia 139
1.1.2. Métodos laboratoriais de diagnóstico 140
1.1.3. Tipo de infeção 144
1.1.3.1. Nível de antigénio segundo o tipo de infeção. 144
1.1.4. Fatores de risco 145
1.1.5. História clínica e Exame físico 149
1.1.6. Classificação da severidade da dirofilariose nos cães de acordo com os sinais clínicos 152
1.1.6.1. Classe de severidade da dirofilariose vs fatores de risco 154
1.1.6.2. Classe de severidade da dirofilariose vs história clínica 155
1.1.6.3. Classe de severidade da dirofilariose vs exame físico 156
1.1.7. Análises sanguíneas 157
1.1.7.1. Análises hematológicas 157
1.1.7.2. Análises bioquímicas 160
1.1.8. Caracterização dos proprietários 162
1.2. DIROFILARIOSE FELINA 164
1.2.1. Prevalência de *Dirofilaria immitis* 164
1.2.1.1. Prevalência de Dirofilaria immitis por freguesia 164
1.2.2. Métodos laboratoriais de diagnóstico 165
1.2.3. Fatores de risco 166
1.2.4. História clínica e Exame físico 169
1.2.5. Análises sanguíneas 173
1.2.6. Exames imagiológicos 174
1.2.6.1. Radiografia 174
1.2.6.2. Ecocardiografia 176
1.2.7. Análise histopatológica 177
1.2.8. Classificação da dirofilariose felina 178

CAPITULO V – DISCUSSÃO 181
1. DISCUSSÃO 183
1.1. Material e Métodos 183
1.2. Resultados 183
1.2.1. Prevalência de *Dirofilaria immitis* 183
1.2.1.1. Dirofilariose canina 183
1.2.1.2.Dirofilariose felina 185
1.2.2. Métodos laboratoriais de diagnóstico 186
1.2.2.1. Dirofilariose canina 186
1.2.2.2.Dirofilariose felina 189
1.2.3. Factores de risco 190
1.2.3.1. Dirofilariose canina 190
1.2.3.2.Dirofilariose felina 193
1.2.4. História clínica e Exame físico 194
1.2.4.1. Dirofilariose canina 194

1.2.4.2.Dirofilariose felina..... 196
1.2.5 Análises sanguíneas..... 198
1.2.5.1. Dirofilariose canina..... 198
1.2.5.2.Dirofilariose felina..... 199
1.2.6. Exame imagiológicos..... 199
1.2.6.1. Radiografia..... 199
1.2.6.2. Ecocardiografia..... 200
1.2.7. Análise histopatológica..... 201
1.2.8. Caracterização dos proprietários 201

CAPITULO VI – CONCLUSÃO..... 203

CAPITULO VII – BIBLIOGRAFIA..... 209

CAPITULO VIII – ANEXO..... 241
Anexo I..... 243
I.1. Distribuição da temperatura média em Portugal Continental entre novembro de 2009 e janeiro de 2011 e distribuição média da temperatura em Portugal Continental entre março 2011 e julho de 2012..... 243
I.2. Formulário dos critérios de inclusão/exclusão no estudo..... 248
I.3. Folha informação ao proprietário sobre o estudo realizado..... 249
I.4. Formulário de autorização do proprietário do animal..... 250
I.5. Questionário epidemiológico efetuado aos proprietários dos cães examinados no estudo..... 252
I.6. Formulário da história clínica efetuada aos proprietários dos cães examinados no estudo..... 255
I.7. Formulário do exame físico realizado aos cães examinados no estudo..... 258
I.8. Formulário dos resultados das técnicas laboratoriais de diagnóstico de *Dirofilaria immitis*..... 260
I.9. Instruções do Fabricante do Teste Imunodiagnóstico ELISA semiquantitativo – Test Snap® Heartworm HTWM® - Idexx 262
I.10. Instruções do Fabricante do Teste Imunodiagnóstico ELISA – Test Snap® Feline Triple test® - Idexx..... 263
I.11 Instruções do Fabricante do Teste Imunodiagnóstico ELISA (Test Solo Step Feline Heartworm ® - Heska)..... 265
I.12. Questionário realizado aos proprietários dos cães examinados acerca da dirofilariose..... 267
I.13. Distribuição gráfica da idade dos cães examinados no estudo..... 268
I.14. Representação gráfica dos fatores de risco..... 269
I.15. Alterações nas variáveis hematológicas nos cães parasitados..... 271
I.16. Alterações nas variáveis bioquímicas nos cães parasitados..... 273
I.17. Distribuição gráfica da idade dos gatos examinados no estudo..... 274

I.18. Resultados do questionário sobre a informação clínica prévia dos gatos examinados no estudo, de acordo com o estado de infeção de *D. immitis*... 275
I.19. Resultados das alterações nas variáveis hematológicas e bioquímicas em gatos parasitados com *D. immitis*..... 276

ANEXO II
II.1. Artigos Científicos..... 278
II.2. Comunicações Internacionais..... 292
II.3. Comunicações Nacionais..... 294
II.4. Comunicações em Poster..... 296

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ÍNDICE DE QUADROS

CAPITULO I – INTRODUÇÃO

Quadro 1 Medidas e localização das diferentes espécies de nemátodes da subfamília Dirofilarinae e Onchocercinae encontradas no sul da Europa. Adaptado de Manfredi *et al*., (2001)..... 5

Quadro 2 Espécies identificadas e número de espécimes por estádio, mês no concelho da Figueira da Foz. L= forma imatura. *An. maculip = An. maculipennis*. Adaptado de Alves *et al.,* (2012)..... 13

Quadro 3 Fases de desenvolvimento da *Dirofilaria immitis* no cão. Mf: microfilária.Adaptado de Montoya-Alonso & Gómez, (2012)..... 18

Quadro 4 Espécies de filárias que infetam cães e gatos. Mf: microfilária. Adaptado de McCall *et al.*, (2008)..... 19

Quadro 5 Classificação do grau de severidade clínica da dirofilariose. Adaptado de Miller & Gordon, (2009) 43

Quadro 6 Características clínicas, alterações analíticas e imagiológicas de acordo com a classe de severidade da dirofilariose. TRC: tempo de repleção capilar. Adaptado de Montoya-Alonso & Gómez, (2012)..... 43

Quadro 7 Frequência da distribuição dos sinais clínicos em 47 cães infetados com *Dirofilaria immitis* na Alemanha. Adaptado de Schrey & Trautvetter, (1998) 44

Quadro 8 Características morfológicas das microfilárias no sangue do hospedeiro definitivo. Adaptado de McCall *et al*, (2008)..... 50

Quadro 9 Vantagens e desvantagens da técnica de exame direto de sangue fresco. Adaptado de Genchi *et al.,* (2007)..... 52

Quadro 10 Vantagens e desvantagens da técnica de filtração. Adaptado de Genchi *et al*., (2007)..... 52

Quadro 11 Vantagens e desvantagens da técnica de Knott modificado. Adaptado de Genchi *et al.,* (2007)..... 53

Quadro 12 Vantagens e desvantagens da coloração histoquímica por fosfatase ácida. Adaptado de Genchi *et al*., (2007)..... 53

Quadro 13 Vantagens e desvantagens dos métodos moleculares. Adaptado de Genchi *et al.,* (2007)..... 55

Quadro 14 Valor preditivo positivo e negativo. Se: sensibilidade Sp: especificidade. Adaptado de Toma *et al*., (2004)..... 57

Quadro 15 Especificidade e sensibilidade de diferentes testes de antigénio de dirofilaria canina (de acordo com a carga parasitária). Adaptado de McCall *et al.*, (2001)..... 58

Quadro 16 Relação dos teste comerciais de antigénios disponíveis em Espanha. Dados da sensibilidade de especificidade facilitados pelos fabricantes. Adaptado de Montoya-Alonso & Gómez, (2012)..... 58

Quadro 17 Tipo de amostra requerido, tempo necessário para a execução do teste e o número de passos para a realização dos testes de pesquisa de antigénio de *Dirofilaria immiti*s. Adaptado de MC Tier *et al*., (1995). 59

Quadro 18 Vantagens e desvantagens dos testes de pesquisa de antigénio de *Dirofilaria immitis*. Adaptado de Genchi *et al*., (2007)..... 60

Quadro 19 Esquema guia do diagnóstico da infeção por *Dirofilaria immitis* em cães. Adaptado de Genchi *et al.*, (2007)..... 60

Quadro 20 Dose efetiva mínima de lactonas macrocíclicas para a prevenção de *Dirofilaria immitis* em cães e gatos e a sua indicação para outros parasitas. Di, *Dirofilaria immitis*, Dr, *Dirofilaria repens*, Anc, *Ancylostoma caninum*, At, *Ancylostoma tubeforme*; Ab, *Ancylostoma Brasiliense*; Tc, *Toxocara canis*; Tct, *T. cati*; Us, *Uncinaria stenocephala*; Tv, *Trichurisvulpis*; Dc, *Dipylidium caninum*; Ms, *Mesocestoides sp*; Tae, *Taenia spp*; Eg, *Echinococcus granulosus*; Em, *Echinococcus multilocularis*; Cf, *Ctenochephalides felis*; Trc, *Trichodetes canis*; Fs, *Felicola substrata*; Oc, *Otodectes cynotis*; Ss, *Sarcoptes scabiei*; Dx, *Demodex canis*; Sem, semanas. Adaptado de Montoya-Alonso & Goméz, (2012)..... 64
Quadro 21 Protocolo de tratamento médico de dirofilariose recomendado pela AHS. SID: a cada 24h; BID: a cada 12h; QUOD: a cada 48h. Adaptado de AHS, (2014)..... 72
Quadro 22 Comparação do desempenho de testes de deteção de antigénio de dirofilariose felina existente no mercado veterinário (estudo experimental com 380 gatos). Adaptado de Berdoukay *et al.*, (2004).. 94
Quadro 23 Critérios de diagnóstico segundo os testes realizados. Adaptado da AHS, (2014)..... 96

CAPITULO III – MATERIAL E MÉTODOS

Quadro 1 Dados climatológicos anuais do concelho da Figueira da Foz. Adaptado da Wikipedia..... 120
Quadro 2 Classificação do grau de severidade clínica da dirofilariose. Adaptado de Miller & Gordon, (2009)..... 132
Quadro 2 Critérios da classifição radiográficos de dirofilariose. Dfel:dirofilariose felina. Adaptado de Brawner *et al.,* (2000)..... 133
Quadro 3 Protocolo de análises laboratoriais de pesquisa de *Dirofilaria immitis* realizado aos cães da amostra de estudo..... 134
Quadro 4 Protocolo de análises laboratoriais de pesquisa de *Dirofilaria immitis* realizado aos gatos da amostra de estudo..... 134

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO I – INTRODUÇÃO

Figura 1 Representação microscópica da *Dirofilaria immitis*: (1) Extremidade anterior da fêmea, mostrando o anel nervoso, esófago, primeira porção do intestino e abertura vulvar. Bar = 200µm. (2) Vista lateral da extremidade posterior do macho, mostrando as espículas grandes e pequenas, papila pré-cloacal, papila pós-cloacal lateral ventral e fasmide. Bar= 100 µm. (3) Vista ventral da extremidade posterior com a papila pré-cloacal, par de pequena papila cloacal, abertura cloacal, 4 pares de papilas pós-cloacal, par de fasmides ventral e espícula pequena e grande. Bar=100 µm. Adaptado de Furtado *et al*., (2010)..... 6

Figura 2 Ciclo de vida da *Dirofilaria immitis*. Adaptado de AHS, (2014)..... 8

Figura 3 *Culex pipiens*. Adaptado de www.entu.cas.cz..... 8

Figura 4 *Culex pipiens.* Adaptado de barresfotonatura.com..... 8

Figura 5 Abundância relativa das espécies nos concelhos do continente. Adaptado Alves *et al.,*(2012)..... 12

Figura 6 Abundância relativa das espécies identificadas nos concelhos da região centro. Adaptado Alves *et al.,* (2012)..... 13

Figura 7 Padrão de distribuição e migração do nemátode *D. immitis* recuperado de cães inoculados. ○ percentagem total de larvas recuperadas de localizações intermédias (tecido subcutâneo e tecido muscular) pelo corpo, incluindo parasitas da cavidade abdominal e torácica, ■ percentagem recuperada do abdómen, △ percentagem recuperada do membro posterior,▲percentagem recuperada no tórax,• percentagem recuperada na localização final (artérias pulmonares, câmaras direitas do coração e veia cava caudal). Adaptado de Bowman & Atkins, (2009)..... 17

Figura 8 Pontos indicam as estações meteorológicas que atingiram 130 UDD em julho, baseado no registo de temperatura dos últimos 15 anos. Adaptado de Genchi *et al.,* (2009)..... 21

Figura 9 Comparação da distribuição geográfica da dirofilariose (*D. immitis*) na Europa em 2001 e 2011. Vermelho: zonas endémicas, rosa: casos esporádicos. Adaptado de Morchón *et al*., (2012)..... 22

Figura 10 Distribuição mundial *da Dirofilaria immitis*. Vermelho: zonas endémicas, verde: zonas não endémicas, cinzento: sem dados. Adaptado de cvbd..... 24

Figura 11 Representação gráfica das alterações patológicas que ocorrem no hospedeiro devido à presença da infeção por *Dirofilaria immitis.* Adaptado de Schrey, (1998)..... 32

Figura 12 Imagem histológica de secção transversal de um parasita adulto fêmea de *D. immitis* com coloração imuno-histoquímica com soro policlonal anti-*Wolbachia spp.* (40 x). Presença de numerosos corpos bacterianos nas células da corda lateral da hipoderme. Adaptado de Grandi *et al.,* (2007)..... 38

Figura 13 Imagem histológica de secção transversal de uma fêmea adulta de *D. immitis* com coloração imuno-histoquímica com soro policlonal anti-*Wolbachia* (40 x). Observam-se numerosos oócitos e embriões no trato reprodutivo que albergam a *Wolbachia spp.* (x40). Adaptado de Grandi *et al.*, (2007)..... 38
Figura 14 Imagem histopatológica de rim de um canídeo com *Dirofilaria immits*. Presença de microfilárias com marcação positiva pela coloração imuno-histoquímica anti- *WSP* (seta) (100 x). Adaptado de Grandi *et al.,* (2007)..... 38
Figura 15 Imagem histopatológica da artéria pulmonar de um canídeo com *Dirofilaria immitis* após tratamento com melasormina. Coloração imuno-histoquímica anti-*WSP*. Verifica-se a presença de várias bactérias no tecido pulmonar (setas) (10 x). Adaptado de Grandi *et al*., (2007)..... 38
Figura 16 Radiografia torácica laterolateral de um canídeo com dirofilariose, revelando um padrão vascular com marcada dilatação das artérias pulmonares (arterite deformante) e cardiomegália direita (Original).. 46
Figura 17 Radiografia torácica laterolateral de um canídeo com dirofilariose, revelando nódulos pulmonares e um padrão pulmonar misto intersticial (moderado a grave), vascular (com arterite deformante) e alveolar. Detectam-se sinais de cardiomegália direita, embora os limites da silhueta cardíaca sejam indistintos (Original)..... 46
Figura 18 Ecocardiografia de um cão infetado com *Dirofilaria immitis*. Os parasitas aparecem como estruturas com conformação de dupla linha paralela, no átrio direito (setas) (Original)..... 47
Figura 19 Ecocardiografia em corte parasternal direito de um cão gravemente infetado com *Dirofilaria immitis.* (SVC: icterícia, hemoglobinúria e hemoglobinémia). Massa composta por aglomerado de parasitas a nível da válvula tricúspide (Original)..... 48
Figura 20 *Dirofilaria immitis:* extremidade cefálica (x400) e caudal (1000 x); C e D: *Dirofilaria repens:* extremidade cefálica (400x) e caudal (1000x); E:extremidade cefálica de *Acantocheilonema reconditum*, mostrando o gancho cefálico (x1000). Adaptado de Genchi *et al.,* (2007)..... 51
Figura 21 Representação gráfica da marcação histoquímica por fosfatase ácida das diferentes espécies de microfilárias. Adaptado de Schrey & Trautvetter, (1998)..... 54
Figura 22 Marcação por coloração histoquímica por fosfatase ácida das diferentes espécies de dirofilárias sem bainha. Adaptado de Schrey & Trautvetter, (1998)..... 54
Figura 23 Artéria pulmonar e ventrículo direito de um cão com infeção severa por adultos de *Dirofilaria immitis* (Original)..... 61
Figura 24 Calendário de desenvolvimento da *D. immitis* mostrando o período de suscetibilidade às lactonas macrocíclicas e melasormina. A linha ponteada representa o intervalo no tratamento, quando a *D. immitis* não é suscetível a nenhum dos tratamentos. Adaptado de AHS, (2014)..... 71
Figura 25 Radiografia torácica lateral de um canídeo com dirofilariose,

revelando nódulos pulmonares e um padrão pulmonar misto intersticial, vascular (com arterite deformante) e alveolar severo. Limites da silhueta cardíaca não são visíveis (Original)..... 76
Figura 26 Distribuição da dirofilariose humana. Lilás: Países com predomínio de casos de *D. immitis*. Cinzento: Países com predomínio de casos de *D. repens*. ■ Casos esporádicos de Dirofilariose Pulmonar ▲ Casos esporádicos de Dirofilariose Subcutânea/ocular. Adaptado de Simón *et al*., (2012)..... 104
Figura 27 Dados epidemiológicos de dirofilariose humana na Europa. Adaptado de Simón *et al.,* (2012)..... 106
Figura 28 Lesão "tipo moeda" contendo um parasita de *Dirofilaria immitis* morto, num granuloma, num lobo pulmonar caudal, numa radiografia torácica de um humano infetado. Adaptado de McCall *et al.*, (2008)..... 109

CAPITULO III– MATERIAL E MÉTODOS

Figura 1 Brasão da cidade da Figueira da Foz..... 119
Figura 2 Localização geográfica da Figueira da Foz (vermelho) no mapa de Portugal. Adaptado de Wikipédia (2014)..... 119
Figura 3 Mapa do concelho da Figueira da Foz. Adaptado de Wikipédia (2014)..... 119
Figura 4 Microfilária de *Dirofilaria immitis,* no exame direto de sangue fresco (400 x) na amostra de sangue de um cão (Original)..... 127
Figura 5 Microfilária de *Dirofilaria immitis,* na técnica de Knott modificado (100 x) na amostra de sangue de um cão (Original)..... 128
Figura 6 Microfilária de *Dirofilaria immitis,* na técnica de Knott modificado (400 x) na amostra de sangue de um cão (Original)..... 128
Figura 7 Resultados do teste Snapp Heartworm® Idexx (Original)..... 129
Figura 8 Resultados do teste Snap® Feline Triple® Test Idexx . Adaptado de Idexx., (2010)..... 129
Figura 9 Resultados do teste Teste Solo Step Feline Heartworm® – Heska (Original)..... 130
Figura 10 Kit Comercial Leucognost SP® (Original)..... 131
Figura 11 Filtração da solução (Original)..... 131
Figura 12 Técnica de coloração histoquímica por fosfatase ácida (Kit Comercial Leucognost SP®). Identifica-se um parasita *Dirofilaria immitis*, pela presença de dois pontos de atividade de fosfatase ácida (coloração avermelhada – seta vermelha), no poro excretor e anal (400 x) (Original)..... 131
Figura 13 Imagens ecocardiográficas. Cortes parasternais direitos em eixo curto da base do coração e grandes vasos. Identifica-se uma estrutura linear ecogénica compatível com dirofilária adulta na zona da bifurcação da artéria pulmonar (seta) (Original)..... 133

CAPITULO IV– RESULTADOS

Figura 1 Prevalência de *Dirofilaria immits* das freguesias do concelho da Figueira da Foz (n=276)..... 131

Figura 2 A - Microfilária de *D. immitis,* no exame directo de sangue fresco (400 x); B - Microfilária de *D. immitis no* método de Knott modificado (400 x) (Original)..... 140
Figura 3 Teste ELISA Snapp® Idexx – resultado negativo (A) ; resultado positivo (B) (Original)..... 141
Figura 4 Coloração histoquímica por fosfatase ácida da *Dirofilaria immitis* (atividade limitada ao poro excretor e anal, indicado por uma seta vermelha (400 x) (Original)..... 143
Figura 5 Resultado do Teste ELISA Snapp® Idexx. A – Nível antigénio baixo; B- Nível antigénio elevado (Original)..... 144
Figura 6 Prevalência da Dirofilariose Felina por nove freguesias do concelho da Figueira da Foz (n=99)..... 164
Figura 7 Resultado positivo do teste Solo Step Feline HW® – Heska. C – linha de controlo, T – linha do teste (Original)..... 165
Figura 8 Imagem ecográfica. Corte parasternal direito em eixo curto da base do coração e grandes vasos. Identifica-se uma estrutura linear ecogénica compatível com dirofilária adulta na zona da bifurcação da artéria pulmonar (seta azul) (Original)..... 177

CAPITULO V – DISCUSSÃO

Figura 1 Prevalência de *Dirofilaria immitis* em Portugal em 1990. Adaptado de Guerrero *et al.,* (1992)..... 183

CAPITULO VI – CONCLUSÃO

Figura 1 "One Health". Adaptado de OIE..... 207

CAPITULO VIII – ANEXOS.

Figura 1 Distribuição da temperatura média em Portugal Continental entre novembro de 2009 e janeiro de 2011. Adaptado de Instituto Português do Mar e da Atmosfera..... 243
Figura 2 Distribuição média da temperatura em Portugal Continental entre março 2011 e julho de 2012. Adaptado do Instituto Português do Mar e da Atmosfera..... 245
Figura 3 Instruções do Fabricante do Teste Imunodiagnóstico ELISA semiquantitativo – Test Snap® Heartworm HTWM® - Idexx. Adaptado de Idexx..... 262
Figura 4 Instruções do Fabricante do Teste Imunodiagnóstico ELISA - Teste SNAP® Feline Triple Test® – Idexx . Adaptado de Idexx..... 263
Figura 5 Instruções do Fabricante do Teste Imunodiagnóstico ELISA - Test Solo Step Feline Heartworm® – Heska. Adaptado de Heska..... 265

ÍNDICE DE TABELAS

CAPITULO IV – RESULTADOS

Tabela 1 Prevalência de dirofilariose canina (*Dirofilaria immitis)* no concelho da Figueira da Foz. IC: Intervalo de Confiança; LI: Limite Inferior; LS: Limite Superior..... 139

Tabela 2 Prevalência de dirofilariose canina por freguesia e respetiva densidade da população canina de acordo com os critérios da OMS (n=276)..... 140

Tabela 3 Resultado das diferentes técnicas laboratoriais e respectiva prevalência de *Dirofilaria immitis* por técnica (n=304). VP: verdadeiro positivo; VN: verdadeiro negativo; FP: falso positivo; FN: falso negativo; Se: sensibilidade; Sp: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo..... 141

Tabela 4 Testes diagnóstico. [1]Teste do McNemar; * p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001..... 142

Tabela 5 Nível de antigénio segundo o tipo de infeção por *Dirofilaria immitis*. Ag:antigénio, Mf:microfilárias. [1]Teste do Qui-Quadrado.... 145

Tabela 6 Distribuição relativa da dirofilariose canina de acordo com o género 145

Tabela 7 Distribuição relativa da dirofilariose canina consoante a faixa etária. 146

Tabela 8 Caracterização epidemiológica da amostra de estudo em relação à infeção por *D. Immitis*.[1]Teste do Qui-Quadrado; ** *p* < 0.01..... 146

Tabela 9 Caracterização epidemiológica do ambiente e utilização da amostra de estudo em relação à infeção por *D. Immitis*. [1]Teste do Qui-Quadrado; * *p* < 0.05 ** *p* < 0.01 *** *p* < 0.001..... 147

Tabela 10 Regressão logística: Variável dependente – estado dirofilária (negativo vs positivo). * *p* < 0.05 ** *p* < 0.01 *** *p* < 0.001; B: coeficiente estimado; EP: erro padrão do B; OR: *Odds Ratio*; IC: intervalo de confiança; LI: limite inferior; LS: limite superior..... 147

Tabela 11 Dados clínicos dos cães testados para *Dirofilaria immitis.* [1]Teste do Qui-Quadrado..... 148

Tabela 12 Parâmetros da história clínica dos animais testados.[1]Teste do Qui-Quadrado; * *p* < 0.05 ** *p* < 0.01 *** *p* < 0.001..... 150

Tabela 13 Atitude dos cães testados de acordo com o estado de dirofilária. [1]Teste do Qui-Quadrado; * *p* < 0.05 ** *p* < 0.01 *** *p* < 0.001..... 151

Tabela 14 Parâmetros do exame físico de acordo com o estado de dirofilária. [1]Teste do Qui-Quadrado; * *p*<0.05 ** *p* < 0.01 *** *p* < 0.001..... 151

Tabela 15 Parâmetro do exame físico de acordo com o estado de infeção por *Dirofilaria immitis.*[1]Teste do Qui-Quadrado; * *p* < 0.05 ** *p* < 0.01 *** *p* < 0.001..... 152

Tabela 16 Associação entre o nível de antigénio e a classificação da severidade da dirofilariose.[1]Teste do Qui-Quadrado; * *p* < 0.05 ** *p* < 0.01 *** *p* < 0.001..... 153

Tabela 17 Relação da classificação da severidade de dirofilariose com o tipo de infeção. Ag: antigénio, Mf: microfilária.[1]Teste do Qui-Quadrado; * *p* < 0.05 ** *p* < 0.01 *** *p* < 0.001..... 154

Tabela 18 Regressão Ordinal: Variável dependente – Estado Dirofilária (Sem dirofilariose, Ligeira, Moderada, Severa e Muito Severa). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$; B: Coeficiente estimado; EP: Erro Padrão do B; IC: Intervalo de Confiança; LI: Limite Inferior; LS: Limite Superior..... 154
Tabela 19 Regressão Ordinal: Variável dependente – Classificação da Dirofilária (Ligeira, Moderada, Severa e Muito Severa) * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$; B: Coeficiente estimado; EP: Erro Padrão do B; IC: Intervalo de Confiança; LI: Limite Inferior; LS: Limite Superior..... 154
Tabela 20 Presença de sintomas segundo a classe da doença. [1]Teste do Qui-Quadrado;* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$..... 155
Tabela 21 Parâmentros da história clínica segundo a classe da doença. [1]Teste do Qui-Quadrado; * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$..... 155
Tabela 22 Parâmetros do exame Físico segundo a classe da doença. [1]Teste do Qui-Quadrado; * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.0011$..... 156
Tabela 23 Estatística descritiva e intervalo de confiança 95% para as variáveis hematológicas nos cães parasitados por *Dirofilaria immitis* (n=79). DP: Desvio Padrão; IC: Intervalo de Confiança; LI: Limite Inferior; LS: Limite Superior; GB: glóbulos brancos; GV: glóbulos vermelhos; VCM: volume corpuscular médio; MCH: hemoglobina corpuscular média; MCCH: concentração média de hemoglobina; IDP: índice de distribuição das plaquetas..... 158
Tabela 24 Estatística descritiva para as variáveis hematológicas segundo a classe da doença (n=79). GB: glóbulos brancos; GV: glóbulos vermelhos; VCM: volume corpuscular médio; MCH: hemoglobina corpuscular média; MCCH: concentração média de hemoglobina; IDP: índice de distribuição das plaquetas [1]Teste one-way ANOVA; [2] Teste Kruskal-Wallis; DP: Desvio Padrão * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$. 159
Tabela 25 Alteração nas variáveis hematológicas segundo a classe da doença (n=79). GB:glóbulos brancos. [1]Teste do Qui-Quadrado; * $p < .05$ ** $p < .01$ *** $p < .001$..... 160
Tabela 26 Estatística descritiva e intervalo de confiança 95% para as variáveis bioquímicas nos cães parasitados por *Dirofilaria immitis*. DP: Desvio Padrão; IC: Intervalo de Confiança; LI: Limite Inferior; LS: Limite Superior; ALT: Alanina aminotransferase..... 160
Tabela 27 Estatística descritiva e intervalo de confiança para as variáveis bioquímicas segundo a classe da doença. ALT: alanina aminotransferase. [1] Teste one-way ANOVA; [2]Teste Kruskal-Wallis; DP: Desvio Padrão * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$..... 161
Tabela 28 Variáveis bioquímicas segundo a classe da doença. ALT: alanina aminotransferase. [1]Teste do Qui-Quadrado; * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$..... 161
Tabela 29 Caraterização sociodemográfica dos proprietários de acordo com o estado de infeção por *Dirofilaria immitis*..... 162
Tabela 30 Conhecimentos da doença pelos proprietários de acordo com o estado de infeção por *Dirofilaria immitis*..... 163

Tabela 31 Prevalência da dirofilariose felina (*Dirofilaria immitis*) no concelho da Figueira da Foz. IC: Intervalo de Confiança; LI: Limite Inferior; LS: Limite Superior..... 164
Tabela 32 Prevalência da dirofilariose felina em nove freguesias do concelho da Figueira da Foz.. 165
Tabela 33 Resultado das diferentes técnicas laboratoriais e respectiva prevalência por técnica (n=100). FIV: vírus imunodeficiência felina; FeLV: vírus leucose felina..... 165
Tabela 34 Resultados do teste de pesquisa de antigénio *D. immitis* e teste de pesquisa de anticorpo anti-*D. immitis* (n=100)..... 166
Tabela 35 Distribuição da dirofilariose felina de acordo com o género..... 166
Tabela 36 Caracterização epidemiológica da amostra de estudo em relação à infeção por *D. Immitis*. M: Média; DP: Desvio Padrão;[1]Teste do Qui-Quadrado; [2]Teste t; * $p < 0.05$ **..... 167
Tabela 37 Regressão logística: Variável dependente – Estado dirofilária (negativo vs positivo); Variáveis independentes – características epidemiológicas e do ambiente * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$; B: Coeficiente estimado; EP: Erro Padrão do B; OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de Confiança; LI: Limite Inferior; LS: Limite Superior..... 168
Tabela 38 Resultados dos teste de FIV e FeLV e a sua relação com a infeção por *D. immitis*.[1]Teste do Qui-Quadrado..... 168
Tabela 39 Parâmetros da história clínica dos animais testados.[1]Teste do Qui-Quadrado; * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$..... 169
Tabela 40 Parâmetros do exame físico na amostra de estudo e a sua relação com o estado de infeção por *D. immitis*..... 171
Tabela 41 Estatística descritiva e intervalo de confiança de 95% para a média das váriaveis hematológicas e bioquímicas de gatos com *D. immitis*. DP: Desvio Padrão; IC: Intervalo de Confiança; LI: Limite Inferior; LS: Limite Superior..... 174
Tabela 42 Caracterização das alterações radiográficas realizadas aos gatos infetados..... 175
Tabela 43 Alterações descritas na análise histopatológica realizada em 4 gatos positivos para *D. immitis*..... 177
Tabela 44 Resultado dos vários exames de diagnóstico realizados em gatos positivos nos testes serológicos. Ac: anticorpo. Ag: antigénio. Rx: radiografia. Eco: ecocardiografia. Histo: histopatologia. Necr: necrópsia..... 178

CAPITULO VIII – ANEXOS

Tabela 1 Alterações nas variáveis hematológicas nos cães parasitados..... 272
Tabela 2 Alterações nas variáveis bioquímicas nos cães parasitados..... 273
Tabela 3 Resultados do questionário sobre a informação clínica prévia dos gatos examinados no estudo, de acordo com o estado de infeção de *D. immitis*[1.] Teste do Qui-Quadrado..... 275
Tabela 4 Resultados das alterações nas variáveis hematológicas e bioquímicas nos gatos parasitados..... 276

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE DE GRÁFICOS

CAPITULO I – INTRODUÇÃO

Gráfico 1 Comparação da sensibilidade e especificidade de 3 testes comerciais de pesquisa de antigénio de dirofilária de uma amostra de cães infetados naturalmente com carga parasitária baixa (0 a 4 fêmeas adultas). As colunas representam a sensibilidade média dos três testes com uma, duas, três ou quatro fêmeas adultas. A última coluna representa a especificidade média dos três testes. Adaptado de Atkins, (2009)..... 58

Gráfico 2 Representação gráfica da utilização mensal de preventivos de dirofilariose (amostra de 768 proprietários). Adaptado de Veterinary Network Information (VIN)..... 65

Gráfico 3 Razões pelas quais os donos não administram a prevenção de dirofilariose ao longo de todo o ano. (amostra de 507 proprietários). Adaptado de Veterinary Network Information (VIN)..... 65

CAPITULO III – MATERIAL E MÉTODOS

Gráfico 1 Caracterização da população de estudo de acordo com o género (frequência relativa) (n= 304)..... 122

Gráfico 2 Caracterização da população de estudo de acordo com a idade (frequência relativa) (n= 297)..... 122

Gráfico 3 Caracterização da população de estudo de acordo com o raça dos cães (frequência relativa) (n= 304)..... 122

Gráfico 4 Caracterização da população de estudo de acordo com o porte de cão (frequência relativa) (n=304)..... 122

Gráfico 5 Caracterização da população de estudo de acordo com o habitat (frequência relativa) (n= 298)..... 123

Gráfico 6 Caracterização da população de estudo de acordo com o ambiente (frequência relativa) (n= 227)..... 123

Gráfico 7 Caracterização da população de estudo de acordo com a utilização (frequência relativa) (n= 228)..... 123

Gráfico 8 Caracterização da população de estudo de acordo com o tamanho do pêlo (frequência relativa) (n= 301)..... 123

Gráfico 9 Caracterização da população de estudo de acordo com a presença de proprietário (frequência relativa) (n= 303)..... 124

Gráfico 10 Caracterização da população de estudo de acordo com género (frequência relativa) (n= 100)..... 124

Gráfico 11 Caracterização da população de estudo de acordo com a idade (frequência relativa) (n= 81)..... 124

Gráfico 12 Caracterização da população de estudo de acordo com a raça (frequência relativa) (n= 100)..... 125

Gráfico 13 Caracterização da população de estudo de acordo com o habitat (frequência relativa) (n=100)..... 125

Gráfico 14 Caracterização da população de estudo de acordo com o ambiente (frequência relativa) (n=83)..... 125

Gráfico 15 Caracterização da população de estudo de acordo com o tamanho do pelo (frequência relativa) (n= 100)..... 126

Gráfico 16 Caracterização da população de estudo de acordo com a esterilização (frequência relativa) (n = 95)..... 126
Gráfico 17 Caracterização da população de estudo de acordo com a presença de proprietário (frequência relativa) (n = 100)..... 126

CAPITULO IV – RESULTADOS

Gráfico 1 Sensibilidade das diferentes técnicas de diagnóstico de *Dirofilaria immitis*..... 142
Gráfico 2 Representação gráfica da percentagem dos níveis de antigénio baixo e elevado do Teste ELISA Snapp® Idexx (n=78)..... 143
Gráfico 3 Prevalência da dirofilariose canina de acordo com o tipo de infeção por *Dirofilaria immitis* (n=83)..... 144
Gráfico 4 Percentagem de animais infetados e não infetados por *Dirofilaria immitis* de acordo com o género (n=304)..... 145
Gráfico 5 Distribuição relativa do estado de infeção por *D. immitis* de acordo com a faixa etária (n=297)..... 146
Gráfico 6 Distribuição dos resultados dos cães investigados de acordo com os meses do ano de 2010 (n=304)..... 148
Gráfico 7 Relação da presença de sintomas com a infeção por *Dirofilaria immitis* (n=243)..... 149
Gráfico 8 Classificação da dirofilariose canina de acordo com os sinais clínicos (n=83)..... 153
Gráfico 9 Associação entre o nível de antigénio e a classificação da severidade da dirofilariose (n=78)..... 153
Gráfico 10 Frequência relativa dos géneros de animais infetados e não infetados por *Dirofilaria immitis* de acordo com o género (n=100)... 166
Gráfico 11 Relação da ausência/presença de sintomas com o estado de infeção para a *D. immitis* (n=82)..... 170
Gráfico 12 Frequência relativa da presença/ausência de sintomas em gatos parasitados com *D. immitis* (n=11)..... 170
Gráfico 13 Frequência relativa dos sintomas apresentados pelos gatos parasitados (n=7). Sint. Card+Resp: sintomas cardio-respiratórios. Sint. GI: sintomas gastrointestinais. Int. Exerc: intolerância ao exercício..... 171
Gráfico 14 Frequência relativa das alterações do exame físico apresentada pelos gatos positivos em pelo menos um teste serologico (n=16). FC: frequência respiratória, FC: frequência cardíaca, Temp: temperatura, TRC: tempo repleção capilar, Ausc. Pulm: Auscultação pulmonar, Palp.: palpação, CC: condição corporal, Ausc. Card.: auscultação cardíaca..... 173
Gráfico 15 Frequência relativa das alterações detetadas no exame físico nos gatos positivos em pelo menos um teste serológico e com sintomas na história clínica (n=7). FC: frequência respiratória, FC: frequência cardíaca, T:emp temperatura, TRC: tempo repleção capilar, Ausc. Pulm: auscultação pulmonar, Palp.: palpação, CC: condição corporal, Ausc. Card.: auscultação cardíaca..... 173
Gráfico 16 Frequência relativa da alterações radiográficas dos gatos parasitados (n=16), classificadas de acordo com o Score Brawner *et*

al., (2000)..... 175
Gráfico 17 Classificação radiográfica Brawner *et al.*, (2000) e a sua relação com a presença de sintomas em gatos infetados por *Dirofilaria* immitis (n=11)..... 176
Gráfico 18 Classificação radiográfica Brawner *et al.,* (2000) e a sua relação com a presença de alterações no exame físico (alt. ex. físico) em gatos infetados por *Dirofilaria immitis* (n=16)..... 176
Gráfico 19 Prevalência da exposição/infeção da dirofilariose felina (n=100)..... 178

CAPITULO VIII – ANEXOS

Gráfico 1 Distribuição gráfica da idade dos cães examinados (n=297)..... 268
Gráfico 2 Estado da infeção por *D. immitis* de acordo com o tamanho do cão (n=236)..... 269
Gráfico 3 Estado da infeção por *D. immitis* de acordo com a zona de habitat (n=227)..... 269
Gráfico 4 Estado da infeção por *D. immitis* de acordo com a presença de vegetação (n=137)..... 269
Gráfico 5 Estado da infeção por *D. immitis* de acordo com as características geográficas do habitat (n=129)..... 270
Gráfico 6 Estado da infeção por *D. immitis* de acordo com tipo de ambiente (n=298)..... 270
Gráfico 7 Estado da infeção por *D. immitis* de acordo com a utilização (n=228)..... 270
Gráfico 8 Distribuição gráfica da idade dos gatos examinados no estudo (n=81)..... 274

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. DIROFILARIOSE CANINA

A Dirofilariose foi considerada uma antropozoonose pela Ordem Mundial de Saúde (OMS), em 1979. É provocada por um nemátode do género *Dirofilaria,* pertencente à família Onchocercidae e à subfamília Dirofilariinae, da ordem Spirurida, a *Dirofilaria immitis* (Leidy,1856) [1, 2]. É transmitida por mais de 70 espécies de mosquitos dos géneros *Aedes, Anopheles e Culex*. Os cães são os principais hospedeiros, mas também estão descritos como hospedeiros: lobos, coiotes, raposas, felinos (incluindo o gato doméstico), mustelídeos (ex: furão), ursos, pandas, coelhos, cavalos, primatas e humanos [3, 4].

1.1. História

A primeira descrição do parasita *Dirofilaria immitis* (*D. immitis)* foi feita em Itália, em 1626, por Francesco Birago, que publicou um tratado de caça onde referia a observação do parasita no coração direito de um cão, no entanto, identificou-a erroneamente como outro parasita, *Dyoctophyma renale* [5-7].

Nos Estados Unidos, a primeira descrição publicada da doença em cães foi realizada pelo físico Osborne, em 1847, no periódico *The Western Journal of Medicine and Surgery* [4]. Foi descrita num cão de Erie, Alabama, como tendo uma infestação massiva de vermes brancos no coração e grandes vasos [8].

Em gatos, os primeiros relatos foram realizados por Travassos, em 1921, no periódico *Brasil-Medical* e por Riley, em 1922, *no Journal of Parasitology* [8].

Os primeiros casos de dirofilariose pulmonar em humanos foram descritos no Brasil por Silva-Araújo, em 1978, na Bahia e por Magalhães, em 1987, numa criança no Rio de Janeiro, que apresentava um parasita macho e outra fêmea no ventrículo direito. Nos Estados Unidos da América, não há relatos de infeções em humanos antes de 1940 e, desde então, foi considerada uma zoonose emergente [9].

Em 1856, Joseph Leidy classificou o agente etiológico dessa enfermidade como *Filaria immitis*. Em 1911, Raillet e Henry, dois parasitologistas franceses, descreveram o género *Dirofilaria* e, assim, a atual classificação taxonómica: *Dirofilaria immitis* [2, 10, 11].

Giuseppe Bancroft, no século XIX, foi o primeiro a sugerir que os insetos têm um papel como vetor no ciclo biológico das filárias. De acordo com Bancroft, os mosquitos infetam-se com o parasita durante a ingestão do sangue do hospedeiro quando se alimentam; contrariamente ao que se supunha na época, em que a via orofecal era a responsável pela transmissão do parasita. Esta intuição foi confirmada mais tarde e descrita no trabalho datado de fins do século XIX por Manson, Bancroft Jr, Grassi e Noe, acerca da filária linfática dos homens [12].

O cão doméstico, *Canis familiaris*, é o hospedeiro definitivo da dirofilária. A *D. immitis* teve a sua origem na Ásia, foi-se disseminando pelos países do mediterrâneo e foi levada para América pelos exploradores e emigrantes. Apesar de na altura dos descobrimentos existirem poucos representantes da *Canis lupus familiaris* na população nativa americana, a população canídea selvagem representada por lobos, coiotes e raposas serviu de hospedeiro definitivo [13].

1.2. Etiologia

1.2.1. Taxonomia

A Dirofilariose é causada pelo parasita *Dirofilaria immitis*, pertence ao filo Nematoda, classe Secernentea, ordem Spirurida, subordem Spirurina, superfamília Filarioidea, família Onchocercidae e subfamília Dirofilariinae [8, 14, 15].

O género *Dirofilaria* está dividido em dois subgéneros: o subgénero *Dirofilaria* que inclui a *Dirofilaria immitis* e outros parasitas que habitam as cavidades cardíacas (*D. ailure, D. spectans),* as cavidades cardíacas e o tecido subcutâneo *(D. lutrae)* e a cavidade abdominal (*D. freitasi*); e o subgénero *Nochtiella* que inclui parasitas de tecidos, como a *Dirofilaria repens (D. repens), D. tenuis e D. ursi* (Manfredi et al., 2001, Manfredi et al., 2007, Silva et al., 2010) (quadro 1) [4, 14, 15] .

To et al., (2012) num estudo recente, descreveram uma nova espécie de dirofilária responsável por infetar cães (3%) e humanos (3 casos descritos) em Hong Kong [16].

Os nemátodes do género *Dirofilaria* são alongados e finos com a extremidade anterior arredondada. Têm uma cápsula bucal rudimentar sem lábios e pequenas papilas cefálicas. O esófago diferencia-se numa região muscular e numa região glandular, mas sem distinção entre ambas. A extremidade caudal das fêmeas é arredondada. A abertura vulvar está localizada atrás da união do esófago com o intestino. A extremidade do macho é enrolada em espiral e mais cónica do que a da fêmea, possuindo uma aba caudal. Têm duas espículas assimétricas e o gubernáculo está ausente [14, 17].

Os nemátodes do subgénero *Dirofilaria* são filárias longas e a cutícula não apresenta estriações. Os nemátodes do subgénero *Nochtiella* são relativamente pequenos, a cutícula apresenta estriações, a papila caudal é assimétrica e a espícula maior é claramente pontiaguda (quadro 1) [4, 14].

1.2.2. Morfología da *Dirofilaria immitis*

Os adultos de *Dirofilaria immitis* são filiformes, longos, com uma coloração esbranquiçada, sendo revestidos por uma camada externa, a cutícula, que lhe confere resistência. Apresentam uma abertura oral terminal sem lábios que é rodeada por seis papilas mediais e duas papilas laterais, anfides. Encontram-se, sobretudo, nas artérias pulmonares e ventrículo direito dos seus hospedeiros. Alimentam-se do plasma, e podendo chegar a viver 5 anos no hospedeiro. A locomoção é realizada através de movimentos ondulantes alternados de contração e relaxamento muscular [4, 14, 18].

A fêmea adulta mede entre 250 a 330 mm de comprimento e 0,48 a 1,51 mm de largura e o macho mede entre 120-180 mm de comprimento e 1,12 mm de largura (quadro 1) [4, 17].

Os machos têm a extremidade caudal em espiral com duas asas laterais curtas. A face ventral apresenta papilas pré-anais, per-anais e pós-anais. As espículas são mais largas na extremidade proximal e afiladas na extremidade distal e são assimétricas (a espícula esquerda é maior que a direita). Não possuem gubernáculo. Apresentam uma cutícula lisa, sendo que as pregas e as estriações estão apenas presentes na face ventral da última espiral da cauda do macho (figura 1) [4, 14, 17].

As fêmeas têm a extremidade caudal obtusa, o ânus é subterminal e a abertura vulvar localiza-se posterior à junção do esófago com intestino, à distância de 1,65-2,72 mm da extremidade anterior e têm um par de úteros (figura 1) [14, 17].

	Dirofilaria immitis	*Dirofilaria repens*	*Acantocheilonema reconditum*	*Acantocheilonema dracunculoides*
Localização Adultos	Artéria pulmonar, ventrículo direito, átrio direito e veia cava	Tecido subcutâneo	Cavidade corporal	Cavidade abdominal
Machos				
- comprimento corpo	120-180mm	50-70mm	9-1 mm	15-31mm
- largura corpo	1,12mm	0,37-0,45mm	0,092-0,1mm	0,12-0,16mm
- comprimento esófago	1,46mm	0,75mm	1,8mm	2,27mm
- comp. espícula esquerda	216-318µm	465-590µm	22-30µm	32-34µm
- comp. espícula direita	188-200µm	185-206µm	9,2-10,4µm	12-16µm
Fêmeas				
- comprimento corpo	250-330mm	106-170mm	21-25,5mm	33-55mm
- largura corpo	0,48-1,51mm	0,46-0,65mm	0,146-0,168mm	0,22-0,28mm
- comprimento esófago	1,10-1.60mm	0,91-1,53mm	2,04-2,34mm	0,90mm
- distância cefálica-vulva	1,65-2,72mm	1,15- 1,62mm	0,68-0,92mm	1,25-1,60mm
Localização microfilárias	Sangue	Sangue	Sangue	Sangue

Quadro 1: Medidas e localização de diferentes espécies de nemátodes da subfamília Dirofilariinae e Onchocercinae encontradas no sul da Europa Adaptado de Manfredi *et al.*,(2001) [14].

As fêmeas são ovovivíparas, libertando as microfilárias (Mf), já descapsuladas, sistema circulatório. Estas medem entre 290-330 µm de comprimento e 5-7 µm largura. A extremidade cefálica é cónica e a caudal é reta e pontiaguda. As microfilárias podem chegar a sobreviver até 3 anos no sangue [4, 14, 19]. As microfilárias têm a sua superfície corporal coberta por estriações anulares transversais distanciadas entre si por 0,5-0,9 µm. A extremidade anterior é constituída por um disco cefálico com dois poros pequenos (canal central e canal cefálico ciliar) e uma cavidade de forma hemicíclica, tipo boca, na parte ventral da primeira estriação, com um gancho triangular que se projeta do palato superior, sendo rodeada por um processo tipo lábios. O poro excretor foi observado no 80º ânulo a contar da extremidade anterior e o poro anal foi observado no 90º ânulo a contar da extremidade posterior. Ambos os poros se localizam na parte ventral do corpo. A extremidade posterior tem uma cauda afilada constituída por um músculo espesso que através da força do seu movimento, permite a locomoção [18].

A ultraestrutura das formas adultas e das microfilárias da *Dirofilaria immitis* têm os mesmos sistemas estruturais: muscular, digestivo, nervoso, excretor, secretor, reprodutor e (exo) esqueleto. No entanto, há algumas modificações na forma embrionária das microfilárias. Assim, a parede corporal consiste numa cutícula com multicamadas, hipoderme e células musculares orientadas no sentido do eixo maior da larva. O sistema digestivo consiste num tubo esofágico primordial, células embrionárias que, no futuro, se desenvolverão no intestino e uma vesícula anal que consiste em microvilos, sugerindo uma função de absorção. O sistema reprodutivo ainda não se encontra desenvolvido.

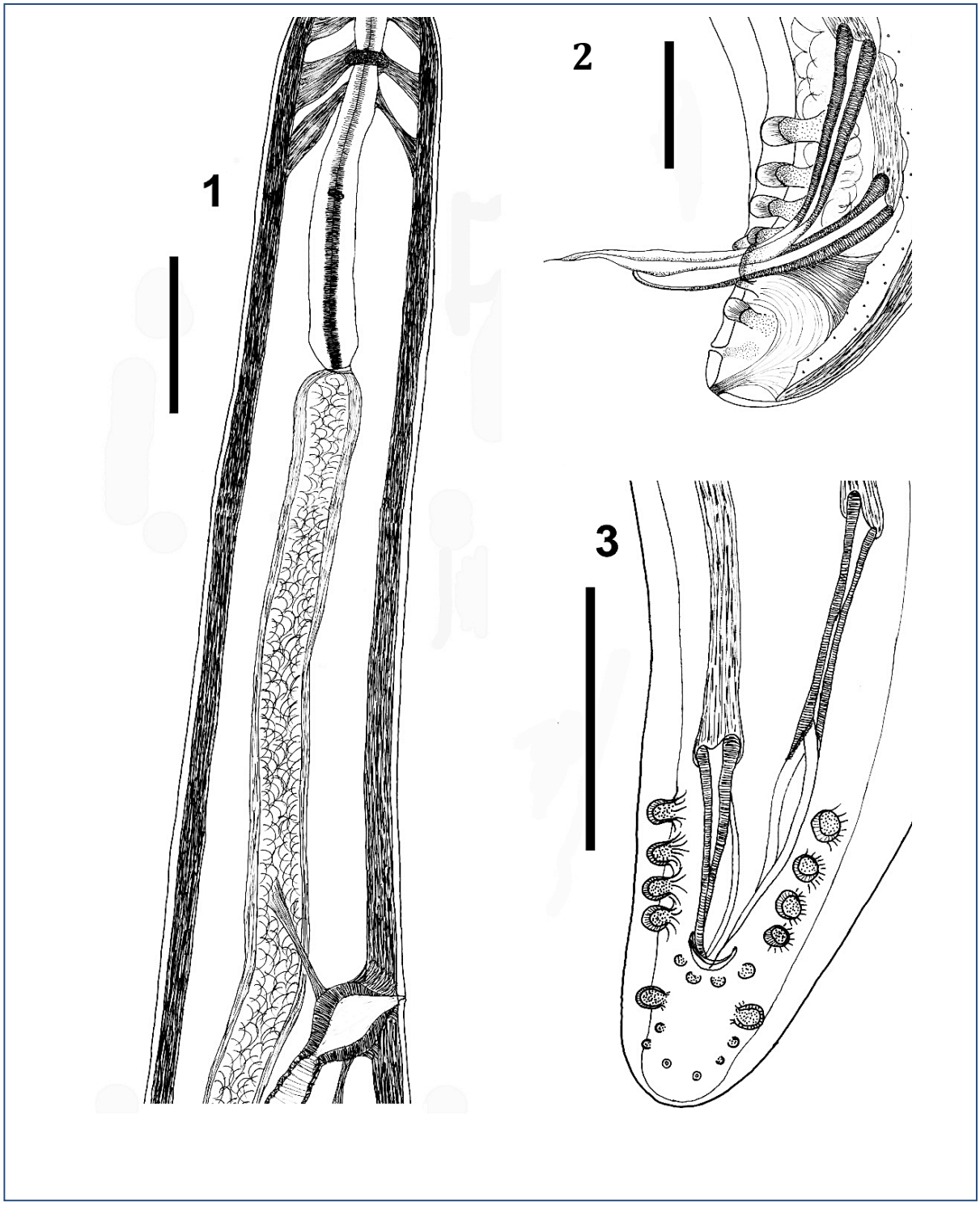


Figura 1: Representação microscópica da *Dirofilaria immitis*: (1) Extremidade anterior da fêmea, mostrando o anel nervoso, esófago, primeira porção do intestino e abertura vulvar. Bar = 200µm. (2) Vista lateral da extremidade posterior do macho, mostrando as espículas grandes e pequenas, papila pré-cloacal, papila pós-cloacal lateral ventral e fasmide. Bar= 100 µm. (3) Vista ventral da extremidade posterior com a papila pré-cloacal, par de pequena papila cloacal, abertura cloacal, 4 pares de papilas pós-cloacal, par de fasmides ventral e espícula pequena e grande. Bar=100 µm. Adaptado de Furtado *et a*l., (2010) [17]

O sistema nervoso consiste num anel nervoso, nervo periférico, anfide no espaço cefálico e fasmide na região da cauda. O sistema excretor consiste nas células excretoras e num apêndice citoplasmático que termina na vesícula excretora. As formas adultas têm o mesmo modelo estrutural que as microfilárias, mas os sistemas encontram-se mais desenvolvidos e maduros, especialmente os sistemas digestivo e reprodutor. A cutícula com multicamadas é coberta por uma epicutícula hidrofóbica, trilaminar e rica em lípidos. A hipoderme cilíndrica, subcuticular envolve as células musculares e a cavidade perientérica que contêm fluído perientérico, o sistema digestivo e o sistema reprodutor. O anfide e a papila cefálica são mais complexas, o gânglio das células nervosas encontram-se acima e abaixo do anel nervoso. O sistema digestivo consiste numa cápsula bucal curta, esófago, intestino composto por células epiteliais colunar e reto. O ovário é didelfo e, posterior a cada ovário, existem as células germinais primordiais que produzem as oogónias primárias que se desenvolvem e maturam durante a sua passagem no recetáculo seminal, onde os oócitos são fertilizados. O útero tem uma camada externa muscular e a contração propulsiona o conteúdo do útero anteriormente. As células espermáticas são ameboides [20].

A estrutura anatómica do nemátode que desperta maior interesse é a presença da cutícula, devido a ser um dos fatores responsáveis pela relação parasita/hospedeiro. A dirofilária, devido à sua localização, está continuamente exposta à ação do sistema imunitário do hospedeiro. A adaptação da cutícula, especialmente da camada mais externa desta, a epicutícula, ao meio hostil em que o parasita vive, contribui de forma decisiva para a sobrevivência da dirofilária no hospedeiro vertebrado. Apesar da diversidade morfológica das cutículas em diferentes espécies de nemátodes e mesmo entre as diferentes fases de evolução da mesma espécie, a estrutura e composição bioquímica tem-se mantido constante. A cutícula é secretada por uma camada fina, a hipoderme, que está separada desta por uma membrana. Do interior para o exterior, foram descritas várias camadas: uma camada basal com uma zona interna e outra externa, uma camada média e uma camada cortical com uma zona interna, outra externa e a epicutícula. Esta é constituída especialmente por proteínas e componentes não proteicos como lípidos, com diferentes caraterísticas biofísicas, levando a que a epicutícula seja constituída por regiões com diferente composição e organização. Em diversas espécies de nemátodes, a superfície é coberta por uma glicocálice osmofílica, com carga negativa e rica em carboidratos. A cutícula da *D. immitis* adapta-se ao padrão geral. A microfilária apresenta uma cutícula constituída por uma membrana trilaminar, uma camada externa densa e uma camada interna fibrosa. A cutícula sofre alterações, aquando das mudas do parasita de L3 para L4. As propriedades biológicas e físicas características da cutícula da forma L3 são a presença de carga negativa, não adsorver proteínas do hospedeiro e apresentar uma aderência não específica às células "in vivo" e "in vitro". A forma L4 tem uma superfície neutra ou ligeiramente positiva, fixa as proteínas do hospedeiro de modo não específico e não apresenta aderência às células. Ambas as formas larvares ativam o complemento pela via alternativa [14].

A estrutura da *D. immitis* indica uma extraordinária adaptação ao meio onde vive e a limitação da ação dos agentes quimioterapêuticos no seu controlo [20].

1.3. Ciclo de vida

A *Dirofilaria immitis* é um parasita com um ciclo de vida heteroxeno constituído por cinco estados larvares (L1 a L5), ocorrendo parte do seu desenvolvimento num hospedeiro invertebrado, um mosquito. O ciclo de vida da *D. immitis* é relativamente

longo (usualmente 7-9 meses), quando comparado com a maioria dos parasitas nemátodes (figura 2) [3].

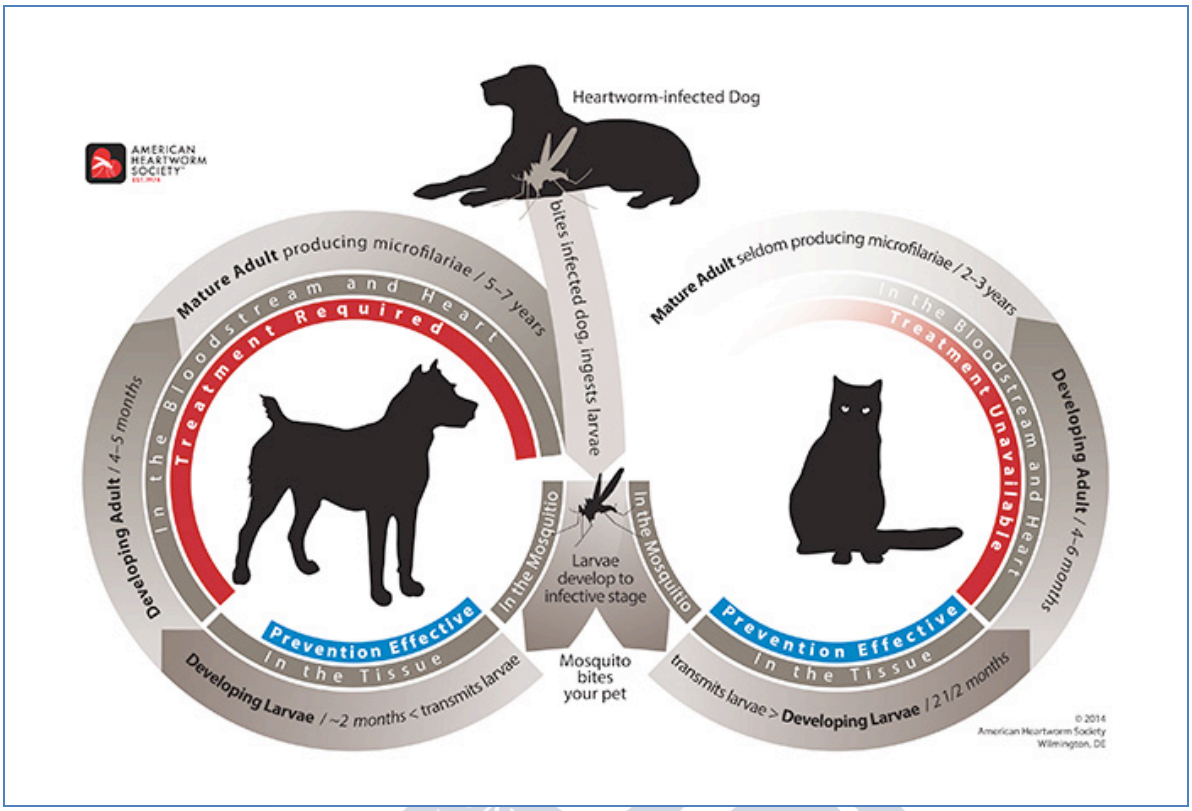


Figura 2: Ciclo de vida da *Dirofilaria immitis*. Adaptado de AHS (2014) [21]

1.3.1. Hospedeiro invertebrado

A *Dirofilaria immitis* é transmitida por mosquitos culicídeos que pertencem a diferentes géneros, como *Aedes* (Ae.), *Anopheles* (An.), *Culex* (Cx.) (figura 3 e 4) e *Ochterotatus* (Oc.) [22, 23].

Figura 3: *Culex pipiens*. Adaptado de www.entu.cas.cz [27].

Figura 4: *Culex pipiens*. Adaptado de barresfotonatura.com [28].

Os culicídeos são insetos pertencentes ao Filo Artophoda, Classe Insecta, Ordem Diptera, subordem Nematocera, família Culicidae. Esta família contém mais de 3500 espécies pertencentes a 37 ou 95 géneros, após nova classificação, sendo os mais

importantes, para a saúde pública e medicina veterinária, os géneros *Anopheles, Culex e Aedes* [12, 24-26].

Os culicídeos têm uma distribuição cosmopolita (exceto a Antártida) e a sua capacidade de adaptação permite a sua presença em todos os tipos de habitats, desde 1250 m abaixo do nível do mar (em minas), até 5500 m de altitude. Apresentam um raio de dispersão de sensivelmente 100 m do local de alimentação, o que é variável consoante a espécie (ex: *Aedes spp.* pode voar até 50 km), podendo contundo dispersar-se por longas distâncias através do vento [12, 24, 26].

O ciclo de vida dos mosquitos necessita de coleções de água para se completar e a sua duração depende das condições atmosféricas e do acesso ao alimento [12, 24, 26].

Quanto à alimentação, enquanto os machos se alimentam exclusivamente de sucos vegetais e néctares, as fêmeas alimentam-se preferencialmente de sangue de animais e vertebrados. Podem ter preferência por animais, zoofilia, ou pelo homem, antropofilia, o que vai condicionar o seu papel como vetores. Por outro lado, a refeição sanguínea tanto pode ser feita fora, exofagia, ou dentro, endofagia, das habitações. Após a refeição sanguínea, as fêmeas passam por um período de inatividade relativa, em que se dá a digestão e maturação dos ovos. Este repouso pode também ser fora ou dentro das habitações, exofílicas ou endofílicas, respetivamente, independentemente do local onde se deu a refeição sanguínea [12, 26].

Os culicídeos utilizam o fototropismo, estímulos químicos (dióxido de carbono, feromonas) e térmicos para encontrar um hospedeiro para efetuar a refeição. O seu pico de atividade varia com a espécie: há espécies noturnas (*Cx. pippiens* e a maioria dos *Anopheles spp*), outras ativas ao amanhecer (*An. gambia, An. balabancensis, An. maculipennis)*, outras que se alimentam durante o dia (*Ae. albopictus*) e outras espécies que apresentam mais do que um pico de atividade por dia *(Ae. Aegyptis, Ae. caspius, Ae. vexans e Cx. modestus)* [12, 24, 29].

Depois da hematofagia, as fêmeas põem até 300 ovos na superfície da água. A eclosão e a maturação larvar dependem da temperatura, alimentando-se de matéria orgânica. As pupas, a fase seguinte, são aquáticas, móveis, em forma de vírgula e não se alimentam. Os adultos emergem através de um tegumento pupal. Nas regiões temperadas, os ovos, as larvas e até os adultos de algumas espécies podem sobreviver ao inverno [26].

O papel destes vetores na epidemiologia da dirofilariose pode ser influenciado por vários fatores, tais como: a sua abundância, a existência de hospedeiros suscetíveis, a periodicidade da circulação de microfilárias nos hospedeiros reservatórios, os ciclos circadinos e sazonais da atividade do inseto que condicionam a frequência das refeições, a sazonalidade do desenvolvimento das larvas de dirofilariose no próprio vetor, as condições climatéricas, que permitem o desenvolvimento do mosquito e da *Dirofilaria immitis*. Outros fatores, que podem modular a expressão da atividade dos vetores, são a idade dos mosquitos (os mais velhos são epidemiologicamente mais importantes, em virtude da maior oportunidade em adquirir e transmitir agentes patogénicos) e o seu estado nutricional (um período de privação de sangue torna mais intenso o padrão de atividade do mosquito) [24, 30].

A transmissão da dirofilariose depende também do habitat dos vetores. Assim, nas áreas suburbanas e urbanas, os vetores endofílicos terão um papel mais importante na transmissão aos animais domésticos, enquanto que, nas zonas rurais, os vetores exofílicos serão os responsáveis pela manutenção do ciclo silvestre da dirofilariose [12, 24, 31]. Um estudo realizado em Porto Rico mostrou a associação do vetor *Ae. aegypti*

com áreas urbanas e o *Cx. quinquefasciatus* com zonas sub-urbanas [22]. Paras *et al.*, 2014, demonstraram que o vetor *Ae. albopictus* prefere zonas urbanas [32].

A transmissão da dirofilariose varia de acordo com as características da região. Alguns mosquitos preferem habitats tipo floresta, como *Ae. sierrensis e An. punctipennis*, outros preferem zonas irrigadas com produção de arroz, *An. quadrimaculatus* [33]. Estudos demonstraram que a prevalência é superior em regiões costeiras, devido ao desenvolvimento do mosquito ser dependente da presença de água e da temperatura ambiente. Logo, zonas pantanosas e vales de rios providenciam condições ambientais ideais para o desenvolvimento do vetor [22].

Outro fator importante na transmissão da dirofilariose é a atração que o hospedeiro exerce sobre o vetor. Os cães atraem um grande número de espécies de vetores: *Ae. caspius, Ae. scapularis, Ae. taeniorhynchus, Cx. pipiens* (figura 3 e 4*), Cx. quinquefasciatus, Cx. declator, Cx. nigripalpus, An. maculipennis e Coiquelletidia (Cs.) annulata* [22]. No entanto, algumas espécies de mosquitos, como *Cx. pipiens e o Cs. annulata,* adaptaram-se ao homem e outros mamíferos, apesar de serem ornitofílicos. O *A.s caspius e o Ae. albopictus* são antropofílicos, podendo ser vetores importantes na transmissão de dirofilária a humanos [12, 24, 34-36]. Capelli *et al.*, 2013 mostraram que o *Cx. pipiens* se alimenta em humanos (26%), mas preferencialmente em cães (70%) [37].

Nas áreas tropicais, os mosquitos são ativos durante todo o ano; nos climas temperados, os adultos estão ativos durante a primavera e verão e têm diferentes ritmos sazonais de atividade. As alterações ambientais e climatéricas previstas (aumento de temperatura média +0,2ºC em 10 anos), como consequência do aquecimento global, vão influenciar fortemente o padrão de atividade dos mosquitos nas áreas temperadas [24].

Perto de 70 espécies de mosquitos da família Culicidae são suscetíveis de permitir o desenvolvimento da *Dirofilaria immitis*, principalmente das espécies *Culex spp, Aedes spp, Anopheles spp, Culiseta spp e Coiquelletidia spp* e, por isso, são considerados vetores potenciais, tanto entre animais como humanos. Têm sido realizados estudos para identificar quais as espécies responsáveis pela transmissão da *D. immitis,* nas diferentes zonas endémicas [29, 38].

Nos Estados Unidos da América (EUA), relacionou-se o aumento da prevalência de dirofilariose nas zonas em que se encontravam presentes as seguintes espécies de vetor: *Ae. sierrensis, Cx. quinquefasciatus, An. punctipennis, An. quadrinaculatus e Ae. canadenses*, enquanto que as espécies *Ae. trivittatus, Ae. aegypti e Ae. albopictus* foram relacionadas com diminuição da prevalência [22, 33, 39].

No México, estudos demonstraram a eficiência dos seguintes vetores: *Ae. vexans, Cx. Quinquefasciatus, Cx. tarsalis* [30] e *Ae. taeniorrynchus* [40].

No Brasil, foi observada a presença de formas larvares L3 na população natural de mosquitos das seguintes espécies: *Cx quinquefasciatus, Aedes taeniorhynchs, Ochleratatus scapularis, Cx. declarator, Cx. nigripalpus* e *Aedes aegypti* [38, 41-47].

Na Argentina, foi confirmada a presença de formas larvares, nas seguintes espécies de mosquito: *Culex pippiens e Aedes aegyptii* [48, 49].

Na Coreia do Sul, Lee *et al.*, (2007) demonstraram a presença de formas larvares de *Dirofilaria immitis* nas seguintes espécies de mosquitos: *Ae. vexans, Cx. pippiens, An. sinesis, An. sineroides e Armigeres subalbatus* [50] .

Em Taiwan, em 2001, Lai *et al*., demonstraram como vetores naturais o *Cx. quinquefasciatus* e o *Ae. albopictus,* sendo o *Ae. albopictus* mais eficiente na transmissão [51].

Na Europa, o *Cx. pipiens* (figura 3 e 4) é considerado o maior vetor de *D. immitis* [52, 53]. A espécie *Cx. pipiens, An. maculipennis e Ae. albopictus* são provavelmente os vetores mais importantes na transmissão da dirofilariose na área do Mediterrâneo [23]. Algum destes mosquitos, como o *Cx. pipiens e An. maculipennis* encontram-se distribuídos por toda a Europa, enquanto outros, como o *Ae. albopictus,* estão a expandir-se para norte, a partir de áreas onde estão estabelecidos no Mediterrâneo [23].

Em Itália, os estudos demonstraram que as espécies *Ae. albopictus, Cx. pipiens, Ae. geniculatus, Ae. vexans, An. maculipennis, Ae. cinereus, Ae. punctor, Cs. richiardi, Cx. modestus e Cx. torrentium* são vetores da *D. immitis* [30, 35, 54]. Um estudo realizado em 2010, na região de Veneto, identificou a presença de *Dirofilaria immitis* nas espécies *Cx. pipiens, Oc. caspius, Ae. vexans* [55]. Giangaspero *et al*., (2013), mostraram a presença de *D. immitis* no vetor *Ae albopictus,* na região Apulia de Itália [56]. Montarsi *et al.*, (2014), demostraram a presença da *D. immitis* no mosquito exótico invasivo *Ae. koreicus* [57].

Yildirim *et al*., (2011) demonstraram a presença de larvas de *D. immitis* nos mosquitos da espécie *Ae. vexans e Cx. pipiens,* na Turquia [30].

Em Espanha, detetou-se a presença de *D. immitis* em mosquitos da espécie *Cx. theileri* [29, 58] e *Cx. pipiens* [29], nas ilhas Canárias.

Kronefeld *et al*., (2014) realizaram um estudo que demonstrou a presença de *D. immitis* no mosquito da espécie *Cx. pipiens/torrentium,* na Alemanha, país não endémico de dirofilária, refletindo a introdução do parasita, em áreas não endémicas do norte da Europa [23].

Em Portugal, a investigação sobre a fauna culicideológica iniciou-se em 1901 estando assinaladas 41 espécies de mosquitos, 10 anopheline e 20 culicine [26, 59].

Durante os anos de 2001-2003, foram capturados em todo o território nacional cerca de 30 mil mosquitos de 15 das 41 espécies já assinaladas. Entre estas, destacaram-se a *An. atroparvus, Cx. pipiens, Cx. theileri e Ae. caspius,* como as mais abundantes, sendo cerca de 92% do total de capturas e as mais amplamente distribuídas nos 18 distritos [26].

As espécies mais abundantes são potenciais vetores de dirofilária, como referido em diferentes estudos: *An. atroparvus* [60], *Cx. pipiens* [29, 30, 46, 48, 50, 61], *Cx. theileri* [26, 58, 62, 63] *e Ae.* (*Ochelaratus*) *caspius* [61].

Noutro estudo realizado entre 2005 e 2008, foram recolhidos 15000 mosquitos adultos e 3000 larvas que pertenciam a 16 espécies. As três espécies mais comuns foram novamente a *Oc. (Aedes) caspius* (75,1%), *Cx. pipiens (*14,4%) *e Cx. theileri* (8,2%) (Osório et al., 2010). No distrito de Coimbra, a distribuição de Culicídeos foi a seguinte: *Cx. pipiens (*57%), *Cx. theileri* (33,7%), *Oc. caspius* (6,2%), *An. maculipennis* (1,4%) [59].

No âmbito do programa REVIVE (Rede de Vigilância de Vetores Culicídeos em Portugal) foram recolhidos mosquitos adultos e imaturos, entre maio e outubro de 2012, em 80 concelhos de Portugal Continental e Madeira. Foram identificadas 21 espécies de mosquitos, 11 em estádios imaturos e 18 em adultos: *Ae. aegyptis, An. claviger, An. maculipennis, An. plumbeus, Cs. richiardii, Culiseta annulata, Cs. longiarreolata, Cx. hortensis, Cx. laticinctus, Cx. modestus, Cx. perexiguus, Cx. pipiens, Cx. theileri, Oc. berlandi, Oc. caspius, Oc. detritos, O.c geniculatus, Uranotaenia unguiculata.* Todas as espécies identificadas, à exceção de *Ae. aegyptis*, identificado pela primeira vez, em

2005, na ilha da Madeira, fazem parte da fauna de culicídeos de Portugal. A sua distribuição pelos concelhos do Continente encontra-se representada na figura 5 [64].

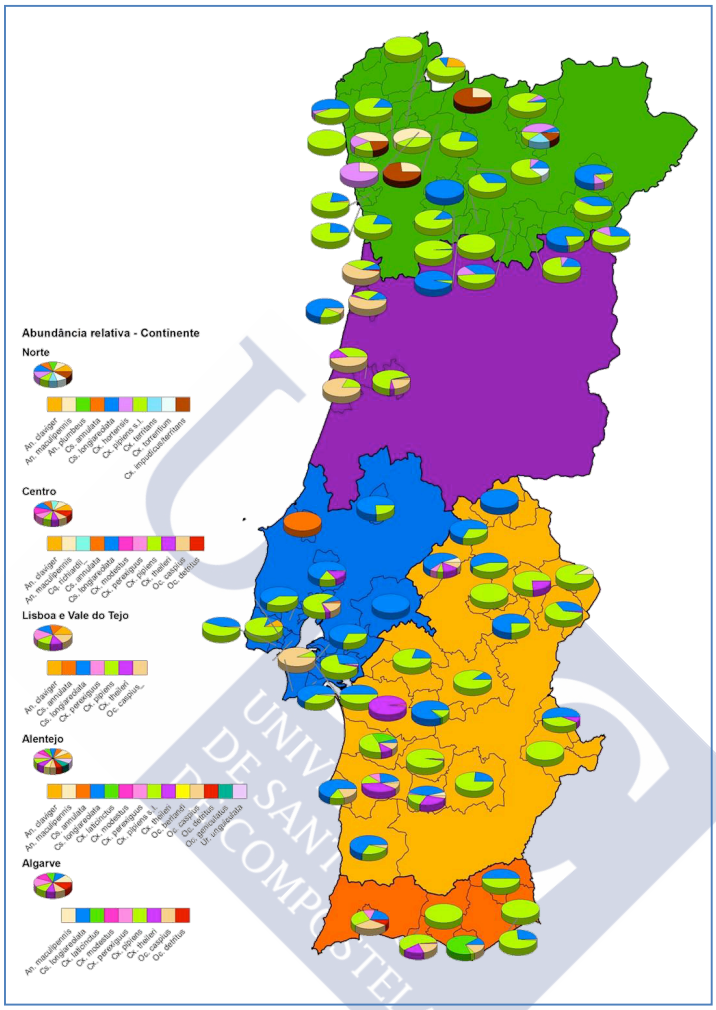


Figura 5: Abundância relativa das espécies nos concelhos do continente.
Adaptado de Alves *et al.*,(2012) [64].

Na região centro, no âmbito da mesmo programa, a Administração Regional de Saúde do Centro de Portugal procedeu a 108 colheitas de culicídeo adultos e 21 colheitas de imaturos, entre maio e outubro de 2012, em 6 concelhos da região centro: Aveiro, Coimbra, Figueira da Foz, Ilhavo, Montemor-o-Velho e Murtosa. Todas as espécies identificadas pertenciam à fauna de culicídeos de Portugal [64].

As espécies mais abundantes e com maior distribuição geográfica e mensal foram *Oc. caspius* (65,3%) e *Cx. pipiens* (27,8%), identificadas todos os meses e em todos os concelhos, onde se realizaram as colheitas, figura 6 [64].

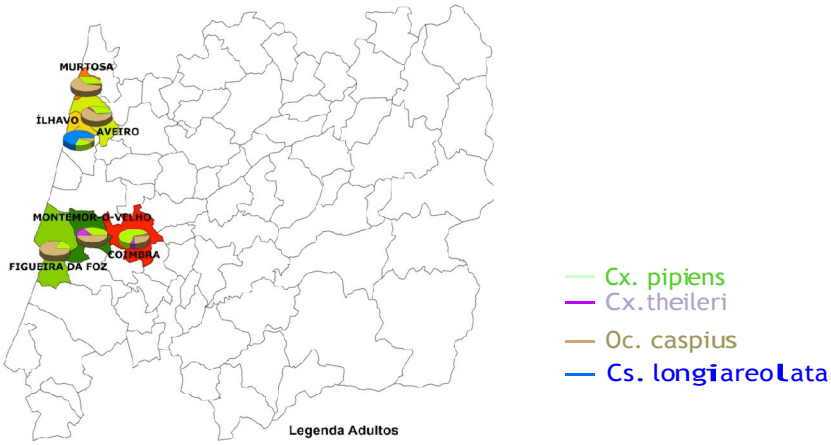


Figura 6: Abundância relativa das espécies identificadas nos concelhos da região centro. Adaptado de Alves *et al.*,(2012) [64].

No concelho da Figueira da Foz, as espécies identificadas e o números de espécimes por estádio e por mês encontram-se descritas no quadro 2. As espécies identificadas foram *Oc. Caspius, Cx. pipiens, Cx. theileri, An. maculipennis* e *Oc. detritus* [64].

	Maio			Junho			Julho			Agosto			Setembro			Outubro			Total
Figueira da Foz	L	□	□	L	□	□	L	□	□	L	□	□	L	□	□	L	□	□	
An. maculip.											2								**2 (0,08%))**
Cx. pipiens					23			217		1	30			83			78		**432 (17,8%)**
Cx. theileri											9			3					**12 (0,5%)**
Oc. caspius		1			241			60			178			303			1190		**1973 (81,5%)**
Oc. detritus		1																	**1 (0,04%)**
Sub-total		2			264			277		1	219			389			1268		
TOTAL	**2 (0,08%)**			**264 (10,9%)**			**277 (9,3%)**			**220 (9%)**			**389 (16%)**			**1269 (52%)**		**2420 (100%)**

Quadro 2: Espécies identificadas e número de espécimes por estádio, mês no concelho da Figueira da Foz. L= forma imatura. *An maculip.= An. maculipennis*. Adaptado de Alves *et al.*,(2012) [64].

Devido à proximidade do oceano Atlântico e à presença da foz do Rio Mondego, existe na Figueira da Foz, um porto comercial, onde é constante a entrada e saída de embarcações, sendo por isso um local priveligiado como porta de entrada de espécies exóticas. Da vigilância do porto da Figueira da Foz foram identificadas cinco espécies da fauna portuguesa de culicídeos (*An. maculipennis, Cx. pipiens, Cx. theileri, Oc. Caspius, Oc. Detritus),* não havendo identificação de espécies exóticas. No entanto, pode ser um ponto de disseminação da doença para países não endémicos [64].

Tendo em conta que o comportamento hematófago dos mosquitos tem um papel primordial na transmissão e manutenção de doenças transmitidas por vetores, foi realizado um estudo em Portugal, em 1993, para determinar as preferências hemáticas de três vetores de dirofilariose reconhecidos no país, *An. antroparvus, Cx. pipiens e Cx. theileri*, provenientes de várias localidades do sudeste do país. Os resultados deste estudo mostraram que as três espécies têm um caráter zoofílico, podendo ser

transmissoras de dirofilariose ao cão. O *Cx. theileri* e, em menor grau, *o An. antroparvus,* aparecem como espécies potencialmente transmissoras da dirofilariose ao homem [63].

Outro estudo realizado entre 2007 e 2010, com intuito de saber os hábitos alimentares das espécies de mosquito, demonstrou que as espécies *Cx. theileri e Oc. caspius* se alimentaram tanto hospedeiro *Canis familiaris* como do *Homo sapiens* [65].

Em relação à presença de larvas de *D. immitis* nos mosquitos em Portugal, foi descrita a sua presença na espécie *Cx. theileri,* na área da Comporta, Alcácer do Sal, em 1983 [26, 60, 62], no Funchal, Ilha da Madeira, em 2003 [66] e nas espécies *Cx. theileri* e *Cx. pipiens molestus* na Madeira [67]. As larvas de *D. immitis* também foram isoladas noutras espécies de culicídeos, nomeadamente, o *An. atroparvus* e *Cx. pipiens* [63].

Entre 2011 e 2013, foram capturados mosquitos em três distritos de Portugal (Coimbra, Santarém e Setúbal), com reconhecida endemecidade para a dirofilariose: 63,48% pertenciam à espécie *Cx. theileri*, 21,19% à *Cx. pipiens,* 6,56% à *Ae. caspius,* 4,43% à *An. maculipennis s.1*, 1,58% à *Cx. univittatus,* e outras espécies com densidades inferiores a 1%. Foi detetado ácido desoxirribonucleico (ADN) de *D. immitis* e respetivas taxas mínimas de infeção (TMI) e taxas de infeção estimada (ERI) nas seguintes espécies: *Ae. Caspius* (TMI 37/1000; ERI 3,73%)*, An. maculipennis s.1* (TMI 30/1000; ERI 3,12%), *Cx. theileri* (TMI 6,8/1000, ERI 0,75%), *Cx. pipiens* (TMI 5/1000, ERI 0,50%) e *Ae. detritus s.1* (TMI 43,5/1000, ERI 4,39%). As taxas de infeção foram mais altas em Coimbra, seguidas de Setúbal e, por fim, Santarém. À exceção de *Cx. pipiens* s.1, em todas as espécies foi encontrado pelo menos um indivíduo potencialmente infetante. Este estudo demonstrou a presença no nosso país de espécies vetores de dirofilariose canina, como o *Ae. caspius, An. maculipennis s.1, Cx. theileri* e o *Ae. detritus s.1*, sendo necessário mais estudos para avaliar melhor o papel do *Cx. pipiens* na transmissão desta doença em Portugal Continental [68, 69].

1.3.2. Desenvolvimento da *Dirofilaria immitis* no hospedeiro invertebrado

O mosquito fêmea infeta-se, quando se alimenta do sangue de um hospedeiro com microfilárias (L1) que se desenvolvem até à fase infetante (L3), no hospedeiro intermediário. O tempo necessário, para o desenvolvimento das microfilárias no hospedeiro intermediário, está dependente da temperatura ambiental. Assim, à temperatura de 28º- 30ºC, o desenvolvimento demora entre 8-10 dias, a 24ºC 11-12 dias e a 22ºC demora 16-20 dias [24, 29, 70]. A larva não sofre muda, quando as temperaturas são inferiores a 14ºC, no entanto, o processo reinicia-se, se a temperatura ambiental voltar a elevar-se [29, 71].

As microfilárias (L1) ingeridas pelo mosquito atravessam a faringe e alcançam o intestino médio onde se mantêm durante 24 horas. Migram até aos túbulos de Malpighi onde penetram na porção distal das células, ficando intracelulares, tornando-se mais pequenas e largas (tipo "salsicha"). No 6 -12º dia, as larvas passam das células tubulares para o lúmen do túbulo e mudam para o estádio L2, e, entre o 9-15º dia, para o estádio L3. Durante os 3 a 4 dias seguintes, a forma L3 cresce e perfura a membrana basal do túbulo, penetrando na cavidade celómica do mosquito. A forma L3 migra pelo corpo até chegar à cabeça e armazena-se no aparelho bucal, na probóscide, onde completa a sua maturação, chegando ao tamanho de 800-900 μm [4, 24, 71, 72] .

A invasão das células de Malpighi pelas formas L1 e a penetração das paredes tubulares pela saída das formas L3 são momentos críticos para a sobrevivência do mosquito. Se a carga parasitária for elevada, a função tubular fica comprometida,

desregulando a excreção de água e iões pelo mosquito. O número máximo de larvas compatíveis com a sobrevivência do mosquito depende da sua espécie [12, 24, 45, 73].

A percentagem de microfilária ingerida pelo mosquito e que se desenvolve até a forma L3 varia de 0 % a 100%. Em geral, a eficiência do vetor é a capacidade de o mosquito permitir o maior desenvolvimento de formas larvares de *D. immitis*, mas sem colocar a sua sobrevivência em causa [12, 24, 41].

A eficiência do vetor pode ser influenciada por fatores genéticos. Em vários estudos genéticos demonstrou-se que apenas a alteração de um gene pode afetar profundamente a sua eficiência. O mapa genético do *Ae. Aegypti,* baseado em isoenzimas e marcadores morfológicos, determinou as regiões dos genes que influenciam a sua suscetibilidade a vários patogéneos (ex: *Plasmodium gallinaceum, Brugia spp, D. immitis)*. Um gene recessivo (designado como f^t), localizado no cromossoma 1 do *Ae. aegyti*, mostrou ser importante no controlo da suscetibilidade ao parasita *D. immitis*. Ficou claro nesse estudo que outros genes devem estar também envolvidos [67]. Outro estudo realizado na zona oeste de Espanha, onde a *D. immitis* é endémica, identificou a forma larvar de *D. immitis* nos mosquito da espécie *Cx. pipiens* com haplotipo H1, mas não nos mosquitos da mesma espécie com haplotipo H2 e H3, demonstrando que a suscetibilidade e resistência do mosquito à infeção é determinada e controlada geneticamente [7].

O desenvolvimento do parasita no mosquito não é um processo benigno. Em geral, a fisiologia do hospedeiro é afetada devido a danos estruturais ou ao desequilíbrio no balanço fisiológico. Vários estudos com *D. immitis* mostraram um aumento da taxa de mortalidade nos mosquitos infetados, quando comparado com mosquitos não infetados. Adicionalmente, os estudos também revelaram uma correlação negativa forte entre a intensidade parasitária e a sobrevivência do mosquito. Palmer *et al*., (1986), cit. por Gouveia, (2007), sugeriram que as microfilárias da *D. immitis* provocam danos completos nas células dos túbulos de Malpighi, e infeções com elevadas cargas parasitárias podem levar a destruição completa do sistema excretor, levando à morte do hospedeiro [67].

Também está descrita a influência do parasitismo na fecundidade do mosquito. Tanto a encapsulação melanótica do parasita, como a formação do ovo, requerem substratos comuns, como a tirosina e a fenilalanina e, por isso, competem por recursos limitados, levando a uma diminuição da fecundidade do mosquitos. Christensen, (1981), cit. por Gouveia, (2007), mostrou que o *Oc. trivittatus* infetado por *D. immitis* tem um impato negativo na fertilidade e, à medida que a intensidade da infeção aumenta, o número de ovos produzidos pelo *Oc. Trivittatus* diminui [67].

A carga parasitária pode afetar a sobrevivência do mosquito, por isso, este usa mecanismos de defesa para bloquear o desenvolvimento larvar, sendo um dos mais importantes a presença de uma armadura bucofaríngea (estrutura que promove a destruição da cutícula das microfilárias, quando estas atravessam a faringe) [12, 24].

Outro mecanismo importante é o tempo de coagulação do sangue ingerido, pois influencia a competência do vetor. Se a coagulação do sangue for rápida, impede que as microfilárias atinjam os túbulos de Malpighi. Por um lado, existem mosquitos que produzem substâncias anticoagulantes (ex: *An. quadrinaculatus*) permitindo que as microfilárias atinjam os túbulos de Malpighi com maior facilidade; por outro lado, existem mosquitos que conseguem coagular o sangue ingerido no intestino, impedindo a migração das microfilárias. O vetor limita o número de larvas que progridem para a forma L3 através do reconhecimento antigénico pelo sistema humoral e celular, tendo

sido identificado na hemolinfa do vetor um polipeptídeo antimicrobiano, a defensina. Outros mecanismos de defesa observados foram a capacidade do *Ae. aegypti* de segregar uma substância que induz a lise da epicutícula do parasita, a capacidade do *Ae. scapularis e Ae. taeniorhynchus* encapsular, numa reação melanótica, as microfilárias presentes nos túbulos de Malpighi, levando à sua morte. A melanina é um pigmento produzido pelos hematócitos, através da hidroxilação da tirosina em dopamina. A tirosina é um fator limitante do processo, podendo ser obtida por via exógena, ou a partir da fenilanina pela fenilanina hidroxilase, que é a enzima requerida para completar a reação de melanização no vetor. A melanização termina com a formação de uma estrutura semelhante a uma membrana na zona externa da cápsula celular. A eficiência da melanização varia de acordo com a espécie e também entre os membros da mesma espécie, devido a diferenças na atividade da fenilanina hidroxilase, que é mais robusta nos primeiros 15 dias de vida do mosquito. Por outro lado, os hemócitos não são capazes de causar lesão às formas L3 que saem dos túbulos de Malpighi permitindo a sua migração até à cabeça do inseto [7, 12, 24, 35, 41, 42, 45, 73].

1.3.3. Hospedeiro vertebrado

A *Dirofilaria immitis* foi encontrada em mais de 30 espécies de mamíferos: canídeos domésticos e selvagens (ex: lobos, coiotes, raposas), felinos domésticos e selvagens, mustelídeos (ex: furão), primatas, mamíferos marinhos, roedores, ungulados e humanos. O cão é o hospedeiro mais frequentemente infetado e o reservatório mais competente [3, 4, 10, 74]. No entanto estão descritos outros hospedeiros: raposas vermelhas (*Vulpus vulpus),* com prevalência de 25% em Itália e 32% em Espanha. No lobo (*Canis lupus*) em Itália e Espanha, Jacal (*Canis aureus*), na Bulgária, na *Lutra lutra,* em Portugal e em furões *(Mustela putorius pitori)* [52].

1.3.4. Desenvolvimento da *Dirofilaria immitis* no hospedeiro vertebrado

A larva infetante (L3) é transmitida a um novo hospedeiro, quando o mosquito fêmea volta a alimentar-se de sangue. Deposita a forma infetante na pele do hospedeiro, juntamente com uma gota de hemolinfa, o que evita a desidratação mantendo a mobilidade da larva. A larva penetra no hospedeiro pela solução de continuidade deixada pelo mosquito. Podem ser transmitidas entre 10 a 12 formas larvares L3 por refeição. Cerca de 45% das larvas infetantes perdem-se na superfície da pele, sendo o processo de transmissão do mosquito para o hospedeiro vertebrado pouco eficiente [75].

As formas L3 e L4 têm termotaxia positiva, quando localizadas junto de um gradiente térmico. Esta capacidade permite que a larva L3 detete mínimas alterações na temperatura, o que é essencial para o sucesso na penetração da pele do hospedeiro endotérmico, através da solução de continuidade. A elevação da temperatura no interior do hospedeiro constitui um estímulo para a deslocação da forma L3 e L4 [72].

A larva infetante (L3) muda para o estádio L4 no tecido subcutâneo, adiposo ou muscular do hospedeiro, entre o 3º e 12º dia, após a infeção. A larva L4 recém-formada tem o mesmo tamanho que a forma L3. O crescimento significativo começa 2 a 3 semanas após a inoculação, de modo que, ao fim de 1 mês, o parasita tem 4 mm de comprimento e, ao fim de dois meses, tem 2 a 3 cm de comprimento [8, 14, 19]. A forma L4 migra através do tecido subcutâneo e músculo até à cavidade abdominal ou torácica (figura 7) [76].

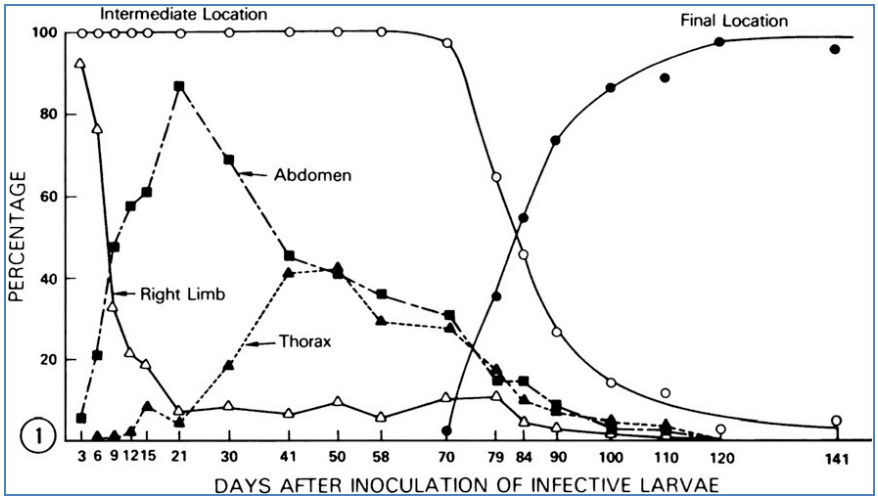


Figura 7: Padrão de distribuição e migração do nemátode *D. immitis* recuperado de cães inoculados. **O** percentagem total de larvas recuperadas de localizações intermédias (tecido subcutâneo e tecido muscular) pelo corpo, incluindo parasitas da cavidade abdominal e torácica. ■ percentagem recuperada do abdómen, △percentagem recuperada do membro posterior,▲percentagem recuperada no tórax,•percentagem recuperada na localização final (artérias pulmonares, câmaras direitas do coração e veia cava caudal) Adaptado de Bowman & Atkins (2009) [8].

A muda final de L4 para L5 (adulto imaturo) ocorre entre o 50 e 68º dia pós-infeção. A larva juvenil (L5) migra do tecido muscular e da cavidade torácica ou abdominal, entra no sistema vascular, circulando até ao coração e artérias pulmonares, onde amadurece até um estado adulto (durante 99 a 152 dias). As primeiras formas de dirofilária que aparecem nas artérias pulmonares têm entre 2 a 3 cm de comprimento. Nesta altura, sofrem um crescimento rápido, chegando as dirofilárias adultas macho a atingirem 12-18 cm e as fêmeas podem atingir 25-30 cm (figura 7) [4, 8, 19, 72].

Quando as formas juvenis da *Dirofilaria immitis* chegam ao coração e pulmões, a pressão venosa sanguínea desloca-as para as pequenas artérias pulmonares. A maioria das filárias alojam-se nos lobos pulmonares caudais, por estes apresentarem maior fluxo sanguíneo [71]. Com o crescimento e o aumento de tamanho, elas progressivamente migram para artérias de maior calibre, até atingirem a maturidade. A localização das formas adultas do parasita depende, principalmente, do seu tamanho e da carga parasitária. Num cão de raça média (ex: Beagle), com uma carga parasitária baixa (ex: 10 nemátodos), os parasitas localizam-se principalmente nas artérias lobares e na artéria pulmonar principal. Se aumentar a carga parasitária, os parasitas também se poderão localizar no ventrículo direito. Um cão com mais de 40 nemátodos apresenta o síndrome de veia cava, no qual a maioria dos parasitas migram para o ventrículo direito, átrio direito e veia cava caudal, interferindo com a função valvular e com o fluxo sanguíneo [3].

Em condições ideais, o ciclo da dirofilária (microfilária a adulto maduro) demora de 184 a 210 dias. Apenas os adultos maduros são capazes de se reproduzir e os hospedeiros só se tornam microfilarémicos 6 a 8 meses depois da infeção inicial. A fertilização ocorre nas artérias pulmonares. As dirofilárias adultas chegam a viver durante 5 anos nas artérias pulmonares dos cães e as microfilárias podem chegar a sobreviver durante 30 meses (quadro 3) [4, 8, 19, 72] .

A dinâmica da interação da microfilária entre cães e mosquitos é importante para a transmissão do parasita. Ainda não foi demonstrado a existência de uma correlação entre as microfilárias circulantes por cm^3 de sangue e o número de parasitas

adultos presentes nas artérias pulmonares. Deve existir um mecanismo na regulação homeostática que controla o número total de microfilárias presentes no sangue periférico, pois o número destas não aumenta descontroladamente durante uma infeção crónica, mesmo sabendo-se que as microfilárias podem viver até 3 anos [8, 19].

Estádio	Dia	Localização	Tamanho
L3	Dia 0 (inoculação)	Subcutâneo	1 mm
L4	Dia 3-10	Musculatura	2 mm
L4	Dia 21	Musculatura (abdómen)	
L4	Dia 41	Musculatura (abdómen/ tórax)	10 mm
L5	Dia 50-70	Penetração da veia jugular	
L5	Dia 70-85	Primeiras larvas chegam ao pulmão	2 – 4 cm
Juvenil	Dia 90-120	Artéria pulmonar	
Adulto	Dia 120 (4º mês)	Artérias pulmonar principais	15 – 30 cm
Microfilária	Dia 210-270 (7º-9º mês)	Sangue periférico	(Mf= 270-385 µm)

Quadro 3: Fases de desenvolvimento da *Dirofilaria immitis* no cão. Mf: microfilária. Adaptado de Montoya-Alonso & Gómez (2012) [77].

Existe uma variação sazonal e diária no número de microfilárias encontradas no sangue dos cães. Diariamente, os níveis circulantes de microfilárias de *D. immitis* é definido como subperiódico, ocorrendo a concentração máxima de microfilárias no sangue circulante, ao amanhecer e ao anoitecer, na maioria das localizações geográficas. Mas mesmo em níveis baixos, o sangue periférico contém 5 a 20% do total de microfilárias. As épocas de maior número de microfilárias presentes no sangue de cães infetados são a primavera e o verão. A flutuação diária e sazonal no número de microfilárias correlaciona-se com a presença do vetor [8, 78].

1.3.5. Outras possibilidades de transmissão

Embora menos comuns, estão descritas duas formas de transmissão, para além dos vetores culicídeos: a transmissão vertical pela via transplacentária e a transfusão sanguínea. As microfilárias transmitidas por estas formas não têm capacidade para atingir a maturação, porque só no vetor se completa o ciclo de vida do parasita, contudo continuam a ser infetantes para os mosquitos, contribuindo para a continuidade do ciclo [79].

1.4. Epidemiologia

As infeções por filárias ocorrem em todo o mundo e são provocadas por diferentes géneros e espécies de nemátodes. Embora a *Dirofilaria immitis* seja considerada a mais importante, por colocar em causa a sobrevivência do hospedeiro, existem outras filárias que podem infetar carnívoros domésticos e selvagens (quadro 4) [3].

Para além da infeção por *D. immitis,* está descrita a presença de *Acanthocheilonema (anteriormente Dipetalonema) reconditum*, na América do Norte e do Sul, como por exemplo, prevalências de 22% no Paraná, Brasil [80]. Na Europa, África e Ásia podem encontrar-se em cães, gatos e carnívoros selvagens, as seguintes espécies: *Dirofilaria immitis, D. repens, A. Reconditum, Acantocheilonema (anteriormente Dipetalonema) dranculoides e Cercopithifilaria (anteriormente Dipetalonema) grassi.* As espécies de dirofilária (*D. immitis e D. repens)* são transmitidas por diferentes espécies de mosquito que atuam como hospedeiros

intermediários e vetores, enquanto as espécies *Acantocheilonema spp.* e *C. grassi* são transmitidas por carraças, piolhos, pulgas e moscas [3]. Existem vários fatores que exercem influência sobre a disseminação de doenças. Atualmente, é consenso científico, que as alterações climatéricas têm um grande impacto na disseminação de doenças provocadas por vetores [29, 81] e não existem fronteiras que evitem a disseminação global de doenças transmitidas por vetores [82].

Agente	Vetor	Período Pré-patente	Mf no sangue	Adulto M/F	Localização dos adultos
Dirofilaria immitis	Culicidae Aedes	[79]120-180 dias	290-330 µm	12-18 cm 25-30 cm	Artérias pulmonares e coração direito
Dirofilaria Repens	Culicidae	189 -259 dias	320-370 µm	5-7 cm 10-17 cm	Tecido subcutâneo e fáscia muscular
Acanthocheilonema reconditum	Pulgas, piolhos, carraças	427-476 dias	269-283 µm	9-17 mm 21-25 mm	Tecido subcutâneo e fáscia muscular
Acanthocheilonema dranculoides	Moscas Carraças	?	195-230 µm	15-31 mm 33-55 mm	Cavidade peritoneal
Cercopithifilaria grassii	Carraças	?	570 µm Microfilárias na pele	Desconhecido 23-24 mm	Tecido subcutâneo e fáscia muscular

Quadro 4: Espécies de filárias que infetam cães e gatos. Mf: microfilária. Adaptado de McCall *et al.*, 2008) [3].

A maior parte dos hospedeiros intermediários e vetores e a maioria dos reservatórios têm distribuições geográficas bem definidas, resultantes de processos de evolução e que condicionam a doença que transmitem, ou o seu local de abrigo. A alteração do clima global poderá expandir a distribuição de agentes patogénicos transmitidos por vetores, tanto no espaço como no tempo, expondo as populações hospedeiras a épocas de transmissão mais prolongadas e expondo populações imunologicamente *naive* a agentes patogénicos recém-introduzidos [83].

A temperatura circundante influencia diretamente a fisiologia dos vetores de sangue frio e dos agentes patogénicos que estes vetores transmitem. Em muitos casos, o agente patogénico só se desenvolve dentro do vetor (incubação), num determinado intervalo de temperatura, mesmo apesar de ambos poderem tolerar temperaturas extremas [83].

Com respeito à dirofilariose, as alterações climatéricas aumentaram o período anual de atividade do mosquito, diminuíram o tempo de desenvolvimento larvar, aumentaram a transmissão em várias regiões geográficas e tornaram novas regiões com condições para o desenvolvimento e disseminação da doença [29, 81].

Para além da temperatura, também são importantes outros fatores ambientais como a precipitação, humidade e a altitude [84].

A ecologia e a epidemiologia das doenças transmitidas por vetores são afetadas pelas inter-relações entre quatro fatores principais: agente patogénico, o hospedeiro (humano ou animal), o vetor e o ambiente. Além das alterações atmosféricas e climáticas, é igualmente plausível que o contexto socioeconómico, os efeitos demográficos e ecológicos lancem algumas dúvidas sobre o papel da alteração climática. Alguns destes efeitos facilitam a expansão de vetores e agentes patogénicos, como a alteração no habitat, alteração no armazenamento de água e dos hábitos de rega,

poluição, desenvolvimento de resistência a inseticidas e fármacos (Ex: *Anophles spp.* e DDT), globalização, aumento do comércio, turismo e viagens internacionais, hospedeiros com imunodeficiência, guerra e agitação civil, falha de gestão global e governamental [29, 83, 85].

Outros fatores importantes são o movimento de pessoas (trabalho, férias, turismo, entre outros) acompanhado do aumento do número de cães que viajam de zonas endémicas para novas áreas (ex: cidadão do Norte da Europa que viaja para Portugal, Espanha ou Itália); o aumento de troca de bens, através de diferentes transportes (ex: contentores, aviões) tem um papel fundamental na introdução e estabelecimento de novas espécies de vetores em zonas não endémicas [82, 85].

É importante referir o papel reservatório de outros animais, como o coiote na Califórnia e a raposa na Austrália. Na Europa, o papel das raposas e dos lobos como reservatório de dirofilária pode ser um fator importante a considerar, devido ao seu papel na manutenção e disseminação da doença [29].

Outro fator fundamental é a presença de mosquitos capazes de atuar como vetor, e a existência de clima adequado para o seu desenvolvimento. É necessário ter em conta a introdução de novas espécies. como o *Ae. albopictus* em Itália e na Europa vindo do sudeste Asiático e Pacífico, sendo a sua disseminação facilitada atualmente pelo transporte acidental em veículos [29].

O desenvolvimento urbano, com introdução de atividade humana em novas áreas, permitiu aumentar a densidade de potenciais hospedeiros e criação de condições para a proliferação de espécies de mosquitos. A criação de microambientes, que permitem suportar o desenvolvimento larvar, mesmo durante os meses frios, devido ao aquecimento das casas, também têm um papel importante na disseminação da doença [29].

Concluindo, a transmissão da dirofilária está dependente do número de cães parasitados e microfilarémicos, do número de mosquitos suscetíveis e do clima que permita a incubação extrínseca do parasita no vetor mosquito [30].

Os mapas de sazonalidade/transmissão baseam-se nas unidades de desenvolvimento de dirofilariose (UDDs). As UDDs representam o número de graus dia (ºC) que a larva de dirofilária está acima do limite de temperatura (>14ºC) no vetor. Portanto, se a temperatura é de 15ºC por 24 horas, a larva ganha 1 UDD, se a temperatura é de 26ºC por 24 horas, a larva acumula 12 UDD. A larva necessita de acumular 130 UDD para ficar infetante. Para determinar isolinhas de UDD em mapas, para o inicio da época de transmissão, é necessário converter a temperatura diária em UDD (temperatura diária= temp máxima + temp mínima/2 – 14ºC). Para determinar o fim da época de transmissão, calcula-se a última data do ano, em que foi possível acumular 130 UDDs em 30 dias, a esperança de vida média do mosquito (figura 8) [8].

O modelo de transmissão sazonal de dirofilária foi formulado por Slocombe *et al*., (1989) [5] no Canadá e reavaliado por Lok and Knight, (1998) [5] nos Estados Unidos [3, 5, 70].

O sistema de informação geográfica (GIS) é uma ferramenta útil em estudos epidemiológicos, permitindo desenhar mapas com informação acerca da distribuição, prevalência e incidência e separar zonas não endémicas de zonas endémicas. Tendo em conta o conceito de crescimento de graus diário (UDD) foi possível predizer a ocorrência e sazonalidade da *D. immitis* na Europa [5] e na Argentina [49].

Figura 8: Pontos indicam as estações meteorológicas que atingiram 130 UDD em julho, baseado no registo de temperatura dos últimos 15 anos. Adaptado de Genchi *et al.*, (2009) [70].

Os mapas de riscos foram produzidos juntando o modelo de transmissão sazonal com o GIS, baseado no regime térmico e informação acerca do vetor [2]. O modelo da dirofilariose é baseado no fato do clima determinar a sazonalidade da transmissão da doença [13].

Este modelo permitiu confirmar que as temperaturas favoráveis na Europa para o desenvolvimento da dirofilária encontram-se, principalmente, nos países de Sul e estimou que o máximo de 10 gerações de *D. immitis* podem desenvolver-se no mosquito vetor por ano [5]. A transmissão de *D. immitis,* na Europa, tem um padrão sazonal com o pico no verão, pois o clima quente facilita o desenvolvimento das larvas no hospedeiro intermediário [5, 49, 81] Em Portugal, a época de transmissão de *Dirofilaria immitis* inicia-se em junho e prolonga-se até outubro [5].

Musella *et al.*, (2014) e Rinaldi *et al.,* (2014) demonstraram que tem aumentado o intervalo potencial de risco de transmissão de dirofilária na Europa, mesmo em latitudes elevadas, na últimas décadas, de 5-6 meses na década de 1980-1989, para 6,5 meses na década de 1990-1999 e para 7 meses na década de 2000-2012 [86, 87].

O mesmo modelo aplicado na Argentina sugeriu que a transmissão é marcadamente sazonal com pico no mês de janeiro e fevereiro (verão) com declíneo em abril e maio [88], As mesmas condições foram descritas para o Uruguai. No Chile, apenas se reúnem as condições para a transmissão do parasita no Norte e Centro do país [88]. Nos países do Norte da América do Sul, a transmissão ocorre durante todo o ano, devido ao fato das temperaturas se manterem dentro do intervalo ideal, para o desenvolvimento do mosquito e do parasita durante todo ano [5].

Nos EUA a transmissão sazonal foi demonstrada em cães e coiotes sentinela e em mosquitos infetados naturalmente [49]. As datas de início foram abril para o Lousiana e Georgia, fevereiro e março para a Flórida e a data de término foi o fim de outubro e início de novembro para o Louisiana e Georgia e início de dezembro para a Flórida. Na Califórnia, a época vai de maio até outubro. Na região da costa do golfo do EUA é continua [8].

Modelos preditivos demonstraram o risco atual de disseminação de infeções por filárias para áreas sem registo de infeções, tanto no hemisfério Norte como no hemisfério Sul [80, 89, 90].

Em Portugal, este modelo foi aplicado aos dados obtidos em 5 estações meteorológicas (Porto, Lisboa, Faro, Açores e Madeira), demonstrando que o local com melhores condições para a transmissão de dirofilariose foi a Madeira com 209,9 dias/ano e um intervalo de risco de transmissão de 8 meses/ano, seguido de Faro com 175,2 dias/ano e intervalo de 6,9 meses/ano, Lisboa com 163,5 dias/ano e intervalo de 6,4 meses/ano, Açores com 140 dias/ano e intervalo 5,6 meses ano e, por fim, Porto com 117,2 dias/ano com período de 5 meses/ano. Durante a última década, foram registados 130 UDD de junho a novembro no Porto e Açores, abril a novembro em Lisboa e Faro, e um período mais extenso na Madeira, de abril a janeiro [91].

A informação dada por estes modelos providencia um bom guia em relação ao risco de transmissão da dirofilária [49]. Permite dar informação aos médicos veterinários e as autoridades de saúde para fazerem esforços na sua prevenção [12].

Atualmente, a infecão por dirofilária disseminou do Canadá e dos estados do Norte dos EUA (43-48ºN paralelo) até ao paralelo 34ºS na América do Sul (Argentina), estendendo-se mesmo até ao paralelo 45ºS [49]. Na América, a área endémica encontra-se entre o paralelo 24º-34ºN. Na Europa, as infeções estão confinadas entre o paralelo 43,5º–50ºN, demonstrando que, embora a temperatura seja crítica, existem outros fatores envolvidos na epidemiologia da doença e que afetam a sua distribuição geográfica [2]. No entanto, o parasita já foi diagnosticado no Norte de França (área de Cheburg, abaixo da latitude de 50ºN) [5]. A área com maior prevalência de dirofilária na Europa é ao longo do Vale do Rio Po, no Norte de Itália, entre a latitude 45-47ºN, com valores de prevalência de 50% [5]. Tem aumentado a incidência e disseminação da dirofilariose para países do Norte e Centro da Europa, zonas que não eram endémicas, apesar dos esforços na prevenção e controlo da doença (figura 9) [2, [29, 74].

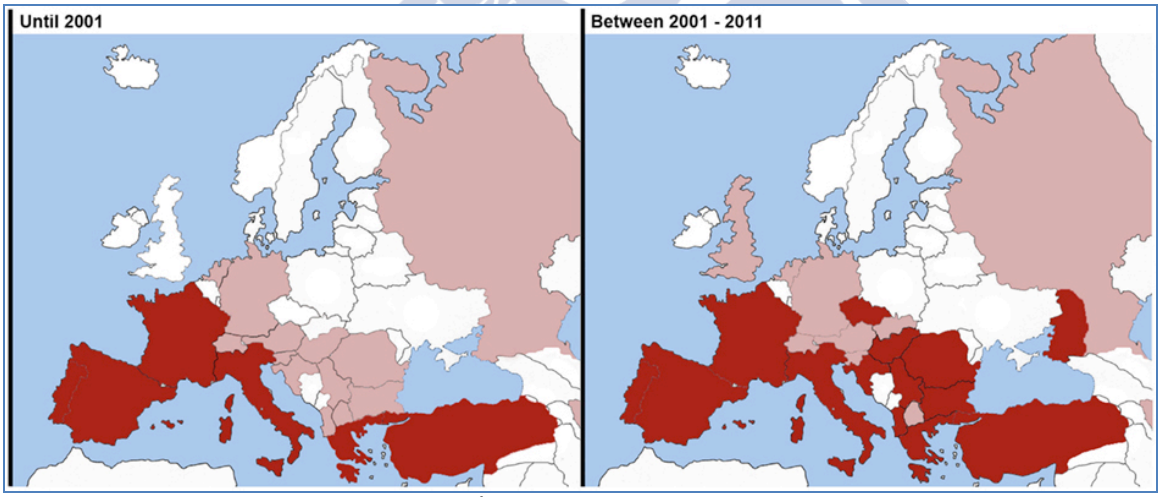


Figura 9: Comparação da distribuição geográfica da dirofilariose (*D. immitis*) na Europa em 2001 e 2011. Vermelho: zonas endémicas, rosa: casos esporádicos. Adaptado de Morchón *et al.*, (2012) [28]

1.4.1. Prevalência de *Dirofilaria Immitis*

1.4.1.1. Fatores de Risco

Tendo em conta a distribuição global da *Dirofilaria immitis,* é importante identificar quais os fatores de risco que poderão potenciar a transmissão da doença e perpetuar a sua disseminação.

A prevalência da dirofilariose canina de acordo com o **sexo** tem resultados contraditórios. Existem estudos que descrevem não existir diferenças significativas entre os sexos [3, 44, 84, 92-110]. No entanto, há outros investigadores que descrevem

uma prevalência superior nos machos, dado que estes passam mais tempo no exterior, na defesa do território, estando mais expostos ao vetor [111-121]. Em relação ao risco, Rosa *et al.,* (2012), mostraram que os machos tinham um risco 1,8 vezes superior às fêmeas e Byeont *et al.*, (2007), mostraram um risco duas vezes superior para os machos. Ao contrário dos outros estudos, Bólio-Gonzalez *et al.,* (2007), revelaram, numa regressão logística, que as fêmeas tinham maior risco (2,85x) que os machos de serem parasitadas por *D. immitis*.

Em relação à prevalência de dirofilariose, alguns autores admitem que a **idade** é um fator de risco importante, pois está relacionada com a exposição à doença. O risco de infeção provavelmente fica estável ao longo da vida, por isso, a probabilidade de adquirir infeção por *Dirofilaria immitis* aumenta com o período de exposição ao mosquito. Logo, à medida que a idade aumenta, os cães têm uma maior janela de oportunidade de serem infetados pelos mosquitos [95-98, 102, 107, 110-113, 115, 116, 122-125].

Muitos estudos demonstraram a prevalência da dirofilariose aumentar até meia idade (por volta dos 8 anos) e depois ter um declínio. Este padrão de prevalência é suspeito das consequências da morte seletiva dos cães infetados ou do seu tratamento [103, 107, 120, 126]. Noutros estudos não se verificaram diferenças na prevalência relativamente à idade [101, 104, 108].

Em relação ao **modo de vida**, em vários estudos foi demonstrada uma prevalência superior nos cães que vivem no exterior, pois estão mais expostos à picada dos mosquitos [56, 97, 109, 115, 116, 119]. Byeon *et al*, (2007), demonstraram que o risco de viver no exterior é 10 vezes superior ao risco de viver dentro de casa [111, 126, 127].

Em relação ao **tamanho do cão**, em vários estudos, os cães de raças grandes mostraram uma prevalência superior aos cães de raças pequenas [115, 116, 127]. As razões apontadas para esse facto foram que, por norma, os cães de raça grande passam mais tempo no exterior [128] e têm uma maior superfície corporal exposta ao mosquito [129].

Em relação à **atividade dos cães**, vários estudos demonstraram que cães de guarda, pastores e de caça têm uma maior prevalência de dirofilariose, principalmente, por passarem mais tempo expostos aos vetores [56, 84, 92, 111, 113, 116].

Em relação ao **tamanho do pelo**, foi hipotetizado que cães com pelagens compridas ou espessas eram menos predispostos a serem picados pelo mosquito, por estes terem maior dificuldade de acesso à pele [128]. Mas a maioria dos estudos não demonstrou diferenças na prevalência, tendo em conta o tipo de pelo [92, 96, 128, 130, 131].

Em relação à **raça,** não foi demonstrada diferenças na prevalência entre cães de raça determinada e cães de raça indeterminada [84, 96, 120, 124, 130, 131].

Em relação à **presença de proprietário**, alguns estudos mostraram uma prevalência superior em cães sem proprietário, em relação a cães com proprietário, por passarem mais tempo no exterior, expostos aos mosquitos [56, 95, 132]. Outros estudos não comprovaram essa diferença, obtendo prevalências semelhantes entre cães sem proprietário e cães com proprietário [103].

1.4.1.2. Prevalência de dirofilariose no Mundo

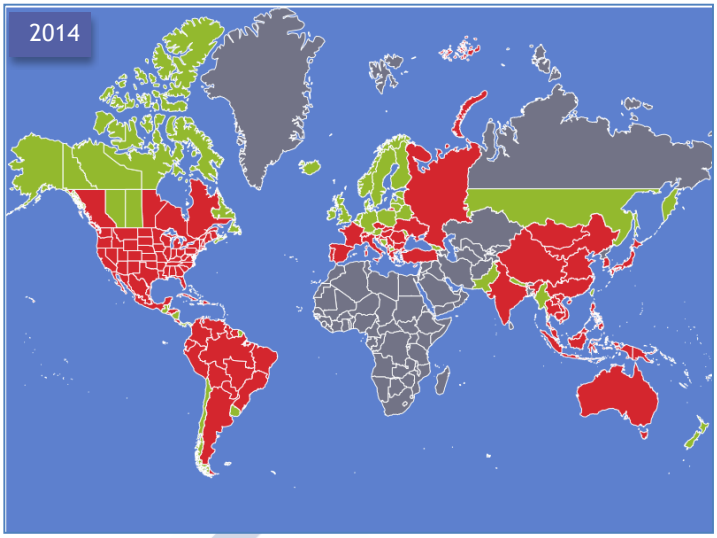


Figura 10 : Distribuição mundial *da Dirofilaria immitis* .
Vermelho: zonas endémicas, verde: zonas não endémicas, cinzento: sem dados
Adaptado de cvbd [133]

A prevalência de *D. immitis* tem aumentado no Mundo (figura 10) [7].

Na **América do Norte,** a infeção por *D. immitis* em cães foi diagnosticada em todos os cinquenta estados dos EUA com prevalência entre 1 a 2% [7]. Com exceção do Alasca, a doença é considerada endémica nos outros quarenta e nove estados. A dirofilariose é enzoótica ao longo da Costa Atlântica e Costa do Golfo, com os estados de sudeste a apresentarem uma maior prevalência. A infeção continua a ser diagnosticada com bastante frequência ao longo do Rio Mississípi e nos estados de Ohio e Rio de Missouri. Novos focos foram detetados no norte da Califórnia e Oregon e infeções autóctones, nos estados de Wyoming, Utah, Idaho e Washington. Dados de 2005 apontam entre ¼ a ½ milhão de cães afetados [3]. Bowman *et al.*,(2009), realizaram um rastreio clínico nacional que demonstrou uma prevalência nacional de 1,4%. A prevalência mais elevada de *Dirofilaria immitis* foi obtida no sudeste do país com 3,9%, no nordeste com 0,6%, no centro com 0,8% e no oeste do país com 1,2%. Também foi obtido uma prevalência elevada ao longo do Rio Mississípi (Arkansas 6,8%, Missouri 2%, Tennessee 3,6%). Conclui também que as amostras positivas ocorriam em áreas tipo "ilhas", rodeadas por áreas com prevalências baixas [134]. Nos concelhos de Fresno e Madeira, Califórnia, foi obtida uma prevalência de 3,47% [128]. Little *et al.,* (2014), realizaram um estudo em que analisaram os resultados obtidos pelos médicos veterinários no EUA entre 2010-2012, concluindo que a prevalência de *D. immitis* era mais baixa que em estudos anteriores (nordeste 0,4%, oeste 0,8%, sudeste 2,9%) [135].

No **Canadá,** a prevalência é de 0,22%. A dirofilariose encontra-se distribuída por todo o país [136], tendo uma prevalência superior nas áreas de Sudoeste de Ontário com prevalência até 8,4%. [3, 7].

No México, um estudo refere que a prevalência de dirofilariose estabilizou nos últimos 10 anos, em valores de 7,3-7,5% [31]. Num estudo realizado em Mérida, Yucatan, confirmou uma prevalência nacional de 8,3%, embora nas áreas costeiras possa chegar aos 19,6% [124].

Na **América Central e Caraíbas**: em **Porto Rico,** a prevalência varia entre 3,1% a 20,4%**,** em **Cuba** (Havana) varia de 7% a 19% e na ilha da Juventude de 37% a 63%, nas **Bahamas** é de 53%, na **ilha Curação** varia entre 9%-11% e na **República Dominicana** é de 18% [3, 100]**. Na Costa Rica**, um estudo nacional revelou uma prevalência de 2% [137].

Na **América do Sul**, a dirofilária está presente nos seguintes países: Argentina, Colómbia, Perú e Brasil e Bolívia (figura 10)[120].

No **Brasil**, a prevalência nacional parece ter diminuído de 7.9% em 1998 para 2% em 2001. Em 2011, um rastreio realizado no país mostrou a existência de cães infetado em 7 dos 10 estados do Brasil. Na região centro-oeste, 5,8% dos cães testados tinham microfilárias e na região do norte 10,7% dos cães foram positivos. Prevalências entre 1.4-10,3% foram determinadas na região nordeste, de 1,1 a 2% na região sul e 2,2 a 52,5% na região sudoeste [31, 97].

O rastreio mais extenso foi realizado no Rio de Janeiro, com a prevalência a decrescer de 21,34% em 1990 para 3,8%, atualmente. Sendo este fenómeno melhor observado na região oceânica de Niteroi, onde em 1988, 43,7% dos 79 cães examinados apresentavam microfilárias, 27% dos 159 em 1995 eram positivos e apenas 0,6% dos 166 cães em 2003 eram positivos. Na vizinha Itacoatiara, a infeção por dirofilariose também diminuiu gradualmente de 37% em 1993, para 31% em 1995, e para 15% em 1997. Em 2003, não foram encontrados cães com microfilárias em 113 cães da região de Itacoatiara [31, 46].

Em São Luís, estado de Maranhão, em 1999, identificaram 15% dos cães com microfilárias circulantes [44]. No estado de São Paulo, identificaram 12,18% [31]. No Recife, estado de Pernambuco, demonstraram 2,3% [114]. Na região de Grande Cuiabá, estado de Mato Grosso, mostraram, 5,8% [138]. Na região de Lago Conceição, Florianópolis, Estado de Santa Catarina, obteve uma prevalência de 15% [96]. Na cidade de Maceió, Alagoas, determinou-se uma prevalência de 1,3% [94]. Na ilha de Marajó, registou-se uma prevalência de 53,5% [105, 123]. No município de Belém, estado do Pará, determinou-se uma prevalência de 10,74% [139]. No estado do Paraná obteve-se uma prevalência de 5,47% [80]. Em 2013, Ogawa *et al*, demonstraram uma prevalência de 12% em cães da cidade do Porto Velho, no estado da Romdónia [47].

Na **Argentina**, a primeira descrição de *D. immitis* foi em 1931, numa necrópsia de um cão. Desde então, foi descrita em 7 das 22 províncias [46]. Mais tarde, num rastreio baseado na deteção de microfilárias, obteve-se uma prevalência nacional de 3,5%. A prevalência é superior em Buenos Aires (4,3%), sendo identificada em 10 dos 45 distritos, principalmente, naqueles próximos do estuário do rio Platte, com prevalência de 5%, sendo as área de maior prevalência as do Sul (23,5%) e Norte (17,7%) [31, 122]. Apesar das diferenças entre os distritos, a prevalência de dirofilariose na Argentina parece ter estabilizado, com apenas ligeiras alterações nos últimos 15 anos, principalmente, na província de Buenos Aires [31].

Na Venezuela, estudos revelaram uma prevalência de 2,3% [3].

No Chile, não foram diagnosticados casos no rastreio nacional que examinou 1056 cães que viviam em 13 regiões administrativas do país. A ausência de infeção pode-se dever ao isolamento geográfico dos Andes, com condições climatéricas únicas [31]. Outros países da América do Sul, sem relatos de *D. immitis*, são a **Guiana Francesa** e o **Uruguai**, mas pode-se dever ao facto de não terem sido realizados estudos [7, 22].

Na Colômbia, aproximadamente 90% do territórios está localizado a norte do Equador, com algumas cidades bastante acima do nível do mar. Em 1987/1988, foi realizado um rastreio que detetou microfilárias em 4,8% de 864 amostras de sangue. Foi detetado em cinco cães que habitavam em Bogotá, que se encontra a 2650 m do nível do mar. Também foi diagnosticado na comunidade amazónica da Colômbia [31]. McCown *et al.,* (2014), mostraram uma prevalência de 1,6% na Colômbia, distribuída da seguinte forma: na zona de Medelian foi de 0%, na zona de Barranquila de 2% e em Cartagena de 3% [140].

No **Perú**, a *D. immitis* foi descrita pela primeira vez em 1945 [46]. Está descrita uma prevalência de 4,35% em Lima, mas no distrito de La Molina, nenhum cão se encontrava infetado [31].

Na **Austrália**, dados dos anos de 80, apontavam para uma prevalência de 30% em Sidney, mas estudos mais recentes reportam apenas uma prevalência de 11,4% Pensa-se que o decréscimo da prevalência deve-se à introdução da prevenção com avermectinas. As zonas mais problemáticas são as zonas norte de Queensland e a zona norte da Austrália. Casos esporádicos são diagnosticados em clínicas veterinárias da região sul [3, 46].

Na **Ásia**, a prevalência no **Irão** é de 11,3% [3]. Um estudo realizado em cães de três províncias do litoral do Irão, Guilan, Mazandaram e Golestan demonstrou uma prevalência de 51,42%, 15,38% e 7,69% respetivamente [141]; no **Japão**, em 1985, demonstrou-se uma prevalência de 59% em cães [3]. Oi *et al,* (2014), compararam as prevalências nos anos de 1999-2001 de 46% com a prevalência obtida de 2009-2011 de 23%, mostrando uma diminuição da prevalência, principalmente na zonas urbanas [142]. Em Taipe, província de **Taiwan,** demonstrou-se uma prevalência de 13,4% [95], outro estudo realizado no norte de Taiwan mostrou uma prevalência de 55% [143]. Na **Tailândia**, foi detetada uma prevalência de 18,2% na área de Chiang Mai [102]. Na região de Dandong, **China**, um estudo indicou uma prevalência de 24% [109]; outro estudo na região de Shenyang, nordeste da China, obteve resultados de 12,7% [144]; outro estudo realizado nas províncias de Yunnan, Hainan e Anhui não relatou nenhum caso de dirofilária [145]. Na **Malásia,** na zona de Johor Bahru, obteve-se uma prevalência de 1,33% [132] podendo chegar aos 70% em algumas zonas [7]. Na **Índia,** um rastreio nacional detetou uma prevalência de 1,5% [146]. Na **Coreia do Sul,** a prevalência foi de 40% [98] e na área de Busan, um estudo determinou uma prevalência de 10,2% [126]. Nas **Filipinas,** a incidência de dirofilária, na área de Manila, ilha de Luzon, foi de 20% [147].

A distribuição da dirofilariose em **África** não é bem conhecida, devido aos poucos estudos realizados, no entanto, a dirofilariose canina foi encontrada em várias regiões. A infeção em cães é comum na zona este de África, África do Sul, Moçambique e República do Sudão, havendo dados de prevalência de 10,2% na Tanzânia [3]. Em Moçambique, foi realizado um rastreio que demonstrou uma prevalência de 31% [148] e uma caso foi detetado na República de Cabo Verde [149]. Ainda foi identificada a infeção em Marrocos, Tunísia, Egito, Quénia, Senegal, Angola, Gabão, Nigéria e Serra Leoa [7].

Na **Europa,** a infeção ocorre principalmente nos países mediterrâneos (Espanha, Portugal, Sul de França, Grécia, Itália, Turquia e alguns países de Leste).

A maior área endémica na Europa é no Vale do Rio Po, no norte de **Itália,** entre as latitudes de 45ºN e 47ºN, com prevalência de 50% a 80%. Um estudo de 1986 definiu como infetado por *Dirofilaria immitis* 50% das províncias do norte de Itália e

apenas 15% das províncias do centro e sul de Itália [29]. É endémica no norte do país com prevalências entre 22-80%, mas atualmente tem-se disseminado por todo o país, o que mostra uma alteração na distribuição do parasita, sendo cada vez mais frequente o seu diagnóstico nas regiões do sul [29, 54, 82, 117]. Enquanto que, os últimos estudos publicados demonstram uma prevalência menor nas zonas endémicas na área do norte de Itália (6,12%), focos autóctones de dirofilariose canina foram descritos nas regiões centrais, como a Toscana e Úmbria, que não eram consideradas endémicas até 1999 [29]. Atualmente, a infeção por dirofilária tornou-se endémica nessas áreas [29, 54, 82]. Na Úmbria, apenas estavam descritos casos de cães importados, mas atualmente a prevalência é de 5-15% [5, 29, 82, 117]. Na Toscana, a prevalência é de 12,5% [82, 150, 151]. A dirofilariose também foi detetada pela primeira vez em regiões de Itália livres de dirofilariose, como a região central de Abruzzo, que num estudo recente, entre 2008 e 2009, mostrou uma prevalência de 2,3% [29, 82, 117]. Noutro estudo realizado no sul de Itália, foram relatadas prevalências entre 0,24-2,57% na região de Apulia [56] e de 3,43% na região de Calábria [54]. Na região de Campânia, na área do Monte Vesúvio, foi determinada uma prevalência de 0,6% em 2001 [152] e 1,7% em 2011 [153]. Na Sardenha, a prevalência era baixa, inferior a 2% , tendo aumentando para 17%, na zona oeste-central da ilha [5, 29, 82, 154]. Em 2014, Pipia *et al.,* demonstraram uma prevalência de 8,9% na Sardenha, mostrando que a presença do parasita e o risco de infeção de *D. immitis* tem aumentado [155]. Magi *et al*., (2014), mostraram uma prevalência de 1,4% de *D. immitis,* na área de Ligura, noroeste da Itália, que era considerada uma zona livre da doença, demonstrando a disseminação da parasitose [156].

Em **Espanha**, a *D. immitis* é encontrada em várias áreas do país, sendo a prevalência mais elevada nas regiões do sul, com descrições de 8,5% na Andaluzia, 6,7% na Estremadura, e 6,3% em Murcia. A prevalência mais elevada da Península Ibérica é a província do sul de Huelva com 36,7%. Outras áreas com prevalências elevadas são Cadiz (12%), Córdoba (18%), Badajoz (8-14%), Alicante (13%). Em Madrid, na zona centro da Península Ibérica, encontrou-se uma prevalência de 1,1 a 2% [5, 29]. Em 1993, Ortega *et al*., descreveram uma prevalência de 2,4% na província de Pontevedra [157].

Um rastreio realizado em 2006 relatou elevadas prevalências na costa mediterrânica de Espanha (18% em Alicante, 9% em Múrcia) e na ilha de Ibiza (39%), enquanto que, em Maiorca, foi recentemente descrito um caso de dirofilariose num cão que nunca tinha viajado para fora da ilha [29]. Um estudo realizado em 1994 mostrou uma prevalência na área Baix Llobregat, Barcelona de 12,8% [93]. Outro estudo mais recente mostrou uma prevalência de 5,25% [158]. Solano-Gallego *et al.,* (2006) num estudo mostraram uma prevalência de 2% em Barcelona, 0,85% em Tarragona e 0,3% na ilha de Maiorca [159]. No centro da Península Ibérica, estão descritas prevalências elevadas em Arganda del Rey (8%), Azuqueca de Henares (24%) e Guadalajara (10%), áreas de influência do rios Henares, Jaram e Tajuna [29]. Num estudo realizado em Salamanca entre 2008 e 2009, foi observada uma prevalência de 29,08%, semelhante ao reportado 20 anos antes, de 33% [29, 36, 112, 160]. Pela primeira vez foram descrita prevalências significativas em duas províncias do Norte: La Rioja (12%) [161] e La Coruna (4,2%) [162]. Na ilha Grand Canária, a prevalência de dirofilariose tem gradualmente reduzido de 58.7% em 1996, para 23,87% em 2002 e para 19,2% em 2010 [107, 113, 118]. Na ilha de Tenerife, a prevalência manteve-se constante entre

22,3% em 2001 e 21% em 2006 [127]. Na Galiza foi determinada uma prevalência de 4,2% [162].

Miró *et al.*, (2013), realizaram um estudo em sete regiões de Espanha, obtendo uma prevalência total de 1,25% de *D. immitis,* superior na zona central (2,3%) e este (2,7%), não sendo detetada no sudeste, nordeste e norte [163].

Em **França,** em 2009, um estudo epidemiológico realizado na maioria do território nacional descreveu uma prevalência de 0,22%; os resultados positivos vieram da área do sul de França, Corsica (12,5%) e Boches-du-Rhône (2,1%). Simultaneamente, foi realizado um estudo em cães com sinais clínicos compatíveis com dirofilariose. Neste grupo, a *Dirofilaria immitis* foi confirmada em 6,78% dos cães. A maioria dos cães eram do sul de França, com a prevalência de 27,3% em Corsica e 22,2% em Bouches–du-Rhôdes e apenas dois casos positivos do norte de França, mas sendo provenientes de Martinique e da Guiana Francesa. Os autores do estudo referem que não houve expansão da dirofilariose da região sul do país para o norte ([29, 164].

Na **Grécia,** durante a década de 90, a incidência da doença aumentou rapidamente, sendo considerada endémica no inicio do novo milénio [5]. Em 2001, foi descrita na região de Attiki, sul do país, uma prevalência de 0,7%; outro estudo realizado em 2003 descreveu prevalências de 13,1% na área de Atenas, na província de Attiki [29]. Desde então, a doença é considerada endémica no sul do país. Outro estudo, realizado em 2005, referiu a dirofilariose como a doença parasitária mais comum em Thessaloniki e um estudo mais recente mostrou uma prevalência de 17,9% em cães da região do Monte Olimpus, no norte da Grécia [29]. Diakou e Kapantaidakis (2014) referem que a distribuição na Grécia pode dividir-se em duas áreas: no norte, continua a ser uma das doenças parasitárias mais prevelantes (10,6-34,8%), enquanto que no sul a doença é esporádica. Num estudo realizado pelos autores em 5 cidades do país mostrou uma prevalência de 13% Thessaloniki, 3,2% Patras, 0,62% Atenas e 0% Lariosa e Herakhium [165].

Na **Turquia,** a doença está disseminada, mostrando prevalências entre 1 a 27%. Em Istambul, a infeção afeta 1,52% dos cães [101], 2% na área de Gemlik de Bursa, 9,6% na província de Kayseri [115] e 26% na província de Hatay [116]. Um estudo realizado por Simsek *et al,* (2008), descreveu a prevalência de 14,8% em Ankara, 12,3% em Sakarya, 10,5% em Mersin e 18,3% em Kocaeli [103]. Na região de Kirikkale, foi descrito prevalência de 34,5%, sendo 58% microfilarémicos e 27,46% amicrofilarémicos [125]. Um estudo realizado na província de Erzurum, na área este da Turquia, revelou uma prevalência de 8,1% por reacção de cadeia de polimerase (PCR) e 2,1% por ELISA ("Enzyme linked immunosorbent assay")[119]. Na mesma província, um estudo realizado em 2013-2014 mostrou uma prevalência de 1,5% através (PCR) [166]. Outro estudo realizado em 10 províncias da Turquia determinou as seguintes prevalências: Afyonkarahisar (18%), Eskisehir (15%), Nevsehir (14%), Aksaray (12%), Kars (10%), Malatya (9%), Nigde (4%), Mersin (3%) e Konya (2%). A província de Ankara não teve nenhum caso positivo, neste estudo [110].

Na **Bulgária,** o único estudo realizado entre 2001 e 2006 mostrou uma prevalência de 6,6% de cães infetados, sendo 8,62% microfilarémicos. Neste país, a dirofilariose canina já não é considerada uma doença rara, mas uma doença endémica [29].

Na **Roménia,** um estudo descreveu uma prevalência de 23,07%, o que mostra a evidência da presença do parasita no país, sendo por isso considerado endémico [29]. Um estudo recente demonstrou uma prevalência de 3,3%, principalmente nas regiões

sul e oeste do país [121]. Um estudo realizado entre julho 2010 e março de 2011, em 9 concelhos da Roménia, mostrou uma prevalência de 7,17% [167]. Outro estudo realizado entre setembro de 2013 e fevereiro de 2014, em cães de um abrigo no sul da Roménia mostrou uma prevalência de 41,33% [168]. Girdan *et al*, (2014), mostraram uma prevalência de 28%, em Bucareste [169].

Na **Croácia e Sérvia,** vários estudos demonstraram a presença de dirofilária sendo esta uma doença endémica nestes países [29]. Na **Sérvia**, entre 2006 e 2007, a prevalência global era de 7,2%, especificamente na região de Vojvodina com 7,2% e Branicevo com 3,17% [104]. Na região de Belgrado, um estudo realizado em 2007 e 2008 mostrou uma prevalência de 22,01% em cães sem dono e 19,58% em cães com dono [170]. Em 2009, um estudo realizado em províncias do norte (Pancevo e Veliko Gradiste) detetou uma prevalência de 22,9% [171]. Em 2011, foi realizado um rastreio em 10 cidades de todo o território da Sérvia, detetando uma prevalência global de 14,98%. Kosic *et al.,* (2014) mostraram, na região de Novisad, uma prevalência de 10,16% de infeção apenas por *D. immitis* e 6,25% de co-infeção de *D. immitis* e *D. repens* [172]. No **Kosovo,** a prevalência global é de 9%, tendo aumentado nas regiões do norte do país com prevalências a irem dos 6,57% aos 16,1%, em algumas áreas [29, 108]. Na Península Istria da **Croácia**, a prevalência canina de dirofilariose chega aos 16% e no Sul do país aos 8% [29].

Na **Eslováquia,** em 2005, testes serológicos identificaram 3/22 cães positivos para *D. immitis* [173], e entre 2007 e 2008, dois estudos demonstraram a infeção em 10 cães coinfetados com *D. repens* [29, 174].

Na **República Checa,** foi detetado o primeiro caso endógeno de dirofilariose canina, sendo por isso considerado, atualmente, um país endémico. Dois anos após a descrição desse caso, foram identificados 89 casos, sendo um deles importado de uma área endémica [29, 173]. Foram igualmente detetadas, na República Checa, temperaturas que permitem a incubação da forma larvar do parasita *D. immitis* para, pelo menos, uma geração [83].

Na **Albânia,** um estudo realizado entre 1995 e 1996 com amostras da área oeste costal mostrou uma infeção de 13,5% [108] e, entre 2007 e 2008, foi descrita uma prevalência de 3% no distrito de Tirana [29].

Na **Algéria,** um estudo realizado na cidade de Algiers demonstrou uma prevalência de 24,46% [106].

Na **Rússia**, a dirofilariose é considerada uma doença emergente. Ultimamente, têm aparecidos casos nas áreas centro e sul do país. Na região de Moscovo, a dirofilariose canina foi descrita em 33 distritos, todos os cães com co-infeção de *D. repens* [29] e, na região de Rostov (sul da Rússia), entre 2002 e 2009, 6,1% dos cães estudados apresentavam *D. immitis* e 5% deles apresentavam co-infeção por *D. repens* e microfilarémicos. Atualmente, a região de Rostov é considerada uma zona endémica [175].Volgina *et al,* (2013), mostraram uma prevalência de 12,2% em cães sem prevenção para mosquitos e 8,2% em cães que realizavam prevenção para mosquitos [176].

Está aumentar o número de casos em países até aqui livres da doença (Suíça, Áustria, Alemanha, Reino Unido, Holanda, Suécia e Hungria), devido aos cães importados de zonas endémicas [3].

Na **Alemanha,** tem-se notado um aumento do número de cães infetados, a maioria importados de áreas endémicas. Entre 2005 a 2006, a prevalência foi de 1,2% e, entre 2008 e 2010, foi de 1,49%, dos quais 30% dos cães eram microfilarémicos e, entre

2009 e 2010, a prevalência foi de 2,6%. Não foi considerado um país endémico até hoje, pois todos os casos descritos são referentes a animais importados, a maioria proveniente de Corfu, Sardenha, Bulgária, Hungria e ilhas Canárias [29, 177].

No **Reino Unido,** foram diagnosticados casos isolados mas não foi diagnosticado nenhum caso autóctone [29]. A preocupação no Reino Unido é que estão presentes no território vetores de *D. immitis*, mosquitos da espécie *Aedes spp., Anopheles spp. e Myzorhynchus spp*. Apesar de o parasita não sobreviver no clima britânico, tem sido já demonstrado que as temperaturas do verão, em determinadas áreas do Reino Unido e em determinados anos, permitem a incubação de larvas de *Dirofilaria immitis* no hospedeiro intermediário. Foi referido que até 2080 poderão ocorrer condições no verão, propícias à incubação da forma larvar, em três de cada cinco anos [83, 90, 178]. Na **Irlanda,** o risco de disseminação da doença para o país, proveniente de países do sul da Europa, poderá existir se os verões forem quente ou se houver adaptação do potencial genético do parasita, para maturar a temperaturas mais baixas [179].

A **Hungria** foi considerada um país endémico desde 2007, após dois estudos terem demonstrando dois cães infetados, sendo um deles o primeiro caso autóctone descrito [29, 180-182]. Farkas *et al.,* (2014) mostraram uma prevalência de 2,4% de *D. immitis* em 2011 e 2012 [183].

Na **Polónia**, um estudo demonstrou resultados positivos em 0,16% dos cães estudados [184].

Na **Suíça**, em 1995, 4 de 371 cães não domésticos do sul obtiveram um resultado positivo para a infeção, e pelo menos 1 cão importado foi submetido a tratamento. Em 1998 foi reportado 0,6% de infeção por *D. imittis*. Um destes cães tinha adquirido a infeção no Canton Tessin, sugerindo um ciclo autóctone. Em 2001, um rastreio em cães, no sul da Suiça, determinou uma prevalência de 6% [5].

1.4.1.3. Prevalência de dirofilariose em Portugal

Em **Portugal**, em 1943, Cambournac & Simões, determinaram a frequência de infestações dos cães por *Dirofilaria immitis* em Água de Moura (Palmela) e na Herdade do Pinheiro (Alcácer do Sal, Setúbal), através da pesquisa de microfilárias no sangue, determinando uma prevalência 63,8% nos cães de Água de Moura e 52,6% nos cães da Herdade do Pinheiro [130].

Um estudo realizado nos anos 90 reportou uma prevalência global de 14,1%, sendo a prevalência de 16,7% no Ribatejo, 16,5% no Alentejo, 12% no Algarve e uma prevalência 30% na ilha da Madeira. No norte e centro do país (Entre Douro e Minho, Trás-os-Montes, Beira Litoral e Beira Interior), as prevalências foram bastante inferiores. Neste estudo, apenas foi realizada a técnica de Knott modificada, não sendo por isso determinadas as infeções ocultas [92, 185, 186].

Na Ilha Madeira foi realizado um estudo retrospetivo, entre 1990 e 1996, determinando-se um total de 22% de animais com microfilárias, sendo 89% (48/55) deste animais parasitados com *D. immitis* [131].

Em 2008, foi reportada uma prevalência de 13% no distrito de Coimbra [187].

Um estudo retrospetivo de setembro 2005 a janeiro de 2010, realizado na região do Baixo-Vouga, distrito de Aveiro, determinou uma prevalência de 9,3% [188].

Um estudo realizado em 2011 determinou a prevalência no norte e norte-centro de Portugal, com valores de 2,1%, com as prevalências mais elevadas a corresponderem ao distrito de Aveiro (6,8%) e Coimbra (8,8%) [29, 189].

Entre outubro 2010 e abril de 2011, um rastreio realizado em Portugal demonstrou uma prevalência global de 3,8% em cães assintomáticos, com prevalências de 2,9% na região norte, 0,9% na região centro, 4,7% na região do Alentejo, 2,4% na região de Lisboa, 5,1% no Algarve, 0% nos Açores e 40% na Ilha da Madeira. Nesse mesmo rastreio também foi calculada a prevalência global de dirofilariose, mas em cães com sintomas suspeitos da presença de uma doença transmitida de vetores, registando-se os seguintes valores: prevalência global 8,9%, região norte 3,4%, região centro 7,4%, Alentejo com 14%, Lisboa com 5,8%, Algarve com 17,1% e Açores com 0%. Não foi determinado este parâmetro na Ilha da Madeira [186].

Outro estudo realizado em 2013 avaliou três distritos de Portugal: Coimbra (13,8%), Santarém (13,2%) e Setúbal (24,8%), confirmando o estado endémico destas regiões [190, 191]. Este estudo mostrou ainda que as regiões sul do país tinham prevalências superiores ao norte, tendência já demonstrada por Cardoso *et al.,* (2012) [186].

Em 2014, foi realizado um estudo em sete distritos de Portugal Continental, obtendo-se uma prevalência global de 2,8%, sendo Beja o distrito com maior prevalência (8,9%), seguido da Guarda (6,7%), Faro (2,7%) e Castelo Branco (2,5%). Não foram registados casos positivos de *D. immitis* em Bragança. Portalegre e Évora [192]. Outro estudo, realizado entre novembro de 2011 e maio de 2014, detetou o antigénio de *D. immitis* em 9,4% dos cães da região do Algarve [193].

A prevalência de dirofilariose canina tem aumentado e disseminado para os países do norte e centro da Europa, tendo sido documentado novos casos em países considerados anteriormente como livres da doença. Em geral, o aumento do movimento de cães infetados pela Europa, uma maior atenção sobre a doença, alterações climáticas, a emergência de novas espécies de vetores e as alterações no ecossistema devido a atividade humana, estilo de vida, são possíveis causas para esse aumento [29].

1.5. Patogenia

A dirofilariose caracteriza-se por lesões inflamatórias agudas e crónicas nos pulmões e outros órgãos, devido tanto à presença de parasitas adultos como à presença de microfilárias na circulação sanguínea. Além disso, adicionam-se os efeitos ligeiros a severos secundários à terapia com o adulticida. O agente causador da patologia*, D. immitis*, é, por sua vez, portador de uma bactéria gram negativa e intracelular, a *Wolbachia pipientis*. Este microrganismo tem um papel essencial na biologia, reprodução dos hospedeiros filárias e um potencial papel importante no desenrolar da patogenia e resposta imunitária à infeção por dirofilária [3, 194].

A imunopatologia da dirofilariose é extremamente complexa e as manifestações clínicas são fortemente dependentes do tipo de resposta imunitária que é estimulada pelo parasita. O facto de o parasita sobreviver vários anos no hospedeiro imunocompetente deve-se à sua capacidade de evitar/modular a resposta imunitária. É por isso importante identificar que componentes do parasita interagem com o sistema imunitário, incluindo o papel da *Wolbachia spp.* [3, 194].

A reposta patofisiológica à infeção por *D. immitis* deve-se, na sua maioria, à presença do parasita adulto, nas artérias pulmonares. As lesões primárias desta doença ocorrem nas artérias pulmonares e parênquima pulmonar e em estados avançados pode afetar o coração [3, 195-197].

O grau de lesão depende do número de parasitas presentes, da duração da infeção e da reação do hospedeiro ao parasita [8]. As lesões ocorrem desde o momento

em que o parasita adulto imaturo (L5) chega às artérias pulmonares (3 meses depois da infeção) e consistem em lesão vascular, doença pulmonar com infiltrados eosinofílicos, eosinofilia e sinais de doença respiratória. Os parasitas adultos vivem nas artérias pulmonares caudais e causam lesões que levam à hipertensão pulmonar que, se não for tratada, progridem inevitavelmente para insuficiência cardíaca congestiva (ICC) [3, 195, 196]. Em casos de infeções massivas por dirofilárias, estas também podem ser encontradas no átrio direito, a nível da válvula tricúspide, provocando obstrução no fluxo sanguíneo [3, 196]. Este evento causa hemólise intravascular massiva e hemaglobinúria, também designada de Síndrome de Veia Cava (SVC) [3, 195, 196, 198]. Alguns dos pacientes com este síndrome apresentam sinais de insuficiência cardíaca direita congestiva como ascite, hepatomegália, edema das extremidades (figura 11) [3, 19, 196].

As microfilárias parecem ter um papel menor na patogenia da doença, mas podem ser responsáveis por pneumonites eosinofílicas e glomerulonefrites. Alguns indivíduos desenvolvem hipersensibilidade às microfilárias, eliminando-as da circulação [3, 195, 196].

Também podem ocorrer migrações aberrantes do parasita para localizações ectópicas, como a câmara anterior do olho, cérebro, medula espinal, fígado e pele [3, 19, 195, 196].

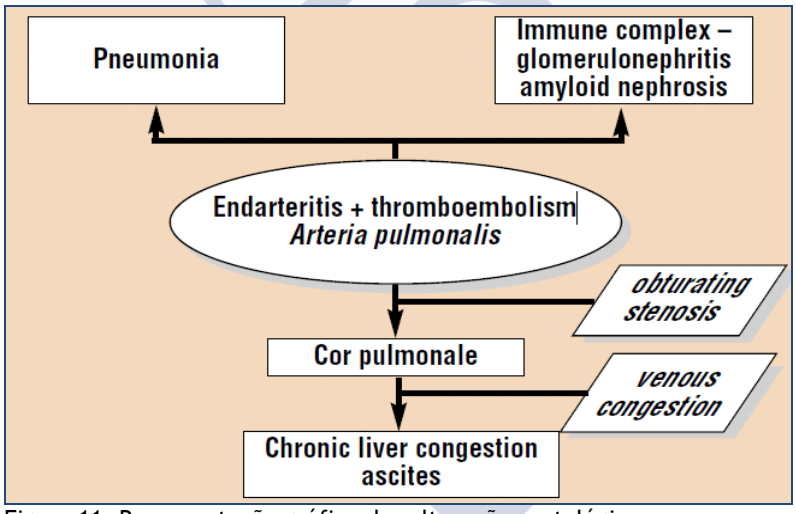


Figura 11: Representação gráfica das alterações patológicas que ocorrem no hospedeiro devido à presença da infeção por *Dirofilaria immitis*
Adaptado de Schrey, (1998) [199].

As microfilárias parecem ter um papel menor na patogenia da doença, mas podem ser responsáveis por pneumonites eosinofílicas e glomerulonefrites. Alguns indivíduos desenvolvem hipersensibilidade às microfilárias, eliminando-as da circulação [3, 195, 196].

Também podem ocorrer migrações aberrantes do parasita para localizações ectópicas, como a câmara anterior do olho, cérebro, medula espinal, fígado e pele [3, 19, 195, 196].

Estudos recentes debruçaram-se sobre a imunopatogenia da dirofilariose, com particular atenção ao papel de componentes do sistema imunitário, como as citocinas, mediadores pró-inflamatórios e componentes celulares e à sua relação com o desenvolvimento de lesões. Embora o espetro de patologias relacionadas com a

dirofilariose crónica seja vasto, a manifestação clínica mais importante é ICC (cor pulmonale e alterações na estrutura e função do ventrículo direito do coração, secundários à lesão pulmonar) [3, 195, 196].

1.5.1. Patologia

As dirofilárias juvenis têm apenas cerca de 2,5 cm de comprimento, quando chegam à circulação sistémica venosa. Elas embolizam passivamente nas artérias pulmonares e distribuem-se em proporção do fluxo sanguíneo lobar. Geralmente existe uma maior acumulação de parasitas na artéria lobar caudal direita, do que na esquerda, devido a ser mais acessível. O contacto entre o parasita e a túnica íntima das artérias pulmonares é essencial para o desenvolvimento de lesões endovasculares. A primeira lesão está limitada aos ramos pequenos periféricos, onde os parasitas chegam primeiro. Depois da chegada dos parasitas às artérias pulmonares, há dilatação das células endoteliais da íntima vascular, levando ao seu espessamento e resultando na diminuição do lúmen dos vasos dos ramos periféricos das artérias pulmonares (endarterite). Adicionalmente, há aumento do espaço intracelular, alteração do eixo longitudinal das células, devido ao trauma mecânico, e alteração da elasticidade da parede arterial [3, 7, 195, 196].

A patogenia da arterite causada pela *D. immitis* continua a ser matéria de especulação. A rutura da junção das células endoteliais e o desnudamento da superfície da túnica íntima das artérias são características das primeiras lesões, que ocorrem alguns dias após a chegada dos parasitas aos vasos. A evidência sugere que as lesões do endotélio ocorrem imediatamente após a chegada do parasita, sendo mais rápidas que a resposta do sistema imunitário, que não consegue ser atempada. Além disso, o desaparecimento das células endoteliais ocorre sem evidência de degeneração e é seguido de uma agressiva acumulação de células e elementos estruturais. Este fenómeno sugere que as células são deslocadas, em vez de destruídas *in situ* [3, 195, 196].

A lesão da superfície endotelial permite que a albumina, plasma e células sanguíneas cheguem ao espaço perivascular, estimulando a proliferação das células musculares lisas e induzindo a formação de vilos intravasculares [7]. Há atração dos macrófagos, granulócitos e plaquetas ao local da lesão, aderindo ao subendotélio exposto. De seguida, as células musculares lisas das artérias pulmonares migram para a túnica íntima e, num processo ativo de proliferação miointimal, produzem um rápido crescimento das lesões. A abundância de plaquetas nas lesões agudas e a sua capacidade de estimular o crescimento do músculo liso vascular, através da libertação de fatores de crescimento derivados das plaquetas, foi hipotetizado como o mecanismo que despoleta e sustém o crescimento destas lesões [3, 195, 196]. Devido à multiplicação e migração das células musculares lisas, a superfície endotelial de cães parasitados aparece rugosa e tanto o lúmen como a "compliance" das artérias ficam reduzidos, dando origem a uma endoarterite pulmonar proliferativa [200].

A severidade da proliferação vilosa está relacionada diretamente com o tempo de infeção, carga parasitária e resposta do sistema imunitário do hospedeiro. Os fluídos e proteínas, que difundem pela parede vascular lesionada, causam edema e inflamação no parênquima pulmonar. As lesões vasculares podem levar à rutura de vasos pulmonares, devido ao aumento abrupto do fluxo cardíaco associado, por exemplo, ao exercício, e provocando hemoptise ou hemorragia pulmonar severa [7].

O fluxo pulmonar é impedido, primeiramente, pela redução da área do leito vascular pulmonar, causado pela endoarterite dos ramos periféricos, mas também pela

sua vasoconstrição. Foi demonstrado, num cão infetado com *D. immitis*, um aumento dos níveis plasmáticos de endotelina-1, um mediador inflamatório produzido pelas células endoteliais e que induz uma vasoconstrição aguda das artérias pulmonares e uma remodelação vascular crónica, podendo ser estes os eventos que contribuem para a hipertensão pulmonar. A trombose e o tromboembolismo comprometem ainda mais a circulação pulmonar. Os parasitas acumulam-se e as lesões desenvolvem-se, distribuindo-se pelas artérias pulmonares, começando nas mais pequenas (ramos periféricos) seguindo-se as maiores, que, ao contrário das anteriores, se dilatam e perdem a elasticidade, ficando mais rígidas, o que leva ao aumento da pressão sanguínea pulmonar. A diminuição da distensão dos grandes vasos leva ao aumento do trabalho cardíaco, principalmente do ventrículo direito, devido ao aumento da resistência vascular, provocada também pela obstrução da vasculatura periférica, levando à hipertensão pulmonar. Consequentemente, existe uma hipertrofia ventricular direita compensatória, inicialmente excêntrica, com dilatação da câmara e estreitamento da parede, como resposta ao aumento da pressão sanguínea pulmonar [3, 195, 196]. A resposta do coração ao stress hemodinâmico, as alterações geométricas e a remodelação cardíaca contribuem para a insuficiência da válvula tricúspide, que complica e precipita a descompensação cardíaca [8].

A dirofilariose impede o fluxo nos ramos pulmonares, diminuindo a reserva pulmonar. Durante um período de tempo, a pressão pulmonar é preservada em repouso, aumentando apenas modestamente durante o exercício, quando as artérias patentes chegam ao máximo da sua distensão. Eventualmente, com o evoluir da patologia, as artérias pulmonares apresentam-se dilatadas, tortuosas, com diminuição da "compliance" e funcionalmente incompetentes, sendo os vasos dos lobos pulmonares caudais, os mais afetados. A árvore pulmonar arterial assume características de um sistema de tubos rígidos, ficando a resistência vascular pulmonar fixa. Neste estádio, a pressão aumenta proporcionalmente ao aumento do fluxo sanguíneo. Consequentemente, a doença é mais severa em pacientes ativos, em que se exige mais trabalho cardíaco. As lesões dos vasos fazem com que estes não consigam responder às necessidades de oxigénio durante o exercício, o que resulta na sua intolerância. Em casos avançados, desenvolve-se uma insuficiência cardíaca congestiva de baixo débito, resultante da incapacidade do ventrículo direito produzir e manter uma pressão de perfusão elevada, requerida para manter o movimento do sangue [3, 195, 196]. Recentemente, foi descrito uma diminuição da matriz de colagénio extracelular no miocárdio dos cães parasitados com dirofilariose, o que contribui para a dilatação ventricular afetando marcadamente as funções sistólica e diastólica do coração [201]. Frequentemente, os cães neste estádio experienciam síncope (uma perda temporária de consciência e postura), quando tentam aumentar o débito cardíaco. A ICC direita com ascite, hepatomegália e caquexia é uma sequela tardia e pode precipitar um episódio agudo de tromboembolismo pulmonar [3, 195, 196].

O SVC é uma condição severa encontrada com mais frequência em cães de raça pequena. Deve-se ao deslocamento de uma massa de parasitas das artérias pulmonares, para o ventrículo direito, onde interferem com a cinética e a função da válvula tricúspide, resultando num aumento da pressão do ventrículo direito. A obstrução do lúmen da válvula tricúspide e do sangue circulante leva a uma insuficiência da tricúspide. Estes fatores levam a uma sobrecarga de volume e pressão no átrio direito, veia cava caudal, com elevação significante na pressão venosa e dificuldade no retorno

venoso. Esta situação normalmente leva à morte do animal, devido à hemólise, hemoglobinúria e coagulação intravascular disseminada [7].

A doença pulmonar ocorre secundariamente às lesões vasculares. Devido ao aumento da permeabilidade da vasculatura pulmonar, desenvolve-se edema perivascular que leva à acumulação de fluido e de um infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar, o que pode ser visualizado radiograficamente, como um aumento na densidade intersticial e alveolar [8].

Lesões focais pulmonares ocorrem devido à formação de trombo e de uma reação inflamatória severa, após a morte espontânea do parasita adulto ou provocada pelo tratamento adulticida [200]. O tromboembolismo agrava o desenvolvimento de hipertensão pulmonar e ICC direita e, em casos raros, pode levar ao enfarte pulmonar. Os parasitas moribundos ou mortos são forçados, pelo fluxo sanguíneo, para os vasos mais pequenos, agravando as lesões existentes, estimulando a coagulação, restringindo mais a circulação pulmonar e podendo causar a consolidação dos lobos pulmonares afetados. Com a morte aguda e massiva de parasitas, o insulto pode ser profundo e principalmente se associado ao exercício. A exacerbação da doença com o exercício deve-se ao aumento do fluxo pulmonar arterial, com libertação de mediadores inflamatórios para o parênquima pulmonar, através de artérias lesadas e permeáveis [8].

Outra situação que ocorre é a pneumonite eosinofílica que produz um quadro de stress respiratório, que consiste numa reação inflamatória imunomediada, que o organismo monta contra os antigénios da cutícula das microfilárias, o que leva a uma disfunção alveolar, distúrbios nas trocas gasosas, resultando em hipóxia, hipoxémia e insuficiência respiratória severa [7]. Essa reação leva à eliminação das microfilárias da microcirculação pulmonar [202]. A granulomatose eosinofílica é pouco comum no parênquima pulmonar. A sua apresentação é induzida da mesma forma que a pneumonite eosinofílica, mas, neste caso, as microfilárias são rodeadas por neutrófilos e eosinófilos, formando granulomas, aparecendo associado a linfoadenopatia brônquica [8].

Estão descritos vários tipos de lesões renais em cães infetados com *Dirofilaria immitis*: 1) glomerulonefropatia imunomediada, 2) glomeruloesclerose, 3) nefrite intersticial crónica, 4) amiloidose. Em termos ultraestruturais, as lesões mais frequentes são 1) espessamento da membrana basal glomerular, 2) aparecimento de vacúolos na membrana basal glomerular, 3) depósitos na membrana basal glomerular e 4) proliferação das células mesengiais. Estes achados sugerem que a presença do parasita induz uma glomerulonefropatia por deposição de complexos antigénio-anticorpo e que as microfilárias têm um papel importante na patologia da glomerulonefrite. As lesões glomerulares e intersticiais são mais severas em cães com contagem elevadas de microfilárias e por longos períodos [8, 203-206]. A proteinúria resultante também é mais exuberante em cães microfilarémicos, do que em cães sem microfilárias. As lesões renais podem progredir para nefrose severa e uma insuficiência renal com azotémia [7].

As dirofilárias por vezes têm migrações aberrantes, ou seja, migram para outros locais, para além da vasculatura pulmonar do hospedeiro. Sinais associados à presença dos parasitas em sítios atípicos depende do órgão afetado; tendo sido descritos parasitas nos músculos, cérebro, medula espinal, câmara anterior do olho [207, 208], pericárdio [209], cavidade abdominal [210]. Também já foram descritos casos de dirofilárias que migraram para a bifurcação aórtica e, mais distalmente, para as artérias digitais [8]. Hayasaki *et al.*, (2013) descreveram a presença errática de *D. immitis* na câmara anterior do olho, em 18 cães, nas últimas 7 décadas [208].

Apesar do nome em inglês ("Heartworm") sugerir uma patologia primária cardíaca, a principal localização dos parasitas e as suas lesões primárias são nas artérias pulmonares, por isso, a dirofilariose canina deve ser considerada uma doença pulmonar e, em quadros avançados pode envolver as câmaras direitas do coração [200].

1.5.2. Imunologia

A resposta do sistema imunitário contra a infeção por *D. immitis* mostra resultados contraditórios. O desenvolvimento desde a fase larvar até à forma adulta e a natureza crónica da maioria destas infeções sugerem uma deficiência da resposta do sistema imunitário, a habilidade do parasita em evitar os mecanismos de controlo do hospedeiro, uma redução da resposta imunitária e uma indução de um estado de imunotolerância do hospedeiro. No entanto, o hospedeiro consegue controlar a carga parasitária, mantendo-a dentro de limites compatíveis com a sobrevivência, destruindo a maioria das larvas adquiridas nas reinfeções [7, 197, 211].

Durante a infeção por *D. immitis,* o primeiro tecido a receber influência dos antigénios do parasita é o endotélio, que têm um papel primordial no desenvolvimento da inflamação, pois controlam diversos processos, como o tónus vascular, a homeostasia, a adesão de plaquetas e leucócitos, a permeabilidade através da parede vascular e a produção de mediadores inflamátorios. São vários os medidadores inflamatórios envolvidos na resposta do sistema imunitário à infeção por *D. immitis* e que exercem diferentes influências:

- Eicosanóides, medidores imunomoduladores e vasoativos potentes, que induzem e suprimem a inflamação, como parte da resposta à agressão;
- Prostaglandina, PGE_2, que estimula a vasodilatação e resposta tipo Th_2 (linfócitos T helper);
- Tromboxano, TxB_2, responsável pela vasoconstrição, agregação plaquetária e estimulação da resposta pró-inflamatória tipo Th_1;
- Leucotrieno, LTB_4, que estímula a quimiotaxia dos leucócitos;
- Caderina endotelial, caderina-E, e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), importantes para a manutenção da integridade do endotelio;
- Óxido Nítrico (NO), vasodilatador potente, implicado em diferentes mecanismos, incluindo a regulação autócrina da pressão vascular.

Existe também a migração de leucócitos através da parede dos vasos sanguíneos, sendo os neutrófilos e os monócitos a chave da reacção inflamatória estimulada pelo parasita, devido à sua interação com as moléculas de adesão das celulas endoteliais e com as glicoproteinas transembranares [212].

A manipulação do sistema imunitário do hospedeiro deve-se, provavelmente, a moléculas libertadas pelo parasita vivo, como os antigénios excretores/secretores (DiE/S), relacionados com o processo metabólico e os antigénios somáticos da dirofilária adulta (DiSA) [197]. No entanto, as maiores alterações patológicas estão relacionadas com a morte dos parasitas adultos que podem despoletar a doença aguda caracterizada pela exacerbação da resposta inflamatória e a emergência de eventos tromboembólicos [213]. Estudos realizados demonstraram que os antigénios DiE/S, através da sua influência sobre as células endoteliais, estimulam a vasodilatação pela produção de PGE_2 e limitam a transmigração dos monócitos para o tecido perivascular. Estas atividades estão relacionadas com a capacidade de sobrevivência do parasita, controlando as lesões sobre o hospedeiro [212]. Os antigénios DiE/S, também, interagem com o sistema fibrinolítico, controlando o desenvolvimento de coágulos de

modo a facilitar a sobrevivência do parasita no sistema circulatório do hospedeiro [213-215].

Estudos realizados sobre a resposta estimulada pelos antigénios DiSA mostraram a exarcebação da resposta pró-inflamatória e devido à sua ligação com o plasminogénio e cooperação com o sistema fibrinolítico, promovem a lise de coágulos [212, 216].

Morchón *et al.,*(2009), demonstraram que cães microfilarémicos desenvolvem uma resposta mais intensa com libertação de citocinas, mediadores inflamatórios e com um resposta de anticorpos, do que os cães amicrofilarémicos, o que sugere que as microfilárias têm um papel importante na estimulação da resposta imune e inflamatória [197].

Morchón *et al.,* (2007), descreveram que os cães microfilarémicos têm uma maior expressão de interleucina IL-4 e iNOSmRNA, do que os cães amicrofilarémicos. Além disso, a expressão de IL-10mRNA é superior em cães com microfilárias circulantes, comparando com a sua expressão insignificante em cães amicrofilarémicos [217, 218].

Estudos recentes, em cães infetados naturalmente com *D. immitis*, usando moléculas derivadas da *D. immitis* e *Wolbachia spp.,* demonstraram que há uma resposta mais forte de anticorpos IgG tanto aos antigénios de *D. immitis* como da *Wolbachia spp.* em cães microfilarémicos, do que a resposta nos cães amicrofilarémicos. Portanto, os cães com microfilárias exibem elevados níveis de anticorpos IgG, que diminuem quando estas desaparecem. No entanto, em cães amicrofilarémicos, com tromboembolismo pulmonar massivo, têm uma resposta de anticorpos IgG contra os antigénios de *Wolbachia spp* e *D. immitis* superiores, à dos cães amicrofilarémicos assintomáticos, sugerindo que a resposta de anticorpos está relacionada com o estado clínico do hospedeiro [218].

Existem estudos que demonstram a participação de ambas as respostas Thelper 1 (Th_1) e Thelper 2 (Th_2), em vários modelos de filariose. A análise do tipo de resposta imune Th_1/Th_2 em cães com dirofilariose indicam que cães microfilarémicos montam uma forte resposta IgG_1 contra antigénios de *D. immitis* e *Wolbachia spp*, enquanto que cães amicrofilarémicos não mostram respostas significantes, quando comparadas com o controlo [218]. A produção de IgG_1 em cães está relacionada com a resposta Th_2 [218, 219]. Por outro lado, a resposta IgG_2 foi detetada tanto em cães microfilarémicos, como em cães amicrofilarémicos, estando relacionada exclusivamente com a presença da *Wolbachia spp*. A produção de IgG_2 é considerada uma resposta tipo Th_1. Estes resultados sugerem que a resposta Th_2 está presente na infeção ativa, enquanto que infeções ocultas aparecem com resposta tipo Th_1 [218].

As microfilárias circulantes na dirofilariose conseguem diminuir a resposta do sistema imunitário (Th_2), em cães com dirofilariose, permitindo que os parasitas adultos sobrevivam longos períodos [7].

1.5.3. Endossimbiose – *Wolbachia spp.*

A *Dirofilaria immitis*, o agente parasitário da dirofilariose, serve de hospedeiro a uma bactéria intracelular de nome *Wolbachia pipientis*. Este microrganismo desenrola um papel essencial na biologia e funções reprodutivas das dirofilárias adultas. Sironi *et al.,* (1995), demonstraram que a *Wolbachia spp.* se desenvolve na dirofilária [194]. É uma bactéria gram-negativa, intracelular, pertencente à ordem Rickettsiales (alfa-2-proteobacteria), género *Wolbachia,* com potencial de desempenhar um papel importante

na patogenia e resposta imunitária da infeção por filárias [194, 220]. As evidências sugerem que a *Wolbachia spp.* mantém uma relação de simbiose com a *D. immitis.* A presença da bactéria é essencial para a sobrevivência do parasita e a sua remoção leva à esterilização das fêmeas e eventual morte dos adultos [221]. A *Wolbachia spp.* está envolvida na muda e embriogénese da filária e a filária, por sua vez, contribui com aminoácidos para o seu crescimento [7].

A *Wolbachia spp.* pode ser encontrada em todos os estádios de desenvolvimento do ciclo de vida do nemátode, tanto no hospedeiro definitivo, como no vetor, sendo abundante na fase larvar do desenvolvimento no hospedeiro definitivo (L3 e L4) [222]. No parasita adulto, a *Wolbachia spp.* é encontrada predominantemente nas células da hipoderme dos cordões laterais (figura 12). Nas fêmeas, a *Wolbachia spp.* também se encontra nos ovários, oócitos e, nos estados de desenvolvimento embrionário, no útero, sugerindo a transmissão vertical (figura 13) [222].

Não foi detetada no sistema reprodutivo masculino, sugerindo que a bactéria é transmitida apenas por via materna, através do citoplasma do ovo, e não pelo esperma [7, 194, 220, 223-225].

Recentemente, a *Wolbachia spp*. foi descrita em novas espécies de filária, da família Onchocercidae, em vários órgãos como as gónodas somáticas (camada epitelial) e parede intestinal, sugerindo uma relação mais complexa que a descrita anteriomente [7].

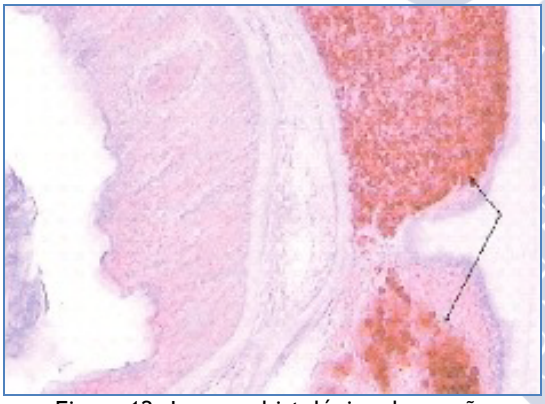


Figura 12: Imagem histológica de secção transversal de um parasita adulto fêmea de *D. immitis* com coloração imuno-histoquímica com soro policlonal anti-*Wolbachia spp.* (40 x). Presença de numerosos corpos bacterianos nas células da corda lateral da hipoderme. Adaptado de Grandi *et al.*, (2007) [196].

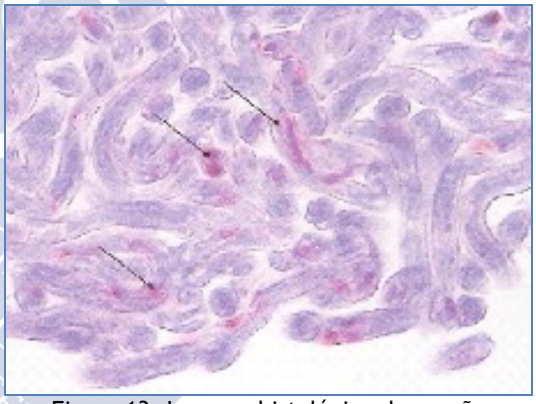


Figura 13: Imagem histológica de secção transversal de uma fêmea adulta de *D. immitis* com coloração imuno-histoquímica com soro policlonal anti-*Wolbachia* (x40). Observam-se numerosos oócitos e embriões no trato reprodutivo que albergam a *Wolbachia spp.* (40 x). Adaptado de Grandi *et al.*, (2007) [196].

Pensa-se que a presença da *Wolbachia spp.* seja essencial para o desenvolvimento da larva no hospedeiro vertebrado e para a sobrevivência da dirofilária adulta no hospedeiro [7]. Alguns pormenores dessa relação sugerem a natureza simbiótica da relação: 1) 100% das filárias estão infetadas pela bactéria; 2) a evolução da bactéria corresponde à evolução das filárias e os estudos filogénicos demonstraram que ambos os organismos "caminham de mãos dadas" há milhões de anos; 3) a bactéria é transmitida à descendência das filárias fêmeas; 4) a remoção da *Wolbachia spp.* (antibióticos/radiação) leva à esterilização das fêmeas e, eventualmente, à morte dos adultos [194, 220, 224-226].

A exposição dos hospedeiros à *Wolbachia spp.* pode ocorrer por três mecanismos: 1) quando as filárias adultas ou as formares larvares são destruídas, por uma reação defensiva do hospedeiro, ou após o tratamento; 2) através da libertação contínua pelo útero das filárias adultas fêmeas, quando estas libertam as microfilárias em circulação; 3) através da rede canicular presente na superfície dos cordões laterais do nemátode. Assim, o hospedeiro pode estar exposto a *Wolbachia spp.* continuamente, durante toda a infeção, desenvolvendo anticorpos contra a bactéria e os seus produtos [220, 223, 227].

Existe evidência direta e indireta que a *Wolbachia spp.* entra em contacto com o hospedeiro infetado por *D. immitis*. A evidência direta foi obtida através de técnicas imuno-histoquímicas em cães e humanos e a indireta é baseada na presença de anticorpos específicos e em mediadores inflamatórios observados em cães, gatos, humanos e ratos imunizados com *Dirofilaria spp.,* ou derivados de antigénios de *Wolbachia spp*. [226].

A primeira evidência da interação entre a *Wolbachia spp.* e o sistema imunitário dos hospedeiros foi obtida em ratos imunizados com adultos de *D. immitis*. e antigénios L3, que desenvolveram anticorpos específicos contra a proteina de superfície da *Wolbachia spp.* (WSP) 25 a 90 dias pós-inoculação [226]. A resposta imunitária contra os antigénios da *Wolbachia spp.* é detetada 2 meses após a infeção, antes da deteção de antigénios específicos para a *Dirofilaria immitis*. Este facto sugere que a *Wolbachia spp.* tem um papel importante no desenvolvimento da resposta do sistema imunitário [194, 220]. Em cães infetados com *D. immitis*, tantos os indivíduos microfilarémicos como os amicrofilarémicos mostraram uma resposta elevada de anticorpos IgG_2, indicativa de uma resposta tipo Th_1 (mediada por células), contra WSP, sendo essa resposta superior em cães microfilarémicos do que em cães amicrofilarémicos. Também se verificou que os cães microfilarémicos montam uma resposta forte de anticorpos IgG_1 contra o antigénio WSP e péptidos de dirofilária (Dipp), mostrando uma resposta tipo Th_2. Estes resultados sugerem que a resposta tipo Th_1 e Th_2 está presente em infeções ativas, enquanto que, em infeções ocultas, está presente apenas uma resposta tipo Th_1 [226]. O antigénio WSP tem efeitos a nível das células endoteliais, aumentando a expressão de mediadores inflamatórios (ex: NO, LTB4) e moléculas de adesão membranar [ex:VCAM-1(Molécula de adesão celular vascular), ICAM-1(Molécula de adesão intercelular)] [25, 197]. Em conclusão, tem aumentado a evidência que a *Wolbachia spp.* participa na resposta inflamatória e imunitária, em cães com infeção por *Dirofilaria immitis* [194].

A evidência da presença de *Wolbachia spp.* ou as suas moléculas no hospedeiro infetado por *Dirofilaria immitis* foi obtida por técnicas de imuno-histoquímica, usando um anti-soro policlonal contra a WSP. Uma coloração positiva foi obtida nos túbulos renais, glomérulos, tecido pulmonar, macrófagos alveolares e monócitos hepáticos de cães infetados naturalmente [220, 226, 228]. Adicionalmente, a glomerulonefrite por imunocomplexos é uma complicação frequente da doença de dirofilariose e a localização da WSP nos glomérulos é sugestiva do papel da *Wolbachia spp.* na patologia renal (figura 14) [194, 228].

Mórchón *et al.,* (2012) realizaram um estudo, no qual detetaram a presença de proteinúria em cães microfilarémicos e amicrofilarémicos, mas a presença de anticorpo anti-WSP IgG foi superior em cães microfilarémicos, sugerindo que a *Wolbachia spp.* associada a microfilárias circulantes contribuem para a doença renal imunomediada em cães com dirofilariose [229].

Associando os efeitos acima descritos, com o facto da *Wolbachia spp.* poder ser uma potencial causa de inflamação, pode ser benéfica a sua redução ou eliminação. Estudos mostram que uma depleção eficiente de *Wolbachia spp.* da *D. immitis* pode aliviar a patologia pulmonar, por ajudar na redução das reações pró-inflamatórias, devido à morte dos parasitas adultos após a terapia adulticida [220, 226, 230].

Cães infetados naturalmente com dirofilárias e tratados com melasormina mostraram uma resposta aumentada e anticorpos IgG (imunoglobulina G) anti-WSP, após alguns dias do tratamento. Um aumento dramático dos anticorpos anti-WSP e anti-*Dirofilaria* foi, igualmente, encontrado 15 dias depois do tratamento com ivermectina. Após 3,5 meses do tratamento, os anticorpos anti-*D. immitis* desceram para valores semelhantes aos anteriores à infeção, enquanto que anti-WSP continuaram a elevar até ao fim do estudo (5,5 meses após tratamento). No estudo de controlo (cães infetados não tratados), a resposta de anticorpo anti-WSP e anti-*D. immitis* continuou a aumentar durante o estudo [226].

Existe um aumento da resposta imune com elevação do nível de anticorpos (IgG anti-WSP) depois do tratamento com adulticida e subsequente libertação massiva de antigénio. Há evidência que, após a morte das microfilárias e dos parasitas adultos, há libertação de *Wolbachia spp.* no sangue, o que interage com o sistema imunitário do hospedeiro (figura 15) [7].

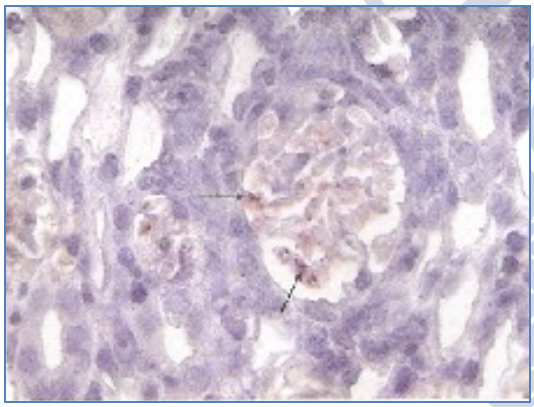


Figura 14: Imagem histopatológica de rim de um canídeo com *Dirofilaria immits*. Presença de microfilárias com marcação positiva pela coloração imuno-histoquímica anti- *WSP* (seta) (100 x). Adaptado de Grandi *et al* (2007) [196].

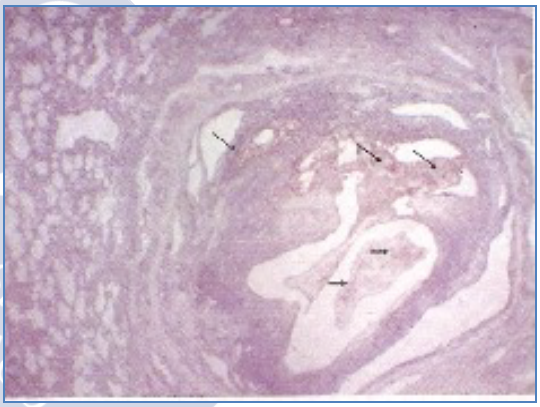


Figura 15:Imagem histopatológica da artéria pulmonar de um canídeo com *Dirofilaria immitis* após tratamento com melasormina. Coloração imuno-histoquímica anti-*WSP*. Verifica-se a presença de várias bactérias no tecido pulmonar (setas) (10 x) Adaptado de Grandi *et a*l,(2007)[196]

A deteção de anticorpos anti-*Wolbachia* pode ser interessante, nas seguintes situações:

- estudos epidemiológicos para avaliar a pressão real da infeção, em áreas endémicas e para determinar o risco, não apenas em infeções ativas (detetadas pelos kits comerciais) mas também pelas infeções pré-patentes [226];
- avaliação da eficácia do tratamento macro/microfilaricida. A morte das filárias continua a ser a maior fonte de libertação de *Wolbachia spp*, aumentando o estímulo para o sistema imunitário do hospedeiro. A deteção da elevação dos níveis de anticorpo anti-*Wolbachia* e da diminuição dos anticorpos anti-*D. immitis* pode ser interpretado como um sinal de eficácia das drogas [226].

Em Portugal, foi descrita a presença de *Wolbachia spp* na *D. immitis*, em cães da região centro-sul do país, detetada através de PCR de ADN *Wolbachia spp.* em 52,6% dos cães positivos para *D. immitis.* Não foi detetadas em cães com infeção oculta [231].

1.6. Sinais Clínicos

Habitualmente pensa-se que a dirofilariose é uma patologia cardíaca, no entanto, os parasitas adultos localizam-se, maioritariamente, nas artérias pulmonares, provocando lesão vascular, como endoarterite, inflamação perivascular e patologia respiratória. A dirofilariose canina apenas afeta as câmaras cardíacas direitas, nos últimos estádios da doença e em infeções, em que a carga parasitária é elevada [3, 19, 232].

A apresentação clínica de dirofilária é **usualmente crónica**. Muitos dos cães infetados são assintomáticos durante meses ou anos, dependendo do número de parasitas presentes, da reatividade individual e do exercício a que o hospedeiro é sujeito. Labarthe *et al.*, (2003), demonstraram que 58,5% cães eram assintomáticos e 41,2% sintomáticos; Meriem-Hind & Mohamed (2009) demonstraram que 75,56% cães não apresentavam sintomas e 24,44% eram sintomáticos; Mortarino *et al.,* (2008), concluíram que a maioria dos cães eram assintomáticos, assim como Villeneuve *et al.,* (2011) [84, 97, 106, 136].

Os sinais da doença desenvolvem-se gradualmente e podem iniciar-se com uma tosse crónica, seguida de dispneia moderada a severa, fraqueza, perda de peso, intolerância ao exercício, síncope após exercício ou excitação. Nesta altura, podem ser audíveis crepitações nos lobos pulmonares caudais e uma divisão do segundo som cardíaco (em 13% dos casos) [3, 8, 200].

Um sintoma frequente é a tosse persistente, crónica, não produtiva, que piora com o exercício. Normalmente existe hipóxia responsável pelos sinais respiratórios como taquipneia e dispneia, podendo ser ligeira a moderada, sendo comum em cães com doença cardíaca severa. A hipóxia deve-se provavelmente à incapacidade de ventilação/perfusão, em algumas áreas lesionadas do parênquima pulmonar. Em cães com dirofilária, as regiões hipoventiladas podem não se encontrar hipoperfundidas, uma vez que a dirofilária interfere com a capacidade de vasoconstrição das artérias pulmonares. Consequentemente, o sangue continua a fluir nas áreas do pulmão não ventiladas, resultando em sangue desoxigenado, que retorna ao coração esquerdo e é bombeado para a circulação sistémica. Noutras situações, a hipóxia pode ser secundária ao tromboembolismo, levando a que o sangue não chegue as zonas embolizadas, o que leva a um aumento do fluxo e incapacidade de ventilar/perfundir. A insuficiência respiratória agrava-se com a progressão da doença [7, 71].

A intolerância ao exercício é outro sinal comum. A redução do fluxo de sanguíneo no músculo esquelético pode ser a causa dessa intolerância. Cães com doença cardíaca ligeira a severa têm uma capacidade reduzida de bombear sangue durante o exercício. Este facto associado à hipóxia contribui para diminuir a demanda de oxigénio aos músculos. O aumento da resistência vascular pulmonar leva à hipertensão pulmonar (aumentando a pós-carga do ventricular direito), que progride para insuficiência ventricular direita, contribuindo para a diminuição da capacidade de bombear sangue pelo ventrículo direito, reduzindo o fluxo sanguíneo durante o exercício. A síncope pode ocorrer em cães com doença cardíaca severa por dirofilariose. Normalmente, surge depois de episódios de exercício ou excitação. O mecanismo exato não está bem

definido. Uma resistência vascular pulmonar fixa na dirofilariose restringe o aumento do débito cardiaco do ventrículo direito necessário durante o exercício, diminuindo o retorno venoso para o coração esquerdo. Embora o retorno venoso do ventrículo esquerdo esteja restringido, a resistência vascular sistémica diminui como reflexo durante o exercício [71].

Esta combinação de fluxo inadequado e diminuição da resistência pode levar à hipotensão durante o exercício, resultando em síncope. Além disso, a síncope é mediada por mecanorecetores presentes na vasculatura pulmonar e no ventrículo direito, que são estimulados pela elevada pressão sistólica durante o exercício. O reflexo dos mecanorecetores estimula um aumento do tónus vagal, produzindo bradicardia, paragem sinusal e pode levar à dilatação arteriolar sistémica [71].

As hemoptises são um sinal presente em alguns cães com dirofilariose severa. Provavelmente, desenvolve-se secundariamente à rutura de uma artéria pulmonar. A doença arterial pulmonar pode levar ao desenvolvimento de aneurismas e a tosse precipita a sua rutura. A hemoptise pode ser ligeira a severa. Neste último caso, pode levar ao choque hipovolémico e morte. A perda de sangue pode ser subestimada, devido ao cão deglutir o sangue, podendo, por isso, haver presença de melena em cães com hemoptise subaguda ou crónica. Pode também estar presente hemorragia pulmonar [71].

Em cães, que desenvolvem uma pneumonia/granulomatose eosinofílica, os sons pulmonares são abafados e pode estar presente dispneia e cianose [8].

Se o quadro progredir para uma ICC direita, podem estar presente sinais como ascite, edema das extremidades, anorexia, perda de peso, desidratação, engurgitação venosa (jugular, cutânea, episcleral ou retinal) e congestão venosa visceral. A nível hepático, a congestão venosa leva hepatomégalia. Esta hepatopatia leva a falha hepática acompanhada de icterícia, elevação das transferases e alteração da coagulação. Também costuma estar presente a congestão esplénica com esplenomegália [7, 200, 233]. A efusão pleural é menos comum. Nesta fase, na auscultação ouve-se um sopro cardíaco no lado direito do tórax, devido à presença de uma insuficiência da válvula tricúspide (em 13% dos casos) e presença de arritmia, devido à presença de fibrilhação atrial (em <10% dos casos). A morte súbita é rara e, na maioria das vezes, os cães falecem por stress respiratório e/ou caquexia ou tromboembolismo severo [3, 8, 200].

A insuficiência cardíaca pode surgir rapidamente ou pode ser gradual. Um quadro mais agudo ocorre após um episódio de exercício ou depois do tratamento adulticida, quando vários parasitas adultos morrem e obstruem a circulação numa larga área do parênquima pulmonar, aumentando a resistência ao fluxo sanguíneo, na vasculatura pulmonar e hipertensão pulmonar [71].

Ocasionalmente, podem observar-se episódios agudos por tromboembolismo pulmonar espontâneo, devido à morte natural dos parasitas, provocando um quadro clínico agudo e severo de dispneia e hemoptise [3, 8, 200].

Alguns pacientes desenvolvem o Síndrome da Veia Cava que é caracterizado por alterações hemodinâmicas, que levam à dispneia, ortopneia, insuficiência respiratória severa (hipóxia/hipoxémia), hemólise intravascular aguda e hemoglobinúria (por hemólise mecânica, devido à turbulência causada pela interferência da massa parasitária com o fluxo sanguíneo), cansaço extremo, intolerância ao exercício absoluto, coagulação intravascular disseminada, diminuição do apetite e choque cardiogénico. Pode ser audível um sopro protossistólico devido à regurgitação tricúspide. Este síndrome é fatal, se não forem removidos os parasitas cirurgicamente [3, 7].

A nível renal pode ocorrer oligúria, devido à diminuição da pressão de filtração e proteinúria, consequência das lesões glomerulares [7].

A presença dos parasitas em locais aberrantes (ex: ventrículo lateral do cérebro, câmara anterior do olho, cavidade peritoneal) pode levar a complicações que, apesar de raras, estão descritas. Os sinais clínicos referem a presença física do parasitas ou são secundários à formação de trombos.

De acordo com os sinais clínicos, a dirofilária classifica-se em quatro graus de severidade (quadro 5):

Grau	Classe	Sinais Clínicos
I	Suave	Ausente, tosse ocasional, fadiga com o exercício ou ligeira perda da condição corporal
II	Moderado	Ausente, tosse ocasional, fadiga com o exercício, ligeira a moderada perda da condição corporal
III	Severo	Perda da condição corporal a caquexia, intolerância ao exercício, tosse ocasional ou persistente, dispneia
IV	Muito Severo	Síndrome Veia Cava – Anorexia, depressão, fraqueza, tosse, dispneia e hemoglobinúria. Mucosas pálidas, tempo repleção capilar aumentado, distensão da jugular

Quadro 5: Classificação do grau de severidade clínica da Dirofilariose.
Adaptado de Miller & Gordon, (2009)[234].

O **grau I** é um canídeo parasitado, mas sem alterações no exame físico, normalmente tem uma carga parasitária baixa e um prognóstico excelente, sendo considerada como dirofilariose subclínica. O **grau II** é um canídeo com sinais clínicos suaves, como tosse ocasional, dispneia suave e intolerância ao exercício. A maioria tem um bom prognóstico. Cães de **grau III** têm tosse persistente, dispneia, intolerância ao exercício severo, perda de peso, caquexia e, por vezes, insuficiência cardíaca direita. Estes pacientes têm um prognóstico pobre, mas com estabilização e cuidados de maneio, 90% deles podem ser tratados com sucesso. Os cães do **grau IV** são conhecidos como SVC. Estes cães têm uma carga parasitária elevada (30 a 200 parasitas, dependendo do tamanho do cão) nas artérias pulmonares e alguns regressam ao ventrículo direito. Os parasitas podem chegar até ao átrio direito e depois à veia cava. Apresentam dispneia, taquipneia, taquicardia, mucosas pálidas, fraqueza e, por vezes, colapso. Estes pacientes requerem cirurgia, para remover os parasitas adultos do coração [25, 235].

No quadro 6 observam-se as características clínicas, alterações analíticas e imagiológicas de acordo com a classe de severidade da dirofilariose [77].

	Grau I	Grau II	Grau III	Grau IV
Anamnese	Normal	Moderada intolerância ao exercício Tosse produtiva depois do exercício	Intolerância ao exercício Anorexia	Intolerância ao exercício Anorexia
Exame físico	Normal	Perda progressiva de peso Mau estado do pelo	Caquexia Sopro sistólico TRC aumentado Mucosas pálidas ou ictéricas Dispneia Tosse persistente	Taquicardia, taquipneia Sopro Sistólico Pulso venoso positivo Mucosas pálidas ou ictéricas Ascite
Diagnóstico	Teste antigénio positivo	Teste antigénio positivo	Teste antigénio positivo	Teste antigénio positivo

Radiografia torácica	Normal	Ligeira dilatação da artéria pulmonar e ramos lobares Aumento moderado do ventrículo direito	Aumento das artérias pulmonares Dilatação do ventrículo direito	Aumento das artérias pulmonares Dilatação severa do ventrículo direito Dilatação da veia cava caudal
Ecocardiografia	Normal	Presença de parasitas adultos	Presença de parasitas adultos nas artérias pulmonares e ventrículo direito	Presença de parasitas adultos nas artérias pulmonares e ventrículo direito, veia cava caudal e craneal
Alt. Analíticas	Normal	Ligeira anemia	Anemia leve ou marcada Azotémia Elevação das transaminases Proteinúria	Anemia por hemólise Azotémia Elevação das transaminases Proteinúria e hemoglobinúria
Prognóstico	Favorável	Reservado	Grave	Desfavorável

Quadro 6: Características clínicas, alterações analíticas e imagiológicas de acordo com a classe de severidade da dirofilariose. TRC= tempo replecção capilar.
Adaptado de Montoya-Alonso & Gómez, (2012) [77].

1.7. Diagnóstico

A infeção por dirofilária pode ser diagnosticada por análises sanguíneas que detetam microfilárias circulantes ou antigénio das dirofilárias adultas, mas devem-se realizar exames analíticos e imagiológicos, para determinar a severidade da doença e a opção terapêutica apropriada (quadro 7) [3].

	Sinais Clínicos	Frequência (%) (N=47)
Sintomas	Assintomático Intolerância ao Exercício Tosse Dispneia Síncope	59,6 25,5 14,9 10,6 2,1
Auscultação	Normal Murmúrio sistólico Tricúspide Sons inspiratórios alterados Murmúrios pulmonar sistólico Divisão do segundo som cardíaco	80,9 10,6 4,3 2,1 2,1
Radiografia	Dilatação do ventrículo direito Alteração na vasculatura pulmonar Normal Infiltrados pulmonares	55,3 42,6 38,3 10,6
Eletrocardiografia	Normal Dilatação cardíaca direita Dilatação cardíaca esquerda	85,1 14,9 2,1
Análises Clínicas	Normal Eosinofilia Trombocitopénia Anemia Proteinúria	72,3 12,8 12,8 4,3 2,1

Quadro 7: Frequência da distribuição dos sinais clínicos em 47 cães infetados com *Dirofilaria immitis* na Alemanha. Adaptado de Schrey & Trautvetter,(1998) [199].

1.7.1. Diagnóstico imagiológico

1.7.1.1. Radiografia

É um exame objetivo e útil, para avaliar a severidade da doença e avaliar as alterações cardiopulmonares e a carga parasitária [19, 21, 236, 237].

Sinais típicos da doença de dirofilária são a dilatação e tortuosidade dos ramos periféricos intralobares e interlobares das artérias pulmonares, particularmente nos lobos caudais [21, 237].

Em cães com dirofilariose, as alterações radiográficas estão presentes em aproximadamente 85% dos casos. Um estudo realizado a duzentos e vinte cães infetados revelou que 70% tinham um aumento do segmento da artéria pulmonar principal, 60% apresentavam dilatação do ventrículo direito, 50% tinham aumento e densidade alterada das artérias pulmonares e 50% apresentavam tortuosidade da artéria pulmonar [8]. A dirofilariose pode ser detetada por radiografia 4 a 5 meses pós-infeção. Os sinais iniciais e subtis visualizam-se nas artérias pulmonares localizadas na zona dorsocaudal dos lobos pulmonares diafragmáticos, onde o fluxo pulmonar é superior e onde se depositam os parasitas imaturos [237]. À medida que a doença vai evoluindo na severidade e cronicidade da infeção, vão sendo visualizados sinais nos ramos arteriais maiores, desenvolvendo-se um padrão vascular de maior diâmetro, com uma linha central brilhante, mas com margens indistintas. Estas alterações são melhor visualizadas na projeção latero-lateral [237].

Em cães com insuficiência cardíaca direita, podem ser visualizadas alterações adicionais, como cardiomegália direita, dilatação da veia cava, aumento da silhueta do fígado e do baço, efusão pleural e ascite [8, 238].

A realização de várias projeções radiográficas permite um melhor detalhe na visualização das alterações provocadas pela dirofilariose. A projeção ventrodorsal é preferida, para visualizar a silhueta cardíaca e minimizar o stress do paciente. A projeção dorsoventral é superior para a avaliação das artérias pulmonares lobar caudais, que são consideradas alteradas, se maiores que o diâmetro da nona costela, na zona onde a costela e a artéria se intersetam. A projeção lateral é a melhor, para avaliar a artéria pulmonar craneal, que normalmente tem o mesmo diâmetro que a veia que a acompanha ou diâmetro igual ao terço proximal da quarta costela (figura 16) [8, 19].

As lesões do parênquima pulmonar são melhor avaliadas radiograficamente. Em casos de pneumonite, está presente um padrão pulmonar misto intersticial e alveolar, que tipicamente é mais severo nos lobos pulmonares caudais. Em casos de granulomatose eosinofílica, visualizam-se nódulos intersticiais associados a linfoadenopatia brônquica e, ocasionalmente, efusão pleural (figura 17). Em casos de tromboembolismo pulmonar, está presente um infiltrado instersticial e alveolar coalescente, ocorrendo principalmente nos lobos pulmonares caudais, refletindo um aumento da permeabilidade vascular pulmonar e inflamação. Em casos de uma embolização massiva, ou enfarte pulmonar, pode estar presente uma consolidação pulmonar [8].

Cães expostos a pouco exercício podem ter elevadas cargas parasitárias, serem clinicamente assintomáticos, e não apresentarem alterações ou apenas alterações ligeiras na radiografia. Por outro lado, cães com doença severa podem ter cargas parasitárias baixas e sinais radiográficos exuberantes. Os sinais radiográficos de doença vascular pulmonar podem persistir por um longo período após a eliminação dos parasitas [7].

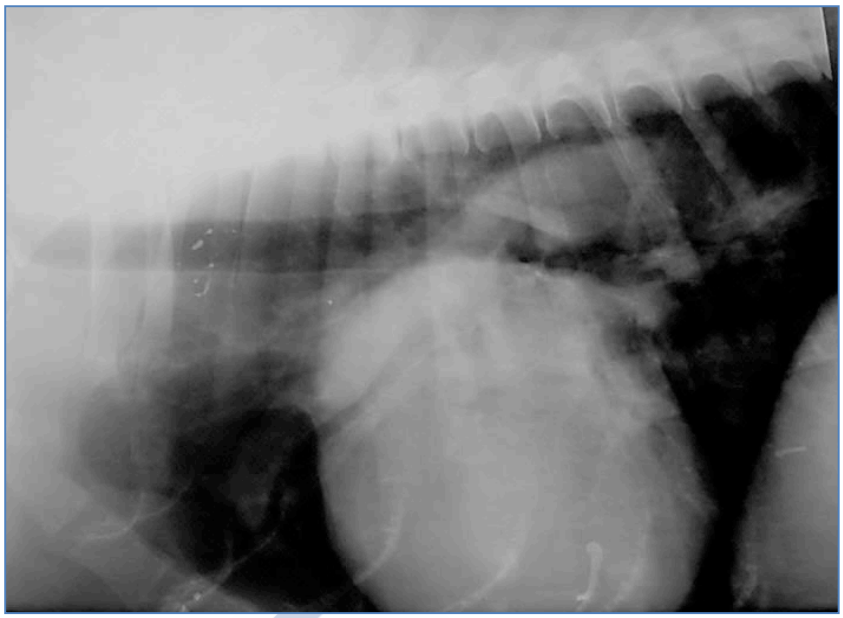


Figura 16: Radiografia torácica laterolateral de um canídeo com dirofilariose, revelando um padrão vascular com marcada dilatação das artérias pulmonares (arterite deformante) e cardiomegália direita (Original).

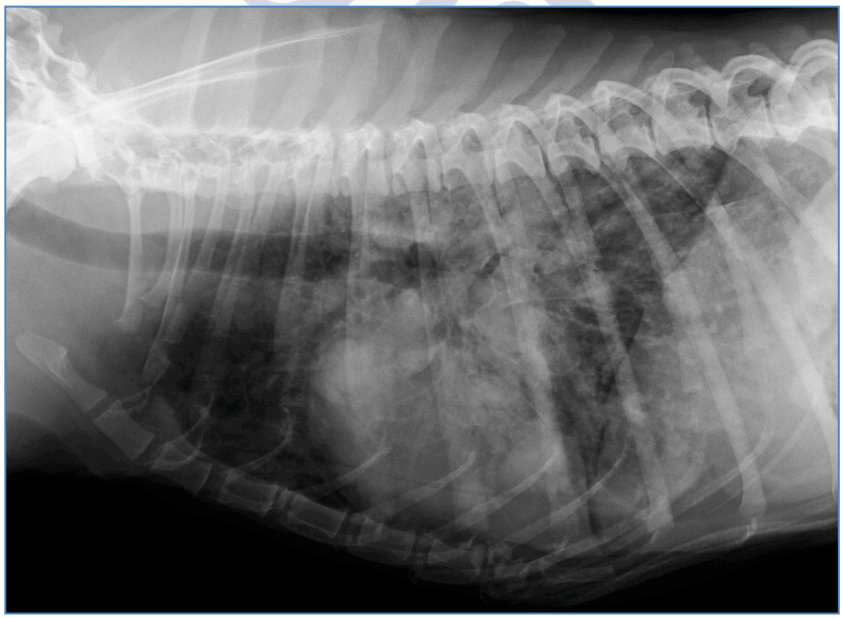


Figura 17: Radiografia torácica laterolateral de um canídeo com dirofilariose, revelando nódulos pulmonares e um padrão pulmonar misto intersticial (moderado a grave), vascular (com arterite deformante) e alveolar. Detectam-se sinais de cardiomegália direita, embora os limites da silhueta cardíaca sejam indistintos.
(Original).

1.7.1.2. Eletrocardiografia

O eletrocardiograma é útil para detetar arritmias, mas é um método pouco sensível para detetar dilatação das câmaras induzidas por dirofilariose. As arritmias, como fibrilhação atrial, são raras em cães com dirofilariose (2-4%), exceto em casos de SVC ou insuficiência cardíaca. Um padrão de dilatação ventricular direita e um desvio do eixo elétrico para a direita são compatíveis com dirofilariose canina [8]. Lombard

and Ackerman, cit. por Atkins (2009) demonstraram que as alterações no eletrocardiograma encontravam-se em 38-62% dos cães com alterações moderadas a severas na ecografia. Por outro lado, Calver, cit. por Atkins (2009) referiu que apenas 6% de um total de 276 cães com dirofilariose, apresentavam alterações no eletrocardiograma compatíveis com dilatação ventricular direita. Também mostrou que os parâmetros mais sensíveis, para a deteção de dirofilariose, são a onda S mais profundas que 0,8 mv na derivação II, um desvio do eixo superior a 103º e mais de três parâmetros de dilatação cardíaca direita. A presença de onda P elevada (onda P >0,4 mv na derivação II e avF) é encontrada em apenas 1-5% dos casos [233, 239].

1.7.1.3. Ecocardiografia

A ecocardiografia permite a visualização direta das câmaras cardíacas e vasos associados, o que permite a observação do parasita nas câmaras cardíacas direita, veia cava caudal, artéria pulmonar e o trato proximal de ambas as artérias pulmonares caudais. As dirofilárias adultas são visualizadas como uma linha dupla linear, curta, flutuando nas câmaras cardíacas ou no lúmen dos vasos (figura 17) [3, 232, 237, 238].

Não é um método eficiente para fazer o diagnóstico, porque nos animais, com baixa carga parasitária, os parasitas encontram-se nos ramos das artérias pulmonares periféricas, sem estarem acessíveis à ecografia. Quando os parasitas são numerosos é mais provável estarem presentes na artéria pulmonar principal, nos ramos interlobares direito e esquerdo, ou no lado direito do coração, sendo, por isso, acessíveis por ecografia [237].

Em cães com hemoglobinúria, é possível visualizar a presença de dirofilárias na válvula tricúspide, sendo conclusivo para confirmar o SVC (figura 18). [237].

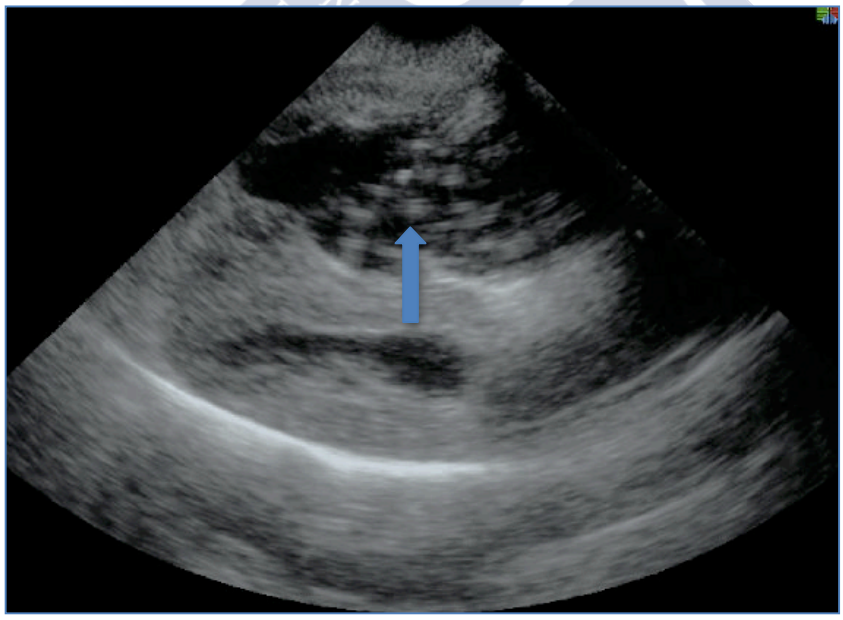


Figura 18: Ecocardiografia de um cão infetado com *Dirofilaria immitis*. Os parasitas aparecem como estruturas com conformação de dupla linha paralela, no átrio direito (setas) (Original).

A ecocardiografia é útil para avaliar a dilatação cardíaca direita: aumento da dimensão "end-diastólica" ventricular direita, aumento da espessura do septo e da parede ventricular direita livre. Foi descrito que 4 a 10 cães com dirofilariose têm um movimento septal paradóxico. Em cães com dirofilariose canina, o ratio da dimensão do

ventrículo interno direito e esquerdo está reduzido em relação ao valor normal (3 a 4), tendo um valor médio de 0,7 [8].

A ecocardiografia "Doppler" pode medir a velocidade nas válvulas tricúspide e pulmonar de modo a determinar a presença de regurgitação e permite a medição não invasiva da pressão pulmonar [238].

A ecocardiografia permite uma melhor avaliação da severidade da doença e estimar a carga parasitária, o que é importante para programar o tratamento e emitir um prognóstico [3, 19].

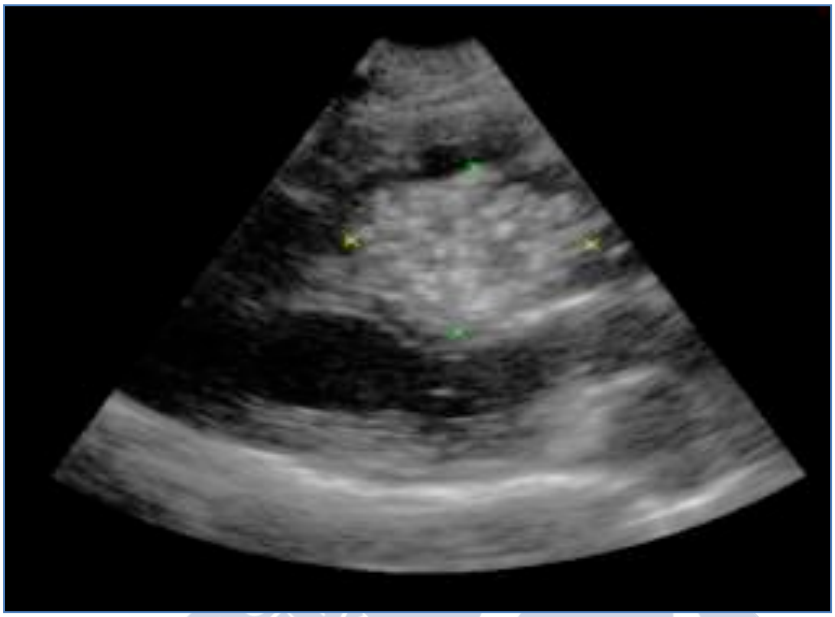


Figura 19: Ecocardiografia em corte parasternal direito de um cão gravemente infetado com *Dirofilaria immitis*. (SVC: icterícia, hemoglobinúria e hemoglobinémia).
Massa composta por aglomerado de parasitas a nível da válvula tricúspide (Original).

1.7.2. Diagnóstico por análises clínicas

Uma avaliação hematológica e bioquímica é útil parar avaliar o estado do cão, antes do tratamento adulticida. Os cães com dirofilariose podem ter uma anemia não regenerativa de baixo grau (10% dos cães afetados moderadamente até 60% dos cães severamente afetados) com diminuição da hemoglobina, sendo classificada de normocrómica e normocítica [233]. Podem ter leucocitose com neutrofilia (20-80%), eosinofilia (85%) e basofilia (60%) [8, 240]. A trombocitopénia pode estar presente em cães com dirofilariose, podendo ser resultado de uma destruição imunomediada [240] e pode ocorrer 1 a 2 semanas após a terapia adulticida (quadro 7) [8].

Em cães com doença severa e com presença de insuficiência cardíaca direita, a atividade das enzimas hepáticas [fosfatase alcalina (FAS), aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT) e a Gama GT (GGT)] podem estar aumentadas (10% dos casos) [8, 240] e, ocasionalmente, é detetada hiperbilirrubinémia. A azotemia está presente em apenas 5% dos cães, mas pode ser de origem pré-renal, se estiver presente desidratação ou insuficiência cardíaca, ou pode ser secundária, a uma glomerulonefrite. A albuminúria está presente em 10 a 30% dos casos, mas se a doença glomerular for severa, a hipoalbuminémia pode complicar o quadro clínico (quadro 6) [8, 233].

Tabrizi (2012), realizou um estudo onde comparou os valores de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina e bilirrubina direta e indireta em cães com dirofilária e em cães saudáveis e mostrou que apenas os valores de fosfatase alcalina e bilurribina indireta eram significantemente maiores em cães com dirofilariose (p<0,05). Concluindo que a dirofilária causa lesão a nível do fígado, mais particularmente, a nível dos ductos biliares. O aumento da bilirrubina pode também estar relacionado com lesão dos glóbulos vermelhos causado pelo parasita [241].

1.7.2.1. Marcadores cardiopulmonares

A *Dirofilaria immitis* produz lesões relevantes, principalmente no sistema cardiopulmonar. Os biomarcadores cardiopulmonares são parâmetros biológicos que podem ser objetivamente medidos e quantificados, como indicadores de processos patológicos ou resposta a intervenção terapêuticas. Os biomarcadores são ferramentas para despiste, diagnóstico e monitorização de processos de doença, mas também para determinar a suscetibilidade e eligibilidade para algumas terapias [7].

São várias as moléculas libertadas em circulação, após dano celular do miocárdio, perfusão inadequada, lise de trombos e podem servir de marcadores precoces, ajudando na decisão de tratamento [7].

Carreton *et al.,* (2009), realizaram um estudo com o objectivo de determinar as alterações dos biomarcadores cardiopulmonares (troponina T cardíaca, troponina I cardíaca, mioglobina e D-dímero) em cães parasitados por *D. immitis*. Esse estudo demonstrou que a troponina T cardíaca não sofre alterações; que a troponina cardíaca I se encontra mais elevada em cães infetados com *D. immitis*; e que a mioglobina e D-dímero (DD) eram significantemente mais elevados em cães com dirofilariose, principalmente se microfilarémicos. Sugeriu a possibilidade de utilizar a troponina I e a mioglobina como marcadores de lesão cardíaca e o DD como ferramenta de diagnóstico de tromboembolismo em cães com dirofilariose cardiopulmonar [242, 243].

Outros estudos demonstraram que o aumento dos níveis de mioglobina e troponina cardíaca I são indicativos de lesão miocárdica em cães parasitados com dirofilariose [242-244].

Carreton *et al.,* (2012), determinaram a variação dos biomarcadores cardiopulmonares (troponina I cardíaca, mioglobina e DD) e outros parâmetros biológicos (contagem plaquetas, aspartato transaminase, creatinina quinase (CK), e CK-MB), durante o tratamento adulticida com melasormina e doxiciclina, de acordo com o protocolo da Sociedade de Dirofilaria Americana (AHS). Os resultados demonstraram que os biomarcadores cardiopulmonares podem ser um suporte na monitorização e avaliação durante o tratamento com adulticida de *D. immitis* e que a avaliação do DD é uma ferramenta útil, para monitorizar a presença de tromboembolismo pulmonar durante o tratamento adulticida [244-246].

O DD é um produto de degradação da fibrina presente no sangue, após a degradação de um coágulo sanguíneo por fibrinólise. Por isso, o aumento da sua concentração no plasma indica processos de fibrinólise e, consequentemente, a formação de coágulo. Vários estudos demonstraram níveis elevados de DD no soro, na presença de doença tromboembólica e coagulação intravascular disseminada. A deteção destas condições em cães em estado crítico permite realizar terapêutica antitrombótica e reduzir os níveis de mortalidade. A dirofilariose é acompanhada de tromboembolismo, devido à morte dos parasitas e alterações no endotélio arterial, o que causa hipertensão pulmonar e ICC direita. Outro estudo demonstrou que os níveis de DD se encontram

aumentados em cães com dirofilariose, principalmente em cães microfilarémicos, quando comparado com cães saudáveis, sugerindo que a avaliação do DD pode ser uma ferramenta importante no diagnóstico, prognóstico e tratamento de tromboembolismo pulmonar. Carretón *et al.,* (2011), realizaram um estudo para avaliar a expressão pulmonar e renal de DD em cães afetados com dirofilariose com e sem microfilárias, com o objetivo de verificar se a presença de microfilárias afeta e predispõe para a presença de micro-trombos durante a doença. Verificaram que os níveis de DD no soro estavam associados à presença de DD nos pulmões e rins, especialmente em cães microfilarémicos. Este estudo sugeriu que a monitorização dos níveis de DD em cães parasitados por dirofilariose é útil para avaliar a presença de tromboembolismo pulmonar e que a presença de microfilárias aumenta a tendência para o desenvolvimento de microtrombos na vasculatura renal, contribuindo para a patologia renal [245-247].

Outro biomarcador é a proteína C reativa, proteína encontrada no sangue, cujos valores aumentam em resposta à inflamação e é considerada uma proteína de fase aguda. É sintetizada pelo fígado e o seu aumento deve-se ao aumento da concentração plasmática de citocinas, como a IL-6, que é produzida predominantemente por macrófagos, adipócitos e pelo fator necrose tumoral alfa (TNF-α). Estudos demonstraram que a proteína C reativa aumenta em cães infetados por dirofilariose e esse aumento está relacionado com a severidade da lesão pulmonar e tromboembolismo. A medição dos níveis de proteína C reativa pode ser considerada útil, simples e económica, para estadiar a doença, monitorizar a terapia, ou decidir qual o tipo de terapia a aplicar [248].

A citologia traqueobronquial pode ser útil, principalmente em cães com tosse, com pneumonite eosinofílica, com doença oculta e em casos com pouca evidência radiológica. O exame revela a evidência de um infiltrado eosinofílico e, ocasionalmente, microfilárias. Em casos de ICC, a análise do fluido abdominal revela um transudado modificado. Os cães com doença cardíaca direita secundária à dirofilariose têm uma pressão venosa central que varia entre 12 a mais de 20 cmH20, mas a ascite pode desenvolver-se em baixas pressões se estiver presente hipoalbuminémia [8].

1.7.3. Diagnóstico laboratorial

A infeção por dirofilariose deve ser diagnosticada laboratorialmente por testes sanguíneos, que detetam as microfilárias circulantes ou o antigénio dos parasitas adultos, mas, como referido anteriormente, outros procedimentos são usualmente requeridos para determinar a severidade da doença e opções terapêuticas. As microfilárias devem ser diferenciadas morfologicamente de outras espécies de filárias que também libertam microfilárias na circulação, especialmente na Europa e em Países do Extremo Oriente (quadro 8 e figura 20) [3].

Espécie	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Observações
Dirofilaria immitis	290 – 330	5 – 7	Sem bainha, extremidade cefálica cónica, extremidade caudal em forma de ponta, motilidade estacionária
Dirofilaria repens	300 – 360	6 – 8	Sem bainha, extremidade cefálica obtusa, extremidade caudal afilada, filiforme e encurvada, motilidade estacionária

Acantocheilonema reconditum	260 – 283	4	Sem bainha, extremidade cefálica obtusa e com um proeminente gancho cefálico e extremidade caudal em forma de gancho e encurvada, motilidade progressiva
Acantocheilonema dranculoides	190 – 247	4 – 6,5	Com bainha, extremidade cefálica cónica e extremidade caudal afiada e extensa, motilidade estacionária

Quadro 8: Características morfológicas das microfilárias no sangue do hospedeiro definitivo. Adaptado de McCall *et al.*, (2008) [3].

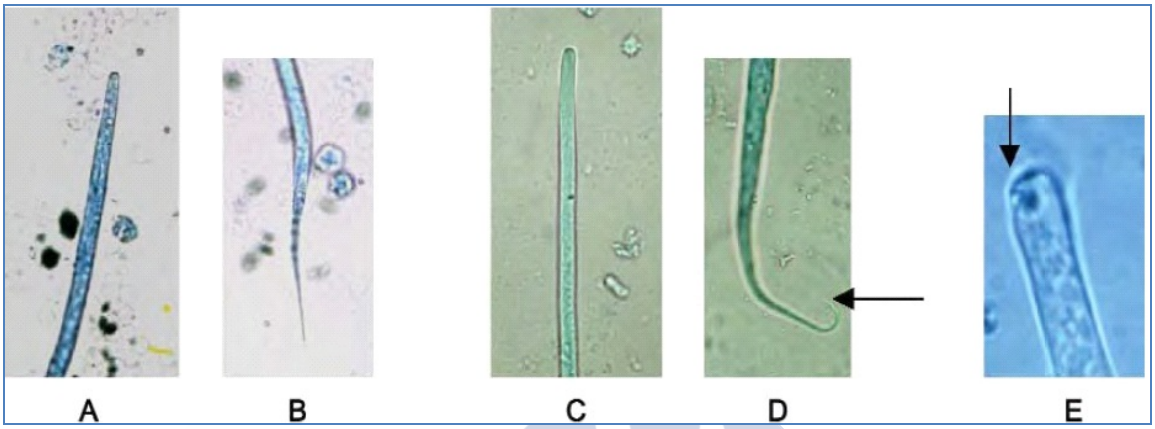


Figura 20: A e B: *Dirofilaria immitis:* extremidade cefálica (400 x) e caudal (1000 x); C e D: *Dirofilaria repens:* extremidade cefálica (400 x) e caudal (1000 x); E: extremidade cefálica de *Acantocheilonema reconditum*, mostrando o gancho cefálico (1000 x). Adaptado de Genchi *et al.*, (2007) [249].

1.7.3.1. Pesquisas de microfilárias circulantes

As microfilárias podem ser diferenciadas pela sua morfologia, coloração histoquímica e métodos moleculares [3]. É importante distinguir entre os diferentes tipos de microfilárias (*D. immitis, D. repens, A. Reconditum),* para evitar falsos positivos.

Apesar da intensidade da microfilarémia não estar relacionada com a carga parasitária adulta, a probabilidade de encontrar microfilárias relaciona-se directamente com a gravidade da infeção [249].

1.7.3.1.1. Exame direto de sangue fresco

Consiste em colocar uma gota de sangue fresco numa lâmina de microscópio, cobrir com uma lamela e observar ao microscópio óptico, em baixa ampliação. As microfilárias são observadas através do seu movimento entre os eritrócitos [249].

Estudos demonstraram uma sensibilidade para esta técnica de 80,9%. Quando a contagem de microfilária é superior a 50 Mf/ml, o exame direto é 100% sensível. Quando a contagem é inferior, a sensibilidade pode cair para 44,3%. Podem ocorrer falsos positivos, se estiverem presentes microfilárias de outras espécies e falsos negativos na presença de uma infeção oculta [250]. A sensibilidade é baixa, quando a amostra tem <10 Mf/ml [251].

As microfilárias de *D. immitis* são ativamente móveis e ficam ondulando mais ou menos no lugar, deslocando-se vagarosamente pela lâmina, enquanto as microfilárias de *A. reconditum* tendem a migrar rapidamente pela lâmina de microscopia (quadro 9) [250].

Vantagens	Desvantagens
Rápido Pouco dispendioso	Sensibilidade baixa Elevada frequência de falsos negativos Não permite a diferenciação da espécie de filária

Quadro 9: Vantagens e desvantagens da técnica de exame direto de sangue fresco. Adaptado de Genchi *et al.*, (2007) [249].

1.7.3.1.2. Exame tubo microhematócrito

Consiste em centrifugar um tubo de microhematócrito com sangue e observar microscopicamente, especialmente a zona do "buffy coat", e detetar a presença de microfilárias, através do seu movimento. Devido à amostra de sangue ser pequena, como na técnica de exame direto, a sensibilidade também é baixa [237, 250].

Wang L-C, cit. por Datz (2003), demonstrou que a sensibilidade desta técnica é superior à do exame direto (55% vs 39%), mas nesse estudo não foi possível determinar qual a espécie de dirofilária presente [250].

1.7.3.1.3. Técnicas de concentração de microfilárias

Vários métodos são utilizados para concentrar as microfilárias circulantes no sangue. Estes métodos têm uma sensibilidade superior por utilizarem um maior volume de amostra e, adicionalmente, podem permitir a diferenciação entre as espécies de microfilárias, através das suas características morfológicas. Consistem na hemólise e fixação das microfilárias [249].

1.7.3.1.3.1. Técnica de filtração

Mistura-se 1 ml de sangue com anticoagulante [Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou heparina] com 10 ml da solução Difil Lysate®. A mistura é injetada através da câmara de filtro (Kit Comercial: Difil-Test®, EVSCO-Milipore), seguida de 10 ml de água destilada para lavar. O filtro é removido da câmara e colocado sobre uma lâmina, corado com azul de metileno ou Difil stain® e visualizado ao microscópio. As microfilárias apresentam-se imóveis mas são facilmente reconhecidas [249, 250].

Podem ocorrer falsos positivos por contaminantes ou por estarem presentes outras espécies de filárias. A sensibilidade é superior à do exame direto e teste do tubo microhematócrito, devido à amostra testada ser maior. Um estudo demonstrou uma sensibilidade de 72,7% e especificidade de 87,7%, usando a necrópsia como exame "gold standard" (quadro 10) [250].

Vantagens	Desvantagens
Rápido e sensível Não necessita de centrifugação	Dispendioso Solução "lysate" desidrata as microfilárias e não permite a sua diferenciação

Quadro 10: Vantagens e desvantagens da técnica de filtração. Adaptado de Genchi *et al.*, (2007) [249].

1.7.3.1.3.2. Técnica Knott modificada

A técnica de Knott (1939) modificado consiste em misturar 1 ml de sangue venoso com anticoagulante (EDTA ou heparina) com 10 ml de formalina a 2% e centrifugar durante 3-5 minutos a 1500 rpm. Decanta-se o sobrenadante e mistura-se o sedimento, em parte iguais, com o corante azul de metileno (1:1000). O sedimento corado é colocado numa lâmina, coberto por uma lamela e observado ao microscópio [249, 252].

O tamanho e morfologia das microfilárias são melhor preservadas por esta técnica, o que permite distinguir as diferentes espécies de microfilárias. Este método é comparável, em termos de sensibilidade, com o teste de filtração, mas a especificidade é

superior (menor número de falsos positivos devido a uma má identificação). Um estudo demonstrou uma sensibilidade de 66,4% e uma especificidade de 95,4% para esta técnica [8, 250]. Courtney and Zeng, cit. Magnis *et al*., (2013) demonstraram que apenas 80,9% das amostra com microfilárias de *D. immitis* foram detetadas pela técnica Knott modificado [251].

Este teste é preferido, uma vez que permite visualizar a morfologia, medir as dimensões corporais e diferenciar as microfilárias nas suas espécies (quadro 11) [237].

No entanto, existem entre 3 a 67% de cães infetados que não têm microfilárias circulantes, mas têm parasitas adultos (infeções ocultas) [249].

Vantagens	Desvantagens
Sensível e específico Permite diferenciar as espécies de microfilárias	Demorado Exige operador com conhecimentos sobre a morfologia das microfilárias

Quadro 11: Vantagens e desvantagens da técnica de Knott modificado.
Adaptado de Genchi *et al,* (2007) [249].

1.7.3.1.4. Técnica da coloração histoquímica por fosfatase ácida

A coloração histoquímica permite diferenciar as espécies de microfilárias através das localizações morfológicas da atividade de fosfatase ácida [253].

Chalifoux & Hunt (1971), descreveram o método Barka, que permite demonstrar um padrão de atividade enzimática da fosfatase ácida, nas diferentes espécies de microfilárias, representando um método preciso para a sua diferenciação. Este método foi aplicado às microfilárias de *D. immitis*, onde a atividade da fosfatase ácida ficou limitada a faixas estreitas nos poros excretor e anal, enquanto nas microfilárias de *A. reconditum*, a atividade enzimática ficou uniformemente distribuída por todo o parasita. Em 1978, Yen &Mak descreveram que a microfilária de *D. repens* têm apenas um local de atividade por fosfatase ácida, o poro anal. As microfilárias por *A. drancuculoides* demonstram três locais de atividade por fosfatase ácida - poro anal, excretor e médio (figura 21 e 22) [3, 7, 251, 253, 254].

O método de Barka usa o Naftol-AS-TR-fosfato como substrato e Pararosanilina como cromógeneo. A grande desvantagem deste procedimento é o curto período de armazenamento dos reagentes (4 semanas para o Naftol-AS-TR-fosfato e 6 meses para a Pararosanilina e nitrato de sódio a 4%). Para além desta desvantagem, muitos autores consideraram este método muito elaborado para o uso de rotina na maioria das clínicas, envolvendo um número elevado de reagentes e manipulações, o que eleva a possibilidade de erro e requer uma equipa especializada [253].

Em 2001, Peribánez *et al*. propuseram uma modificação à técnica descrita por Chalifou & Hunt (1971), chegando aos mesmo resultados, através do kit comercial Leucognost-Sp® (Merck, Alemanha), mas com maior rapidez e simplicidade. Este kit é utilizado na deteção da reação da fosfatase ácida em leucócitos no diagnóstico de leucemia em humanos. Este kit baseia-se no mesmo princípio, utiliza apenas quatro reagentes, e apresenta como vantagens a maior facilidade na preparação dos reagentes e execução, para além do período de armazenamento dos reagentes ser de 2 anos. É um método mais simples e rápido (quadro 12) [253, 254].

Vantagens	Desvantagens
Muito específico	Dispendioso Demorado Necessária experiência técnica em laboratório

Quadro 12: Vantagens e desvantagens da coloração histoquímica por fosfatase ácida.
Adaptado de Genchi *et al.,* (2007) [249].

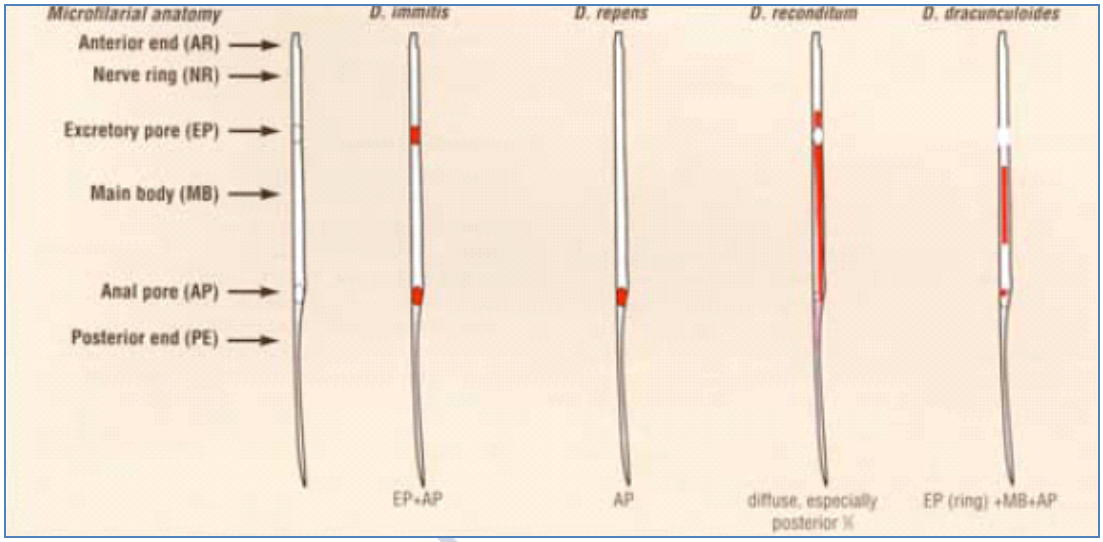


Figura 21: Representação gráfica da marcação histoquímica por fosfatase ácida das diferentes espécies de microfilárias. Adaptado de Schrey & Trautvetter, (1998) [199].

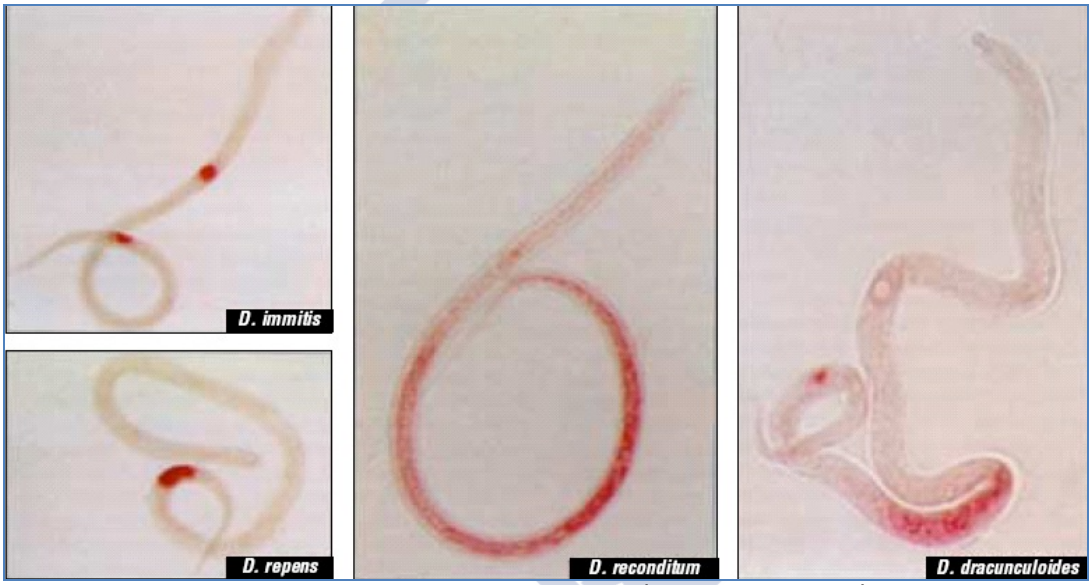


Figura 22 : Marcação por coloração histoquímica por fosfatase ácida das diferentes espécies de dirofilárias sem bainha. Adaptado de Schrey & Trautvetter, (1998) [199].

1.7.3.1.5. Métodos moleculares

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma ferramenta sensível e precisa na diferenciação das espécies de microfilárias [255-257]. Vários métodos de PCR usando diferentes "primers", foram desenvolvidos para essa diferenciação. É bastante útil para detetar e identificar as microfilárias, tanto no hospedeiro definitivo como no hospedeiro intermediário (mosquitos) [35, 50]. Permite também identificar infeções mistas (infeções por várias espécies de filárias) (quadro 13). Várias técnicas têm sido descritas ao longo dos últimos anos [249].

Mar *et al*., (2002), usando o "primer" ITS2 (internal transcribed spacer region 2) num ensaio de PCR, conseguiram diferenciar as microfilárias de *D. immitis* das de *A. reconditum*, com especificidade de 100% e uma sensibilidade elevada [255].

Casiraghi *et al.*, (2006), descreveram um método simples, mas altamente específico, para identificar as três dirofilárias mais prevalentes na Europa (*D. immitis, D.*

repens, A. reconditum), baseado na amplificação por PCR do ADN mitocondrial (125 rADN e *cox1,)* com "primers" das filárias, seguido de digestão com enzimas de restrição que geram bandas polimórficas, o que permite diferenciar as três espécies e a amplificação por PCR com "primers" específicos para a espécie, o que permite suportar a restrição da análise, particularmente, em casos de infeções múltiplas [256].

Goia *et al.*, (2010), desenvolveram uma nova técnica molecular baseada no PCR múltiplo com sensibilidade elevada, que utiliza primer do ADN mitocondrial (125rADN) que deteta e diferencia simultaneamente e sem equívocos a *D. immitis* da *D. repens*, a partir ADN extraído do sangue periférico canino [258].

Latrofa *et al*., (2012), descreveram outra técnica de PCR múltiplo que permite simultaneamente a deteção e identificação de cães infetados por filarioides: *D. immitis, D. repens, A. reconditum e Cercopithifilaria sp*. Baseia-se na amplificação de diferentes fragmentos da *cox 1* (subunidade 1, da oxidase do citocromo c da mitocôndria) com uma mistura de "primers" espécies-específico que permite distinguir qual a espécie de microfilárias em circulação [61].

Silbermayr *et al*., (2014), mostraram que a análise molecular por PCR direto é capaz de detetar microfilárias no sangue e a forma L3 no vetor mosquito, de forma rápida, sensível e económico, quando comparado com o método de PCR "standard", permitindo a distinção entre as diferentes espécies de *Dirofilaria spp* [259].

Vantagens	Desvantagens
Sensibilidade e especificidade elevada Capaz de discriminar entre todas as espécies de filaria	Dispendioso Demorado Laboratório especializado Técnico laboratorial especializado

Quadro 13: Vantagens e desvantagens dos métodos moleculares. Adaptado de Genchi *et al.*, (2007) [249].

1.7.3.2. Pesquisa de antigénio de Dirofilaria immitis no sangue

1.7.3.2.1. Métodos serológicos

Vários kits comerciais de ELISA, imunocromatografia e hemoglutinação, estão disponíveis e detetam a presença de antigénio circulante no soro, plasma, ou sangue total, proveniente do sistema reprodutor das parasitas fêmeas adultas. A maioria dos testes são muito específicos, de sensibilidade elevada, rápidos e de execução fácil [249].

Estes kits de testes são utilizados, frequentemente, nas clínicas veterinárias, para detetar dirofilariose em cães. Suplantaram o uso dos testes de pesquisa de microfilárias, tanto no despiste como no diagnóstico, devido à sua elevada sensibilidade e especificidade e devido aos efeitos amicrofilarémicos dos preventivos de dirofilária e à percentagem elevada de infeções ocultas [260].

Esta técnica também deve ser usada para determinar a eficácia da terapia adulticida, devido à rápida eliminação dos antigénios da circulação, após a morte do parasita [249].

Existem vários atributos importantes, que são requeridos a um antigénio para que sirva de marcador da infeção por dirofilariose. O antigénio deve ser específico da espécie, expressado por parasitas imaturos e não por larvas inefetivas e ser suficientemente imunogénico para ser detetado diretamente num teste de pesquisa de antigénio, ou indiretamente num teste de pesquisa de anticorpos. Os antigénios detetados pela última geração de testes cumprem todos estes critérios, com exceção de serem produzidos apenas pelo útero de fêmeas férteis e maturas [249].

A maioria dos testes deteta com precisão infeções com 3 ou mais fêmeas adultas maduras, no mínimo, com 7 a 8 meses de idade, mas geralmente não deteta infeções com menos de 6,5 meses de idade. Parasitas adultos machos, mesmo que maduros, não são detetados [261, 262]. São altamente específicos, pois não ocorre reacção cruzada com outros parasitas caninos (ex: *D. repens, Acanthocheilonema spp)* [236, 263]. Recentemente, Schnyder & Deplazes, (2012), demonstraram uma reatividade cruzada dos kits comerciais de pesquisa de antigénios circulantes de *D. immitis* com *A. Vasorum*, sendo o resultado do teste um falso positivo. É por isso importante exclui-lo com recurso a outros testes de diagnóstico (técnica Knott modificado, pesquisa de microfilárias, serologia, teste Baerman) [264].

A necessidade de um teste de antigénio de elevada sensibilidade e especificidade levou ao desenvolvimento no mercado de vários e diferentes kits. As técnicas utilizadas nestes testes são ELISA (ex: Snap ^{TM} Canine Heartworm PF, PetCheck® HTWM PF, ASSURE®CH, DiroCHEK® e UNI-TEC®CHW), hemoaglutinação (ex: VetRED®) e imunocromatografia (SoloStep CH®, Witness HW®). Os testes variam entre si, na facilidade de execução, no tipo de amostra sanguínea necessária, no tempo requerido, no número de passos que são necessários realizar e custo [261].

A quantidade de antigénio em circulação está relacionada com o número de dirofilárias fêmeas adultas presentes. Existem testes semi-quantitativos de ELISA (ex: Snap Canine Heartworm PF®) que podem predizer a carga parasitária e dar alguma indicação sobre o número de parasitas adultos presentes. Estes testes são úteis para prever complicações tromboembólicas, que ocorrem principalmente, após o tratamento adulticida [8, 237].

Os resultados falsos positivos podem ocorrer, mas normalmente devem-se a erro técnico. Se não houver risco de exposição, é recomendado confirmar todos os testes antigénios positivos em cães assintomáticos, antes da terapia adulticida [237].

Apesar da elevada sensibilidade, podem ocorrer falsos negativos em infeções pré-patentes (menos de 6,5 meses de duração), em infeções leves (carga parasitária baixa), em infeções apenas por parasitas machos, ou quando não foram seguidas as instruções do fabricante [19, 237, 252].

Estudos recentes mostraram que o aquecimento prévio das amostras em banho maria a 104º C durante 10 minutos permite a quebra das ligações entre os complexos Ag/Ac que interferem com o resultado do teste de antigénio, levando a falsos negativos. Deste modo, há um aumento do nível de antigénio circulante, melhorando a sensibilidade dos testes. Estes resultados sugerem que o sangue dos cães pode conter fatores que inibem a deteção do antigénio [265, 266].

Actualmente não há testes capazes e de detetar infeções apenas por adultos machos [252].

Os resultados dos testes de antigénio devem ser interpretados cuidadosamente, sendo necessário a sua integração com a restante informação clínica. Os cães de áreas de prevalência baixa têm tendência para ter infeções com poucos parasitas, necessitando de um teste com sensibilidade elevada [261].

1.7.3.2.1.1. Factores a considerar na seleção de um teste de antigénio de D. immitis

A) Precisão

A precisão é o fator mais importante a considerar, quando se seleciona um teste. A precisão é a probabilidade de identificar corretamente o estado de infeção do cão (ex: infetado/não infetado) [250].

A sensibilidade de um teste é a probabilidade do teste identificar corretamente um animal infetado. A especificidade é a probabilidade de um teste identificar corretamente um animal não infetado. Embora a sensibilidade e a especificidade ajude a quantificar a precisão dos testes serológicos, não predizem qual a probabilidade de encontrar a doença na população selecionada. Os valores preditivos positivos e negativos são medidas que estimam melhor a precisão do teste, pois têm em conta as suas características e a prevalência da doença nos animais que são testados [267].

O valor preditivo positivo dos testes de pesquisa de dirofilária (VPP) é a probabilidade da dirofilariose estar presente num animal que apresente teste positivo, enquanto que o valor preditivo negativo dos testes de dirofilariose (VPN) é a probabilidade de a dirofilariose não estar presente num animal, em que teste é negativo. Para um dado teste de despistagem, o VPP e VPN é função da sensibilidade do teste, da especificidade e da frequência da doença, na zona onde o teste é utilizado. Os valores preditivos positivos e negativos encontrados apenas dizem respeito à população em estudo. O valor VPP e o VPN não dependem apenas das propriedades do teste de despistagem, mas flutuam consideravelmente em função da frequência da doença e, por isso, são qualificados de valores extrínsecos. A confiança do valor VPP, que se pode atribuir a um resultado positivo em meio muito infetado, é elevada e, ao contrário, esta confiança é muito limitada em meio fracamente infetado. O inverso ocorre com o VPN (quadro 14) [267].

	População Infectada	População Indemne
Resposta positiva	Se	1-SP
Resposta negativa	1-Se	SP
Total	1	1

Quadro 14: Valor preditivo positivo e negativo. Se: sensibilidade Sp: especificidade
Adaptado de Toma *et al.*, (2004) [267].

Os três fatores críticos que limitam a sensibilidade dos testes de antigénios são a idade, o sexo do parasita que infeta o cão e, com uma importância menor, o número de parasitas presentes. Em geral, os kits de testes de antigénio não detetam infeções com menos de 6,5 meses, infeções só por machos e a sensibilidade diminui, quando estão presentes menos de três adultos fêmeas maduras [250].

A sensibilidade e especificidade dos testes de diagnóstico são excelentes, contudo, a sensibilidade baixa, quando a infeção por dirofilariose é ligeira e com reduzida carga parasitária (quadro 15 e gráfico 1). A sensibilidade dos testes aumenta, quando aumenta a carga parasitária das fêmeas adultas no hospedeiro de 1 para 3 ou mais parasitas. Para cães com apenas uma fêmea, a sensibilidade varia de 61,9% a 85,7%, em testes realizados nas clínicas (kits) e 80 a 95%, em testes realizados em laboratórios. Em cães com 3 ou mais fêmeas, os valores de sensibilidade dos testes realizados nas clínicas (kits) variam de 93 a 100%, comparando com o intervalo de 98,1% a 100% dos testes realizados em laboratório. As infeções só com machos não são

detetadas. A especificidade dos testes é de 100%, com exceção do AbboScreen ™ que tem especificidade de 96% [268].

Genchi *et al.,* (2012) realizaram um estudo em que compararam o resultado de três testes de antigénio (Witness® dirofilaria, Snap® HTWM e Speed® diro) com o teste PetCheck® HTWM ("gold standard"). Foram testadas 384 amostras de cães e os resultados obtidos foram: sensibilidade de 92%, 98% e 59% para o Witness® dirofilária, Snap® HTWM e Speed® diro, respetivamente (Witness® vs Snap® p>0,05, e ambos vs Speed® p<0,001) e com especificidade de 100% para os três. O VPP foi 100% e o VPN de 97%, 98% e 87% Witness® dirofilaria, Snap® HTWM e Speed® diro, respetivamente [269].

A sensibilidade e especificidade dos testes comerciais disponíveis é elevada, como visível no quadro 16 [77].

Teste	Neg n=100	1 fêmea n=21	2 fêmeas n=20	≥ 3 fêmeas n=57	Machos n=10
DiroCheck®	100	85,7	95	100	0
PetCheck® HTWM PF	100	76,2	85	100	0
Heska SoloStep™ CH Batch Test Strips	100	71,4	95	96,5	0
AbboScreen™ Canine HW Antigen Test	96	71,4	100	93	0
Heska™ Solo Step CH	100	76,2	96	96,5	0
ICT Gold® HW	100	61,9	85	93	0
Snap® HW PF	100	76,2	85	93	0
Witness® HW	100	71,4	90	94,7	0
FILARIA IC (Italiano)	100	76,2	85	100	0
Witness® HW (Australiano)	100	66,7	90	94,7	0

Quadro 15: Especificidade e sensibilidade de diferentes testes de antigénio de dirofilária canina (de acordo com a carga parasitária). Adaptado de McCall *et al.*,(2001) [268].

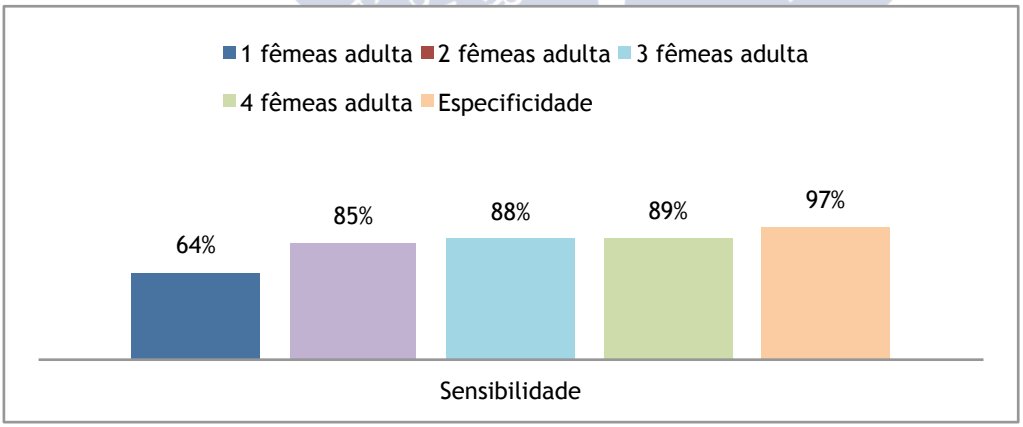


Gráfico nº 1: Comparação da sensibilidade e especificidade de 3 testes comerciais de pesquisa de antigénio de dirofilária de uma amostra de cães infetados naturalmente com carga parasitária baixa (0 a 4 fêmeas adultas). As colunas representam a sensibilidade média dos três testes com uma, duas, três ou quatro fêmeas adultas. A última coluna representa a especificidade média dos três testes Adaptado de Atkins 2009 [239].

Nome	Fabricante	Sensibilidade	Especificidade
Snap Filaria®	Idexx®	98%	100%
Speed Diro®	Virbac®	95,2%	99%
Antingen HW Ag 2.0®	Bionotet®	94,4%	100%
Uranotest dirofilariosis®	Uranovet®	94,4%	100%
Witness HW®	Pfizer-Symbiotic®	97,5%	100%

SensPert CHW®	SensPERT®	99%	100%
Fastest HW Antigen®	Megacor®	98,6%	99,1%
CHW Ag®	Quicking Biotech®	91,3%	100%
VetScan Canine Wellness Profile + HW®	Abaxis®	98%	98%
DFVtest *Dirofilaria*®	Divasa®	94,4%	100%

Quadro 16: Relação dos teste comerciais de antigénios disponíveis em Espanha. Dados da sensibilidade de especificidade facilitados pelos fabricantes. Adaptado de Montoya-Alonso & Gómez (2012) [77].

B) Propriedades do teste, facilidade de execução e custo

As propriedades do teste são importantes na seleção dos testes. O teste a utilizar numa clínica pequena, com uma equipa limitada, deve ser um teste fácil de executar e individual. Por outro lado, grandes clínicas com técnico laboratorial podem usar testes que permitem testar múltiplas amostras e com um maior grau de dificuldade e número de passos. Os testes mais simplificados permitem uma menor preparação, menor número de passos a realizar e menor tempo total na execução do teste [261].

Os testes que usam sangue total são mais fáceis de executar, uma vez que não há necessidade de separar os componentes sanguíneos. Os testes de sangue total: VetRED®, Snap Canine Heartworm PF® requerem a adição apenas de um reagente na amostra. O ASSURE CH®, que utiliza plasma ou soro, requer dois passos adicionais (a preparação da amostra e lavagem). Os outros três testes (DiroCHEK®, PetChek HTWM PF® e UNI-TEC CHW®) requerem um lavagem adicional e/ou transferência das amostra. O DiroCHECK® e o PetCheck® requerem que o trabalho se realize em pequenos poços, colocados próximos uns dos outros. Por isso, é necessário um cuidado extra para não haver contaminação cruzada (quadro 17). Os testes individuais são mais dispendiosos que os testes em que se testam várias amostras de cada vez [261].

Teste	Tipo de amostra	Tempo de execução (minutos)	Nº passos
VetRed®	Sangue total	3	3
ICT Gold™ NW®	Plasma, soro e sangue total	6	5
Snap Heartworm PF®	Plasma, soro e sangue total	8	4
ASSURE CH®	Plasma e soro	15	6
UNI-TEC CHW®	Plasma, soro e sangue total	15	8
Pet Chek HTWM PF®	Plasma e soro	20	6-7
DiroCHECK®	Plasma e soro	20	8

Quadro 17: Tipo de amostra requerido, tempo necessário para a execução do teste e o número de passos para a realização dos testes de pesquisa de antigénio de *Dirofilaria immitis*
Adaptado de MC Tier *et al.*, (1995) [261].

C) Rapidez

Os testes que utilizam sangue total são mais rápidos de executar. O VetRED® é o teste mais rápido, demorando apenas 3 minutos a executar e 2 minutos de espera. O teste Snap Canine Heartworm PF® demora cerca de 8 minutos. Este deve ser colocado numa superfície plana e ficar estacionário. O ASSURE CH® e UNI-TEC CHW® demora acerca de 15 minutos, o DiroCHECK® e PetChec HTWM PF® requerem cerca de 20 minutos. Ao contrário do VetRED®, a reação do teste dos kits ELISA podem demorar mais tempo que o requerido (quadro 17) [261].

D) Conclusão

Os kits de pesquisa de antigénio de dirofilariose tornaram-se importantes ferramentas no diagnóstico e maneio das infeções por *Dirofilaria immitis*. Os testes disponíveis são bons, mas a sua precisão não é de 100% em todas as situações. Cada

teste tem limitações individuais. Se o resultado é questionável, deve-se tentar confirmar o teste, usando outro teste de pesquisa de antigénio diferente, ou outro teste clínico ou laboratorial relevante. Finalmente, a seleção do kit de teste de antigénio envolve não só uma cuidadosa consideração acerca da precisão de cada teste, mas também das propriedades do teste (quadro 18 e 19) [261].

Vezzani *et al.,* (2008) recomendam complementar o uso dos testes de antigénio com técnicas de concentração de microfilárias e outros procedimentos (ex: radiografia ecocardiografia), para obter um diagnóstico preciso, principalmente em zonas com prevalências baixas [270].

Vantagens	Desvantagens
Especificidade e sensibilidade elevada	Dispendioso Não está disponível para infeções por outras espécies de filárias

Quadro 18: Vantagens e desvantagens dos testes de pesquisa de antigénio de *Dirofilaria immitis*. Adaptado de Genchi *et al.,* (2007) [249].

Mf Knott	Ag Teste	Interpretação	Comentários
Positivo	**Positivo**	Diagnóstico definitivo de dirofilariose	Teste semiquantitativo e os sinais clínicos podem ajudar a prever o risco de tromboembolismo durante o tratamento
Positivo	**Negativo**	Diagnóstico definitivo de dirofilariose depois de identificar as microfilárias como *Dirofilaria immitis*	Necessidade de PCR ou Coloração por histoquímica para diferenciar a espécie de microfilária Risco baixo de complicações por tromboembolismo
Negativo	**Positivo**	Diagnóstico definitivo de dirofilariose. Infeção oculta	Teste semiquantitativo e os sinais clínicos podem ajudar a prever o risco de tromboembolismo durante o tratamento

Quadro 19: Esquema guia do diagnóstico da infeção por *Dirofilaria immitis* em cães Adaptado de Genchi *et al.,* (2007) [249].

1.7.4. Necrópsia

A necrópsia é o método "gold standard" na deteção de *Dirofilaria immitis*. É o melhor método para identificar a presença ou ausência de parasitas adultos ou imaturos que habitam nas artérias pulmonares e no coração. No entanto, a necrópsia não deteta os parasitas na fase pré pulmonar ou o parasita com localização ectópica [271].

Os parasitas adultos podem ser encontrados no ventrículo direito, nas artérias pulmonares e nas suas ramificações. A superfície das artérias encontram-se rugosa e as artérias dilatadas. Os lóbulos pulmonares caudais com tromboembolismo encontram-se edemaciados e hemorrágicos ao corte e com um exsudado sanguinolento. Quando se incide sobre as artérias pulmonares, encontram-se parasitas mortos. Também se pode encontrar parasitas mortos no átrio direito e veia cava caudal, quando o número de parasitas é muito elevado, como no caso do síndrome da veia cava. Na presença deste síndrome, também se verifica dilatação e hipertrofia do ventrículo direito, hipertrofia das artérias pulmonares, endoarterite proliferativa, o fígado mosqueado e flebite crónica da veia cava (figura 23) [3, 8, 239].

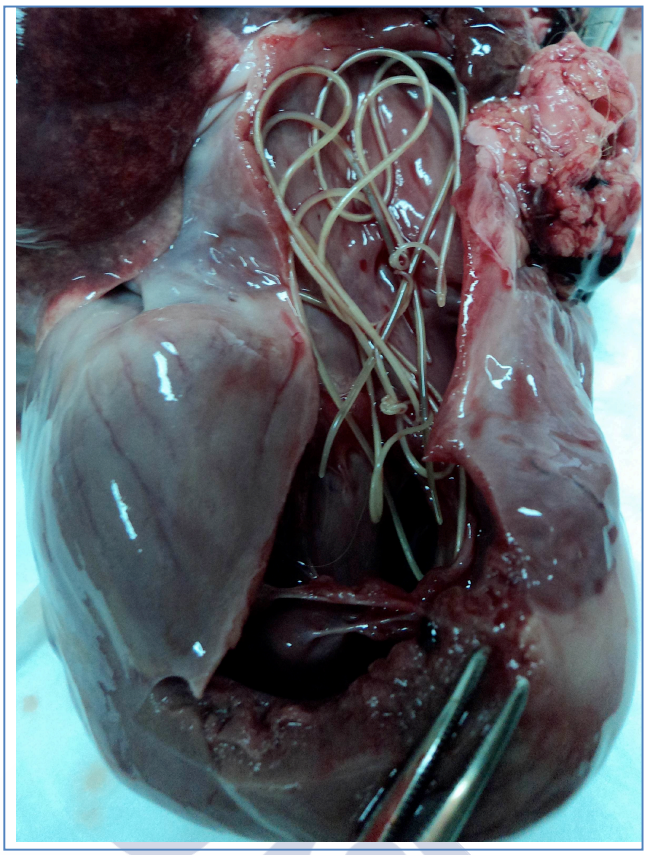


Figura 23: Artéria pulmonar e ventrículo direito de um cão com infeção severa por adultos de *Dirofilaria immitis* (Original).

1.8. Rastreio

Durante vários anos, a AHS recomendou os testes de concentração de microfilárias (teste Knott modificado ou teste filtração), como os testes de eleição para a despistagem da infeção por *D. immitis* [272]. No entanto, desde os anos 90, que essa recomendação foi alterada com base no desenvolvimento de testes de pesquisa de antigénio de *D. immitis* com elevada sensibilidade e especificidade e devido àção microfilaricida dos preventivos (ex: milbemicina e ivermectina) que ocultava a doença [237, 272, 273].

A geração atual de testes de pesquisa de antigénio identifica a maioria das infeções ocultas. Estudos demonstraram que 3 a 67% de cães infetados não têm microfilárias em circulação e esta percentagem aumenta em cães desparasitados com lactonas macrocíclicas [237]. A pesquisa de microfilárias passou a ser um teste complementar. A maioria da nova geração dos testes de antigénio identifica a maioria da infeções ocultas, infecções que consistem em apenas uma fêmea madura e com 100% de especificidade. Menos de 1% das infeções patentes são não antigénicas, por isso testar para antigénio deteta mais infeções, do que testar só para microfilárias [237, 252, 274].

Os testes de pesquisa de antigénio detetam apenas a presença de fêmeas adultas e com idade fértil, aproximadamente, a partir dos 6,5 meses de infeção e são 100% específicos. Por causa dos testes falharem na deteção de infeções pré-patente, as atividades de supervisionamento estão limitadas e o tratamento de animais infetados pode tardar. A pesquisa de antigénios e microfilárias deve ser realizada, aproximadamente 5 a 6 meses pós-infecão, respetivamente. No entanto, a antigenémia precede a aparência de microfilárias, em algumas semanas. Em infeções com cargas parasitárias baixas ou a fazer profilaxia com lactonas macrocíclicas, a antigenémia pode

aparecer mais tarde. Para determinar quando se deve testar, deve-se determinar a data de possível infeção e adicionar 7 meses. Para detetar a infeção que ocorre durante a época de transmissão, o teste deve ser realizado 7 meses após o período de transmissão [252, 275, 276].

1.9. Profilaxia

A dirofilariose canina é uma doença que pode ser totalmente prevenida, sendo por isso uma prioridade em cães que vivem em zonas de risco elevado [237].

Os cachorros devem iniciar a profilaxia até às 8 semanas. A evidência sugere que reduzindo a população reservatória, através do aumento do número de cães que recebem profilaxia, diminui proporcionalmente a prevalência da infeção em cães não protegidos. A proteção colateral dissemina-se criando uma zona de proteção de quimioprofilaxia e é mais efetiva em comunidades, onde a prevalência de dirofilariose na população canina é baixa [252, 275, 276].

Esta prevenção deve ser efetuada por todos os cães que vivam em áreas endémicas. Deve ser iniciada 1 mês antes do início da época de transmissão e a última dose administrada um mês após terminada a época. Em zonas endémicas, aconselha-se o tratamento mensal durante todo o ano [7, 237].

Antes de iniciar um regime profilático, todos os cães com mais de 6 meses, que possam ter sido infetado nos sete meses anteriores ou mais, devem ser testados com um teste de pesquisa de antigénio e, se possível, devem também ser avaliados para a presença de microfilárias circulantes [237, 276]. É estrategicamente importante determinar o estado de parasitismo por dirofilária, antes de iniciar a prevenção pela primeira vez, para evitar o atraso no diagnóstico de infeções sub-clínicas e confusão potencial acerca da eficácia da profilaxia [252, 275, 276].

Atualmente, utilizam-se as avermectinas do grupo das lactonas macrocíclicas (ivermectina, selamectina, moxidectina, milbemicina), administradas por via oral, tópica ou parental, que demonstraram uma eficácia excecional, quando administrados nas doses e intervalos recomendados e com espetro de atividade contra nemátodes e artrópedes (quadro 20) [7, 237, 277]. Esta medicação impede o desenvolvimento e elimina as formas larvares da dirofilária após algumas semanas ou meses da infeção [276]. Estes fármacos têm um elevado ratio terapêutico/toxicidade e possuem uma atividade antihelmíntica contra microfilárias, larvas L3 e L4, e em alguns casos, jovens adultos. O efeito filaricida da formulação oral ou tópica é conseguida através de uma administração pulsátil e em doses baixas que eliminam as larvas pré-cardíacas, permitindo que a eficácia seja, virtualmente, 100%, quando administradas nas doses e intervalos corretos e mantendo um elevado nível de segurança [252, 275, 276].

Estes fármacos não previnem a inoculação da larva pelo vetor, mas impedem o seu desenvolvimento até às formas adultas [7].

A profilaxia oral e tópica tem um regime mensal. A eficácia de uma administração mensal assegura a proteção durante 1 mês, mas pode ter um intervalo temporal de ação maior. No entanto, a eficácia para a larva L4 tardia é reduzida e inconstante. As infeções com adultos jovens, com 52 dias pós infeção, são pouco suscetíveis à quimioprofilaxia. Com o desenvolvimento da larva, esta vai sendo menos suscetível à quimioprofilaxia, requerendo progressivamente um maior número de administrações, para atingir um nível elevado de proteção [252, 275, 276].

A extensão da eficácia contra larvas L4 tardias ou adultos juvenis tem implicações importantes na profilaxia de cães, que falharam algumas doses durante o

período de transmissão, ou que, estão na época de transmissão antes de começar a profilaxia, podendo já ter sido infetados. Quando a falha entre doses é superior a 4 meses, aumenta o risco de infeção [252, 275, 276].

Alguns cães da raça Collie, Border Collie, Shetland Sheepdog, Old English Sheepdog e outros cães com deficiência na glicoproteina-P (herança autossómica recessiva) são sensíveis a vários medicamentos. As lactonas macrocíclicas são um exemplo. A sensibilidade foi observada com doses elevadas de ivermectina (que excedem 16 vezes a dose profilática) com sinais neurológicos de toxicidade, mas esta sensibilidade também foi descrita com outras lactonas macrocíclicas. As doses profiláticas das lactonas macrocíclicas aprovadas para cães demonstraram ser seguras em todas as raças [252, 275, 276].

A ivermectina (6 a 12 µg/ kg, por via oral (PO) mensal) elimina a forma larvar L3 e L4, durante os 2 meses após a infeção. Se for administrada continuamente durante 12 meses, pode ter uma ação que se estende até aos 3 a 4 meses pós infeção. A ivermectina também parece ser efetiva a eliminar as formas adultas imaturas, O efeito microfilaricida reduz o número de microfilárias circulantes. Alguns estudos indicam que a ivermectina tem propriedades adulticidas, quando usadas continuamente por 16 meses e podem chegar aos 100%, quando usadas continuamente por 30 meses. No entanto, não está aconselhada a sua utilização para eliminar as infeções por adultos de dirofilária [276].

A milbemicina (0,5 a 0,99 mg/kg PO mensal) elimina a forma larvar L3 e L4, nas primeiras 6 semanas pós infeção. Tem um efeito retroativo de 2 meses. Por isso, tem uma eficácia de 97 % se administrada durante 12 meses, após um lapso de 3 meses, e 41% de eficácia se administrada continuamente durante 12 meses, após um lapso de 4 meses. Ao contrário das outras lactonas macrocíclicas que tem um efeito microfilaricida lento na dose preventiva, a milbemicina tem um efeito microfilaricida rápido. Este efeito pode levar a uma morte rápida das microfilárias em cães com carga elevada de microfilárias, o que pode provocar um reação anafilática. Por essa razão, é importante conhecer o estado de microfilaremia do canídeo e tomar as precauções necessárias (repouso em jaula durante 12 a 24 horas após a administração). Na dose preventiva, a milbemicina também mostrou eficácia contra nemátodes e céstodes. Também tem propriedades adulticidas parciais, quando administradas continuamente ao longo do tempo [276].

A moxidectina (2,5 mg/kg) e a selamectina (6 a 12 mg/kg) estão disponíveis como uma fórmula tópica, para aplicar mensalmente. A selamectina na dose de 6 mg/kg, aplicação tópica, mensal, durante um período de 6 meses, demonstrou uma eficácia de 100%, em 270 cães, sendo o grau de proteção igual ao da ivermectina [277-279]. A selamectina na dose preventiva é efetiva, para prevenir a infeção por dirofilárias, elimina pulgas, ovos de pulgas, ácaros (ex: *Sarcoptes spp.*). Tem um efeito retroativo de 2 meses e tem uma eficácia de 99%, se administrada mensalmente durante 12 meses, após um lapso de 3 meses. A selamectina causa uma redução gradual nas microfilárias circulantes [276]. A moxidectina é uma molécula altamente lipofílica que atinge elevadas concentrações plasmáticas e que vai sendo eliminada gradualmente pelo hospedeiro, de aplicação tópica mensal na dose de 2,5-6 mg/kg [280, 281].

A administração subcutânea de uma formulação de microesferas lipídicas impregnadas com moxidectina de libertação lenta (0,17 mg/kg) providencia uma proteção contínua que ultrapassa os seis meses, chegando aos doze meses. Este fármaco deve ser administrado um mês antes da época de transmissão [237, 282-285]. Para

maximizar a proteção, está aconselhado a administração semestral da moxidectina, mas em áreas onde a infeção está limitada a um período de 5 a 6 meses, apenas uma administração anual deve providenciar uma margem confortável de proteção [252]. Em relação as reações adversas, na maioria dos estudos não foram detetadas reações adversas sistémicas, apenas uma ligeira tumefação subcutânea no local da injeção com dor ligeira à palpação [282-285].

Príncipio Ativo	Apresentação	Espécie	Dose	Indicação	Idade mínima tratamento
Ivermectina	Comprimido	Cão	6 µg /kg	Di, Dr	6 sem
Ivermectina/ Pamoato de Pirantel	Comprimido	Cão	6 µg /kg	Di, Dr, Tc, Tl, Ac, Us	6 sem
		Gato	24 µg /kg	Di, At, Ab	6 sem
Milbemicina	Comprimido	Cão	0,5 mg/kg	Di, Tc, Tl, Ac, Tb,	2 sem/0,3 kg
Milbemicina/Praziquantel	Comprimido	Cão	0,5 mg/kg	Di, Tc Tl, Oc, Tv, Dc, Tae, Eg, Ms	2 sem
		Gato	2 mg/kg	Di, At, Tc, Dc, Tae, Em	6 sem/0,3kg
Milbemicina/Lufenuron	Comprimido	Cão	0,5mg/kg	Di, Tc, Ac, Tv, Cf	2 sem
Moxidectina	Comprimido	Cão	3 µg /kg	Di	6 sem
	Injetável	Cão	0,17mg/kg	Di, Dr, As, Us	12 sem
Moxidectina/Imidaclopride	Tópico	Cão	2,5 mg/kg	Di, Tc, Ac, Tv, Cf, Oc, Ss, Dx	7 sem/1kg
	Comprimido	Gato	1 mg/kg	Di, Tc, At, Sf, Oc	9 sem
Selamectina	Tópico	Cão	6 mg/kg	Di, Dr, Tc, Cf, Ss, Oc, Trc	6 sem
		Gato	6 mg/kg	Di, Tct, At, Sf, Oc, Fs	6 sem

Quadro 20: Dose efetiva mínima de lactonas macrocíclicas para a prevenção de *Dirofilaria immitis* em cães e gatos e a sua indicação para outros parasitas. Di, *Dirofilaria immitis*, Dr, *Dirofilaria repens*, Ac, *Ancylostoma caninum*, At, *Ancylostoma tubeforme*; Ab, *Ancylostoma Brasiliense*; Tc, *Toxocara canis*; Tct, *T. cati*; Us, *Uncinaria stenocephala*; Tv, *Trichurisvulpis*; Dc, *Dipylidium caninum*; Ms, *Mesocestoides sp*; Tae, *Taenia spp*; Eg, *Echinococcus granulosus*; Em, *Echinococcus multilocularis*; Cf, *Ctenochephalides felis*; Trc, *Trichodetes canis*; Fs, *Felicola substrata*; Oc, *Otodectes cynotis*; Ss, *Sarcoptes scabiei*; Dx, *Demodex canis*; Sem, semanas. Adaptado de Montoya-Alonso & Goméz, (2012)[77].

1.9.1. Falta de eficácia

A falta de eficácia do produto preventivo de dirofilariose é definida, pelo Centro de Medicina Veterinária (CMV) da "Food and Drug Administration (FDA)", quando um cão se infeta com dirofilariose, estando a fazer a prevenção. Existem várias razões para esta falta de eficácia: falha na administração da medicação, subdosagem, falha na retenção da medicação pelo canídeo, na absorção do princípio ativo, na metabolização do produto e falha do princípio ativo matar o parasita. O receio atual é que a dirofilária possa estar a desenvolver resistência a alguns medicamentos. O conhecimento atual alertou para a possibilidade real de resistência às lactonas macrocíclicas da *D immitis* [8, 237].

A maioria da falta de eficácia pode ser explicada por faltas e atrasos na administração do produto preventivo, principalmente em zonas com elevadas prevalências. Este fato ocorre com maior probabilidade nas áreas endémicas, onde o

desafio da infeção é excecionalmente elevado, em comparação com outras áreas não endémicas (gráfico 2 e 3) [252, 275].

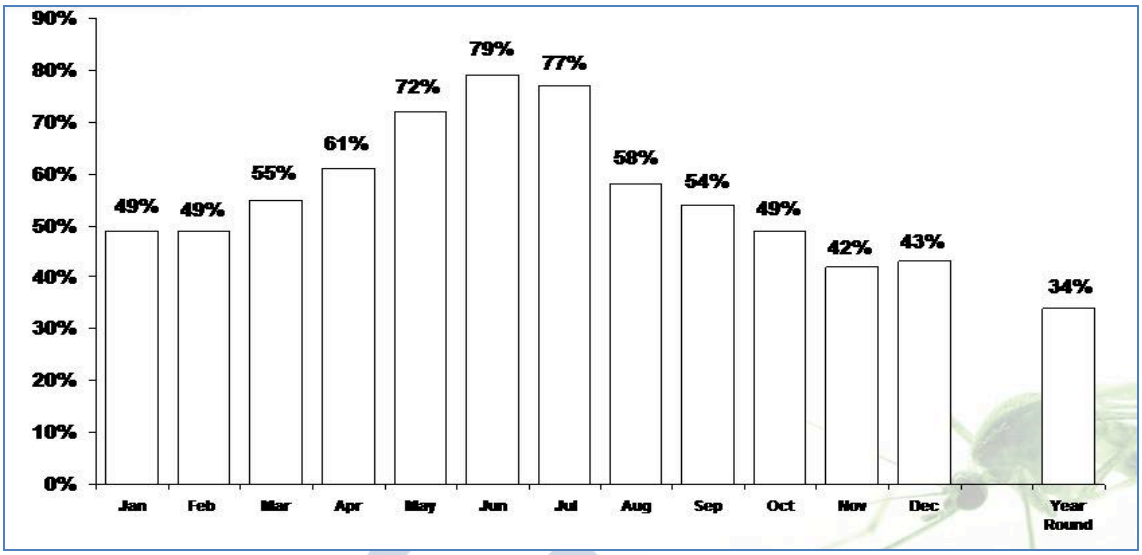


Gráfico 2: Representação gráfica da utilização mensal de preventivos de dirofilariose (amostra de 768 proprietários). Adaptado de Veterinary Network Information (VIN) [286].

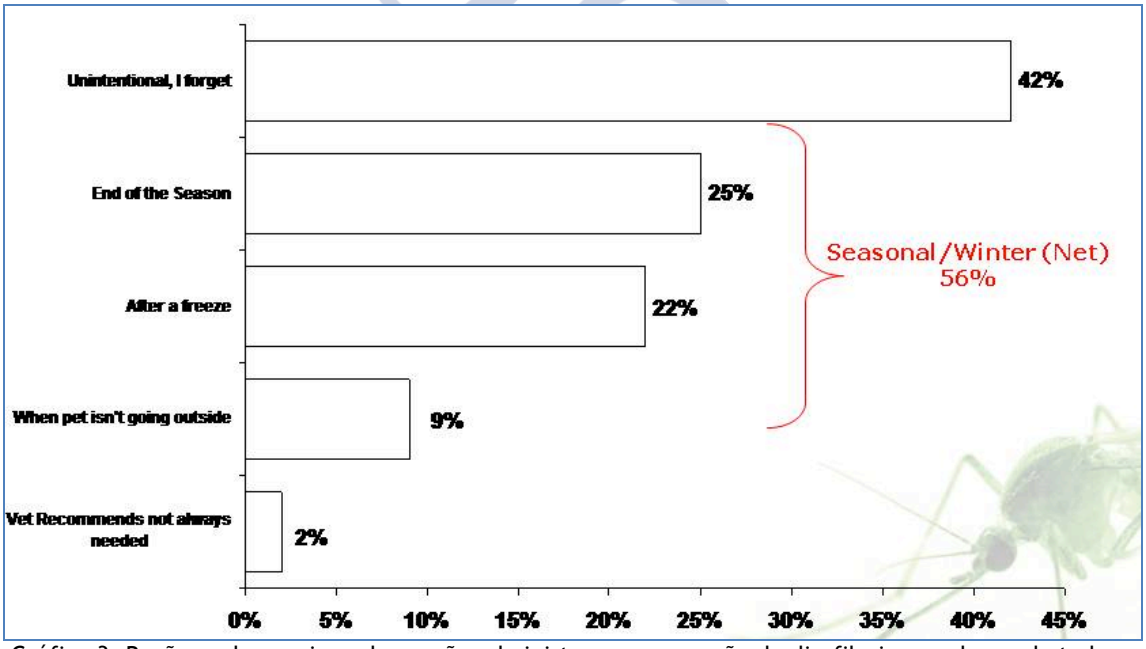


Gráfico 3: Razões pelas quais os donos não administram a prevenção de dirofilariose ao longo de todo o ano (amostra de 507 proprietários). Adaptado de Veterinary Network Information (VIN) [286].

Por outro lado, a melhoria na qualidade dos testes de pesquisa de antigénio de dirofilariose permitiu detetar mais casos com cargas parasitárias baixas [252, 275].

O aumento de casos descritos de falha de eficácia da profilaxia da dirofilariose, levantou a suspeita da possibilidade de estarem a ocorrer resistências. É importante referir que os parasitas não se tornam resistentes a drogas, mas que os produtos usados em condições não ideais podem selecionar parasitas com pool genético resistente. Estas populações de parasitas sobreviventes são chamadas de estirpes resistentes [252, 275].

Existem dois fatores que podem desempenhar um papel importante na infeção por dirofilárias. Primeiro, os produtos usados para a prevenção têm como objetivo eliminar as formas L3 e L4 jovem. Não têm como objetivo eliminar as microfilárias (L1). Por isso, se o produto for dado a animais microfilarémicos, as microfilárias podem não ser eliminadas. Estas microfilárias selecionadas pelo medicamento podem ser transmitidas entre cães pelos mosquitos. Por isso, é pouco prudente usar preventivos em cães microfilarémicos, pois corre-se o risco de selecionar microfilárias resistentes à exposição de concentrações subletais de lactonas macrocíclicas. Segundo, alguns preventivos têm outros alvos, para além da dirofilaria, como pulgas e nemátodes intestinais, e são necessárias doses superiores para esse efeito, aumentando a dose mínima para eliminar a dirofilária [281].

Quando se considera a possibilidade de resistência, é geralmente aceite que existe polimorfismo genético na população de dirofilárias e que os genes ou múltiplos genes contribuem com alelos que permitem a resistência, o que leva à diminuição e perda de suscetibilidade às lactonas macrocíclicas. Não se sabe ainda a frequência da existência de alelos resistentes na população, o número de genes envolvidos, se o gene é dominante ou recessivo. O desenvolvimento da resistência na população é mais complexo que apenas a presença de alelos em indivíduos. Devem ser considerados outros fatores como a biologia distinta do parasita, a extensão de refúgio, o número de animais tratados e a dose dos fármacos administrada. Os preventivos utilizados "off de label" podem ter selecionado parasitas com genes resistentes e os parasitas sobreviventes podem desenvolver e tornar-se uma sub-população resistente [252, 275].

Atualmente, têm sido realizados estudos sobre o fenótipo molecular de dirofilária com o objetivo de associar marcadores moleculares à falha dos tratamentos. Foi examinado a presença de polimorfismos em diferentes genes associados, anteriormente, com a resistência às lactonas macrocíclicas noutros nemátodes, como o gene de transporte ABC (glicoproteina- P), e o gene MDR1 (gene multirresistência 1), que estão em defeito em cães da raça collie, levando à sensibilidade à avermectina. Foi descrito que existem pequenos polimorfismos em vários destes genes distribuídos aleatoriamente pelo mundo. Por exemplo, na estirpe do Mississippi Delta, foi demonstrado uma redução do polimorfismo genético, o que pode indicar uma selecão provocada pelas lactonas macrocíclicas. Os mesmos investigadores relataram uma diminuição do polimorfismo nas microfilárias num cão resgatado do furação Katrina, no Canadá, em que só após 2 anos de tratamento adulticida e microfilaricida, foi possível eliminar as microfilárias, pois estas demonstraram resistência aos microfilaricidas. Também foi sugerido que a taxa de infeção pode estar envolvida na falha de eficácia [252, 275, 281].

Vários estudos "in vivo" consistiram na recolha de microfilárias de cães com dirofilariose (que realizavam prevenção) e a sua inoculação nos mosquitos. Posteriormente, foi recolhida a forma dos mosquitos e injetadas nos cães de laboratório, aos quais foi administrado a prevenção com lactonas macrocíclicas. Estes estudos indicaram a presença de sub-populações resistentes à dirofilariose. Qualquer composto preventivo, no mercado, de administração oral, tópica ou parental, obteve pelo menos um estudo com falhas. No entanto, apesar dos efeitos de resistência a todos as lactonas macocíclicas, as diferenças nos princípios ativos, doses e vias de administração resultaram em diferentes taxas de falhas [252, 275].

Outro fator possível para a falha de eficácia é a relação hospedeiro-parasita. O exato modo de ação das doses de prevenção das lactonas macrocíclicas não é

inteiramente conhecido. Um estudo envolvendo *Brugia malyi,* um nemátode filária que causa filariose linfática em humanos indicou, que a ivermectina impede a capacidade do parasita de secretar uma proteína imunomoduladora pela vesícula secretória, impedindo a microfilária de evadir-se do sistema imunitário. Este achado, sugere que as lactonas macrocíclicas trabalham em conjunto com o sistema imunitário para eliminar a microfilária da *Brugia spp*. e é, presumível, que o modo de ação das lactonas macrocíclicas sobre a *Dirofilaria immitis* seja semelhante [252, 275]. Um estudo semelhante realizado com microfilárias de *D. immitis* mostrou a ligação de neutrófilos às microfilárias ("in vitro") suportando o conceito do envolvimento do sistema imunitário na ação das lactonas macrocíclicas [7].

A educação profissional e do cliente é o fator mais importante a considerar quando se reportam falhas na eficácia dos produtos preventivos. A biologia complexa do parasita, os efeitos nas alterações das condições ambientais que afetam a população de vetores, a dinâmica dos hospedeiros (selvagem e domésticos) e eventos da interação dinâmica humanos e animais de estimação são fatores relevantes. Em face dos vários fatores e variáveis é essencial que todos os membros da clínica veterinária garantam que os clientes compreendem as implicações da dirofilariose, o risco de infeção por dirofilariose na área, e proporcionem uma prevenção correta. As lactonas macrocíclicas continuam a ser a melhor e única opção para prevenir a infeção por dirofilárias e todos os esforços devem ser intensificados para aumentar o número de cães que recebem a profilaxia [252, 275].

Atualmente é aceite que existem nichos de dirofilárias resistentes. A extensão, disseminação e razões dessa resistência não são plenamente compreendidos e são controversas. No entanto, um dos fatores com maior impacto de falha da ação dos preventivos é a "compliance" dos donos. A eficácia dos produtos disponíveis é eficaz em 95% das vezes, por isso, devem ser usados continuamente [252, 275].

É essencial uma aproximação prudente a esta situação com uma vigilância apertada, através de ações como: testar os cães antes de iniciarem a prevenção, testar os animais anualmente, mesmo quando estão a fazer a prevenção, para evitar o escape de alguma forma L3 e produção de microfilárias, tratar os cães infetados com melasormina e não com protocolos longos com lactonas macrocíclicas, para reduzir a hipótese de seleção das microfilárias com fenótipo resistente. Também é importante manter os cães com prevenção anual, para reduzir a seleção de parasitas que foram submetidos apenas a uma dose de preventivo, visto que algumas estirpes necessitam de três doses consecutivas para serem eliminadas, e também devido à dificuldade de calcular o início e fim da época de transmissão [281].

A falta de eficácia foi reportada em lactonas macrocíclicas, por isso, repetir o teste anualmente deve fazer parte integral do exame anual, para garantir que a profilaxia é conseguida e mantida. Quando a transmissão de dirofilária tem um ciclo sazonal deve-se realizar o teste tendo em conta o período de 7 meses após o fim época sazonal [252, 275].

Todos os cães que estiveram 2 meses ou mais sem realizar a prevenção, ou que mudaram de produto devem realizar um teste de antigénio em 3 intervalos: 1) antes da administração do novo produto para determinar o estado de dirofilária na altura da troca do produto; 2) 4 meses após o início do novo produto para assegurar que o produto anterior era efetivo; 3) 9 meses depois da troca para assegurar que o produto funciona corretamente [274, 276].

1.9.2. Profilaxia do vetor

Para reduzir a disseminação da transmissão de doenças por vetores é necessária uma proteção contra os vetores artrópodes. A utilização periódica de drogas, que tanto eliminam como impedem a alimentação, através da prevenção da picada dos hospedeiros definitivos pelo vetor, permite prevenir a transmissão de dirofilariose [287].

Existem vários produtos no mercado que permitem esta ação. São produtos inseticidas com efeito residual no animal, como a Expsot®, Scalibor® e Advantix®. A Expsot® contém imidaclopride e permetrina e a taxa de mortalidade do mosquito *Ae. aegypti* atinge os 90% após 7 dias e 50% após 28 dias, e um efeito repelente perto de 90% após 7 dias e 60% após 28 dias. A Scalibor® contém delmetrina e é a única coleira de cão que existe no mercado com efeito "anti-eat" de 98-100% durante 27 semanas e um efeito insetida de 63-86% durante 16 semanas. O Advantix® contém permetrina e imidaclopride e serve como repelente de flebótomos, pulgas e carraças, podendo servir como repelente de mosquitos [252, 275]. A combinação de imidaclopride 10% e permetrina 50% foi desenvolvida como uma formulação "spot-on" com eficácia contra pulgas, mosquitos, flebótomos e carraças. A aplicação a cada 21 dias é eficaz na prevenção de infeções simples ou múltiplas, provocadas por doenças transmitidas por vetores em cães jovens, quando aplicadas antes da primeira exposição [287].

1.10. Tratamento

O objetivo do tratamento é melhorar a condição clínica do animal através da eliminação dos parasitas adultos e microfilárias, com o mínimo de complicações durante e depois do tratamento [237]. O tratamento da dirofilariose é difícil, pois não é um tratamento simples, nem 100% seguro, devido ao risco de efeitos secundários e pela destruição massiva de parasitas. Por isso, é necessário escolher uma estratégia terapêutica apropriada e, por vezes, retardar o início do tratamento até estabilizar o animal [3, 232, 252, 275].

Deve ser realizada uma avaliação do paciente antes do início do tratamento, com os seguintes objetivos: 1) predizer a toxicidade do adulticida; 2) identificar os cães com maior risco de desenvolver tromboembolismo pulmonar depois da terapia adulticida; 3) estimar a reversibilidade da doença [71]. A extensão da avaliação pré-adulticida varia com o estado clínico do animal e a possibilidade de existirem doenças coexistentes que possam afetar o tratamento [263]. É importante verificar as variáveis que influenciam a probabilidade do aparecimento de complicações tromboembólicas, após o tratamento com o adulticida como: a extensão da doença vascular pulmonar, a severidade da infeção (carga parasitária), idade, tamanho e o nível de atividade física do cão [237, 252, 275]. O tromboembolismo pulmonar tem maior probabilidade de surgir em cães com infeções severas que exibam sinais clínicos e radiográficos compatíveis com uma obstrução arterial pulmonar severa, especialmente se tiver presente insuficiência cardíaca direita [263].

É essencial determinar o estado cardiopulmonar e o risco de complicações por tromboembolismo destes pacientes, para avaliar o prognóstico, para isso, devem ser realizadas análises sanguíneas, testes de pesquisa de antigénio, radiografias torácica e ecocardiografias [263]:

- Animais com baixo risco de complicações por tromboembolismo: cães assintomáticos, sem alterações radiográficas, com baixo nível de antigénio circulante ou teste de antigénio negativo com microfilárias circulantes,

ausência de dirofilárias na ecocardiografia, sem outras patologias e possível restrição de exercício durante o tratamento [232, 238];

- Animais com elevado risco de complicações por tromboembolismo: com sintomas relacionados com a doença (tosse, intolerância ao exercício, ascite,…); radiografia torácica com alterações visíveis, elevado nível de antigénio em circulação, visualização de dirofilárias no átrio direito na ecocardiografia, presença de outras doenças e sem possibilidade de restrição de exercício durante o tratamento [232, 238].

O tratamento de pacientes assintomáticos, ou com sinais clínicos pouco exuberantes tem uma taxa elevada de sucesso. No entanto, os animais com doença moderada a severa apresentam maior risco no tratamento [237].

As raças pequenas são um desafio para a terapia adulticida, porque o risco de tromboembolismo pulmonar pós-tratamento é mais elevado, devido a terem uma reserva pulmonar pequena por parasita [71].

Os cães que apresentem sinais clínicos exuberantes, provocados pela presença de dirofilária, devem ser estabilizados antes do tratamento adulticida com a administração de glucocorticosteróides, diuréticos, vasodilatadores, agentes inotrópicos positivos e fluidoterapia, sendo essencial a restrição de exercício durante o tratamento, para reduzir o risco de hipertensão pulmonar, melhorar a circulação cardiopulmonar e diminuir o risco de tromboembolismo [194, 237].

A relação hospedeiro-parasita tem um papel vital no desenvolvimento da severidade da doença e, para o maneio efetivo dos casos é necessário entender essa relação. O número de parasitas tem efeito na severidade da doença, mas o nível de atividade do cão também é muito importante. Durante períodos de aumento da atividade e exercício, há aumento do fluxo sanguíneo para os vasos pulmonares, causando destruição dos capilares com subsequente rutura e fibrose. Este facto leva ao aumento da resistência pulmonar vascular e potencial desenvolvimento de insuficiência cardíaca direita. Por isso é imperativo a restrição total de atividade (ex: exercício, excitação e ambientes quentes), durante todo o tratamento [237, 252, 275].

O único medicamento adulticida aprovado pela FDA para o tratamento adulticida é o dihidrocloridrato de melasormina (derivado do arsénico), administrado por via intramuscular profunda, nos músculos lombares, entre L3 e L5, com uma eficácia entre 94,2-95,7% [3, 252, 275]. A droga é absorvida rapidamente para a circulação sistémica, mais de 50% são absorvidas nos primeiros 5 minutos. Após a administração, a concentração de melasormina no soro vai aumentando até atingir o pico, 30 minutos, e depois diminui rapidamente, mantendo-se numa concentração baixa, mas estável, mais de 24 horas. A droga é metabolizada, via hidrólise, no fígado e excretada pela bílis. O derivado do ácido arsénico é excretado pela urina [71].

Apesar de existirem dois protocolos de tratamento (duas doses e três doses), actualmente, o protocolo das três doses (quadro 21) é o tratamento aconselhado pela AHS, sendo mais seguro e eficaz. Este regime tem várias vantagens: primeira, causa a morte de mais parasitas do que o regime de duas doses; segunda, a primeira dose de melasormina elimina aproximadamente 90% dos parasitas machos e apenas 15 a 20% dos parasitas fêmeas, levando a uma eliminação inicial de 50 a 65% dos parasitas. Este resultado diminui o risco de complicações pós adulticida, devido a um menor número de parasitas mortos que chegam aos pulmões, em cada injeção. A repetição da administração de melasormina, após 30 dias, elimina os parasitas fêmeas remanescentes.

A desvantagem é ser mais dispendioso do que o protocolo das duas injeções [7, 71, 237, 252, 275].

A melasormina tem uma margem de segurança baixa, por isso, é necessário ter cuidado para administrar a dose correta. O órgão com maior significado toxicológico é o pulmão. A administração de três vezes a dose recomendada (7,5mg/kg) pode produzir inflamação pulmonar, edema pulmonar e morte. Na dose recomendada, as reações adversas são comuns, mas suaves. Elas incluem tosse (22%), depressão e letargia (15%), anorexia (13%), febre (7%), congestão pulmonar (5%), emese (5%), diarreia (2,5%), dispneia (2,5%) e hipersalivação (2%) [71].

Reações adversas locais, como edema e dor no local da injeção, são frequentes. As reações mais severas ocorrem quando a droga é depositada no tecido subcutâneo, em vez do tecido muscular. Para evitar esse fenómeno, deve-se aplicar pressão no local da injeção, durante 1 a 2 minutos, para evitar a saída do produto do músculo para o tecido subcutâneo. Não devem ser administrado mais de 4 ml em cada local [71, 199, 237].

A primeira complicação major associada à administração de melasormina é neurológica e está associada ao local de injeção. O mecanismo destas complicações é desconhecido, mas pensa-se estar relacionado com uma aplicação imprópria da injeção, colocando a droga em contacto direto com o tecido nervoso, ou a migração do mesmo através da fáscia, resultando num maior edema e compressão das raízes nervosas [71, 288].

Uma consequência inevitável do tratamento adulticida de sucesso é o tromboembolismo pulmonar. Quando vários parasitas morrem, desenvolve-se trombose pulmonar. Se o tromboembolismo for suave, pode passar despercebido clinicamente, mas em casos severos pode ocorrer um quadro de stress respiratório. Estas complicações podem ser reduzidas através de restrição de exercício durante 30 a 40 dias, seguido da administração de heparina e doses elevadas de glucocorticoides (prednisolona 2mg/kg dia por 4 a 5 dias). O uso empírico de aspirina não está aconselhado, por falta de evidência clínicas dos benefícios dos efeitos antitrombóticos [252, 275].

A melasormina não é eficaz contra parasitas com menos de 4 meses de idade. Ao contrário do descrito anteriormente, estudos recentes mostram que a melosormina poderá ter ação sobre formas mais juvenis [7]. A eficácia incompleta da melasormina contra parasitas jovens pode ser um problema, quando se pretende eliminar a totalidade dos parasitas. Existe um intervalo de tempo em que há ausência de efeito da melasormina e das lactonas macrocíclicas (figura 24) [252]. Para evitar que os parasitas que se encontram nesse intervalo de tempo sobrevivam, deve-se associar uma lactona macrocíclica, 3 meses antes de iniciar o tratamento com a melasormina. Este protocolo permite eliminar as larvas com menos de 2 meses e permite que os parasitas, entre os 2 a 4 meses de idade, atinjam a idade em que são suscetíveis à melasormina [237].

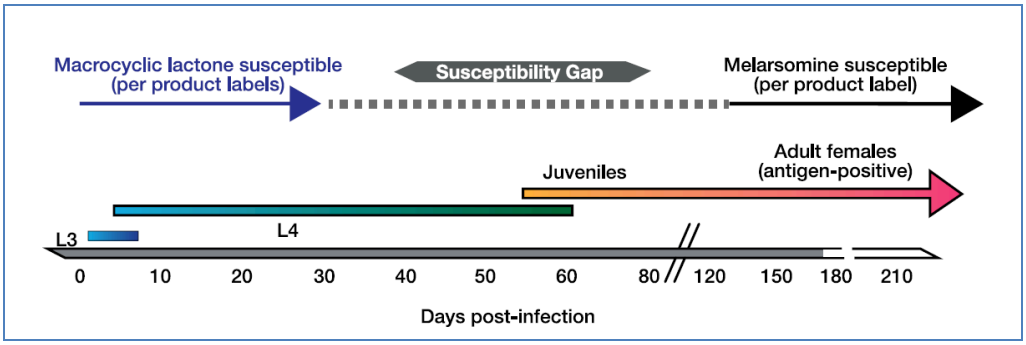


Figura 24: Calendário de desenvolvimento da *D. immitis* mostrando o período de suscetibilidade às lactonas macrocíclicas e melasormina. A linha ponteada representa o intervalo no qual a *D. immitis* não é suscetível a nenhum dos tratamentos. Adaptado da AHS 2014 [21].

As lactonas macrocíclicas administradas como microfilaricidas causam uma descida rápida no número de microfilárias e, por isso, devem ser usadas com cuidado em cães com elevadas contagens de microfilárias. Um pré-tratamento com anti-histamínicos e/ou glucocorticoides pode minimizar o potencial efeito adverso. A moxidectina tópica não mostrou reações adversas, quando aplicada para eliminar elevadas contagens de microfilárias, sendo por isso a lactona macrocíclica a utilizar para este efeito [252].

Apesar da controvérsia devido ao risco de induzir resistências às lactonas macrocíclicas, é benéfica a sua administração até 3 meses antes da administração de melasormina, quando a apresentação clínica não exige uma intervenção imediata. A razão desta abordagem é reduzir as microfilárias circulantes, eliminar as larvas migrantes de *D. immitis*, as formas imaturas, reduzir a função reprodutora das fêmeas e a redução da massa antigénica, que, por sua vez, reduz o risco de tromboembolismo pulmonar [237].

A *D. immitis* serve como hospedeiro da bactéria *Wolbachia spp.*. O tratamento com tetraciclinas durante 1 mês é letal para a bactéria, resultando na infertilidade do parasita fêmea. Foi hipotetizado que a *Wolbachia spp.* contribui para a inflamação pulmonar e renal, através da proteína de superfície WSP e outras moléculas. Estudos demonstraram que a WSP induz uma resposta específica IgG na maioria dos hospedeiros infetados por *D. immitis* e também está envolvida na tolerância imunitária que permite a sobrevivência do parasita por longo tempo. A doxiciclina foi testada para utilização no tratamento de dirofilária. Um estudo mostrou que os cães, pré-tratados com ivermectina e doxicilina antes da injeção de melasormina, têm menor patologia pulmonar associada com a morte do parasita adulto (60% dos cães), quando comparada com a patologia pulmonar associada à morte de parasitas, em cães tratados só com a melasormina. Também foi observado um menor grau de alterações histológicas pulmonares, poucos episódios de tromboembolismo moderados a severos e ausência de casos mortais até 3 a 4 anos do tratamento. Se a doxiciclina for inserida no protocolo de tratamento, deve ser administrada antes da melasormina, para reduzir ou eliminar a bactéria *Wolbachia spp.* e os seus metabolitos, na altura em que o parasita adulto morre e se desintegra. A doxiciclina deve ser administrada na dose de 10mg/kg BID por 4 semanas, tendo sido demonstrado que elimina mais de 90% do microorganismo *Wolbachia spp.* [194, 221, 252, 289, 290].

A utilização de doxiciclina, juntamente com um preventivo da família das lactonas macrocíclicas, antes da administração de melasormina, elimina as larvas migrantes e pelo menos metade dos parasitas juvenis, para a produção de microfilárias

pelos parasitas fêmeas e reduz a seleção de estirpes de filárias que podem ser portadores de genes responsáveis pela resistência ás lactonas macrocíclicas [289].

O tratamento com doxiciclina consegue impedir a transmissão de *D. immitis,* por reduzir o stock de microfilária (baixa concentração de microfilárias ou cães amicrofilarémicos) devido a bloquear a embriogénese e reduzir a disseminação pelo mosquito. Portanto, a doxicilina tem um potencial que impede a transmissão de dirofilárias [291, 292].

Estudos demonstraram que a eliminação da *Wolbachia spp.* induz uma apoptose extensiva das células germinativas dos parasitas adultos, células somáticas dos embriões, microfilárias e formas L4, mas não das células dos cordões hipodérmicos, sugerindo que a *Wolbachia spp.* regula a apoptose do nemátode no hospedeiro [7].

Em casos em que a melasormina está contraindicada, ou a condição clínica do paciente torna impraticável o tratamento adulticida, deve ser ponderada a utilização de doses profiláticas de ivermectina com doxicilina. O objetivo desta estratégia é bloquear o desenvolvimento da filária e diminuir ou eliminar as reações secundárias derivadas da libertação da bactéria pelo parasita, quando este é destruído [7].

Os estudos sugerem que a administração conjunta de ivermectina e doxiciclina, devido à sua acção sinergética, durante alguns meses antes da administração de melasormina, ou mesmo sem a melasormina, bloqueiam a transmissão da doença (efeito microfilaricida) e eliminam os parasitas adultos (efeito macrofilaricida) com menor potencial de tromboembolismo severo, do que apenas a utilização de melasormina [3, 194, 220, 237, 289]. Passeri *et al.,* (2014), demonstraram que o efeito adulticida da doxiciclina e ivermectina está associado a uma diminuição da regulação do sistema imunitário pelo parasita [293].

Tendo em conta os últimos avanços na evidência clínica, a AHS, recomenda um aproximação multimodal no tratamento de dirofilariose, sugerindo um protocolo de tratamento (quadro 21) [252].

Dia	Tratamento
Dia 0	Restrição de exercício Animal sintomático: - Estabilização do animal - Prednisolona - 0,5 mg/kg BID 1 semana, - 0,5 mg/kg SID 2 semana, - 0,5 mg/kg QUOD terceira e quarta semana
Dia 1	Administrar de medicação preventiva de *D. immitis* (ex: ivermectina) Mf positivo: - pré-tratamento com anti-histamínico e ou glucocorticoides, para reduzir o risco de anafilaxia Observação de aparecimento de sinais de reação durante 8 horas
Dia 1 a 28	Administrar a doxiciclina 10mg/kg BID por 4 semanas Reduzir a patologia associada à morte dos parasitas Interromper a transmissão da dirofilariose
Dia 30	Administrar medicação preventiva de *D. immitis*
Dia 60	Administrar medicação preventiva de *D. immitis* 1ª injeção de melasormina 2,5 mg/kg intramuscular (IM) Prednisolona - 0,5 mg/kg BID 1 semana, - 0,5 mg/kg SID 2 semana, - 0,5 mg/kg QUOD terceira e quarta semana Reduzir a atividade física a níveis mínimos - Restrição em jaula
Dia 90	Administrar medicação preventiva de *D. immitis*

	2ª injeção de melasormina 2,5 mg/kg IM
Dia 91	3ª injeção de melasormina 2,5 mg/kg IM Prednisolona Manter a redução da atividade física a níveis mínimos durante 6 a 8 semanas
Dia 120	Teste de pesquisa de microfilárias - Se positivo tratar com microfilaricida e repetir após 4 semanas Estabelecer o tratamento anual de prevenção de dirofilária
Dia 271	Teste de pesquisa de antigénio de *D. immitis*, pesquisar presença de microfilárias.

Quadro 21: Protocolo de tratamento médico de dirofilariose recomendado pela AHS. SID: a cada 24h, BID: a cada 12h, QUOD:a cada 48 h, IM: intramuscular. Adaptado de AHS, (2014) [21]

1.10.1. Terapias alternativas

1.10.1.1. Administração contínua de lactonas macrocíclicas

A administração contínua de doses profiláticas de ivermectina, moxidectina e selamectina é eficaz na redução da esperança de vida juvenil e no parasita adulto. Apesar de não estar recomendada, a administração oral mensal de ivermectina, na dose profilática de 6-12 μg/kg, por um período de 2 a 2,5 anos, demonstrou eliminar os parasitas adultos. O efeito adulticida da ivermectina requer mais de um ano de administrações mensais e pode demorar mais de 2 anos até eliminar completamente as dirofilárias. Quanto mais velho for o parasita, quando exposto à ivermectina pela primeira vez, mais lentamente ele é eliminado. Por essa razão, este regime deve ser restrito a casos selecionados, excluindo cães ativos, cães de trabalho e cães severamente infetados. Deve ser realizado uma radiografia a cada 4-5 meses de tratamento, para avaliar o padrão pulmonar. É de realçar que, durante o tratamento, a infeção persiste e a patologia pode agravar-se. Além disso, o uso de lactonas macrocíclicas em cães positivos pode levar à seleção de subpopulações de dirofilárias resistentes [236, 237, 263, 294].

1.10.1.2. Terapias naturais

Não há evidência clínica que as terapias naturais, à base de plantas, tenham efeito preventivo e de tratamento da dirofilariose [252].

1.10.2. Remoção cirúrgica

A terapia cirúrgica está aconselhada em cães com elevada carga parasitária, com parasitas presentes nas câmaras cardíacas (átrio direito e orifício da válvula tricúspide), quadro clínico de síndrome da veia cava e com risco severo de desenvolver tromboembolismo pulmonar [3, 232, 276, 295]. O procedimento é realizado através da extração dos parasitas adultos com um fórceps, através de venotomia jugular, guiado por fluoroscopia ou ecocardiografia [3, 263, 276, 296].

O murmúrio tricúspide deve desaparecer, 12-24 horas após a cirurgia, assim como a hemoglobinúria. Pode ser necessária fluidoterapia, em pacientes criticamente doentes com hipovolémia, para restaurar a hemodinâmica e a função renal. Após algumas semanas da cirurgia, deve ser recomendado o tratamento adulticida com melasormina, para eliminar os parasitas remanescentes, particularmente, se ainda visíveis na ecocardiografia [263].

O risco de mortalidade intraoperatório é baixo e a taxa de sobrevivência e de recuperação está relacionada com o número de parasitas removidos [252].

A taxa de sobrevivência e de recuperação em cães com risco elevado de tromboembolismo pulmonar é melhorado significativamente pela remoção física dos

parasitas, antes do tratamento adulticida [263]. Ao contrário da terapêutica médica, a extração cirúrgica de filárias pode evitar o risco de tromboembolismo pulmonar [226].

1.10.3. Confirmação da eficácia do adulticida

O teste de pesquisa de antigénio de dirofilária é o método mais fiável para confirmar a eficácia da terapia adulticida, mas também se deve monitorizar a microfilarémia [237]. Se todas as fêmeas adultas foram eliminadas, o teste de antigénio deve ser negativo, 6 meses após o tratamento. No entanto, um único teste não permite confirmar que o cão é negativo para dirofilária, pois, se estiverem presentes formas larvares ou juvenis, não há produção de antigénio suficiente para ser detetado pelo teste de pesquisa de antigénio. Este fenómeno é especialmente crítico, se as lactonas macrociclicas não forem administradas antes do tratamento adulticida. Se um cão positivo para dirofilária realizar o tratamento adulticida, sem ser administrada a lactona macrocíclica até 3 a 4 semanas após a última dose de adulticida, é necessário ter um resultado negativo de teste de antigénio, após 7 meses da dose inicial de lactona macrocíclica, para ser considerado negativo. Como os parasitas adultos continua a morrer até 1 mês após a administração do adulticida, os cães podem ser antigénicos até 6 meses após o tratamento, por isso, é necessário aguardar este período tempo, para eliminar do organismo o antigénio, antes de reconsiderar um novo tratamento [252].

1.10.4. Eliminação das microfilárias

Historicamente, o tratamento microfilaricida é realizado 3 semanas a 1 mês após o tratamento adulticida, no entanto, são necessários vários tratamentos mensais para eliminar completamente as microfilárias de circulação. Os protocolos atuais, que combinam a doxiciclina com lactonas macrocíclicas antes do tratamento adulticida, têm eliminado a necessidade do tratamento microfilaricida após o tratamento adulticida. A administração de lactonas macrocíclicas deve ser iniciada logo após o diagnóstico de dirofilariose (AHS 2014). Este passo permite controlar a disseminação das dirofilárias e leva à diminuição da população de reservatórios [237].

Apesar de não haver drogas aprovadas pela FDA com efeito microfilaricida, as lactonas macrocíclicas são os medicamentos mais seguros e efetivo para eliminar as microfilárias. São todas efetivas na dose profilática. Os produtos microfilaricidas mais potentes são: milbemicina, moxidectina parenteral e selamectina tópica, produzindo um eliminação mais rápida, mas deve ser usado com cuidado em cães com elevada contagem de microfilárias [237].

A rápida morte de elevado número de microfilárias, 4 a 8 horas após a administração da primeira dose, pode causar efeitos sistémicos como letargia, inapetência, salivação, tremores, defecação, mucosas pálidas e taquicardia. Se a reação ocorrer, a maioria dos sinais são transientes e inócuos. Um pré-tratamento com anti-histamínicos e glucocorticoides pode minimizar o potencial efeito adverso. A moxidectina tópica não mostrou reações adversas, quando aplicada para eliminar elevadas contagens de microfilárias, sendo por isso a lactona macrocíclica a utilizar para este efeito [252]. Ocasionalmente, um cão com microfilárias de 5000 Mf/ml desenvolve um colapso circulatório agudo. É necessário instituir tratamento imediato com fluidos parentais e administração de glucocorticoides. É importante a observação de cães em risco durante 8-12 horas, após a administração do microfilaricida. Nas doses subsequentes não é necessária tanta vigilância porque o número de microfilárias vai estar diminuído [237].

Para verificar que a eliminação das microfilárias é completa com a quimioprofilaxia, está recomendado a realização de um teste de pesquisa de microfilárias, ao mesmo tempo que se realiza a pesquisa de antigénio, 6 meses após o tratamento adulticida [252].

1.11. Complicações da dirofilariose

1.11.1. Tromboembolismo pulmonar

O tromboembolismo pulmonar é uma consequência inevitável do sucesso da terapia adulticida mas também pode ser espontâneo e severo se a carga parasitária for grande e a doença pulmonar extensiva. Se os sinais de embolismo (febre ligeira, tosse, hemoptise, exarcebação da insuficiência cardíaca direita) se desenvolverem, eles são normalmente evidentes, 7 a 10 dias após a administração do adulticida, mas, ocasionalmente podem ocorrer mais tarde [237, 252]. Ao exame físico é frequente encontrar dispneia, febre, mucosas pálidas, crepitações e sons pulmonares adventícios [239]. A fatalidade aguda pode resultar de uma falha respiratória fulminante, coagulação intravascular disseminada (CID), ou ser repentina (arritmia ou embolismo pulmonar massivo) [8, 263].

Na radiografia torácica, podem aparecer vários infiltrados pulmonares significativos, principalmente, nos lobos pulmonares caudais e pode observar-se consolidação pulmonar. Se comparar a radiografia com a realizada pré-tratamento, vão ser notórios os sinais de agravamento. A nível laboratorial, é possível obter leucocitose com desvio à esquerda, monocitose, eosinofilia e trombocitopénia. O grau de trombocitopénia pode dar informação prognóstica [8, 239].

O maneio médico da doença tromboembólica pulmonar é empírica e controversa. Consiste num confinamento numa jaula restrita, suplementação com oxigénio [jaula de oxigénio ou cânula nasal (50 a 100 ml/kg)] e administração de glucocorticoides. Estes, em doses anti-inflamatórias, podem ajudar a controlar os sinais de tromboembolismo pulmonar. Um estudo demonstrou que não há diminuição da eficácia de melasormina, quando usada com a prednisolona. Em áreas endémicas, onde é expetável elevadas cargas parasitárias, pode ser aconselhado o uso de predinosolona, nas doses de 0,5 mg/kg SID (1ª semana), 0,5 mg/kg BID (2º semana) e 0,5 mg/kg QUOD (3 a 4º semana). Pode ser necessária fluidoterapia, mas é essencial ser acompanhada de monitorização da pressão venosa central, para evitar a precipitação de uma falha cardíaca, maximizar a perfusão tecidular e combater a desidratação. A administração de heparina (75 UI/kg subcutâneo, TID, até normalização da contagem de plaquetas, 5 a 7 dias) e aspirina (5 a 7 mg/kg/dia) têm sido utilizadas devido às propriedades antitrombóticas mas com resultados controversos [8, 237, 239, 263]. O uso empírico de aspirina como antitrombótico não é recomendado, por não haver evidência clínica e por haver estudos que a contraindicam [252].

1.11.2. Pneumonite eosinofílica e granulomatose eosinofílica

A pneumonite eosinofílica (ou alérgica) está descrita em 14% dos cães com dirofilariose, e pode-se desenvolver num estádio inicial do curso da doença. A sua patogenia envolve uma reação imunológica contra as microfilárias, nos capilares pulmonares. Os sinais clínicos incluem tosse, acompanhada, por vezes, de taquipneia e/ou dispneia e outros sinais típicos de dirofilariose, como perda de peso e intolerância ao exercício. A nível do exame físico, é possível auscultar crepitações pulmonares. A

nível radiográfico, podem-se encontrar infiltrados broncointersticiais difusos, podendo ter também um componente alveolar, apresentando um pior padrão, a nível dos lobos pulmonares caudais. Pode-se encontrar eosinofilia e basofilia no sangue periférico (figura 25) [234, 239, 297].

A terapia com corticosteroides (prednisona ou prednisolona 1 a 2 mg/kg por dia) leva a uma rápida atenuação dos sinais clínicos e com melhorias radiográficas visíveis em menos de 1 semana. A dose de corticosteroides deve ser reduzida, quando se obtiver melhoria clínica. O tratamento adulticida deve ser realizado após melhoria clinica [234, 239, 297].

Figura 25: Radiografia torácica lateral de um canídeo com dirofilariose, revelando nódulos pulmonares e um padrão pulmonar misto intersticial, vascular (com arterite deformante) e alveolar severo. Limites da silhueta cardíaca não são visíveis (Original).

A granulomatose eosinofílica é uma apresentação clínica mais severa, mas também mais rara, com a presença de granulomas pulmonares eosinofílicos e com uma pior resposta ao tratamento. Este síndrome é caracterizado por um padrão inflamatório nodular maior e organizado, associado à linfoadenopatia bronquial e, ocasionalmente, a efusão pleural. Está presente tosse, dispneia e cianose e, na auscultação estão presentes sibilos e crepitações pulmonares, mas também pode haver abafamento dos sons pulmonares. O tratamento com prednisona, no dobro da dose aconselhada para a pneumonite eosinofílica, leva a uma remissão parcial ou completa dos sinais em 1 a 2 semanas. O prognóstico é mais reservado porque são frequente as recorrências. A prednisona pode ser combinada com a ciclofosfamida ou a azatioprina, para fortalecer o efeito imunossupressivo. A terapia adulticida deve ser retardada até haver remissão dos sinais. Pode ser necessário a remoção cirúrgica das lesões lobares [8, 239].

1.11.3. Glomerulonefrite

A maioria dos cães com dirofilariose crónica podem ter glomerulonefrite, que pode ser severa. As lesões glomerulares produzidas pela dirofilariose, raramente

produzem insuficiência renal, mas o dilema terapêutico existe, quando se encontra um cão com proteinúria, azotemia e dirofilariose [8, 239].

1.11.4. Hipertensão pulmonar e insuficiência cardíaca congestiva

A insuficiência cardíaca direita resulta do aumento do pós carga do ventriculo direito secundário à doença crónica da vasculatura pulmonar e tromboembolimo que resultam em hipertensão pulmonar. Esta, por sua vez, deve-se à proliferação miointimal, à endoarterite vilosa, ao tromboembolismo, à vasoconstrição pulmonar reativa secundária, à hipóxia alvelolar e a obstrução física provocada pelos parasitas pulmonares. Quando severa e crónica, a hipertensão pulmonar pode complicar com regurgitação secundária da tricúspide e insuficiência cardíaca direita. Os sinais clínicos podem dever-se à diminuição do débito cardíaco, ou à elevada pressão venosa central e congestão venosa (ex: perda de peso, intolerância ao exercício, mucosas pálidas, ascite, dispneia, distensão da veia jugular, pulso jugular, distenção abdominal ou efusão pleural [8, 234, 239, 297],

O tratamento consiste na redução dos sinais de congestão, redução da hipertensão pulmonar e no aumento do débito cardíaco. Para isso, são necessárias medidas como o maneio alimentar, farmacológico e intervenções médicas: dieta restrita em sódio; diuréticos (ex: furosemida, espiranalactona, clorotiazida); inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECAS) (ex: enalapril, benazepril, ramiprimil); oxigenoterapia, corticosteroides e broncodilatadores. Para melhorar o débito cardíaco pode-se usar vasodilatadores como a hidrolazina, dialtizem e amlodipina [8, 234, 239, 297]. Não há evidência clínica que a digoxina melhore a sobrevivência dos pacientes com dirofilariose, devendo apenas ser utilizada na presença de fibrilhação atrial. Na presença de outro tipo de arritmia, pode ser necessária terapia antiarrítmica apropriada [7].

Se já estiver presente a insuficiência cardíaca, o tratamento com melasormina deve ser adiado até estabilização do quadro clínico. Se houver uma boa resposta ao maneio da insuficiência cardíaca, a terapia adulticida pode ser iniciada entre 4 a 12 semanas. A melasormina deve ser evitada em cães com insuficiência cardíaca refratária [8, 239].

1.11.5. Síndrome da veia cava

O SVC, apesar de não ser muito frequente, é de grande severidade, sendo uma das complicações mais temidas da dirofilariose. A maioria dos estudos demonstra uma predileção pelo sexo masculino, sendo 75 a 90% dos casos. É caracterizado por elevadas cargas parasitárias (usualmente mais de 60 parasitas, com a maioria a residir no átrio direito e na veia cava) e tem um prognóstico muito reservado. O desenvolvimento clínico é fatal se não proceder à extração cirúrgica do parasita [237, 239].

A migração retrógada dos parasitas adultos para a veia cava e o átrio direito produz obstrução parcial do fluxo sanguíneo para o coração direito e interfere com o aparelho valvular, levando a uma insuficiência da tricúspide (resultando num murmúrio sistólico, pulso jugular e aumento da pressão venosa central) [8, 237, 239].

Os sinais clínicos presentes incluem hemoglobinúria, anemia hemolítica, devido ao trauma a que estão sujeitos os glóbulos vermelhos, quando atravessam a massa de dirofilárias que ocupam o átrio direito e a veia cava. Pode-se desenvolver coagulação intravascular disseminada. A disfunção hepatorenal não é totalmente conhecida, mas

resulta do efeito combinado da congestão passiva, diminuição da perfusão e do efeito deletério da hemólise. Sem tratamento, a morte ocorre entre 24 a 72 horas, devido ao choque cardiogénico complicado pela anemia, acidose metabólica e CID [8, 237, 239].

O exame físico revela mucosas pálidas, aumento do tempo de repleção capilar, pulso fraco, distensão jugular, pulso jugular, hepatoesplenomegália e dispneia. Na auscultação torácica, podem ouvir-se sons pulmonares adventícios e um murmúrio cardíaco sistólico devido à insuficiência da tricúspide (87%), desdobramento do S2 (67%) e ritmo de galope (20%). Outros achados são ascite (29%), icterícia (19%) e, hemoptise (6%). A temperatura varia do subnormal ao elevado [8, 237, 239].

O prognóstico é reservado. O tratamento com fluidoterapia é utilizado, para melhorar o débito cardíaco e a perfusão tecidular, prevenir ou reverter a CID, prevenir a nefropatia pela hemoglobina e corrigir a acidose. Deve-se evitar uma fluidoterapia exuberante, pois pode piorar os sinais de insuficiência cardíaca [239].

Nos casos de SVC deve ser realizada a remoção cirúrgica de dirofilárias, para tentar reverter o mau prognóstico [237].

1.11.6. Migrações aberrantes

Apesar das dirofilárias tipicamente habitarem as artérias pulmonares dos lobos pulmonares caudais dos cães, podem ser encontradas no ventrículo direito, no átrio direito e na veia cava. Muito menos frequente, as larvas L5 imaturas migram para outros locais como cérebro, medula espinal, espaço epidural, câmara anterior do olho, câmara vítrea do olho, tecido subcutâneo e cavidade peritoneal [239].

1.12. Prognóstico

O prognóstico para os cães assintomáticos com dirofilária é bom, mas, à medida que a severidade da doença aumenta, o prognóstico torna-se cada vez mais reservado. Após a terapia adulticida, inicia-se a resolução das manifestações clínicas e a reversão das alterações da camada íntima dos vasos pulmonares. O prognóstico é reservado, quando a apresentação inicial está associada a CID severa, SVC, embolização massiva, granulomatose eosinofílica, doença pulmonar arterial severa e insuficiência cardíaca [8, 237, 239]. As lesões radiográficas e arteriográficas começam a melhorar após 3 a 4 semanas do tratamento adulticida e a hipertensão pulmonar reduz após alguns meses. As alterações do parênquima pulmonar pioram nos primeiros 6 meses pós tratamento adulticida, mas melhoram nos 2 a 3 meses seguintes. A persistência de lesões pulmonares sugere que a terapia adulticida não obteve sucesso total. Os sinais de insuficiência cardíaca devem melhorar com a terapia sintomática, repouso e remoção dos parasitas [8, 237, 239].

De acordo com a AHS, a profilaxia deve ser aconselhada a todos os cães com mais de 8 semanas de idade, mensalmente, durante todo o ano, que vivam em zonas endémicas de dirofilariose, de modo a prevenir a doença e impedir a sua disseminação [252].

2. DIROFILARIOSE FELINA

A dirofilariose felina foi descrita pela primeira vez em 1921, no Brasil, por Travassos e em 1922, nos EUA e Filipinas [298]. Desde então, a sua prevalência não tem parado de aumentar [262, 298]. O número de casos descritos aumentou numa média de dois por ano, no início dos anos 60 e mais de sete por ano, na década de 90. No entanto, a variação da apresentação clínica e a ausência de testes de diagnóstico fiáveis resultam num subdiagnóstico da infeção [299].

No entanto, o seu diagnóstico tem-se tornado mais frequente, devido ao aumento do conhecimento e sensibilização dos médicos veterinários acerca da doença e do desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais fiáveis [77].

Os gatos são considerados hospedeiros suscetíveis, mas não ideais, para o parasita *Dirofilaria immitis* [295]. Apesar dos gatos desenvolverem doença associada à infeção, apresentam uma elevada resistência ao parasita, o que se reflete em diferentes fatores: as infeções naturais têm uma carga parasitária baixa, com menos de 10 parasitas, sendo a infecção mais comum, entre 1 a 4 parasitas; apenas 25% das larvas L3 inoculadas experimentalmente em gatos se desenvolvem até ao estado adulto; as infeções são amicrofilarémicas ou com uma microfilarémia transitória (1 a 2 meses); têm um prolongado período pré-patente (7-8 meses) e a esperança de vida dos parasitas adultos é reduzida (2-3 anos) [8, 295].

Na infeção dos gatos, o órgão mais frequentemente afetado é o pulmão [306] e caracteriza-se por uma resposta imunológica exacerbada à presença dos parasitas, que se reflete numa ampla variedade de sinais clínicos (tosse, dispneia, taquipneia, vómito, etc.) [300].

2.1. Ciclo de vida

Existem diferenças significativas entre a dirofilariose felina e a clássica dirofilariose canina. Embora os gatos sejam hospedeiros suscetíveis, são mais resistentes à infeção pela *D. immitis* adulta do que os cães. Essas diferenças devem-se à adaptação parcial do hospedeiro ao parasita. Por exemplo, quando se inocula 100 larvas L3 em cães não expostos previamente à dirofilariose, 60 larvas conseguem desenvolver-se em 100% dos cães. Enquanto em gatos inoculados com o mesmo número de larvas, apenas se desenvolvem 3 a 10 parasitas adultos, em 75% dos gatos [301], ou seja, a percentagem de larvas L3, que se desenvolve até ao estádio adulto nos gatos, foi baixa (0% a 25%), quando comparada com os cães (40% a 90%) [252]. Algumas formas parasitárias são eliminadas durante a muda das fases larvares, no entanto, a maior taxa de mortalidade parasitária observa-se aquando da chegada dos adultos imaturos aos pulmões (3 a 4 meses depois da infeção), sendo, por isso, poucos os parasitas que chegam à idade adulta (menos de 10 parasitas) [77, 301]. Habitualmente, apenas um a dois parasitas adultos estão presentes e aproximadamente um terço das infeções são unissexo (sendo a maioria machos). No entanto, estas infeções são consideradas severas, apesar da baixa carga parasitária, devido à menor superfície corporal do gato e da vasculatura pulmonar, à sua relação com a biomassa do parasita e às relações entre o parasita e o sistema imunitário do hospedeiro [200, 252, 301, 302]. O facto da árvore arterial pulmonar felina ser menor, comparativamente com o cão e com consequente menor circulação contralateral, leva a que a embolização, mesmo com um menor número de parasitas, possa produzir resultados desastrosos, incluindo a morte do hospedeiro [303].

As migrações aberrantes ocorrem com maior frequência em gatos do que em cães e incluem as cavidades corporais, nódulos subcutâneos, artérias e o sistema nervoso central [77, 298, 304]. Favole *et al.,* (2013), descreveram um caso de dirofilariose epidural num gato paraparético [305].

Os parasitas que sobrevivem demoram mais tempo a atingir a maturidade, por isso, o período pré-patente nos gatos é superior ao dos cães (7 a 8 meses *versus* os 6 meses) e a sua sobrevivência é mais curta (1 a 3 anos *vs* 5 a 7 anos) [8].

Gatos infetados com parasitas adultos podem apresentar microfilárias em circulação (< 20% das infeções). No entanto, esta microfilarémia surge uma semana mais tarde quando comparada com seu aparecimento no cão (195 dias pós infeção) e raramente persiste mais do que 228 dias pós-infecção. A eliminação das microfilárias deve-se à ação do sistema imunitário do gato [301]. As microfilárias, se ingeridas pelo mosquito, desenvolvem-se até à forma L3, sendo, por isso, possível a sua transmissão a outros hospedeiros [302]. Experimentalmente, foi demonstrado que quando são transferidas microfilárias de gatos para cães, existe novamente produção de microfilárias circulantes, o que indica que no gato poderá existir uma supressão reversível, possivelmente imunomediada, da produção de microfilárias [306].

2.2. Epidemiologia

Se a dirofilariose canina está presente numa região do mundo, então, a dirofilariose felina também deverá estar presente [301]. A prevalência felina corresponde, aproximadamente, a 5 a 20% da prevalência canina da mesma região geográfica. Segundo a European Scientific Counsel Companion Animal Parasites (ESCCAP), geralmente a prevalência em gatos é 10 vezes inferior à verificada em cães, nas áreas consideradas endémicas. No entanto, em alguns estudos pode chegar aos 50% da prevalência dos cães [307]. A falta de consistência entre a prevalência de dirofilariose em cães e gatos, na mesma área, pode ser o reflexo dos hábitos alimentares das espécies de mosquitos dessa área geográfica [300, 308].

Os gatos, por norma, não são os alvos preferenciais dos mosquitos, sendo menos atraídos por estes [300, 309] diminuindo, assim, a probabilidade de serem parasitados [42]. Fatores, como uma menor massa corporal, podem explicar a menor preferência dos vetores pelos felinos [24]. Guerrero, (2009), referiu que os mosquitos *Culex spp*, apesar de não serem particularmente atraídos pelos gatos, alimentam-se tanto de cães como de gatos. Os hábitos alimentares desta espécie de mosquitos iniciam-se ao pôr de sol e mantêm-se durante a noite. Neste período do dia, os cães tem o hábito de dormir, em ambientes ideais para o vetor (ambiente quente e rico em dióxido de carbono), tornando-se um alvo fácil para o mosquito. Por outro lado, os gatos, em condições naturais, são caçadores noturnos e movem-se bastante, o que impede o contacto suficiente do vetor com o hospedeiro para se alimentar [301].

Alguns estudos demonstraram quais as espécies que se alimentam de gatos. Kramer & Genchi, (2002), referiram que o *Culex pipiens* tem uma maior probabilidade de se alimentar de gatos do que o *Aedes caspius* [300]. Gomes *et al.,* (2007), mostraram que as espécies *Aedes spp. (Ae. albopictus, Ae. scapularis, Ae. taeniorhynchus), Culex spp., Coquillettidia spp., Psorophora spp., e Mansonia spp.*, se alimentam tanto de sangue canino como felino, sendo, por isso, vetores potenciais de dirofilariose [310]. Lee & Atkins, (2010), demonstraram que os vetores de *D. immitis,* como o *Ae. taeniorhynchus e Cx. quinquefasciatus,* são responsáveis pela transmissão de dirofilariose em cães e gatos [304].

Tendo em conta que os cães são os hospedeiros reservatórios de *D. immitis,* ou seja, a fonte das microfilárias, os géneros de mosquitos que se alimentam de cães e gatos são os responsáveis pela transmissão dos parasitas entre as espécies [310].

A prevalência e distribuição da dirofilária é mais conhecida em cães, mas informação acerca da frequência de infeção em gatos começa a estar disponível. Hoje, é aceite que a doença em gatos ocorre em áreas onde cães parasitados habitam, mas a distribuição geográfica e o nível de infeção é menos previsível [3, 302].

Acredita-se que a prevalência e distribuição da dirofilariose felina esteja a aumentar [41, 42, 311]. Estudos realizados nos EUA mostram que, apesar de a taxa de prevalência de dirofilariose canina se manter relativamente constante, o diagnóstico do número de gatos parasitados tem vindo a aumentar. Este aumento pode refletir uma maior consciencialização por parte dos médicos veterinários, dos proprietários dos animais, ou uma melhoria nos meios de diagnóstico disponíveis [252, 308].

No EUA, a dirofilariose felina foi descrita em 29 estados, com prevalências entre 3% a 19%, verificando-se que as prevalências superiores se localizavam em áreas endémicas de cães [7]. A maior prevalência da doença em gatos foi descrita no sudeste dos Estados Unidos, Costa do Golfo e no vale do rio Mississípi. Os estudos realizados focaram-se em gatos de abrigos [8].

Miller *et al.,* (2000), realizaram um rastreio nacional, nos EUA, que consistiu em 2000 gatos assintomáticos de 21 áreas geográficas, demonstrando que a taxa de exposição à dirofilariose por gatos, varia desde 5% a 33%, com uma média de 12%. Da população de gatos, estimou-se que 0,5% tinham uma infeção presente, tendo em conta os resultados do teste de pesquisa de antigénio [8, 312].

Kalkstein *et al.,* (2000), realizaram um estudo na península de Michigan, tendo obtido uma prevalência de infeção de 1,9%, (25/1348) e uma prevalência de exposição de 9,9% (134/1348). Em Tulsa, Oklahoma, obteve-se uma prevalência de exposição de 23% [313, 314].

Um estudo realizado na Florida, Sul da Carolina, Tennessee e Texas descreveu que 20% dos gatos de interior eram positivos para o teste de anticorpo e 12% para o teste de antigénio [313, 314].

Outro estudo, realizado na Universidade no Norte da Carolina e do Texas, avaliou gatos com proprietário e que apresentavam sinais cardiorrespiratórios, demonstrando uma prevalência de infeção de 9% e uma taxa de exposição de 22% [8].

Carleton &Tolbert, (2004), estimaram uma prevalência, no nordeste da Georgia de 2,1%. Na Florida, 17% dos gatos foram positivos no teste de anticorpo e em apenas 4,9% dos gatos se detetou a presença de adultos de *D. immitis.* Descreveram uma prevalência de 2,8%, no Alabama, 4,3%, no Sul da Carolina, 10%, na Louisiana e 2,5%, Este de Tennessee [77, 315].

Em Auburn, Califórnia, obteve-se prevalências de 33% e 21% em Miami e Florida, respetivamente [8].

Levy *et al.,* (2011), realizaram um estudo em gatos, que foram recolhidos após o furação Katrina, detetando a presença de antigénio de *Dirofilaria immitis,* revelando uma prevalência de 8%, mas nenhum dos gatos tinha em circulação ADN de *Wolbachia pipiens* [316].

A infeção também se encontra descrita no Canadá e em países da América do Sul, como a Venezuela e o Brasil [7]. No Brasil, Labarthe *et al.,* (1997), demostraram a presença de um parasita macho maduro na região apical da porção cranial do lobo

pulmonar esquerdo, na necrópsia de um gato. A prevalência de dirofilariose em gatos, na área metropolitana do Rio de Janeiro, foi de 0,8% [34].

Na Austrália, Sidney, foi demonstrada a presença de dirofilariose felina, em 1980 [302].

Na Ásia, 0,8% dos gatos apresentaram dirofilariose, num estudo levado a cabo no Irão. No Japão, Kanto, (1985), determinou uma prevalência de 2% em gatos [302]. Nogamia & Sato, (2000) descreveram, em Saitama, Japão, uma prevalência de 0,8% de dirofilária em gatos [317]. Em 1998, foi descrito uma prevalência no Japão, nas ilhas de Honshu e Kyushu, que variava entre 0,5% a 9,5%, em gatos de rua e entre 3% a 5,2% em gatos de interior [302, 318]. Na Coreia do Sul, província de Gyunggi, obteve-se uma prevalência de 2,6% [319]. Em Bangkok, Tailândia, 4,6% gatos foram positivos, na pesquisa de antigénio de dirofilariose [320].

No continente Africano, apenas existem descrições de dirofilariose felina na Serra Leoa [77].

A prevalência de dirofilariose felina na Europa tem sido descrita em diferentes, estudos realizados, nos últimos anos.

Em Espanha, na província de Barcelona, foi descrita uma prevalência de 8,89% nos gatos, através da pesquisa de anticorpos anti-*Dirofilaria immitis* e anti-*Wolbachia spp.* [321]. Montoya-Alonso *et al*., (2014), demonstraram a presença de 11,47% dos gatos positivos, para o anticorpo anti-*D.immitis* e anti-*WSP* e 0,26% dos gatos positivos, para o antigénio de *D. immitis*. A maior prevalência de anticorpo foi detetada, nas áreas circundadas pelo rio Llobregat e Anoia (Baix Llobregat 11,5%, Vallés Ocidental 13,2%, Barcelonés 11,7%). Também detetaram elevadas prevalências de exposição em zonas urbanas (cidade de Barcelona 13,1%, Sabadell 15,5%), mostrando que os gatos urbanos também estão em risco da infeção por *D. immitis* . Acrescentaram ainda que, devido ao facto de os gatos em Espanha não realizarem a profilaxia, a *D. immitis* representa um risco superior para esta espécie do que para o cães [322]. Outros dois estudos epidemiológicos realizados na Ilha Gran Canária, Espanha, em 2004 e 2011, mostraram uma prevalência de 18,3% e 33% respetivamente [29, 118].

Em França, num estudo realizado até 2001, detetou-se microfilárias de *D. immitis* nas amostras de urina de gatos, não tendo obtido resultados nas amostras de sangue, na zona de Sommieres, no sul de França. Os gatos infetados também mostravam sinais radiográficos compatíveis com a dirofilariose [29].

Em Itália, no norte, foi realizado um estudo que mostrou uma prevalência de 16 %, nos gatos (teste de anticorpo positivo), variando entre 9 a 27%, de acordo com a região estudada [300]. Kramer & Genchi, (2002), descreveram uma prevalência de 7 a 27%, na região hiperendémica do Vale do Rio Po [300]. Outro estudo, realizado na mesma zona, mostrou uma prevalência de 4,7% de gatos (teste de anticorpo positivo), sendo seis infeções (2,8%) confirmadas pela avaliação, através do teste antigénio e ecocardiografia [323]. Na zona central de Itália, um estudo, realizado entre 2008 a 2009, na região Abruzzo, demonstrou uma prevalência de 0,3% em gatos [117], na região da Toscânia, mostrou uma prevalência de 23,5% [29].

Em Portugal, foi realizado um estudo em gatos provenientes do norte e centro norte do país, com uma seroprevalência de 15%, sendo as maiores prevalência obtidas em Aveiro (18,7%) e Viseu (17,6%), seguidas do Porto (16%), Viana do Castelo (14,3%), Coimbra (13%), Vila Real (12,9%), Braga (7,1%) e Bragança (0%) [29, 189].

Foram realizados outros estudos em Portugal, mas que apenas detetaram a presença de antigénio de dirofilariose no soro de gatos (prevalência de infeção), obtendo

as seguintes prevalências: 1,43% (1/70), na área metropolitana de Lisboa [324], 1,2% (1/86), na região do Sado [325], 1,4% (1/72), na sub-região do Baixo Vouga [326] e 5,9% (4/68), na região de Olhão [327].

A verdadeira prevalência da infeção é desconhecida e provavelmente subdiagnosticada, devido às limitações do diagnóstico ainda existentes e à maior tendência dos gatos em exibir sinais clínicos muitas vezes transitoriamente, ou até mesmo morrerem sem confirmação da infeção [308, 323].

2.2.1. Fatores de risco

As medidas ambientais para reduzir o risco de infeção parecem ter pequenos benefícios nos gatos. De facto, manter o animal no interior é uma das medidas mais importantes na redução das taxas de infeção nos cães, mas parece ser ineficaz na proteção da doença nos gatos. Os gatos que habitam no exterior, apesar de estarem mais suscetíveis a serem picados pelos mosquitos, parece que o seu sistema imunitário responde mais eficazmente, garantindo uma parcial proteção. No entanto, ainda não foram realizados estudos para determinar o nível de suscetibilidade. Por outro lado, os gatos mantidos no interior, quando se encontram com o vetor, desenvolvem a doença até ao estado adulto [299, 302]. Genchi *et al.,* (2007), em Itália, demonstraram que entre 9 a 27% dos gatos seropositivos para *D. immitis* no norte do país, 19% deles eram de interior [302]. Outro estudo realizado na Universidade do Norte da Carolina e Texas, demonstrou que 1/3 dos gatos parasitados eram estritamente de interior [8]. Em Tulsa, Oklahoma, os 23% gatos parasitados eram estritamente de interior [313, 314]. Embora seja presumível que gatos que vivam no exterior tenham um maior risco de ser expostos à doença (anticorpo positivo) e infeção (antigénio positivo), o facto de viver exclusivamente no interior não providencia uma proteção completa à exposição da doença, sugerindo que a prevenção para a dirofilariose deve ser indicada, tanto para gatos de exterior como interior [8, 304, 312].

Parece haver uma maior suscetibilidade dos gatos machos para a infeção por *D. immitis*. Num estudo realizado em 98 gatos parasitados, 70 eram machos e 28 eram fêmeas [299, 328]. Miller *et al.*, (1998) demonstraram que os machos eram mais afetados que as fêmeas, mas sem diferenças estatisticamente significativas. Infeções experimentais confirmaram que os gatos machos são mais suscetíveis à infeção em termos de taxa de infeção (macho 82% e fêmea 67%) e carga parasitária (macho com média de 6,3 parasitas, e fêmeas com média de 3 parasitas) [328]. Atkins *et al.,* (2000), num estudo retrospectivo que incluíu 50 casos de infeção por dirofilária em gatos (1985-1997), mostraram que a prevalência em machos não foi superior à prevalência das fêmeas, concluindo que o risco de exposição à dirofilária e desenvolvimento da doença é semelhante no macho e na fêmea [329]. Nas ilha Grand Canária não foram encontradas diferenças significativas entre machos (32,1%) e fêmeas (34%) [118]. Por isso, apesar da maior tendência do macho de explorar e andar no exterior, o que aumenta a sua exposição aos mosquitos vetores [299] a predisposição pelo sexo não tem sido suportada pelos estudos serológicos recentes [3].

A infeção felina de dirofilariose pode ocorrer em qualquer idade. Num estudo realizado em 72 gatos, a idade média foi de aproximadamente 4 anos. O gato mais novo tinha 10 meses e mais velho 17 anos [299, 308]. Atkins *et al*., (2000), numa população de 50 gatos, entre 1985-1997, obtiveram uma idade média de infeção de 6 anos (1 aos 19 anos de idade) [329]. Kalkstein *et al.,* (2000), mostraram que o risco era superior para gatos com mais de 2 anos de idade [313]. Morchón *et al.,* (2011), na Ilha Gran

Canária, descreveram uma maior prevalência em gatos com 6 anos (46,8%), seguido de gatos entre os 3-6 anos (35%) e a mais baixa em gatos entre 1-3 anos (20,5%), com diferenças significativas entre os 3 grupos ($p < 0,05$) [118].

Na Coreia do Sul, província de Gyunggi, a prevalência foi superior em gatos mais idosos, com 2,8% em gatos de 4-6 anos de idade e 18,2% em gatos com mais de 6 anos de idade [319]. Venco *et al.,* (2008), constataram que a idade média e mediana dos gatos infetados por dirofilariose numa área endémica é elevada (9 e 10,5 anos respetivamente), sugerindo que quanto mais tempo um gato vive numa área endémica, mais aumenta o risco [330].

Não foi demonstrada diferença significativa entre os gatos de pelo curto e pelo comprido no diagnóstico de dirofilariose, nem diferenças entre raças [306].

Lorentzen & Caola, (2008), descreveram que a prevalência de dirofilariose felina (0,9%) se aproxima da observada em infeções pelo vírus da leucemia felina (FeLV) (1,9%) e vírus da imunodeficiência felina (FIV) (1%), em populações comparáveis [331]. Num estudo realizado por Levy, (2007), a seroprevalência de antigénio de *D. immitis* foi de 4%, de antigénio de FeLV de 2,6% e de anticorpos de FIV de 3,6%, mostrando que a prevalência de dirofilariose felina foi superior à da infeção por retrovírus. O vírus da leucemia Felina não foi considerado um factor de predisposição e a dirofilariose felina é uma doença com risco superior ao vírus da leucemia felina [306, 328]. Um estudo realizado em gatos de abrigos mostrou que gatos positivos ao vírus da imunodeficiência felina têm uma maior incidência na presença de anticorpos circulantes que a população em geral, mas não têm uma maior incidência da infeção madura. Por isso, é provável que o risco de exposição para o FIV seja tão alto como o risco para a dirofilariose [328]. No entanto, em estudos posteriores, não houve qualquer tipo de associação entre a infeção por *D. immitis* e co-infeções por FIV e FeLV e, atualmente, pensa-se que estes vírus felinos não aumentam o risco de infeção pelo parasita da dirofilariose [332].

O risco aparente de infeção com dirofilárias adultas no gato é equivalente ao risco das infeções retrovirais, mas o risco da infeção com parasitas imaturos é três vezes superior ao das doenças retrovirais [306].

2.3. Patogenia

A importância clínica da dirofilariose está amplificada em gatos, mesmo quando estão presentes apenas um pequeno número de parasitas, pois pode pôr em causa a sobrevivência do animal. Embora os parasitas adultos se localizem nas artérias pulmonares e causem uma arterite local, alguns gatos nunca manifestam sinais clínicos. Existem duas fases críticas da doença, nas quais se desenvolvem sinais clínicos: 1) chegada do parasita à vasculatura pulmonar; 2) morte do parasita adulto [252, 301].

2.3.1. Fase da chegada dos parasitas aos pulmões

A primeira fase coincide com a chegada do parasita imaturo às artérias e arteríolas pulmonares, aproximadamente 3 a 4 meses depois da infeção. O parasita juvenil (L5 com cerca de 1,5 cm) é ejetado pela via pulmonar, ficando alojado nos ramos caudais, nas artérias pulmonares [333]. Nos gatos, a maioria dos parasitas juvenis morre poucos dias depois de chegar às artérias pulmonares e são poucos os que se desenvolvem até ao estádio adulto. Como consequência da chegada e morte dos parasitas juvenis, produz-se uma resposta inflamatória aguda nas artérias pulmonares, parênquima pulmonar e vias aéreas [77, 252, 301]. Os gatos podem apresentar sinais

clínicos, como tosse, dispneia e vómito, ou mesmo morte súbita, mas 28% dos gatos permanecem assintomáticos [77, 298]. Devido à manifestação clínica e resposta ao tratamento ser semelhante, esta primeira fase é muitas vezes confundida com um quadro de asma ou bronquite alérgica. No entanto, atualmente faz parte do síndrome de doença respiratória associada à dirofilariose (HARD). Os sinais clínicos associados com esta fase aguda mantêm-se, enquanto o parasita amadurece, o que é demonstrado pelas lesões histopatológicas, que são evidentes mesmo quando o gato elimina o parasita. As lesões microscópicas mais notáveis são a hipertrofia medial oclusiva das pequenas arteríolas pulmonares, infiltrados eosinofílicos no parênquima pulmonar (pneumonite), mas outras alterações também podem ser visualizadas nos brônquios, bronquíolos, alvéolos e artérias pulmonares [252, 301, 304].

As lesões vasculares descritas são a proliferação da íntima, hipertrofia musculares da túnica média e infiltrado celular inflamatório da adventícia (eosinófilos e neutrófilos), nas artérias pulmonares acometidas, com consequente estreitamento do lúmen e tortuosidade da artéria pulmonar [303]. As superfícies arteriais observadas em microscópico eletrónico de varredura apresentam numerosa e exuberante proliferação [334]. Mas estas lesões histológicas já foram descritas em gatos sem dirofilariose [79, 303, 333].

Nos gatos, se as formas juvenis amadurecem até ao estado adulto, o sistema imunitário do hospedeiro suprime a sua resposta e pode haver resolução de alguns sinais. Estudos demonstraram a capacidade dos parasitas vivos em suprimirem a atividade dos macrófagos intravasculares pulmonares, o maior componente do sistema reticuloendotelial dos gatos [252, 298, 304]. A supressão do sistema imunitário pelo parasita permite que os gatos tolerem a infeção, sem sinais clínicos aparentes, entrando assim numa fase subclínica [77, 252].

No entanto, a presença destes parasitas produzem uma endoarterite vilosa, fibrose da íntima vascular e hipertrofia da parede vascular das artérias pulmonares lobares e periféricas, semelhante ao que ocorre nos cães [77].

As lesões são muito localizadas e, por isso não provocam uma obstrução suficiente para produzir hipertensão pulmonar. Portanto, a hipertensão pulmonar é um evento ocasional nos gatos, assim como, a insuficiência cardíaca direita (por incremento da pós-carga ventricular direita), podendo estar associadas a doença crónica de dirofilariose e, mais tarde, manifestar-se por efusão pleural (hidrotórax e quilotórax), ascite ou ambas [8, 77, 335].

O síndrome da veia cava é raro em gatos com dirofilariose, devido ao baixo número de adultos habitualmente presente. No entanto, a presença apenas de 1 ou 2 parasitas pode ser suficiente para causar regurgitação da válvula tricúspide [77, 252].

2.3.2. Fase da morte dos parasitas adultos

Quando os parasitas adultos maduros começam a morrer, termina a regulação do sistema imunitário e inicia-se a segunda fase da doença. A degeneração do parasita causa uma reação inflamatória intensa, sobretudo a nível dos lobos caudais, acompanhada de tromboembolismo, o que leva ao aparecimentos de edema pulmonar agudo, insuficiência respiratória e stress respiratório, que pode culminar na morte do animal [3, 252, 298, 301]. Estas reações nos gatos podem ocorrer com a morte de um único parasita [252, 298].

A forma mais grave da dirofilariose felina ocorre após a morte do parasita adulto, quando se libertam fragmentos do mesmo, que são arrastados para as arteríolas mais

pequenas, afetando a integridade vascular pulmonar e o fluxo sanguíneo e provocando lesão arterial severa. Consequentemente, surge hipertensão pulmonar, aumento da pós-carga ventricular direita e eventualmente falha cardíaca congestiva direita. A lesão do parênquima pulmonar (enfarte e consolidação) é secundaria ao tromboembolismo pulmonar arterial e ao aumento da permeabilidade vascular [77].

A morte súbita está descrita em 10 a 20% dos gatos, com infeção por parasitas adultos maturos [252, 298].

A morte dos parasitas causa uma recrudescência da inflamação pulmonar e tromboembolismo, uma vez que despoletam uma exacerbada agregação plaquetária, proliferação da íntima, hipertrofia vilosa, arterite granulomatosa, edema perivascular e hemorragia. O fluxo pulmonar obstruído e a alta resistência vascular elevam a tensão ventricular direita e o consumo de oxigénio, podendo resultar em insuficiência cardíaca, hipotensão e isquémia miocárdica [79].

Se o gato sobrevive a este estádio, há uma hiperplasia das células alveolares tipo II que substituem as células normais tipo I, o que causa lesão permanente pulmonar, o que pode levar a uma doença respiratória crónica, o terceiro estádio da dirofilariose felina [298].

2.3.3. Lesões histopatológicas

A nível histopatológico, em gatos com dirofilariose, observa-se uma endoarterite eosinofílica moderada a severa das artérias pulmonares, seguida de hipertrofia muscular severa das artérias de tamanho médio e de pequeno calibre em todos os lobos pulmonares, juntamente com a obstrução completa de algumas arteríolas, devido à presença de trombos [336, 337]. A hipertrofia da camada média das artérias pulmonares está frequentemente descrita na dirofilariose felina. A presença da *D. immitis* estimula a camada muscular média até à sua hipertrofia, mas esta alteração não pode ser considerada específica da dirofilariose felina, pois também já foi descrita em gatos infetados com *Aelurostrongylus abstrusus e Toxocara cati* [336].

Estes fenómenos levam a uma diminuição da função pulmonar, hipoxémia, dispneia e tosse e, em alguns gatos, é responsável pelo aparecimento de doença respiratória crónica [7].

Foi hipotetizado que a lesão da cutícula dos parasitas liberta elevadas quantidades de antigénio, o que causa choque sistémico agudo (dispneia, hipóxia e hipotensão sistémica), tendo sido demonstrado esta hipótese através de um modelo experimental [7].

A relação *D. immitis*/hospedeiro é extremamente complexa. O curso da dirofilariose felina é imprevisível. Este facto reflete que a relação entre o parasita e o gato é, em alguns aspectos, diferente da dirofilariose canina [338].

A *D. immitis* desenvolveu estratégias moleculares específicas para evadir ao sistema imunitário. A informação do mecanismo da patogenia e sobrevivência do parasita *D. immitis* no hospedeiro felino ainda é limitada. A PGE_2 foi relacionada com a resposta anti-inflamatória, e é predominante durante os primeiros 2 meses da infeção felina. Após o qual é substituída por uma predominância do TxB_2 (pró-inflamatório) que é acompanhado da elevação dos níveis de anticorpos contra a proteína de superfície da *Wolbachia spp.* (WSP), no período de 6 meses de pós-infeção. Esta alteração ocorre aquando da chegada do parasita às artérias pulmonares [339].

Morchón *et al.,* (2007), realizaram um estudo que revelou um aumento significativo dos níveis de eicosanoides (PGE_2, TxB_2, LTB_4), tanto em infeções naturais,

como experimentais de dirofilariose. Os elevados níveis de TxB_2 e LTB_4 detetados 6 meses após a infeção são consistentes com a reação inflamatória e obstrutiva que caracteriza a doença de dirofilariose em gatos, enquanto que o aumento da PGE_2, dois meses pós infeção, pode estar relacionada com a sobrevivência do parasita na primeira fase da infeção [340].

Em relação à inflamação, em infeções naturais e experimentais, foram identificadas 41 proteínas, das quais 13 ainda não tinham sido descritas anteriormente. Muitas destas proteínas são a chave de sobrevivência do parasita, permitindo a produção de energia, atividades antioxidantes e de desintoxicação e regulação da resposta Th_2. O seu reconhecimento ocorre antes da maturação e localização dos parasitas adultos nas artérias pulmonares [338, 339]. Estas proteínas vão surgindo cronologicamente, aos 2, 4 e 6 meses pós infeção, nas infeções experimentais dos gatos. Estes resultados sugerem que existe um reconhecimento gradual do antigénio na dirofilariose felina [338].

Em adição, o parasita consegue bloquear proteínas importantes do processo de glicólise e do sistema fibrinolítico, o que pode estar relacionado com a patologia aguda da dirofilariose felina [338].

A ativação do sistema fibrinolítico, no qual o plasminogénio tem um papel importante, pode ter uma relevância especial nos parasitas adultos de *D. immitis,* que vivem no sistema circulatório do hospedeiro, por um longo período de tempo. A produção de anticorpos específicos contra diferentes proteínas, que se ligam ao plasminogénio, pelo sistema imunitário do gato, pode interferir com a sua atividade de favorecer o desenvolvimento de tromboembolismo, um dos mais importantes processos patológicos na dirofilariose felina. É consistente com a concentração elevada de TxB_2, responsável pelo estímulo inflamatório e reação obstrutiva, previamente detetada em infeções naturais de gatos e em gatos infetados, 6 meses pós-infeção [339].

Mais estudos são necessários para obter mais informação acerca das moléculas de *D. immitis* e a sua possível função, na relação do processo responsável pela patologia da doença [197].

2.3.4. Endossimbiose – *Wolbachia spp.*

Como referido anteriormente, a *D. immitis* serve de hospedeiro à bactéria gram negativa W*olbachia spp*. Esta bactéria foi implicada na patogenia da doença, principalmente, devido à produção de endotoxinas. Estudos recentes demonstraram que a WSP induz uma resposta específica de IgG em hospedeiros infetados pela *D. immiti*s. Foi hipotetizado que a *Wolbachia spp.* contribui para a inflamação pulmonar e renal, através da sua proteína de superfície WSP, independentemente do componente da endotoxina [301].

Foi detetado o anticorpo específico anti-WSP IgG, tanto a nível experimental, como em gatos infetados naturalmente [194, 226, 341].

A resposta imune aos antigénios da *Wolbachia spp.* é detetada 2 meses após a infeção, antes da deteção dos anticorpos contra o antigénio *D. immitis*. Estes achados sugerem que a *Wolbachia spp.* tem um papel importante na resposta imunitária da infeção por dirofilariose em gatos e poderá ter valor diagnóstico [194, 342].

Estes resultados mostram que a morte dos filarídeos, com a consequente libertação da bactéria *Wolbachia*, aumenta a resposta inflamatória e imune no hospedeiro infetado por *D. immitis* [226, 307] podendo ter valor de diagnóstico e ser chave para novas estratégias de controlo e tratamento com antibióticos, em animais infetados [222, 343, 344]. Os dados também podem sugerir que a forte resposta por IgG

contra antigénios *D. immitis,* em infeções experimentais e naturais [345], tal como a forte e duradoura reação imunitária dos gatos a *Wolbachia spp.*, tem um papel na resistência natural destes hospedeiros à infeção por *D. immitis* [343, 344], ou seja, esta resposta é capaz de impedir o desenvolvimento da maioria das larvas e de destruir partes dos parasitas adultos [342].

A longa duração da resposta humoral contra *WSP* permite que gatos expostos previamente consigam eliminar a larva do parasita mais eficazmente numa exposição posterior, dando uma nova explicação para a resistência natural do gato à infeção por dirofilariose. A *WSP* demonstrou estimular a expressão de mediadores pós-inflamatórios, fortalecendo a teoria que a *Wolbachia spp.* contribui diretamente para a patologia da doença [304].

Garcia-Guash *et al.,* (2012), realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a influência da *Wolbachia spp*, nas variáveis que permitem determinar a função respiratória, em gatos seropositivos com sinais de HARD, utilizando o Pletismógrafo Barométrico de Corpo (BWBP). Os resultados demonstraram que a presença de *Wolbachia spp.* estimula uma resposta inflamatória aguda superior, tanto a nível brônquico, como a nível vascular e parenquimatoso, agravando o estado de broncoreatividade associado à presença de seropositividade de *D. immitis* em gatos [346, 347].

Existem evidências que a *Wolbachia spp.* tem um papel fundamental na imunopatogenia da dirofilariose felina [77]. Foi hipotetizado que os antigénios da bactéria são pró-inflamatórios, contribuindo para o quadro clínico de dirofilariose felina, particularmente aquando da morte do parasita, por isso, o tratamento com tetraciclina poderá ser uma estratégia no tratamento da dirofilariose adulta [335].

2.4. Sinais clínicos

O quadro clínico da dirofilariose felina pode manifestar-se clinicamente desde uma forma assintomática (28%), ou com sinais clínicos transitórios e ligeiros, ou sinais cardiopulmonares, ou gastrointestinais e que podem ter um carácter hiperagudo, agudo ou crónico, e eventual desfecho fatal. Está descrito que entre 10-20% podem apresentar-se por morte súbita [77, 308, 330, 348].

Os sinais clínicos desenvolvem-se principalmente em dois estádios do ciclo de vida do parasita. O primeiro estádio coincide com a chegada dos parasitas adultos imaturos (L5) às artérias pulmonares, 4 a 6 meses depois da infeção. O outro estádio corresponde à morte do parasita adulto, usualmente 2 a 3 anos depois da infeção estar estabelecida [200, 308].

A doença subclínica deve-se à capacidade do gato conviver com a infeção sem desenvolver sintomatologia, podendo eliminar a doença sem se detetar a presença de sinais clínicos. A apresentação assintomática pode-se dever ao estilo de vida sedentário do gato contemporâneo, pois o exercício mostrou ser um fator que influencia a severidade da doença [308, 332, 349].

Quando presentes, os sinais mais frequentes são a nível respiratório ou digestivo [77].

Um síndrome per-agudo ou agudo está muitas vezes relacionado com a presença de parasitas L5 nas artérias pulmonares, ou à morte de um ou mais parasitas, embolização ou migração aberrante e apresenta-se pela combinação de alguns sinais como stress respiratório, dispneia, taquicardia, hemoptise, choque, salivação, colapso, vómito, diarreia, síncope, cegueira, ataxia, "head tilt", convulsões e morte. Devido à

rapidez da instalação dos sintomas, a morte pode ocorrer rapidamente, impossibilitando os donos de repararem nos sinais clínicos. O exame pós-morte revela enfarte e edema pulmonar [301].

A morte súbita está descrita como assintomática em gatos parasitados por dirofilária, sendo muito mais frequente em gatos do que em cães, mas a patogenese deste síndrome ainda não foi bem elucidado, estando descritas algumas hipóteses: colapso circulatório e falha respiratória, devido a enfarte arterial pulmonar agudo e tromboembolismo pulmonar agudo, resultante da morte do parasita adulto; devido à presença de hipertensão pulmonar, no entanto, a sua presença é rara em gatos; quadro de choque anafilático sistémico agudo devido a uma libertação aguda de antigénio da dirofilária [301, 350].

No caso do animal apresentar uma doença arterial grave, pode surgir uma insuficiência cardíaca direita, apresentando-se com tosse, doença parenquimatosa pulmonar, ou evidência de eventos tromboembólicos (febre, tosse, dispneia, hemoptise, palidez, estertores pulmonares, taquicardia e hipotensão). O derrame pleural, quilotórax e ascite secundário à insuficiência cardíaca direita também podem ocorrer [79].

Num estudo realizado em 50 casos naturais de dirofilariose felina, no norte da Carolina, demonstrou-se a presença dos seguintes sinais clínicos: sinais do sistema respiratório (64%): dispneia (48%), tosse (38%), espirros; sinais do sistema gastrointestinal: vómitos (38%); sinais neurológicos, como colapso e síncope em 14% dos gatos e morte súbita em 10% gatos. O aparecimento súbito de sinais neurológicos pode dever-se a migrações aberrantes, principalmente a nível cerebral [329, 335].

O exame físico normalmente não apresenta alterações nos animais assintomáticos, no entanto, pode haver diminuição dos sons pulmonares adventícios; presença de um murmúrio sistólico cardíaca ou ritmo de galope. Se houver insuficiência cardíaca, pode estar presente distensão jugular venosa, dispneia e raramente ascite [328, 351].

Pode-se verificar que os gatos com dirofilariose apresentam um leque largo de sinais clínicos, podendo estes ser transitórios e inespecíficos, ou que podem mimetizar outras doenças, como a asma e a bronquite alérgica [252].

2.5. Diagnóstico

O diagnóstico de dirofilariose felina é mais esquivo que o diagnóstico de dirofilariose canina e pode ser negligenciado facilmente [301]. Para isso, contribuem os seguintes fatores: 1) incidência da infeção em gatos ser baixa; 2) sinais clínicos transitórios e inespecíficos; 3) alterações laboratoriais transitórias ou ausentes; 4) amicrofilarémia [3]. No entanto, são vários os testes e procedimentos que estão disponíveis para facilitar o diagnóstico. Os testes serológicos permitem detetar a presença de anticorpos anti-*D. immitis* ou antigénio do parasita adulto; os exames imagiológicos, como a radiografia torácica e a ecocardiografia, são ferramentas úteis para o diagnóstico e aconselhadas pela AHS [3, 8, 252].

A dirofilariose felina deve ser sempre um diagnóstico diferencial em gatos que vivam em zonas endémicas [77].

2.5.1. Diagnóstico imagiológico

2.5.1.1. Radiografia

A radiografia providencia uma forte evidência de infeção por dirofilariose felina, sendo uma ferramenta importante no diagnóstico, pois permite avaliar a severidade da doença, monitorizar a progressão ou regressão da mesma e definir o prognóstico [77, 352].

Nelson *et al.,* (2008), referem que apenas uma minoria dos gatos infetados apresentam radiografias sem alterações, reforçando a sua importância no diagnóstico da dirofilariose felina [349]. No entanto, as alterações radiológicas são menos consistentes na dirofilariose felina, comparativamente com a dirofilariose canina, e a sua ausência não exclui a infeção [295, 330].

Os principais achados radiográficos que sugerem a presença de dirofilariose são: dilatação e tortuosidade das artérias pulmonares lobares principais e artérias pulmonares periféricas, que podem estar associada a uma menor definição das suas margens. A artéria pulmonar deve ter um diâmetro inferior a 1,6 x superior ao diâmetro da nona costela, no nono espaço intercostal; presença de padrão pulmonar broncointersticial (por vezes alveolar) focal ou multifocal, que pode desaparecer espontaneamente; ligeiro aumento do ventrículo direito; presença de sinais de tromboembolismo pulmonar (opacidades intersticiais ou alveolares); e outros sinais: hiperinsuflação pulmonar, efusão pleural, pneumotórax, consolidação de lóbulo pulmonar. Estas alterações vasculares são melhor visualizadas na projeção ventrodorsal, especialmente a artéria lobar caudal direita, onde normalmente se localiza o parasita [3, 77, 295, 299, 301, 329, 335, 353].

Donahoe *et al*. (1976), viram que as alterações detetadas em radiografias de gatos infetados experimentalmente com *D. immitis* foram o aumento da visualização das artérias pulmonares, hipertrofia cardíaca direita, áreas focais e difusas da densidade do parênquima pulmonar. No mesmo estudo, observou-se que pelo menos uma das lesões era visível radiograficamente, após 3 a 7 meses da infeção, em todos os gatos. A severidade das alterações não foi diretamente proporcional ao número de larvas infetantes inoculadas, à carga parasitária, ou à idade dos gatos. No entanto, constatou-se que os gatos do sexo masculino apresentaram lesões cardiopulmonares mais severas do que as fêmeas, o que também se observou com os gatos que tiveram microfilarémia durante a infeção. As densidades parenquimatosas diminuiram em oito dos 15 gatos, 4 a 6 meses após a infeção, tendo sido a dilatação das artérias pulmonares o sinal mais consistente de infeção por *D. immitis* [354].

Selcer *et al.,* (1996), realizaram um estudo em que fizeram o acompanhamento radiográfico de 80 gatos expostos à *D. immitis*. Em 61% dos gatos, foram observados parasitas adultos. Os achados radiográficos desses gatos incluíram doença pulmonar broncointersticial, dilatação das artérias pulmonares lobares e hiperinsuflação pulmonar. Na maioria dos gatos positivos, a dilatação arterial pulmonar lobar melhorou com a progressão da doença, enquanto que a hiperinsuflação tornou-se mais frequente. O padrão pulmonar nos gatos positivos para dirofilariose manteve-se anormal, ao longo do estudo, ao contrário dos gatos negativos para dirofilariose, em que melhorou em 50% dos casos. Foi observada cardiomegália em menos de 50% dos gatos com parasitas adultos na necrópsia [355].

Brawner *et al.,* (2000), em 250 gatos com sinais compatíveis com dirofilariose, 36% exibiram sinais radiográficos consistente com dirofilariose e 60% tinham títulos de

anticorpo positivo. Dos gatos com anticorpo negativo, 13% mostrou alterações nas radiografias e dos gatos com anticorpos positivos 46% não mostraram sinais radiográficos [356].

Venco et al., (2008), estudaram a evolução das alterações radiográficas em gatos infetados. As radiografias torácicas mostraram um padrão pulmonar ou alterações vasculares associadas, consistentemente, com o aparecimento de sinais clínicos transitórios de doença respiratória. No entanto, o padrão pulmonar difuso também é característico de outras doenças respiratórias (ex: asma e infeção por aelerostrongilose). O padrão pulmonar focal, em áreas periféricas dos lobos caudais, parece ser mais específico de dirofilariose felina. Também houve uma tendência de aumento da silhueta cardíaca, durante o estudo associado à ocorrência de sinais clínicos, no entanto foi pouco significativo [330].

É expetável que as alterações radiográficas a nível cardiovascular e pulmonar possam preceder ou manter-se após a infeção por dirofilariose [356]. As alterações morfológicas das artérias pulmonares em gatos infetados tendem a normalizar ou a desaparecer completamente, não deixando vestígios de infeção [77]. Dillon *et al.,* (2000), mostraram que as lesões radiográficas não estão correlacionadas, nem com os sinais clínico, nem com a serologia. Alguns gatos, sem sinais radiográficos de doença, testaram positivo para o antigénio. Outros gatos, com lesões radiográficas típicas de dirofilariose felina, foram negativos nas avaliações serológicas [357]. As diferenças temporais, no desenvolvimento do parasita, na resposta imunitária do hospedeiro e da doença orgânica, como a regressão espontânea das lesões, podem levar a discrepâncias entre os achados radiográficos, clínicos e serológicos [3, 8, 295, 301]. A ausência de alterações radiográficas não exclui o diagnóstico de dirofilariose [308].

2.5.1.2. Angiografia

A angiografia pode ser muito útil no diagnóstico da dirofilariose felina, por ser um método que permite a visualização da morfologia das artérias pulmonares [307]. Num gato suspeito de dirofilariose, com resultado do teste de deteção de antigénio negativo e ecocardiografia normal, pode-se realizar uma arteriografia pulmonar para confirmar o diagnóstico. As dirofilárias são visualizadas como defeitos de preenchimento negativos em artérias opacificadas. Outras alterações associadas à dirofilariose felina incluem artérias pulmonares tortuosas, dilatadas, obstrução arterial pulmonar e defeitos no preenchimento linear. Quando executada correctamente, esta técnica permite estabelecer o diagnóstico de dirofilariose felina. No entanto, existem limitações para a sua utilização na rotina clínica. Apesar de ser muito informativa o seu uso está limitado em casos em que o diagnóstico definitivo não pode ser estabelecido por meios menos invasivos [295, 299, 328].

2.5.1.3. Eletrocardiografia

Normalmente o eletrocardiograma de um felino com dirofilariose não apresenta alterações, logo não é um exame complementar que acrescente muita informação ao diagnóstico. No entanto, os gatos com insuficiência cardíaca direita poderão apresentar alterações sugestivas de aumento ventricular direito [77, 295, 328].

2.5.1.4. Ecocardiografia

Deve ser sempre realizada, quando há suspeita de infecção por dirofilariose e os sinais radiográficos, ou dados imunodiagnóstico são insuficientes para estabelecer um

diagnóstico. A ecocardiografia é mais sensível nos felinos do que nos caninos e, normalmente identifica o parasita em 40 a 80% dos gatos parasitados [295, 332, 358].

As dirofilárias localizam-se principalmente no ramo principal e ramo lobar direito da artéria pulmonar, sendo necessário procurar metodicamente em todas estas localizações. A parede do parasita adulto é hiperecogénico e produz uma imagem de duas linhas paralelas com 0,7 a 1,2 mm de espessura, separadas aproximadamente por 0,5 a 1 mm e com comprimento variável, porque reflete o ângulo no qual as dirofilárias estão alinhadas relativamente ao plano da imagem ecocardiográfica. Um ecografista experiente tem uma boa capacidade de realizar o diagnóstico definitivo de dirofilariose, através da visualização dos parasitas adultos, particularmente, quando existe mais do que um parasita [328, 349].

A quantificação da carga parasitária é, no entanto, difícil, pois os parasitas normalmente adquirem uma posição em espiral, o que faz com que os ecos intercetem as dirofilárias em diferentes locais, originando imagens múltiplas, sobrestimando os número de parasitas [328]. No entanto, a quantificação da carga parasitária tem uma boa correlação com a contagem pós- morte de parasitas adultos.

Em casos suspeitos, a elevada especificidade deste exame (perto dos 100%) permite a confirmação da infeção por dirofilárias com mais de 5 meses de duração, podendo os parasitas serem visualizados ecocardiograficamente em ¾ dos gatos com parasitas nas artérias pulmonares ou ventrículo direito [3, 8, 301, 323, 352, 358, 359]. A presença de falsos positivos na ecocardiografia pode dever-se à presença ocasional de uma densidade linear semelhante à estrutura de dirofilárias, no entanto, não se sabe a causa destas densidades e presume-se que sejam resultado de uma reflexão da parede da artéria pulmonar [308].

Venco *et al.,* (1998), em 51 gatos assintomáticos com dirofilariose, detetou-se a presença de parasitas adultos na ecocardiografia, em 21,5% dos gatos. Os parasitas foram encontrados no ventrículo direito (4 gatos), no átrio direito (1 gato), no tronco pulmonar (4 gatos) e na artéria pulmonar direita (2 gatos) [360].

Defrancesco *et al.*, (2001), mostraram que de 43 gatos, que foram submetidos a ecocardiografia, 17 mostraram evidência do parasita no exame. Os parasitas encontravam-se principalmente nas artérias pulmonares (71%), ventrículo direito (41%), átrio direito (35%) e veia cava caudal (6%). Em 7 gatos, o exame ecocardiográfico demonstrou a presença do parasita em múltiplas câmaras cardíacas [359].

2.5.2. Diagnóstico por análises clínicas

As alterações sanguíneas que surgem em gatos parasitados são pouco específicas, não sendo por isso úteis para o diagnóstico da infeção [332].

A análise hematológica pode mostrar uma anemia não regenerativa suave (presente 1/3 de casos) e, ocasionalmente, um aumento de eritrócitos nucleados. A presença de eosinofilia é inconstante, mesmo em amostras seriadas [328].

Se existir doença arterial pulmonar avançada e tromboembolismo pode estar presente neutrofilia com desvio à esquerda, monocitose, trombocitopénia e coagulação intravascular disseminada. Nas análises bioquímicas, o mais comum é a presença de hiperglobulinemia, embora surja de forma inconsistente [328].

2.5.2.1. Lavagem transtraqueal ou broncoalveolar

Num exsudato obtido pela lavagem transtraqueal, ou broncoalveolar num gato com dirofilariose, pode–se observar a presença de eosinófilos, que podem ser

acompanhado ou não de eosinofilia, sendo sugestivo da presença de uma doença parasitária ou alérgica. Este achado não é específico devido à possibilidade de infeções por outros parasitas pulmonares (ex: *Aelurostrongylus abstrususm, Paragonimus kellicotti),* ou a um quadro de pneumonite alérgica [3, 295].

2.5.3. Diagnóstico laboratorial

Apesar de estarem disponíveis vários testes de deteção de dirofilária no mercado, a sua interpretação tem de ser cuidadosa. Tantos os testes para a deteção do anticorpo anti-*D. immitis* como para a deteção de antigénio são ferramentas úteis, aumentando a probabilidade de diagnóstico, quando usadas em conjunto. Para avaliar a precisão deste testes é necessário ter em conta a sua sensibilidade e especificidade e a prevalência de dirofilariose no local de estudo [250].

2.5.3.1. Pesquisas de microfilárias circulantes

A presença de microfilárias em gatos infetados é rara e transitória. A maioria das infeções naturais por *D. immitis* são amicrofilarémicas [317]. Quando presente, a microfilarémia é baixa e transitória e com apenas 1 a 2 meses de duração [3, 77], ocorrendo, aproximadamente, em 50% dos gatos infetados, 6,5 a 7 meses pós-infecção [262].

As microfilárias poderão estar ausentes em infeções uni-sexo, ou em situações em que o sistema imunitário do gato, bastante eficaz, as eliminou da circulação, através da produção de anticorpos [252].

Donahoe *et al.,* (1976), descreveram que apenas 20% dos gatos infetados experimentalmente se tornaram microfilarémicos, e Dillion, cit. Ryan *et al*., (1995) descreveu que os gatos têm uma maior capacidade, em comparação com os cães, de eliminar microfilárias da circulação sanguínea. Por estes motivos, o teste para pesquisa de microfilária, apesar de permitir comprovar o diagnóstico, não pode ser utilizado para descartar a presença de infeção por dirofilariose em gatos [299, 354]. A sensibilidade do teste é baixa mas a sua especificidade é de 100% [3, 8, 295].

Nogami *et al.,* (2000), mostraram o aparecimento de microfilárias, 98 dias após a transplantação de formas juvenis de *D. immitis* [317]. A periocidade foi determinada pelo método trigonométrico e foi caracterizada como sub-periódica noturna. Quando não estão em circulação, as microfilárias são sequestradas em pequenos vasos dos pulmões, sendo um local em que a sobrevivência é mais favorável. Hayasaki *et al.*, (2003), inocularam experimentalmente 4 gatos com 100 a 123 larvas L_3 de *D. immitis*. Apenas um dos gatos ficou microfilarémico, no dia 240 pós-infeção, demonstrando que o parasita se pode desenvolver até à maturação sexual no gato. O número de microfilárias mostrou um padrão nocturno, atingindo o seu pico às 21:00h e decresceu gradualmente até às 7:00h [361].

2.5.3.2. Métodos serológicos

2.5.3.2.1. Pesquisa de antigénio de Dirofilaria immitis no sangue

Os teste de pesquisa de antigénio deteta proteínas libertadas pelo parasita adulto fêmea (proveniente do útero da fêmea), através de anticorpos monoclonais que não são específicos da espécie, podendo ser pesquisados no soro, plasma ou sangue total dos gatos [352].

Como o resultado positivo do teste de antigénio está fortemente associado a uma infeção por parasitas adultos fêmeas, só é esperado após 6 a 7 meses da infeção. As infeções em gatos têm uma carga parasitária baixa (1 a 4 parasitas), logo o período pré-patente é maior, as infeções só por machos são frequentes, levando a que estejam apenas disponíveis níveis baixos de antigénio, resultando numa frequência elevada de falsos negativos [252, 352].

Também se encontra documentado a formação de um complexo antigénio-anticorpo, o que resulta em testes falsos negativos, tendo sido proposto o pré-aquecimento da amostra em banho maria a 104º C por 10 minutos, para quebrar estes complexos, antes da realização do teste [252, 362].

Outros casos de falsos negativos são infeções por parasitas imaturos, podendo os gatos vir a suportar um período de dificuldade respiratória durante as fases de migração das larvas [332]. No entanto, a taxa de falso positivos é baixa, ou seja, quando o teste é positivo, reflete a infeção pelo parasita [77, 363]. A morte súbita e as manifestações clínicas podem ocorrer em gatos antigénios-negativos, podendo ser secundárias à migração dos parasitas imaturos, ou à morte de um parasita adulto macho [307]. Por estas razões, o teste de antigénio não é considerado apropriado, para o rastreio da infeção por dirofilariose em gatos, quando usado isoladamente [363].

A sensibilidade dos testes disponíveis no mercado tem vindo a aumentar, sendo bastante eficazes na deteção de infeções por apenas uma parasita adulto fêmea (quadro 22) [349].

Desde 2008, começou a ser comercializado especificamente para gatos um teste para a deteção de antigénio (IDEXX SNAP® Feline Triple®), que deteta antigénios de *D. immitis* e FeLV e anticorpos de FIV (IDEXX 2008). Apresenta um aumento de sensibilidade de cerca de 15%, sobre os testes convencionais e, segundo o fabricante, apresenta uma sensibilidade de 89,3% e especificidade de 99%, na deteção de dirofilariose em gatos [364].

Teste serológico	Sensibilidade %	Especificidade %	Nº positivos	Nº falsos positivos	Nº negativos	Nº falsos negativos
IDEXX Snap® antigen	79,3	98,0	23	7	344	6
SA Scientific CHAT® antigen	79,3	99,7	23	1	350	6
Synbiotics DiroCheck® antigen	86,2	99,1	25	3	348	4

Quadro 22: Comparação do desempenho de testes de deteção de antigénio de dirofilariose felina existente no mercado veterinário (estudo experimental com 380 gatos).
Adaptado de Berdoukay *et al.*,(2004) [352].

Tendo em conta que os resultados positivos dependem de fatores como o sexo, idade e número de parasitas e com menor extensão do tamanho do hospedeiro [363], um teste positivo confirma o diagnóstico, mas um resultado negativo não descarta a infeção [77], pois estes testes subestimam a prevalência da doença em felinos [252].

2.5.3.2.2. Pesquisa de anticorpo anti-Dirofilaria immitis no sangue

Tendo em conta as limitações das técnicas de pesquisa de microfilárias e do teste de pesquisa de antigénio no diagnóstico da dirofilariose felina, a utilização do teste de pesquisa se anticorpo teve o seu interesse renovado.

O desenvolvimento de anticorpos acontece contra estádios de desenvolvimento do parasita, contra o parasita adulto de ambos os sexos e deve-se às interações hospedeiro- parasita que afetam a resposta imunológica do hospedeiro, o que leva a uma maior sensibilidade dos testes de pesquisa de anticorpo [262].

O teste de pesquisa de anticorpo de *D. immitis* através da técnica de ELISA está disponível comercialmente para deteção de anticorpos, utilizando antigénio recombinante ou antigénio de dirofilária extraído ou purificado [79]. Estes testes são utilizados para a triagem de dirofilariose felina e possuem pouca ou nenhuma reação cruzada com infeções gastrointestinais [363].

A técnica de ELISA utiliza antigénios SA e E/S para diagnosticar precocemente a infeção [365]. Existe um aumento significativo de anticorpos anti-*D. immitis* IgG, nos 2 meses pós infeção, a ambos os antigénios. Os resultados demonstram que ambos os antigénio SA e E/S podem discriminar entre o estado infetado e não infetado, após 2 meses de infeção. Os níveis de IgG contra os antigénios somáticos persistem algum tempo, após a morte do parasita, enquanto que os níveis anticorpo específico para antigénio E/S diminuem. É necessário um título igual ou superior a 1:16, para o teste ser considerado positivo [262, 365].

Apesar de estar relatada uma sensibilidade de 98% e uma especificidade igualmente elevada para os testes de pesquisa de anticorpos anti-*D.immitis*, estudos realizados, com recurso a necrópsia de gatos naturalmente infetados, demonstraram uma sensibilidade inferior de 32% a 90% e uma especificidade de 78% a 99% [3, 306]. A sensibilidade do teste varia de acordo com o estádio de desenvolvimento larvar, o que leva a diferentes resultados entre os testes. Um teste de anticorpo positivo deverá ser confirmado por outra evidência de dirofilariose, para se considerar o diagnóstico [349].

O resultado positivo do teste de pesquisa de anticorpo nos gatos documenta uma exposição ao parasita e tem a vantagem de detetar tanto as infeções por machos como por fêmeas. No entanto, um resultado positivo não indica necessariamente uma infeção pelo parasita, pois podemos encontrar um resultado positivo, quando o gato está infetado por parasitas adultos, tem uma infeção ectópica, está infetado por larvas L4 e L5, ou eliminou a infeção de forma natural, ou através de fármacos recentemente [262]. As infeções abortivas podem estimular a produção de anticorpos específicos contra larvas, sem nunca alcançar o estádio de adulto, pois a exposição à forma larvar despoleta a resposta imunológica humoral. Após a eliminação do parasita, há diminuição do nível de anticorpos, no entanto, não se sabe quanto tempo demora essa redução. Foi estimado que os 100% dos gatos tornam-se seronegativos após 16 a 17 meses [3, 77, 250, 295, 352, 354, 363].

Portanto, um resultado positivo apenas nos dá a garantia que o animal já teve a infeção, ou foi exposto à mesma, mas não nos indica a presença de uma infeção activa [252, 349].

Estes testes oferecem informações sobre a distribuição e o risco de infeção com o parasita, numa população de gatos [328], mas não se correlacionam com o número de parasitas presentes, nem com a severidade clínica e radiográfica [79, 262]. No entanto, os estudos indicam que os animais sintomáticos apresentam uma maior probabilidade de serem positivos que os gatos assintomáticos [349].

A relação entre o nível de anticorpo e antigénio foi relacionada demonstrando que baixos níveis de anticorpo anti-*D. immitis* raramente são associados à presença de antigénio circulante. Estas reações fracamente positivas podem-se dever a uma infeção abortiva, pré-patente, ou infeção anterior com persistência dos anticorpos circulantes. As reações intensamente positivas são associadas à presença dos parasitas adultos no coração ou pulmão [300].

Um resultado negativo de anticorpo pode sugerir 3 possibilidades: o gato não se encontra infetado, a infeção tem menos de 50 a 60 dias, ou há uma quantidade insuficiente de imunoglobulina G, para ser detetada pelo antigénio do teste [363]. Se o gato tiver sinais clínicos sugestivos de dirofilariose, apesar de o teste de anticorpo ser negativo, recomenda-se continuar a pesquisa com radiografia torácica ou ecocardiografia, ou repetir o teste 2 a 3 meses depois, pois estima-se que 25% das infeções sejam falsos negativos [252].

Tendo em conta que tanto as formas juvenis como as formas adultas são capazes de provocar lesões nos gatos, o uso de ambos os testes de anticorpo e antigénio aumentam a probabilidade de um diagnóstico correto (quadro 23).

Teste	Descrição	Resultado	Interpretação	Limitações
Teste Pesquisa Anticorpos	Deteta o anticorpo produzido pelo gato em resposta à presença de dirofilária	Negativo	Baixo índice de suspeita	Os anticorpos confirmam a infeção pelo parasita, mas não confirmam a persistência da mesma
		Positivo	Elevado índice de suspeita	
Teste Pesquisa Antigénio	Deteta o antigénio produzido pelo parasita fêmea adulto	Negativo	Baixo índice de suspeita	Os parasitas machos e imaturos não são detetados
		Positivo	Confirma o diagnóstico de dirofilária	
Radiografia Torácica	Deteta a dilatação da vasculatura pulmonar e a inflamação do parênquima pulmonar, entre outros achados	Negativo	Baixo índice de suspeita	Sinais radiológicos compatíveis com outras patologias pulmonares
		Positivo	Elevado índice de suspeita	
Ecocardiografia	Deteta a presença de parasitas adultos	Negativo	Não altera o índice de suspeita	Falta de experiência da deteção ecocardiográfica do parasita; parasitas imaturos não são detetados
		Positivo	Confirma o diagnóstico de dirofilariose	

Quadro 23: Critérios de diagnóstico segundo os testes realizados.
Adaptado da AHS, (2014) [252].

2.5.4. Necrópsia

Tendo em conta a dificuldade do diagnóstico, a confirmação por necrópsia deve ser realizada em gatos suspeitos de morte por dirofilariose, ou naqueles, em que a morte não tem explicação, caso o proprietário dê autorização [349].

A necrópsia identifica a forma L4, L5 e adultos, providenciando o diagnóstico definitivo pós morte [352].

Deve-se fazer uma inspeção minuciosa, para procurar a presença de parasitas na veia cava, câmaras do coração direito e artérias pulmonares. A infeção pode passar facilmente despercebida, pois consiste, na maioria dos casos, em apenas 1 ou 2 parasitas, e particularmente, se estivermos perante parasitas imaturos, mortos ou fragmentados. Deve-se ter uma atenção especial às extremidades distais das artérias pulmonares, pois os parasitas mortos podem ser forçados e comprimidos pelo fluxo sanguíneo. Tendo em conta as migrações aberrantes, os parasitas poderão estar localizados em locais ectópicos, como as artérias sistemáticas, cavidades corporais, cérebro e medula espinal, sendo importante a inspeção destes locais [3, 301, 323, 363].

Num estudo em que se realizou necrópsia a 129 gatos, foi encontrada a maioria das dirofilariose nos locais expetáveis: câmaras direitas do coração, artérias pulmonares e, ocasionalmente, nos pulmões. No entanto, alguns parasitas foram encontrados em locais menos habituais, como ventrículos, vasos sanguíneos do cérebro, veia hepática [299].

O objetivo principal da necrópsia é a visualização direta do parasita adulto, no entanto, também permite a recolha de amostras para análise histopatológica. Os achados nesta análise ocorrem principalmente a nível pulmonar e nos vasos pulmonares com hipertrofia da camada muscular da artéria pulmonar, artérias e arteríolas, com formação de sulcos elevados em projeção acima da superfície. Em termos citológicos, é possível observar infiltração celular com eosinófilos, linfócitos e plasmócitos da camada íntima das artérias pulmonares, e macrófagos nos alvéolos. E também é frequentemente descrita a presença de hipertrofia medial das artérias pulmonares. No entanto, gatos infetados com outros parasitas pulmonares, como o *Toxocara cati* ou *Aelurostrongylus abstrusus* podem desenvolver as mesmas alterações histológicas nos vasos pulmonares [308].

2.5.5. Diagnósticos diferenciais

A dirofilária deve fazer parte da listagem de diagnósticos diferenciais das doenças que se possam apresentar com sinais clínicos semelhantes a nível respiratório, como asma felina, cardiomiopatia, pneumonia (bacteriana, viral, fúngica ou por protozoários), neoplasias pulmonares (primárias ou metastáticas) e as infeções por *Aelurostrongylus abstrusus* e *Paragonimus kellicotti* [3, 328].

As lesões parenquimatosas pulmonares observadas nestas doenças são semelhantes às observadas na dirofilariose, no entanto, as alterações das artérias pulmonares, como a tortuosidade, são específicas desta parasitose.

A diferenciação do quadro de asma felina e bronquite alérgica de um quadro de HARD pode ser difícil, pois a apresentação clínica é semelhante e respondem favoravelmente ao tratamento com cortiscosteroides [328].

Também podem ser secundários à presença de *D. immitis*, o pneumotórax, quilotórax, abcesso pulmonar, efusão pleural ou hipertensão pulmonar [3, 328].

2.6. Profilaxia

A profilaxia mensal é segura e eficaz, deve ser recomendada em gatos que vivam em áreas endémicas de dirofilariose e que seja provável a exposição a mosquitos vetores, mesmo sendo de interior [3]. A administração do preventivo durante todo o ano deve ser considerada, devido as seguintes razões: 1) atividade contra alguns parasitas intestinais e, no caso da selamectina e moxidectina, parasitas externos; 2) aumento da "compliance" pelo dono; 3) eficácia retroativa, que permite salvaguardar falhas na administração [301].

A profilaxia pode ser obtida com a administração mensal de lactonas macrocíclicas por via oral (ivermectina 24 µg/kg e milbemicina 2mg/kg), ou por via tópica (selamectina 6-12 mg/kg, moxidectina 1 mg/kg e eprinomectina 0,5mg/kg). Os preventivos devem ser iniciados em gatinhos com 8 semanas de idade e devem ser administrados a todos os gatos que habitem áreas endémicas, durante o período de transmissão do parasita [301].

A administração prolongada dos referidos fármacos profiláticos tem ação sobre as larvas jovens (1-2 meses após a infeção), parasitas imaturos (3-5 meses), jovens adultos (6-7 meses) e/ou adultos (mais de 8 meses). A eficácia de 95% ou mais exige a administração durante 9 a 30 meses, dado a dificuldade na lise do parasita e quanto mais velho o parasita, maior a sua resistência, sendo a ivermectina a mais potente, seguida da selamectina e moxidectina e, por último, a milbemicina oxima [263].

Devido à necessidade da existência do mosquito como hospedeiro intermediário para a transmissão da dirofilariose, nos países norte da Europa, é prática corrente interromper a quimioprofilaxia durante os meses de inverno e iniciar até 30 dias, após o início estimado da temporada de transmissão e continuado até 30 dias, após a temporada ter terminado [307]. Em climas mais quentes, onde os mosquitos podem ser encontrados durante todo o ano, a profilaxia anual contínua deve ser praticada [366].

Deve-se realizar um teste pré-tratamento (teste anticorpo e antigénio), para verificar a presença ou ausência de *D. immitis*. Está aconselhado retestar os gatos depois da primeira época de prevenção, no inicio de cada época de transmissão e antes de iniciar o preventivo, com exceção se se optar pela prevenção durante todo o ano [367].

O ciclo de vida longo do parasita no gato, associado à dificuldade de um diagnóstico preciso, aumenta o risco de realizar a profilaxia em gatos infetados, mas os estudos mostram que a administração mensal de preventivos a gatos infetados com parasitas adultos não precipita alguma reação negativa [367].

Estudos realizados, para avaliar a eficácia e a segurança da formulação tópica de imidaclopride 10% com moxidectina 1%, demonstraram uma eficácia de 100% contra o desenvolvimento da infeção por adultos de *D. immitis* em gatos, quando tratados 30 dias após a inoculação do parasita, na fase larvar L3 [368]. A aplicação da formulação tópica, mensalmente, iniciando-se 1 mês antes da época e terminando 1 mês após o termino de época de transmissão, previne o desenvolvimento da dirofilariose felina e providencia o tratamento contra a infestação por pulgas [368-371]. Genchi *et al.*,(2004) demonstraram a eficácia da combinação da milbemicina e praziquantel, numa dose de 2-4 mg/kg, na prevenção da dirofilariose felina [372]. McTier *et al.,* (2000), demonstraram que a selamectina, quando administrada mensalmente, previne a infeção e outros autores, demonstraram a sua segurança, quando administrada a gatos infetados naturalmente [279, 302]. Baker *et al.,* (2014), avaliaram a eficácia do uso da combinação de fipronil – (S)- metopreno, eprinomectina e praziquantel na prevenção de *D. immitis,* mostrando uma eficácia de 100% [373].

Infelizmente, apenas uma pequena minoria dos veterinários prescreve regularmente o preventivo da dirofilariose em gatos. Um inquérito realizado a 1101 clínicas veterinárias do oeste do EUA, mostrou que apenas 13% tinham o hábito de recomendar a prevenção para dirofilariose em pacientes felinos. Da população que se apresentou à Universidade da Pennsylvania entre 1999 e 2006, só 12 % dos gatos, em comparação com 80% dos cães, fazia prevenção [304].

As consequências da dirofilariose felina podem ser a morte do animal e não existem solução terapêuticas, por isso, é prudente ter os gatos com um regime preventivo mensal, durante todo ano em zonas endémicas [8, 374].

2.7. Tratamento

O tratamento de gatos infetados com *D. immitis* é controverso e as opções de tratamento são limitadas, quando comparadas com os cães.

Se o gato se encontrar assintomático, apesar de evidências radiográficas que sugiram doença pulmonar vascular/intersticial consistente com dirofilariose felina, deve-se ser prudente e dar tempo para uma cura espontânea. Os casos subclínicos devem ser monitorizados periodicamente (6 a 12 meses de intervalo), através de testes de anticorpo, antigénio e radiografia. Os gatos com recuperação mostram regressão nos sinais radiográficos e seroconversão de antigénio positivo para negativo [3]. Entre 26-60% dos gatos assintomáticos não mostraram sinais clínicos de dirofilariose. Vários estudos mostraram que aproximadamente 80% dos gatos assintomáticos se curam de forma espontânea e que a maioria da infeção persistiu mais de 3 anos. Deve-se iniciar um tratamento preventivo de forma continuada para evitar reinfeções [77].

Uma das abordagens conservadora, para gatos infetados com evidência radiográfica de doença pulmonar, consiste na utilização de prednisona em doses que vão diminuindo ao longo do tempo, no entanto, não tem eficácia adulticida [252]. Os efeitos do tratamento devem ser reavaliados, tendo em conta a resposta clínica e os sinais da radiografia torácica. Este tratamento deve ser repetido, se houver recorrência dos sinais clínicos [295, 301]. Os gatos devem receber tratamento preventivo, para evitar reinfeções [77]. Este regime empírico também deve ser iniciado em gatos sintomáticos, com teste de anticorpo ou antigénio positivo [295].

Os gatos que apresentem uma situação clínica aguda, com dificuldade respiratória grave, devem ser prontamente estabilizados, com terapia de suporte apropriada para o tratamento de choque [301]. Dependendo das circunstâncias, pode-se incluir glucocorticoides intravenosos de ação rápida, [dexametasona 1-2 mg/kg IV (intravenosa) ou IM; sucinato sódico de prednisolona 5-10 mg/kg IV], fluidoterapia balanceada, broncodilatadores [aminofilina 5-6 mg/Kg PO ou IM BID ou TID, teofilina de liberação lenta 10-25 mg/kg PO SID, terbutalina 0,01 mg/kg SC (subcutânea)] e oxigénio por via intranasal ou jaula de oxigénio. Os diuréticos são inapropriados mesmo em gatos com padrão pulmonar intersticial ou alveolar severo [3].

O uso de broncodilatadores justifica-se pela capacidade das xantinas (aminofilina e teofilina) melhorarem a função dos músculos respiratórios [375], assim como a terbutalina, que causa um relaxamento direto do músculo liso das vias aéreas (Johson 2006). A existência de hiperinsuflação pulmonar pode ser indicativo de broncoespasmo, que pode beneficiar com broncodilatação [303].

No caso de insuficiência cardíaca decorrente da doença arterial pulmonar, o tratamento para controlar a ICC inclui toracocentese, se na presença de efusão pleural, confinamento e jaula de oxigénio e tratamento com furosemida, se necessário. O uso de

um IECA, como o enalapril, associado à ação do diurético, promove uma melhoria clínica sustentada, uma vez que promove a vasodilatação [79].

A natureza e uso de outros tratamentos de suporte são orientados de acordo com a evolução da situação clínica do gato [79].

A ivermectina na dose de 24 μg/kg mensalmente, durante 2 anos, mostrou reduzir a carga parasitária em 65% quando comparado com gatos não tratados. Tendo em conta que a carga parasitária em gatos é reduzida, o problema não é a massa total de parasitas, mas a resposta anafilática resultante da morte do parasita. É expetável que esta resposta ocorra com o tratamento com ivermectina, devido à morte dos parasitas, mas a extensão desta reação ainda é desconhecida [295, 301] .

Existe algum debate acerca da administração de doxiciclina em animais infetados por dirofilariose, com o objetivo de eliminar a *Wolbachia spp*. Por isso, atualmente, o tratamento com doxiciclina não é recomendado, como tratamento adjuvante em gatos [304].

2.7.1. Remoção Cirúrgica

Em principio, é preferível remover os parasitas, em vez de os destruir, de modo a evitar a resposta inflamatória do hospedeiro. Quando são observados vários parasitas nas câmaras cardíacas direitas por ecocardiografia, pode estar aconselhada a cirurgia [295]. A técnica de venotomia jugular foi desenvolvida com o intuito de extrair os parasitas adultos de *D. immitis* nos gatos [376, 377]. Outra técnica é a realização de toracotomia direita e atriotomia [378]. Num estudo realizado, procedeu-se à remoção cirúrgica dos parasitas em 9 gatos (4 por venotomia jugular e 5 por toracotomia), tendo sobrevivido 8 gatos com melhorias clínica significativa [379]. Quando se opta pela prática cirúrgica, deverá existir a preocupação da ocorrência de reações anafiláticas (pré-tratamento com glucocorticoides e antihistamínicos), potencialmente fatais, associadas à disseção traumática dos parasitas durante o procedimento com libertação de antigénio [295, 350].

2.7.2. Monitorização

Deve-se monitorizar o estado de infeção em todos os gatos infetados, mesmo que continuem assintomáticos, que tenham sido tratados empiricamente e tenham feito tratamento adulticida ou cirúrgico [301].

Este acompanhamento será mais eficiente se incluir testes de pesquisa de anticorpo anti-*D. immitis* e teste de pesquisa de antigénio. Está aconselhado a realização de testes serológicos em intervalos de 6 a 12 meses. O intervalo de re-análise deve ser adaptado às circunstâncias clínicas de cada gato. Nos gatos assintomáticos, pode ser suficiente realizar testes anualmente, no entanto, este intervalo deve ser encurtado para 4 a 5 meses, nos casos de gatos com teste de antigénio positivo. Em animais clinicamente normais e com resultado negativo no teste de deteção de antigénio, a repetição dos testes de anticorpo é opcional, uma vez que os níveis de anticorpo persistem durante tempo indeterminado em circulação, após a eliminação dos parasitas [79, 349].

2.8. Prognóstico

A infeção por *D. immitis* em gatos é atualmente reconhecida como uma potencial causa de doença grave no gato e potencialmente mortal [6].

No entanto a imprevisibilidade dos resultados da infeção por *D. immitis* nos gatos sugere que a capacidade de reação e tolerância à infeção é individual, sendo possível um desfecho fatal. Por isso, a melhor aproximação à dirofilariose felina é a quimioprofilaxia, para a sua prevenção [304].

Venco *et al.,* (2008), referem que o prognóstico dos gatos parasitados é sempre reservado, devido ao pequeno tamanho do animal, comparativamente com a biomassa do parasita, o que leva a considerar o gato sempre fortemente infetado, mesmo quando presente uma baixa carga parasitária [371].

Num estudo com 50 gatos com infeção natural, apenas nove sobreviveram. Cinco gatos tiveram morte súbita, pouco tempo após o início dos sinais clínicos e o tempo de sobrevivência da maioria dos restantes animais, após o diagnóstico da infeção, não foi superior a 1,5 anos [329].

Genchi *et al.,* (2008), mostraram que cerca de 79% dos gatos foram capazes de curar espontaneamente e sobreviver à infeção. Também verificou que a probabilidade de morte ou morte súbita aumentou significativamente com a idade no momento do diagnóstico da infeção, mas não foi detetada diferença por sexo ou com a presença ou ausência de sintomas [6].

A sobrevivência à infeção por dirofilariose foi comparada com outras doenças cardiovasculares em gatos. Atkins, (2007), considerou que o prognóstico da dirofilariose felina é, geralmente, comparável com a cardiomiopatia hipertrófica, a doença cardíaca primária felina [303].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3. DIROFILARIOSE HUMANA

3.1. O Que é a dirofilariose humana?

A dirofilariose humana foi considerada, desde 1979, uma antropozoonose pela OMS. É uma doença parasitária, que afeta o ser Humano, causada por parasitas do género *Dirofilaria,* que infetam primariamente o cão e o gato [77].

São vários os nemátodes filaroides que afetam mamíferos e que podem ocasionalmente infetar humanos, sendo na maioritariamente dos casos, devido às espécies *D. immitis* e *D. repens* e um pequeno número de casos atribuído a outras espécies, como *D. tenuis* e *D. ursi*. No entanto, houve vários casos, em que não foi possível determinar qual a espécie envolvida, sendo descritos como *Dirofilaria spp*. [77].

A primeira descrição da presença da *D. immitis*, numa pessoa, foi em 1887, por Magalhães, num rapaz do Rio de Janeiro, Brasil, tendo sido encontrados dois parasitas no ventrículo esquerdo, um adulto macho e uma fêmea [380]. Em 1941, foi descrita num cadáver de uma mulher, em Nova Orleans. Em 1954, foi descrita por Moore um caso de dirofilariose pulmonar, sendo depois reconhecido por Beaver e Orihel, em 1965. No Japão, o primeiro caso de dirofilariose pulmonar foi descrito em 1970. Vários casos foram descritos, desde então, na literatura, principalmente, na região sudeste dos Estados Unidos da América, Mediterrâneo e Japão, e outros climas subtropicais onde a dirofilariose é considerada endémica [380, 381].

Nas áreas endémicas de dirofilariose canina, o contacto entre as pessoas residentes e as espécies de *Dirofilaria spp*. é frequente, no entanto, só uma pequena parte delas vão desenvolver alterações anatómicas. Por isso, o termo de dirofilariose humana deve incluir tanto os casos sintomáticos, assim como os casos assintomáticos, porque não é possível determinar em que pessoas e em que momento se vão desenvolver alterações clínicas [77].

3.2. Ciclo de vida

Em relação à *D. immitis*, os humanos são considerados hospedeiros acidentais e o risco está aumentado, em áreas endémicas para dirofilariose canina. O homem infeta-se através da picada de um mosquito culicídeo infetado com larvas L3, ou seja, da mesma forma que os reservatórios animais. A maioria das larvas do estádio L3 e L4 são eliminadas pelo sistema imunitário [382]. No entanto, uma ou mais larvas podem prosseguir a sua migração pelo tecido conectivo, até à circulação venosa e coração direito, podendo chegar às artérias pulmonares, onde se desenvolvem lesões típicas da dirofilariose humana. O nemátode induz vasculite, o que leva à sua morte pelo sistema imunitário (Theis, 2005). O parasita morto é incorporado num granuloma, que, em termos imagiológicos, é reconhecido como uma lesão "tipo moeda" [3, 77].

O parasita não completa o seu ciclo de vida no hospedeiro humano, tendo sido descrito, apenas, um caso de presença de microfilárias num humano [382], pelo que o homem não é um hospedeiro relevante do ponto de vista de transmissão [77].

Os quatro principais fatores que influenciam a frequência e distribuição da dirofilariose pulmonar são tamanho da população canina, a prevalência da dirofilariose canina, a densidade da população de mosquitos vetores e a exposição à picada de mosquitos com hábitos alimentares antropofílicos [383, 384].

Cancrini *et al.,* (2003), descreveram o mosquito da espécie *Ae. albopictus* como vetor natural de *D. immitis*, em Itália. Descreveram também a sua atração por humanos,

na cidade de Padova [35]. Tendo em conta o comportamento alimentar antropofílico desta espécie de mosquito, que se alimenta principalmente de mamíferos (cães, vacas. coelhos e humanos), pode ser um dos vetores responsáveis pela disseminação da dirofilariose aos humanos. Tendo em conta que o comportamento hematófago dos mosquitos tem um papel primordial na transmissão e manutenção de doenças transmitidas por vetores, foi realizado um estudo em Portugal, em 1993, para determinar as preferências hemáticas de três vetores de dirofilariose reconhecidos no país, *Anopheles antroparvus, Cx. pipiens e Cx. theileri*, provenientes de várias localidades do sudeste do país. Os resultados mostraram que as três espécies têm um caráter zoofílico, podendo ser transmissoras de dirofilariose ao cão. O *Cx. theileri* e, em menor grau, *o An. antroparvus,* aparecem como espécies potencialmente transmissoras da dirofilariose ao homem [63].

Outro estudo realizado, também realizado em Portugal, entre 2007 e 2010, com intuito de saber os hábitos alimentares das espécies de mosquito, demonstrou que as espécies *Cx. theileri e Oc. caspius* se alimentaram tanto em cães como no ser humano [65].

3.3. Epidemiologia

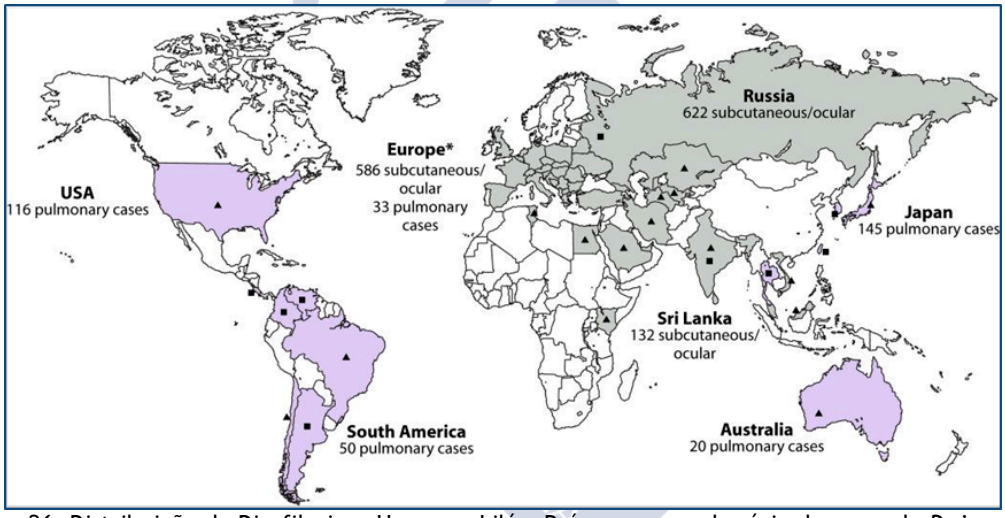


Figura 26: Distribuição da Dirofilariose Humana. Lilás: Países com predomínio de casos de *D. immitis*. Cinzento: Países com predomínio de casos de *D. repens*. ■ Casos esporádicos de Dirofilariose Pulmonar ▲ Casos esporádicos de Dirofilariose Subcutânea/ocular. Adaptado de Simón *et al.,* (2012) [7].

Foram publicados aproximadamente 1780 casos de dirofilariose humana, sendo 370 de dirofilariose pulmonar e aproximadamente 1410 de dirofilariose subcutânea/ocular, em todo o mundo [7, 77, 385].

A maior parte dos casos humanos de *D. immitis* foram descritos na América, Austrália e Japão. Na Europa, Ásia (exceto Japão) e África, os casos de *D. repens* são mais frequentes do que os casos de *D. immitis* (figura 26) [77].

Os estudos epidemiológicos realizados em humanos têm duas aproximações: revisões retrospetivas de casos publicados e análises seroepidemiológicas. A distribuição mundial de dirofilariose humana, conhecida atualmente, não coincide exatamente com a distribuição de dirofilariose canina, principalmente pela falta de informação. Existem países com relatos de casos de dirofilariose humana e sem dados de dirofilariose canina e vice-versa [7].

Nos EUA, contabilizam-se 116 casos de dirofilariose pulmonar (por *D. immitis*) e menos de 29 casos de dirofilariose subcutânea/ocular atribuídos a *D. tenuis* e *D. ursi*. Os casos de *D. immitis* foram descritos, na sua maioria, nos Estados da Costa Atlântica, Golfo do México e vale do Mississipi, onde estão descritas prevalências elevadas na população canina. Todos os pacientes eram adultos, a idade variou entre 28 e os 79 anos, sendo mais frequente entre 50 e 60 anos. O ratio homem/mulher descrito foi de 2:1 [77].

Na América do Sul, estão descritos cerca de 50 casos, a maior parte provieram do sudoeste do Brasil (na zona do Rio de Janeiro, São Paulo e Florianópolis) e, de forma esporádica, da Costa Rica, Argentina, Venezuela e Colómbia [77]. Vezzani *et al.,* (2011), refere que o baixo número de casos de dirofilariose humana descritos na Argentina pode dever-se à natureza assintomática da infeção e devido à dificuldade no seu diagnóstico [120].

No Japão, foram descritos 24 casos de dirofilariose pulmonar humana, entre 1998 e 2004 [3]. Hirano *et al.,* (2002), descreveram 4 casos de dirofilariose pulmonar em pacientes assintomáticos, com uma lesão nodular solitária, não calcificada, com menos de 2,5 cm de diâmetro, no exame imagiológico, após o diagnóstico histológico e imuno-histoquímico da porção de pulmão removida cirurgicamente [386].

Lee *et al.*, (2000), descreveram o primeiro caso de dirofilariose pulmonar humana, na Coreia. Um paciente, com queixas de dor torácica há 1 mês, apresentava uma lesão em forma de moeda de 2 cm de diâmetro, na radiografia torácica e com dilatação do linfonodo mediastínico, a patologia revelou dirofilariose pulmonar complicada, com pneumonia necrótica, fibrose e enfarte [387].

Na Austrália, Narine *et al,* (1999), descreveram o caso de um paciente do sexo feminino, 36 anos de idade, com história de dor torácica pleurítica. A radiografia, mostrava uma opacidade pulmonar bem definida, no lobo pulmonar superior direito. Foi referida para uma biópsia, por toracoscopia, a uma massa bem definida no lobo pulmonar superior direito com 20 x 25 x 20mm. O exame histopatológico descreveu a presença de *Dirofilaria immitis* [388].

Na Europa e Ásia, onde coexistem a *D. immitis* e a *D. repens* na população canina, com exceção do Japão (onde prevalecem os casos de *D. immitis*), predominam os casos de dirofilariose subcutânea/ocular por *D. repens* (1370 casos) sobre os casos de *D. immitis* (30 casos), mesmo em áreas onde a sua prevalência, na população canina, é elevada (figura 27) [77].

Um estudo retrospetivo realizado na Europa demonstrou que apenas 10 casos de infeção por dirofilárias de um total de 270 casos foram causados *por Dirofilaria immitis* [389].

A revisão retrospetiva dos casos publicados apenas oferece uma visão parcial da dirofilariose humana, a ponta do icebergue, uma vez que nas áreas endémicas, onde existem vetores com hábitos zooantropofílicos, as infeções humanas devem ser muito mais frequentes que os casos descritos na literatura. Os sintomas dos pacientes com dirofilariose, especialmente na sua variante pulmonar, passam muitas vezes despercebidos, ou são atribuídos a outras causas. Como alternativa, a deteção de anticorpos específico no sangue permite avaliar o risco real da infeção zoonótica, numa área determinada. Os estudos seroepidemiológicos realizados em residentes de diferentes áreas endémicas mostram elevadas taxas de infeção, em semelhança ao que ocorre em cães [7].

Country	No. of cases					
	Pulmonary dirofilariasis			Subcutaneous dirofilariasis		
	Until 1999	2000–2011	Total	Until 1999	2000–2011	Total
Spain	5	3	8	6	2	8
France	2	2	4	24	63	87
Italy	3	10	13	135	188	323
Greece		3	3	10	25	35
Hungary			0		31	31
Croatia			0		10	10
Serbia			0	3	19	22
Germany	2	1	3	6	3	9
Turkey			0	1	21	22
Russia		2	2	61	561	622
Austria			0		>16	>16
Ukraine			0	23	1	24
Others[a]						170

Figura 27: Dados epidemiológicos de dirofilariose humana na Europa. Adaptado de Simón *et al.*, (2012)[7].

Estudos serológicos realizados em Espanha, na zona de Salamanca, demonstraram que 10% da população humana tinha IgG circulantes anti-*D. immitis*, sendo que, há uma década, a prevalência era de 5,6%. Este aumento da seroprevalência na área pode ser explicado pelo desenvolvimento urbano da zona, em paralelo com o aumento da população canina, e falha na prevenção da parasitose [382]. Também foi descrito uma prevalência de IgG circulantes em 21% e 28% da população humana da zona oeste da Espanha, e Tenerife, respetivamente [77], e 10 a 30% em diferentes regiões isoclimatéricas da ilha da Gran Canária [7].

Em Itália, foi descrita uma seroprevalência de 32,3% de *D. immitis* em humanos, em Pavia, norte de Itália; na Sérvia, registou-se uma seroprevalência de 8,1% [390]; em Espanha, na região de Roja verificou-se uma seroprevalência de dirofilariose canina em 12% dos cães e 11,6% em Humanos [85].

Nos EUA, registou-se seroprevalências de 13,8% e 16,3% para IgG e IgE anti-*D. immitis*, respetivamente, em crianças, no Hawai; 27% (IgG) e 5% (IgE), em habitantes de Maryland; e 5,2% no Illinois [7, 385].

A serologia também permitiu identificar a dirofilariose humana em áreas e situações, nas quais era impossível diagnosticar de outra forma, devido ao isolamento e carência de meios diagnósticos, como uma comunidade de índios Tikuna Amazonas, onde os cães estavam infetados por *D. immitis* [77, 382].

Estes dados sugerem que o risco de infeção humana com *D. immitis* e *D. repens* é muito mais elevado do que mostram os estudos retrospetivos de casos previamente publicados [77].

3.3.1. Dirofilariose humana em Portugal

Em Portugal, apenas estava descrita a presença de *D. immitis*, não sendo conhecidos casos de *D. repens* autóctone em nenhum hospedeiro definitivo (ex: cão, gato e humanos) [391], no entanto, Baptista-Fernandes *et al*., (2015), descreveram um caso importado da Índia de *D. repens*, num homem, de 23 anos, que apresentava um nódulo no epicanto do olho esquerdo e que após extração foi confirmada a presença do parasita por estudos morfológicos e moleculares [392].

Em relação à *D. immitis,* em Portugal, apenas está descrito um caso de dirofilariose ocular em humanos [26] e a sua presença em dois casos de nódulos pulmonares, detetados após a sua remoção cirúrgica e exame histopatológico [185].

Com exceção destas duas descrições e em contraste com outros países europeus, não têm sido divulgados casos de infeção humana por *Dirofilaria immitis*.

Belo *et al.*, (2014), realizaram um questionário on line aos médicos de Portugal, para aferir os conhecimentos, atitudes e práticas dos clínicos face à dirofilariose. Dos resultados obtidos desse questionário, realça-se a ocorrência da infeção em humanos, nos últimos cinco anos, com referência a 10 casos, entre os quais, sete eram cutâneos (quatro diagnosticados por histologia e três por serologia), dois pulmonares (sendo um deles diagnosticado por serologia) e um oftálmico (diagnosticado por serologia). Observou-se ainda um desconhecimento geral dos clínicos sobre a parasitose, reforçando a necessidade da sua maior divulgação à comunidade médica, e, portanto, a necessidade de mais estudos para saber a epidemiologia atual da dirofilariose no país [391].

3.4. Patogenia

A dirofilariose pulmonar humana caracteriza-se pelo aparecimento de nódulos pulmonares, devido aos parasitas adultos imaturos. Os parasitas adultos imaturos L5 alcançam os ramos da artéria pulmonar de pequeno e médio calibre, onde são retidos, causando uma reação inflamatória local e embolismo [393].

A histologia macroscópica mostra a existência de um nódulo bem circunscrito, com uma área com coagulação central que rodeia o parasita, circundada por uma parede fibrótica de 1 a 3 mm de espessura, cor amarela a esbranquiçada. A microscópica mostra um granuloma bem circunscrito, que contém o parasita em diferentes estádios de decomposição, na luz da artéria pulmonar afetada, com uma área central, com necrose coagulativa, circundada de paredes com tecido fibroso, contendo células epitelóides, células gigantes de Langhans, linfócitos, células plasmáticas e fibroblastos [393].

A *D.immitis* também se pode encontrar em localizações extrapulmonares estando descritas as seguintes: cérebro, intraocular, hepática, tecido adiposo do mesentério e artéria testicular. Estes casos são raros e, com exceção da dirofilariose encontrada na câmara anterior do olho, os parasitas continuam associados aos vasos sanguíneos. Mais raramente, foram encontrados parasitas em decomposição, no espaço retroperitoneal, um parasita vivo fêmea de *D. immitis* foi recentemente extraído da cavidade peritoneal de um homem, e, em algumas ocasiões, o parasita foi encontrado no coração e grandes vasos de pessoas no exame pós-mortem [381].

A existência da bactéria simbiótica do género *Wolbachia* na espécie filária também se encontra nas infeções humanas e têm um papel importante, na resposta imunológica do hospedeiro. A evidência da participação dos antigénios de *Wolbachia spp*. no estímulo da resposta do sistema imunitário humano, foi obtida pela primeira vez num estudo realizado na área endémica de Espanha. Foram detetados anticorpos específicos IgG contra a WSP em todos os indivíduos diagnosticados com dirofilariose pulmonar [382].

Alguns dos casos descritos na literatura são os seguintes:

- Em 1974, Dobson and Welch, cit. Theis, (2005), descreveram um quadro de dirofilariose aguda em 6 crianças, que se apresentavam com sinais clínicos (convulsões epiteliformes e sinais de meningite), o que mostra o envolvimento do sistema nervoso central. Uma das crianças também tinha

uma infeção ocular. Foram diagnósticadas como meningites eosinofílicas causadas por *D. immitis* [75]*;*

- Em 1979, Moorehouse, cit. Theis, (2005), descreveu um caso de *D. immitis* intraocular, num homem de Queensland, tendo sido removido um parasita com 8,3 mm de comprimento da câmara anterior [75];
- Em 1979, Tada *et al.*, cit. Theis, (2005), descreveram um paciente homem de 74 anos, do Japão, com granuloma no tecido adiposo do mesentério. A massa media 3x1x1cm e estava ligada ao tecido circundante. A morfologia do parasita estava preservada e foi diagnosticada como *D. immitis* [75]*;*
- Em 2001, Theis *et al.,* cit Theis, (2005), descreveram, num paciente do sexo masculino de 28 anos, um nódulo de 3 cm, palpável e localizado no canal inguinal, que envolvia o testículo esquerdo. Devido à suspeita de um tumor, foi removido cirurgicamente e observou-se a presença de um parasita imaturo num ramo da artéria testicular, confirmado por PCR, como *D. immitis* [75];
- Em 2002, um paciente masculino de 39 anos de idade, assintomático, apresentava um nódulo hepático não específico, no segmento VI, com 2x1,3cm. Após a sua resseção cirúrgica, o exame histopatológico demonstrou uma lesão granulomatosa com necrose central contendo um nemátode em degradação, sendo compatível com *Dirofilaria immitis*. O teste de pesquisa de anticorpos reagiu positivamente contra o antigénio adulto de *D. immitis* [75, 394];
- Rodrigues-Silva *et al.,* (2004), no Estado do Rio de Janeiro, Brasil, descreveram um caso de dirofilariose pulmonar num paciente com 45 anos de idade, que apresentava dor torácica e a radiografia torácica, revelou um nódulo pulmonar solitário, localizado no lóbulo inferior esquerdo, mimetizando uma neoplasia. A histopatologia mostrou áreas de enfarte e abcesso com reação gigantocitária, centrado num nemátode compatível com *D. immitis,* e presença de um infiltrado inflamatório mono e polimorfonuclear, com acentuado predomínio de eosinófilos [395];
- Jamishidi *et al.*, (2008), relataram um caso de dirofilariose periocular, numa paciente do sexo feminino, 27 anos, residente no Irão. Apresentava desde há 2 semanas edema periocular e olho vermelho. Com a lâmpada de fenda foi possível observar um parasita a mover-se na área subconjuntival. Foi extraído um parasita filária vivo sendo diagnosticado como *Dirofilaria immitis*, por exame microscópico [396];
- Miliaras *et al.,* (2010) relatam um caso num paciente do sexo masculino, 52 anos, na Grécia, que apresentava uma lesão em forma de moeda no pulmão direito, que se demonstrou ser *D. immitis* [397].

3.5. Sinais Clínicos

As pessoas infetadas por *Dirofilaria immitis* são assintomáticas, em 54-80% dos casos descritos, portanto, só uma minoria dos pacientes apresentam sinais relacionados com a dirofilariose pulmonar. Quando presentes, os sintomas descritos são tosse, dor torácica pleurítica ou não-pleurítica, expetoração purulenta ou sanguinolenta, hemoptise e dispneia. Também poderão estar presentes outros sinais gerais, como febre, astenia, mialgias [77, 381]. A exploração física é quase sempre normal, podendo, no entanto,

descrever-se estertores, crepitações e sibilâncias como sinais mais frequentes. Pode surgir efusão pleural, mas de pequena magnitude [77].

3.6. Diagnóstico

O problema maior no diagnóstico de dirofilariose é a presença de nódulos pulmonares, assintomáticos, que na maior parte dos casos são identificados acidentalmente, quando se realiza uma exploração radiológica do tórax, geralmente por razões não relacionadas com a dirofilariose. A descoberta da uma lesão "tipo moeda" requer um trabalho de diagnóstico intenso, para excluir outras causas, pois existem pelo menos 20 causas conhecidas deste tipo de lesão, que podem ser classificados em 5 categorias maiores: tumores malignos, tumores metastáticos, tumores benignos, quistos e granulomas inflamatórios (ex: tuberculose) (figura 28) [398].

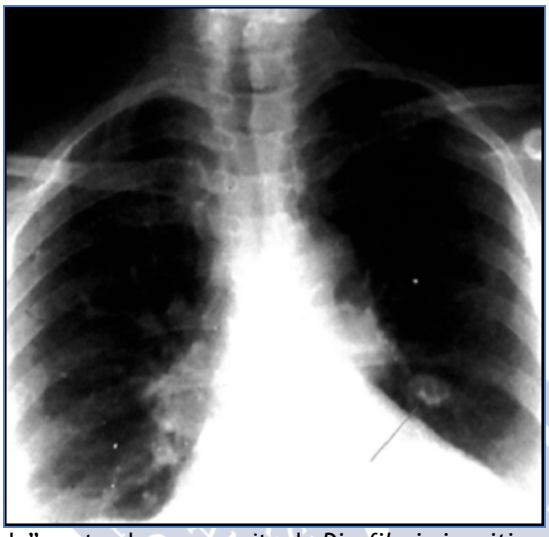


Figura 28: Lesão "tipo moeda" contendo um parasita de *Dirofilaria immitis* morto, num granuloma, num lobo pulmonar caudal, numa radiografia torácica de um humano infetado.
Adaptado de McCall *et al.*, (2008) [3].

Devido aos diagnósticos diferenciais, os doentes são submetidos a radiografia torácica, broncoscopia, exame bacteriológico da expetoração, cultura de material obtido por lavagem transtraqueal, tomografia axial computorizada, ressonância magnética [75], sendo muitas vezes necessária a recolha de amostras biológicas por punção aspirativa de agulha fina (PAAF), toracoscopia ou toracotomia e ressecção cirúrgica do tecido pulmonar [29, 75].

Os nódulos solitários são os mais frequentes, mas já foram descritos nódulos múltiplos (máximo de 5 no mesmo indivíduo). Geralmente as características radiográficas sugerem benignidade: nódulos com bordos bem definidos, forma esférica ou ovóide e densidade homogénea. Também estão descritas lesões residuais calcificadas, o que é consistente com lesões angiocêntricas típicas da dirofilariose. Com alguma frequência, as lesões podem desaparecer com o tempo, sugerindo que a dirofilariose pulmonar pode cursar com lesões transitórias. Há evidência que os nódulos tendem a aparecer mais no pulmão direito, mas não há diferenças quanto à sua localização nos diferentes lóbulos, nem tão pouco relação com a idade e sexo do homem. Aparecem habitualmente em localização periférica, geralmente subpleural [29].

Durante o processo de diagnóstico, deve-se resolver duas questões fundamentais: a obtenção da amostra adequada e uma correta identificação do agente

causal. Devido à ausência de microfilárias no sangue, o diagnóstico é realizado habitualmente por um biópsia, que permite determinar a presença do parasita nos nódulos. No entanto, este procedimento é invasivo, com potencial iatrogénico. Permite obter material biológico para análise histológica e identificação do parasita, no entanto, esta nem sempre é possível devido alguns fatores, como, o grau de destruição do parasita e semelhança das cutículas das diferentes espécies (critério pouco fiável) [77, 399].

Como alternativa e complemento ao diagnóstico, quando as características morfológicas estão alteradas, realiza-se a técnica de PCR, que tem elevada sensibilidade e especificidade. Tem a vantagem de requerer apenas uma quantidade mínima de ADN, para se obter uma resposta positiva.

A coloração imuno-histoquímica, é outra opção, podendo revelar a presença de *Wolbachia spp.* no nódulo, indicando a prévia presença de *Dirofilaria spp*. No entanto, estas técnicas apresentam a desvantagem de não evitarem a intervenção cirúrgica, para obtenção do material biológico [77].

A presença do parasita estimula uma resposta forte do sistema imunitário do humano, levando à produção de anticorpos. O desenvolvimento dos testes indiretos, para aplicar às pessoas que habitem em zonas de prevalência elevadas, permite uma melhora avaliação da infeção e do seu impacto na saúde humana [75]. Não existem testes serológicos comerciais disponíveis para este efeito, mas, a nível experimental têm-se utilizado diferentes complexos de antigénios, para detetar os anticorpos e realizar o diagnóstico de dirofilariose humana. A técnica de ELISA utiliza extratos de antigénios somáticos e excretores/secretores de parasitas adultos. No entanto, os antigénios complexos produzem reações cruzadas com outras espécies de parasitas helmintes do homem, principalmente o *Toxocara canis, Ascaris lumbricoides, Strongyloides stercoralis, Ancylostoma duodenale e Necator americanus*, pois todos eles têm uma via migratória que estimula a resposta do sistema imunitário [75]. O problema da especificidade pode ser resolvido, utilizando polipéptidos presentes nos complexos antigénicos, cuja especificidade para a *D. immitis* foi demonstrada previamente. A aplicação de polipéptidos isolados (ex: antigénio 22 kDa dos adultos de *D. immitis* - Di229), na técnica de ELISA, demonstrou ter uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 90%, com valores preditivos positivo e negativo de 75% a 100%, respetivamente [77, 400].

Se a comunidade médica tiver testes serológicos à disposição, a determinação da presença e extensão da dirofilariose humana poderá ser avaliada de forma mais precisa e o custo no tratamento destas lesões será menor. No entanto, devido à probabilidade baixa pré-teste, a positividade de um teste serológico deve ser complementada com outros dados, como a radiologia, antecedentes pessoais e zona de residência, antes de aplicar qualquer medida invasiva [77].

3.7. Tratamento

A dirofilariose humana não tem tratamento farmacológico, sendo a sua remoção cirúrgica curativa [77].

As únicas ações que podem contribuir para o maneio da parasitose são a prevenção dos reservatórios animais, que são fonte de infeção para o homem. A atividade do médico veterinário e de todos que contribuem para diminuir a incidência na população canina, terá repercussões benéficas na população humana; e o conhecimento da existência da dirofilariose por parte dos médicos determinará a sua inclusão, como

diagnóstico diferencial em casos de nódulos pulmonares, podendo evitar a iatrogenia da intervenção médica [77].

3.8. Conclusão

A maioria das doenças causadas por vetores são consideradas emergentes e a sua prevalência tem aumentado, incluindo a dirofilariose humana. O aumento dos casos humanos publicados nos últimos anos contradiz a ideia de que a dirofilariose humana é acidental e pouco frequente. A expansão geográfica e o aumento da prevalência nas populações caninas é, provavelmente, o fator mais importante, com influência no incremento de casos humanos. No entanto, é necessário analisar outros dados, como, por exemplo, mais de 80% dos casos humanos publicados foram identificados em países, onde existem grupos ativos de investigação de dirofilariose. No entanto, noutros países com prevalências igualmente elevadas não existem denúncias, ou, quando existem, são esporádicas, sugerindo que provavelmente a dirofilariose humana é subdiagnosticada. Este facto sugere que o conhecimento do parasita pela comunidade científica e médica pode influenciar decisivamente a deteção de casos humanos [77].

A severidade da localização pulmonar das lesões de *D. immitis*, no hospedeiro humano, faz com que o diagnóstico seja um desafio e o tratamento um risco. Não existe um método de diagnóstico fiável que evite a cirurgia, sendo o único modo de proteger a saúde humana deste parasita zoonótico, a prevenção da doença em cães e gatos que vivem em zonas endémicas [77].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO II – PLANEAMENTO DO TRABALHO

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. PLANEAMENTO DO TRABALHO

A dirofilariose é uma doença parasitária zoonótica cuja prevalência tem aumentado em várias zonas do mundo, apesar das medidas de profilaxia disponíveis, tornando-se clara a necessidade do estudo da sua distribuição geográfica, com o objetivo de implementar medidas que impeçam a sua disseminação.

Portugal é considerado um país enzoótico para a *Dirofilaria immitis* e o concelho da Figueira da Foz reune condições climátericas e atividades sócio-económicas que permitem o desenvolvimento do vetor, a disseminação e perpetuação da doença. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a prevalência de *D. immitis* em canídeos e felinos do concelho da Figueira da Foz.

O conhecimento da prevalência da dirofilariose poderá alertar a comunidade veterinária para o risco dos cães e gatos manifestarem a doença, de modo a implementarem medidas que permitam a sua deteção e profilaxia, sobretudo por se tratar de uma doença severa e pelos riscos que representa para a Saúde Pública.

1.1. Objetivos Específicos

1- Definir os níveis de seroprevalência da infeção por *D. immitis* em cães e gatos pertencentes ao concelho da Figueira da Foz.
2- Comparar a eficácia de diferentes métodos laboratoriais (deteção da presença de microfilárias no sangue periférico pelo exame direto de sangue fresco, exame do tubo microhematócrito e pela técnica de Knott modificado; deteção da presença de antigénio circulante proveniente de fêmeas adultas de *D. immitis*, no sangue dos cães, e identificação das microfilárias pela técnica de Knott modificado e técnica de coloração histoquímica através da fosfatase ácida) no diagnóstico da dirofilariose canina.
3- Determinar quais os métodos laboratoriais que permitam o diagnóstico de dirofilariose felina (deteção de microfilárias no sangue periférico pelo exame de sangue fresco e técnica de knott modificado, deteção da presença de antigénio de *D. immitis* e presença de anticorpos anti- *D. immitis*).
4- Relacionar a presença de sintomas e sinais clínicos com a severidade da dirofilariose.
5- Relacionar os valores de análises sanguíneas com a presença da diroflariose e com a sua severidade.
6- Avaliar a importância da dirofilariose na população canina e felina do concelho da Figueira da Foz e o seu possível impacto na Saúde Pública.
7- Avaliar, através de um inquérito epidemiológico, as características sociodemográficas e os conhecimentos dos proprietários dos animais sobre a dirofilariase.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO III – MATERIAL E MÉTODOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1. Área de Estudo

O estudo de prevalência de *D. immitis* em cães e gatos foi realizado no concelho da Figueira da Foz, concelho Português do distrito de Coimbra, região centro e subregião do baixo Mondego, situada na desembocadura do Rio Mondego com o Oceano Atlântico. As coordenadas de GPS são N 40º 9' 22,36" e W 8º 52' 18,49" (figura 2 e 3) [1].

Figura 1: Brasão da cidade da Figueira da Foz [1].

A cidade é atravessada pelo rio Mondego (o maior rio que nasce em Portugal) e pela sua rede hidrográfica, da qual fazem parte várias ribeiras e cinco lagoas (salgueiros, velas, braças, corvos e leirosa), que em muito condicionam a vida de todo o concelho, tanto no aspeto económico quer no aspecto social [1].

É sede de um concelho com 379 km^2 de área, subdividida em 14 freguesias. É a segunda cidade maior do distrito, com cerca de 62125 habitantes e 24448 famílias [401].

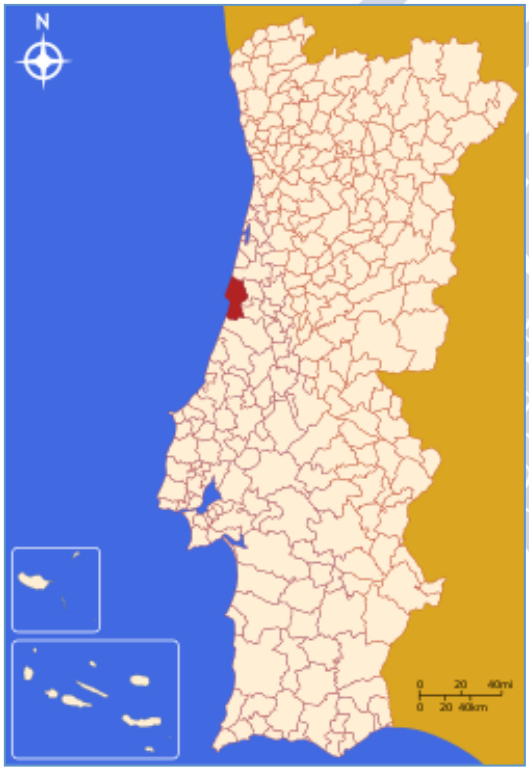


Figura 2: Localização geográfica da Figueira da Foz (vermelho) no mapa de Portugal. Adaptado de Wikipédia (2014) [1].

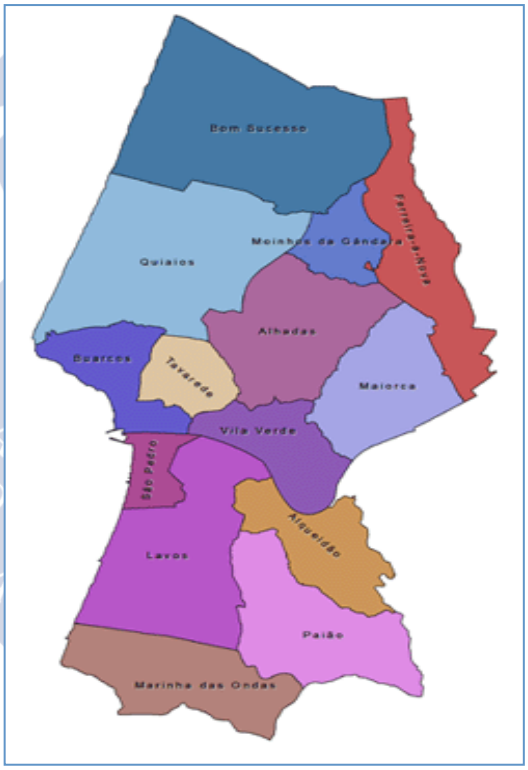


Figura 3: Mapa do concelho da Figueira da Foz. Adaptado de Wikipédia (2014) [1].

A Figueira da Foz tem um clima mediterrâneo do tipo Csb de acordo com a classificação climática de Köppen-Geiger. No inverno, as temperaturas variam entre os 7º C e os 14º C, raramente descendo abaixo dos 0ºC, enquanto que no verão, as temperaturas oscilam entre os 15º C e os 25º C podendo ultrapassar os 35º C em vagas de calor (tabela 1). A ação reguladora do oceano Atlântico faz com que as temperaturas não sejam nem demasiado altas, nem demasiado baixas. A temperatura média anual ronda os 15º C, enquanto que a precipitação média anual é de cerca 600 mm. É

influenciada diretamente pelos ventos do quadrante NO, caracterizados pelas fracas amplitudes térmicas e marcada por excelentes condições no domínio da luminosidade [1]. Tendo em conta a sua localização geográfica é expectável que os valores de UDD sejam um intervalo entre os obtidos na estação metereológica do Porto (117,2 dias/ano – 5 meses ano) e Lisboa (163, 5 dias ano – 6,4 meses/ano) [91].

O clima e a vida socioeconómica da região, com várias atividades dedicadas à agricultura, como a cultura de arroz, providenciam condições ideiais para o desenvolvimento dos vetores da dirofilariose [1]. Foram identificadas no concelho da Figueira da Foz, as seguintes espécies de culidídeos, potencialmente vetores de *D. immitis*: *Oc. caspius, Cx. pipiens, Cx. theileri e An. maculipennis*, no período de transmissão da dirofilariose Maio a Outubro [64].

No Quadro 1, estão representados os dados climatológicos anuais para a Figueira da Foz e no anexo I.1 está representada a distribuição da temperatura entre novembro de 2009 e janeiro 2011 e entre março de 2011 e julho de 2012.

Dados climatológicos para Figueira da Foz													
Mês	**Jan**	**Fev**	**Mar**	**Abr**	**Mai**	**Jun**	**Jul**	**Ago**	**Set**	**Out**	**Nov**	**Dez**	**Ano**
Temperatura máxima registrada (°C)	22,0	24,0	26,5	30,0	32,6	37,0	39,5	36,4	33,0	36,0	29,2	23,2	39,5
Temperatura máxima média (°C)	13,6	14,0	16,6	18,4	19,0	21,4	22,5	22,9	22,4	20,1	17,4	14,4	18,5
Temperatura mínima média (°C)	6,6	7,0	9,6	11,0	12,7	14,7	15,4	15,4	15,0	12,8	10,2	7,8	11,5
Temperatura mínima registrada (°C)	-0,1	-3,0	0,4	0,8	7,0	10,2	7,0	5,0	4,0	2,0	2,0	0,0	-3,0
Precipitação (mm)	93,3	61,3	84,3	47,1	44,4	16,9	5,4	9,0	29,4	66,7	81,1	88,5	627,1

Quadro 1:Dados climatológicos anuais do concelho da Figueira da Foz. Adaptado de Wikipédia (2014) [1].

1.2. Amostras

As amostras dos cães que integraram o estudo foram recolhidas entre os meses de novembro de 2009 e janeiro de 2011, no concelho da Figueira da Foz e a amostra dos gatos foram recolhidas entre os meses de março de 2011 e julho de 2012.

Os animais usados no estudo compreenderam 304 canídeos provenientes das 14 freguesias do concelho. Do total das amostras, 247 foram recolhidas em cães da Clinicão - Hospital Veterinário da Figueira da Foz e 57 foram obtidas em cães da Associação Protetora Animais da Figueira da Foz (APAFF). A amostra de felinos compreendeu 100 animais proveniente de 9 das 14 freguesias e, do total da amostra, 82 foram recolhidas em gatos pacientes da Clinicão – Hospital Veterinário da Figueira da Foz e 18 foram obtidos em gatos da APAFF.

As amostras foram recolhidas em cães e gatos que cumpriam os seguintes critérios de inclusão (anexo I.2):

- Idade superior a 1 ano;
- Domiciliados no concelho da Figueira da Foz (pelo menos há 1 ano);
- Não fizeram profilaxia da dirofilariose nos últimos 2 anos;
- Sem história de infeção prévia por dirofilariose.

Os proprietários foram informados dos objetivos do estudo (anexo I.3) e assinaram um formulário de autorização do mesmo, permitindo a participação do seu animal (anexo I.4).

O tamanho da amostra foi calculada usando a fórmula proposta pelo Thrusfield (2013) [402], para uma população grande (infinita), com um intervalo de confiança de 95%:

$$n = \frac{1{,}96^2 Pexp(1-Pexp)}{d^2}$$

n= amostra requerida
Pexp= prevalência esperada
d= precisão absoluta desejada

O valor utilizado como prevalência esperada canina foi de 18,8%, sendo este um valor médio das prevalências apresentadas por Araújo (1996) [185].

A amostra total requerida com um intervalo de confiança de 95% e um nível de precisão absoluta de 5% foi de 235 animais:

$$n = \frac{1{,}96^2 x 0{,}188(1-P0{,}188)}{0{,}05^2} = 235$$

O valor utilizado como prevalência esperada felina foi de 5,46%, correspondendo este valor a 20% da prevalência canina (27,3%) obtida na Figueira da Foz [301, 403].

A amostra total requerida, com um intervalo de confiança de 95% e um nível de precisão absoluta de 5%, foi de 79 animais:

$$n = \frac{1{,}96^2 0{,}0546(1-0{,}0546)}{0{,}05^2} = 79 \text{ animais}$$

1.3. Caracterização da população de estudo

1.3.1. População canina

A amostra, para a qual foram determinados os resultados, era constituída por 304 cães. Do total da amostra, 140 eram machos (46,1%) e 164 eram fêmeas (53,9%) (gráfico 1), com idades compreendidas entre 1 e 19 anos (26,3% entre 1 a 3 anos de idade, 42,7% entre 4 a 9 anos e 31% com idade igual ou superior a 10 anos) (gráfico 2).

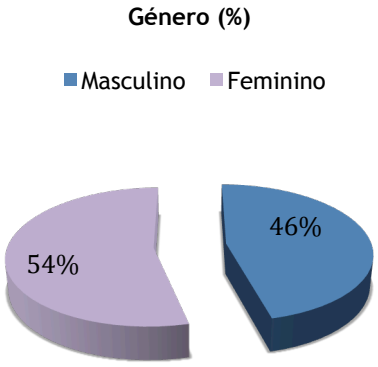


Gráfico 1: Caracterização da população de estudo de acordo com o género (frequência relativa) (n= 304).

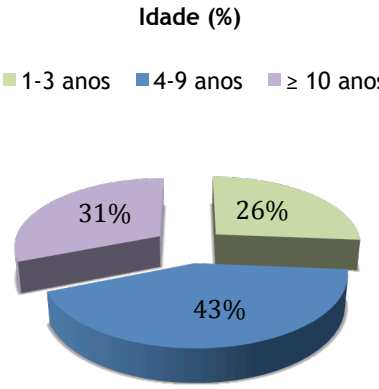


Gráfico 2: Caracterização da população de estudo de acordo com a idade (frequência relativa) (n= 297).

Em relação à raça, 41,8% eram cães de raça pura e 58,2% sem raça determinada (gráfico 3). Em relação ao porte dos cães, 37,8% eram de pequeno porte (<10 kg), 39,8% de médio porte (entre 10 a 24,99 kg) e 22,4% de grande porte (≥ 25kg) (gráfico 4).

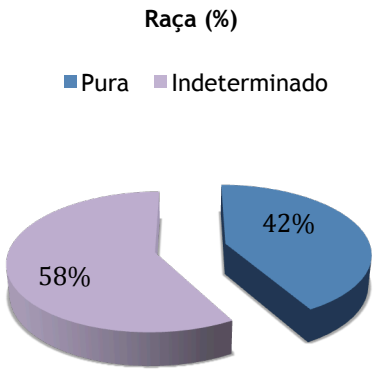


Gráfico 3: Caracterização da população de estudo de acordo com o raça dos cães (frequência relativa) (n= 304).

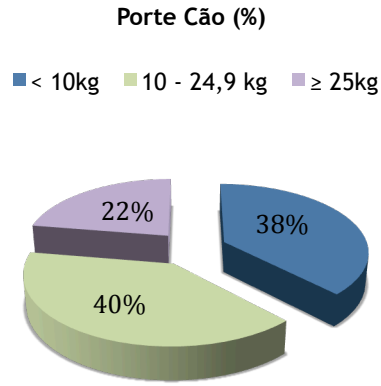


Gráfico 4: Caracterização da população de estudo de acordo com o porte de cão (frequência relativa) (n=304).

De acordo com o habitat, 35,9% dos cães são mantidos no interior e 64,1% dos cães são mantidos no exterior (gráfico 5); de acordo com o ambiente, 56,9% vivem em ambiente rural e 43,1% vivem em ambiente urbano (gráfico 6).

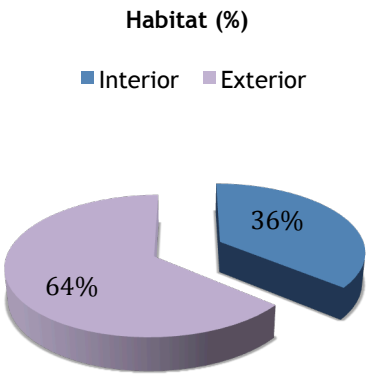


Gráfico 5: Caracterização da população de estudo de acordo com o habitat (frequência relativa) (n= 298).

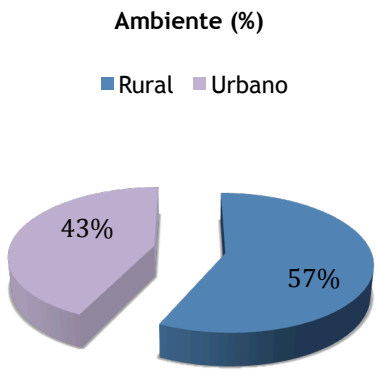


Gráfico 6: Caracterização da população de estudo de acordo com o ambiente(frequência relativa) (n= 227).

Em relação à utilização do cão, 69,3% eram animais de estimação, 10,1% cães de guarda e 20,6% cães de caça (gráfico 7). Em relação ao tamanho do pelo, 52% tinham pelo curto, 28% pelo médio e 20% pelo comprido (gráfico 8). De acordo com a presença de proprietário, 80,9% tinham proprietário e 19,1% eram provenientes da APAFF (gráfico 9).

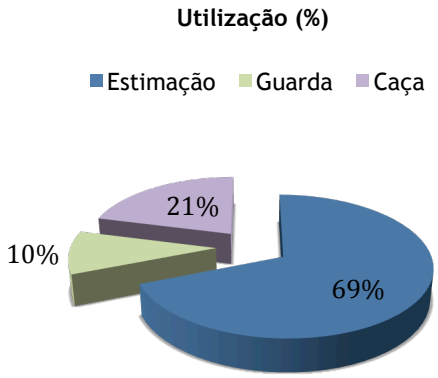


Gráfico 7: Caracterização da população de estudo de acordo com a utilização (frequência relativa) (n= 228).

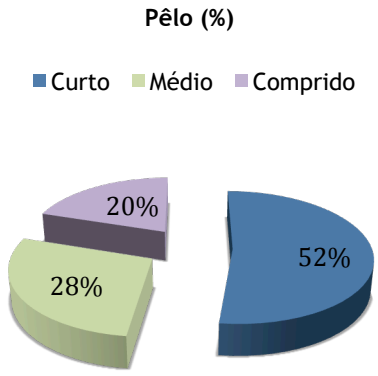


Gráfico 8: Caracterização da população de estudo de acordo com o tamanho do pelo (frequência relativa) (n= 301).

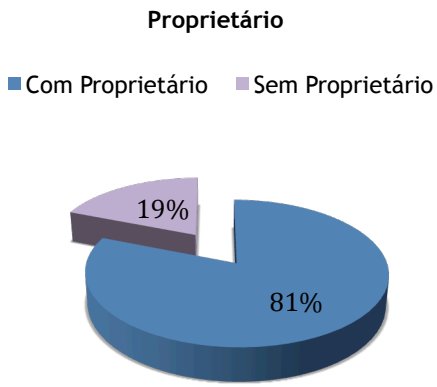


Gráfico 9: Caracterização da população de estudo de acordo com a presença de proprietário (frequência relativa) (n= 303).

1.3.2. População felina

A amostra para a qual foram determinados os resultados, era constituída por 100 gatos que cumpriam integralmente os critérios de inclusão.

Do total da amostra, 35 eram machos (35%) e 65 eram fêmeas (65%) (gráfico 10), com idades compreendidas entre 1 e 18 anos - 43 % até 7 anos e 57% com idade igual ou superior a 7 anos (gráfico 11) - sendo a média 8,4 ± 4,8 anos.

Em relação à raça, 4% dos gatos eram de raça pura (persa) e 96% sem raça determinada (gráfico 12).

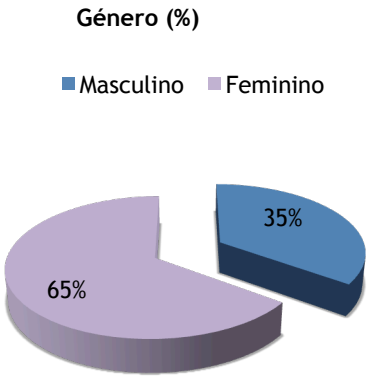


Gráfico 10: Caracterização da população de estudo de acordo com género (frequência relativa) (n= 100)

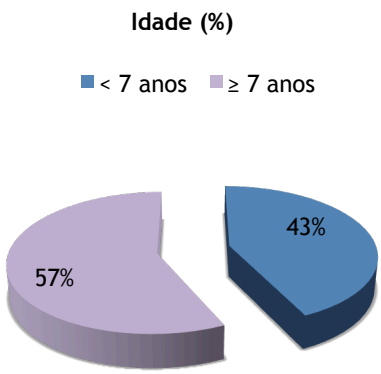


Gráfico 11: Caracterização da população de estudo de acordo com a idade (frequência relativa) (n= 81).

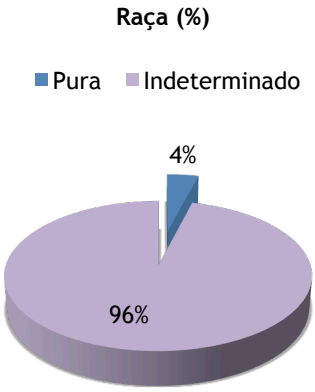


Gráfico 12: Caracterização da população de estudo de acordo com a raça (frequência relativa) (n= 100).

De acordo com o habitat, 19% dos gatos eram mantidos no interior, 47% dos gatos mantidos num habitat misto (interior e exterior) e 34% dos gatos eram mantidos no exterior (gráfico 13) e, em relação ao ambiente, 31,3 % viviam em ambiente rural e 68,7% em ambiente urbano (gráfico 14).

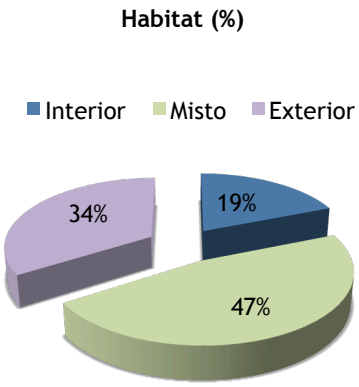


Gráfico 13: Caracterização da população de estudo de acordo com o habitat (frequência relativa) (n=100).

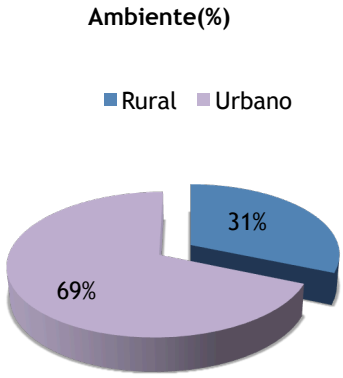


Gráfico 14: Caracterização da população de estudo de acordo com o ambiente (frequência relativa) (n=83).

Em relação ao tamanho do pelo, 92% tinham pelo curto, 3% pelo médio e 5% pelo comprido (gráfico 15). Em relação à esterilização, 34,7% eram esterilizados e 65,3% não eram esterilizados (gráfico 16).

De acordo com a presença de proprietário, 82% tinham proprietário e 18 % eram provenientes da APAFF (gráfico 17).

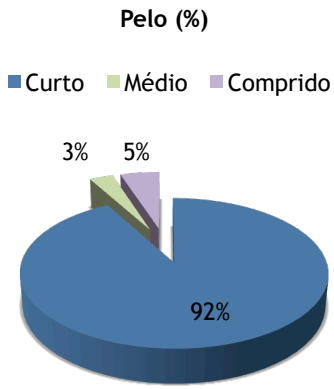


Gráfico 15: Caracterização da população de estudo de acordo com o tamanho do pelo (frequência relativa) (n= 100)

Gráfico 16: Caracterização da população de estudo de acordo com a esterilização (frequência relativa) (n = 95)

Gráfico 17: Caracterização da população de estudo de acordo com a presença de proprietário (frequência relativa) (n = 100).

1.4. Recolha de material e produtos biológicos.

Quando todos os critérios de inclusão eram cumpridos e o formulário de autorização preenchido, procedeu-se à recolha de informação epidemiológica (anexo I.5), da história clínica (anexo I.6) e realizou-se o exame físico a todos os gatos (anexo I.7).

O material biológico foi recolhido de acordo com as seguintes indicações (anexo I.8):

- Apontar a hora da recolha de sangue;
- Recolher 7 ml de sangue dos cães da amostra de estudo de uma das seguintes veias: jugular, cefálica ou safena dos cães (colocando 3 ml de sangue em EDTA, 2 ml de sangue em heparina e 2 ml num tubo seco) e 3 ml de sangue dos gatos de uma das seguintes veias: jugular ou cefálica (colocando 1,5 ml do sangue em EDTA, 0,5 ml em heparina e 1 ml num tubo seco);
- Manter refrigerado (4ºC) até à análise (máximo até 72h).

1.5. Métodos de diagnóstico

1.5.1. Técnicas para deteção de microfilárias no sangue

1.5.1.1. *Exame direto de sangue fresco*

1- Realizado a todas amostras de sangue caninas e felinas
2- Homogeneizou-se o sangue conservado em EDTA;
3- Colocou-se 25 µl de sangue numa lâmina 76 x 22 mm, com ajuda de uma pipeta calibrada;
4- Cobriu-se com uma lamela 22 x 22 mm;
5- Observou-se ao microscópio ótico com a ampliação de 100 X e 400 X;
6- Verificou-se um resultado positivo, quando se visualizou a presença de microflárias com movimentos turbulentos entre os eritrócitos (figura 4) [250]:
   a. *D. immitis* e *D. repens* – movimento serpentiforme e estacionário,
   b. *A. reconditum* – movimento retilíneo e progressivo.

Figura 4: Microfilária de *Dirofilaria immitis, no* exame direto de sangue fresco (400 x) na amostra de sangue de um cão (Original).

1.5.1.2. Técnica do tubo microhematócrito.

1- Realizado em todas amostras de sangue caninas
2- Encheu-se um tubo capilar de microhematócrito com sangue;
3- Selou-se uma das extremidades com plasticina;
4- Centrifugou-se (centrifuga Alresa, modelo Microcen) amostra a 6000 rpm, durante 5 minutos;
5- Observou-se ao microscópio ótico, a porção plasmática do tubo, próximo à linha leucocitária, com uma ampliação de 100 x e 400 x.
6- Verificou-se um resultado positivo, quando se visualizou a presença de microflárias com movimentos turbulentos entre os eritrócitos (figura 4) [250]:
   a. *D. immitis* e *D. repens* – movimento serpentiforme e estacionário,
   b. *A. reconditum* – movimento retilíneo e progressivo.

1.5.1.3. Técnica de Knott Modificado.

1- Realizado as amostras de sangue canino e felinas.
2- Homogeneizou-se o sangue conservado em EDTA;
3- Misturou-se 1 ml de sangue com 9 ml de formalina a 2% no caso das amostras de cães e misturou-se 0,5 ml de sangue com 4,5 ml de formalina a 2% nas amostras felinas;
4- Aguardou-se 2 a 3 minutos;
5- Centrifugou-se a amostra a 1500 rpm, durante 5 minutos;
6- Removeu-se o sobrenandante;
7- Adicionou-se ao sedimento uma gota de azul de metileno 0,1%;
8- Aguardou-se 2 minutos;
9- Transferiu-se o sedimento para uma lâmina 76 x 22 mm e cobriu-se com uma lamela 22 x 22 mm;
10- Observou-se ao microscópio ótico na ampliação de 100 x e 400 x.
11- Verificou-se um resultado positivo, quando se visualizou a presença de microfilárias fixadas com coloração azulada com extremidade cefálica cónica e extremidade caudal em forma de ponta (figura 5 e 6) [3].

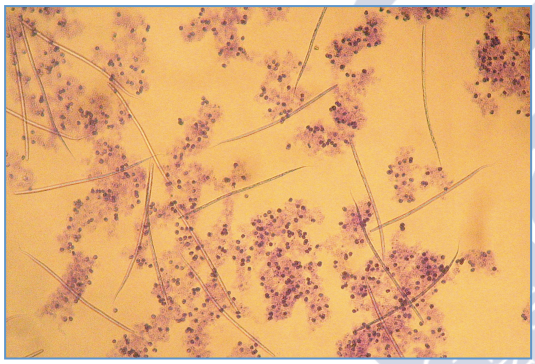


Figura 5: Microfilária de *Dirofilaria immitis*, na técnica de Knott modificado (100 x) na amostra de sangue de um cão (Original).

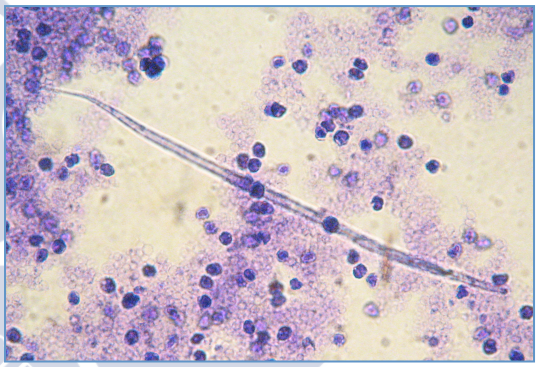


Figura 6: Microfilária de *Dirofilaria immitis*, na técnica de Knott modificado (400 x) na amostra de sangue de um cão (Original).

1.5.2. Pesquisa de antigénio de *Dirofilaria immitis.*

1.5.2.1. *Teste imunodiagnóstico ELISA semiquantitativo canino.*

Para a pesquisa do antigénio de *Dirofilaria immitis* em cães, utilizou-se o Teste Snapp® Heartworm® (kit SNAP® Heartworm – Idexx®) [364].

O procedimento foi efetuado a todos os cães da amostra de acordo com as instruções do fabricante do Kit (anexo I.9). O resultado da leitura do teste pode ser o seguinte (figura 7):

- O teste só é valido se não aparecer nenhuma coloração no controlo negativo;
- O teste é negativo se aparecer uma coloração azulada no controlo positivo;
- O teste é positivo, mas de baixo nível de antigénio, se aparecer duas colorações azuladas: controlo positivo e indicador de baixo antigénio;
- O teste é positivo, mas de alto nível de antigénio, se aparecer três colorações azuladas: controlo positivo, indicador de baixo antigénio e indicador de elevado antigénio.

Resultado Negativo | Resultado Positivo Nivel baixo de antigénio | Resultado Positivo Nível alto de antigénio

Figura 7: Resultados do teste Snapp Heartworm® Idexx (Original).

De acordo com o fabricante, a sensibilidade do teste é de 98% (IC 94-100%) e a especificidade de 97% (IC 84-100%) [364].

1.5.2.2. Teste imunodiagnóstico ELISA felino

Para a pesquisa do antigénio de *Dirofilaria immitis* em gatos, utilizou-se o Teste SNAP® Feline Triple Test® – Idexx, que também permitiu pesquisar o antigénio do vírus de Leucose Felina e anticorpos do vírus de Imunodeficiência Felina.

O procedimento foi efetuado de acordo com as instruções do fabricante do Kit (anexo I.10). Os resultados da leitura do teste podem ser os seguintes (figura 8):

- O teste é negativo, se aparecer uma coloração azulada no controlo positivo.
- O teste é positivo, se surgir qualquer cor nos pontos de amostra que contêm antigénio para *D. immitis*, ou anticorpos para FIV, ou antigénio para FeLV e uma coloração azulada no controlo positivo.
- O teste é considerado inválido, se o controlo positivo não mudar de cor.

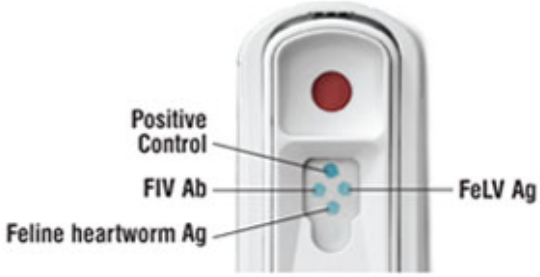


Figura 8: Resultados do teste Snap® Feline Triple® Test Idexx. Adaptado de idexx 2010 [364].

De acordo com o fabricante, a sensibilidade do teste para a pesquisa de antigénio de *D. immitis* é de 89,3% e a especificidade de 99,5%; para a pesquisa de antigénio de FeLV, a sensibilidade é de 100% e a espeficidade de 98,6 % e para a pesquisa de anticorpo de FIV, é de 100% e 99,2%, respectivamente [364].

1.5.3. Pesquisa de anticorpo de *Dirofilaria immitis*

1.5.3.1. Teste imunodiagnóstico ELISA felino

Para a pesquisa do anticorpo de *Dirofilaria immitis,* realizado as amostras felinas, utilizou-se o Teste Solo Step Feline Heartworm® – Heska.

O procedimento foi efetuado de acordo com as instruções do fabricante do Kit (anexo I.11). O resultado da leitura do teste pode ser o seguinte (figura 9):

- O teste é negativo, se surgir uma linha azul no controlo positivo.
- O teste é positivo, se surgir uma linha vermelha na linha de teste.
- O teste é considerado inválido, se não aparecer a linha azul no controlo positivo.

Figura 9: Resultados do teste Teste Solo Step Feline Heartworm® – Heska (Original).

Snyder *et al.,* (2000) descreveram que a sensibilidade do teste para a pesquisa de anticorpo de *D. immitis* varia de 31,6 - 84,2% e a especificidade de 80,8 – 99,8% [363].

1.5.4. Diferenciação histoquímica das espécies de microfilárias

1.5.4.1. *Técnica de coloração histoquímica por fosfatase ácida.*

Para a técnica de coloração histoquímica por fosfatase ácida, utilizou-se o Kit Comercial Leucognost SP®.

Esta coloração foi realizada apenas às amostras sanguíneas que foram positivas no exame direto de sangue fresco e/ou no teste Knott modificado e de acordo com as instruções do fabricante:

1- Misturou-se 1 ml de sangue conservado em heparina com 6 ml de água destilada;
2- Aguardou-se 2 a 3 minutos;
3- Centrifugou-se a 1500 rpm, durante 5 minutos;
4- Decantou-se o sobrenadante;
5- Fez-se esfregaço do sedimento numa lâmina 76x22mm;
6- Secou-se ao ar durante 5 minutos;
7- Fixou-se com o fixador Leucognost® Fixing Misture durante 1 a 3 minutos;
8- Lavou-se com água destilada (Henry Schein®) durante 1 minuto;
9- Preparou-se a solução corante (Kit Comercial Leucognost SP®) (figura 10);

Figura 10: Kit Comercial Leucognost SP® (Original).

a. Dissolveu-se em 60 ml de água destilada, 2 ml do reagente I (ácido Naphthol AS-OL fosfórico) e 0,8 g do reagente II (acetato de sódio);
b. Misturou-se 4 a 5 gotas do reagente IIIa (solução Pararosaniline-HCL) e IIIb (solução nitrito) num tubo de ensaio, aguardou-se 1 minuto e adicionou-se à solução;
c. Filtrou-se a solução com um filtro rápido (filtro de papel dobrado qualitativo, 315, retenção partículas 17-30µm, VMR®) (figura 11).

Figura 11: Filtração da solução (Original).

10- Submergiu-se as lâminas previamente fixadas na solução corante, durante 2 horas e meia em câmara escura.
11- Lavou-se com água destilada (Henry Schein®) durante 10 segundos
12- Submergiu-se as lâminas na solução "Mayer´s hemalum"® durante 15 minutos
13- Lavou-se em água corrente durante 2 minutos
14- Secou-se à temperatura ambiente
15- Observou-se ao microscópio ótico (microscópio Olympus CH20), na ampliação 100x e 400x
16- Pode verificar-se os seguintes resultados (figura 12) [253]:
   - *D. immitis*: mostra dois pontos de atividade de fosfatase ácida (coloração avermelhada), no poro excretor e anal.
   - *D. repens*: mostra apenas um ponto de atividade, o poro anal.
   - *A. dranculoides:* mostra um ponto de atividade no poro anal e vários pequenos pontos na zona corporal interna.
   - *A. reconditum:* a atividade enzimática fica uniformemente distribuída por todo o parasita.

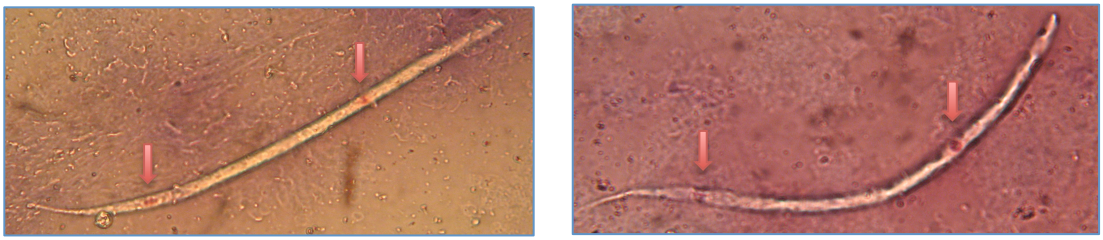


Figura 12: Técnica de coloração histoquímica por fosfatase ácida de uma amostra de sangue de um cão (Kit Comercial Leucognost SP®). Visualiza-se um parasita *Dirofilaria immitis*, pela presença de dois pontos de atividade de fosfatase ácida (coloração avermelhada – seta vermelha), no poro excretor e anal (400 x) (Original).

1.5.5. Análises sanguíneas

As análises sanguíneas foram realizadas apenas às amostras dos cães e gatos que foram positivas em pelo menos uma das técnicas laboratoriais realizadas:

- Hemograma (MS4e® - Vet Hematology Analyzer –Melet Scholesing)
- Bioquímicas (VetTest8008® Chemistry Analyser – Idexx)
  - Amostras caninas: alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FAS), creatinina (Crea), proteinas totais (PT), albumina (ALB), globulinas (GLOB).
  - Amostras felinas: gamaglutamiltransferase (GGT), FAS, Crea, PT, ALB, GLOB:

1.5.6. Radiografia

Foram realizadas duas projeções radiográficas (latero-lateral e ventro-dorsal) aos gatos positivos, no teste de pesquisa de anticorpo anti-*D. immitis* e/ou no teste de pesquisa de antigénio *D. immitis.*

As radiografias foram classificadas de acordo com os critérios radiográficos adaptados de Brawner *et al.,* (2000) (quadro 2) [356]:

Grau	Definição	Critérios radiográficos
0	Sem sinais radiográficos de Dfel	Sem sinais radiográficos consistentes com Dfel
0,5	Consistente mas inespecífico de Dfel	Aumento da opacidade broncointersticial
1	Ligeiramente indicativo de Dfel	Dilatação da artéria lobar caudal com ou sem alterações pulmonares ou outras
2	Moderadamente indicativo de Dfel	Dilatação da artéria lobar caudal com ou sem alterações pulmonares ou outras
3	Fortemente indicativo de Dfel	Dilatação da artéria lobar caudal com ou sem alterações pulmonares ou outras

Quadro 2: Critérios da classifição radiográficos de dirofilariose. Dfel: dirofilariose felina. Adaptado de Brawner *et al.*, (2000) [356].

1.5.7. Ecocardiografia

A ecocardiografia foi realizada aos gatos que foram positivos no teste de pesquisa de anticorpo anti-*D. immitis* e/ou no teste de pesquisa de antigénio *Dirofilaria immitis*, após consentimento do proprietário (figura 13).

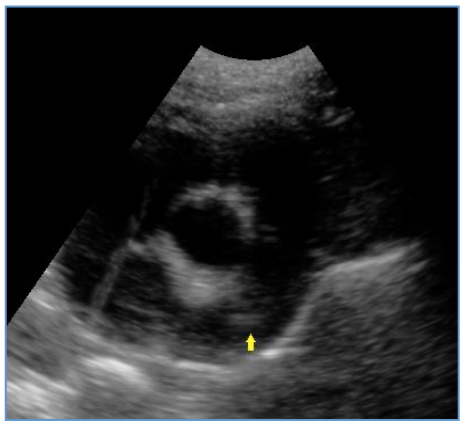
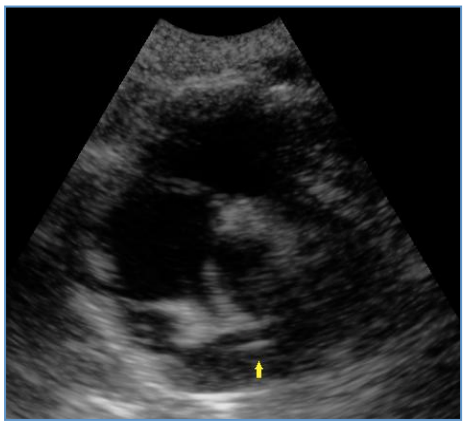
A.  B. 

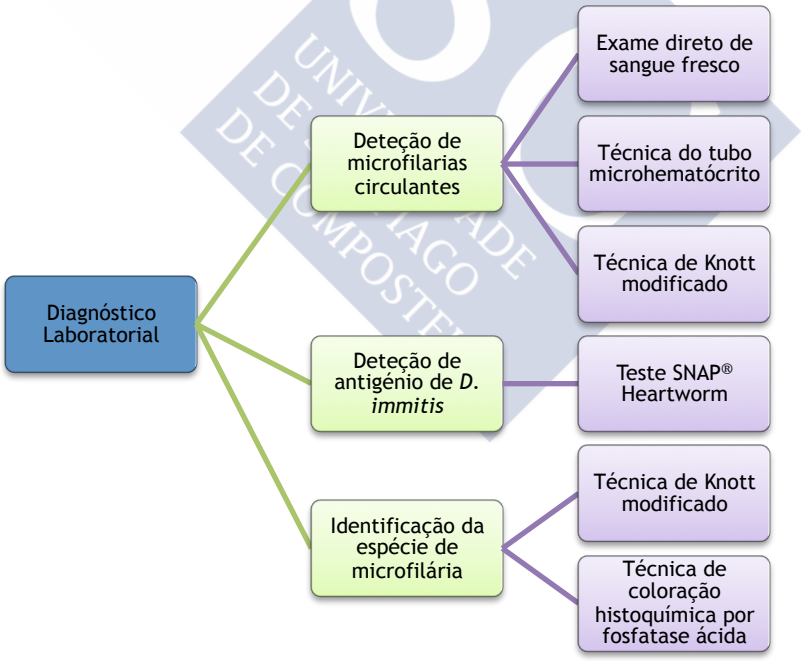
Figura 13: Imagens ecocardiográficas. Cortes parasternais direitos em eixo curto da base do coração e grandes vasos de um cão. Identifica-se uma estrutura linear ecogénica compatível com dirofilária adulta na zona da bifurcação da artéria pulmonar (seta) (Original).

1.5.8. Histopatologia

A histopatologia foi realizada aos gatos que faleceram e testaram positivo, em pelo menos um dos testes serológicos, após o consentimento dos proprietários para a realização da necrópsia e análise histopatológica do coração e pulmões.

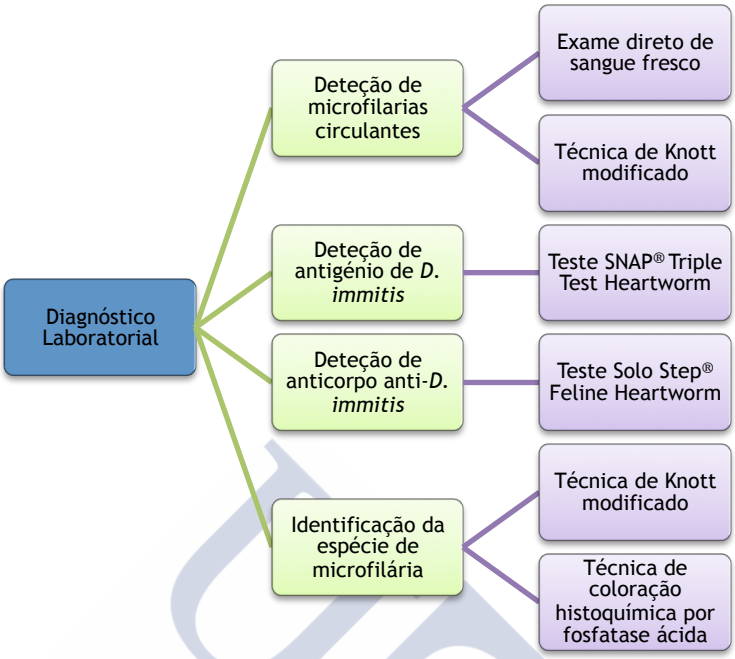
1.6. Protocolo de diagnóstico laboratorial de *Dirofilaria immitis*

1.6.1 Protocolo de diagnóstico laboratorial canino



Quadro 3: Protocolo de análises laboratoriais de pesquisa de *Dirofilaria immitis* realizada aos cães da amostra de estudo

1.6.2 Protocolo de diagnóstico laboratorial felino



Quadro 4: Protocolo de análises laboratoriais de pesquisa de *Dirofilaria immitis* realizada aos gatos da amostra de estudo

1.7. Classificação da severidade da doença nos cães com infeção por *Dirofilaria immitis* de acordo com os sinais clínicos apresentados

A classificação da severidade da doença, nos cães com infeção por *Dirofilaria immitis,* tendo em conta os sinais clínicos apresentados, foi realizada de acordo com Miller & Gordon (2009) (quadro 5): grau I – suave; grau II – moderado: grau III-severo; grau IV – muito severo [234].

Grau	Classe	Sinais Clínicos
I	Suave	Ausente, tosse ocasional, fadiga com o exercício ou ligeira perda da condição corporal
II	Moderado	Ausente, tosse ocasional, fadiga com o exercício, ligeira a moderada perda da condição corporal
III	Severo	Perda da condição corporal a caquexia, intolerância ao exercício, tosse ocasional ou persistente, dispneia
IV	Muito Severo	Síndrome Veia Cava - Anorexia, depressão, fraqueza, tosse, dispneia e hemoglobinúria. Mucosas pálidas, tempo repleção capilar aumentado, distensão da jugular

Quadro 5: Classificação do grau de severidade clínica da dirofilariose. Adaptado de Miller & Gordon, (2009) [234].

1.8. Questionário aos proprietários

Aplicação de um questionário aos proprietários dos cães examinados para aferir o seu conhecimento sobre a parasitose (anexo I.13)

1.9. Análise dos dados

Os dados obtidos foram tratados através do Software SPSS versão 22.0 [404]. As variáveis numéricas foram resumidas através da média, mediana, mínimo, máximo e desvio padrão e as variáveis qualitativas foram resumidas recorrendo às frequências absolutas e relativas. Somente foram determinadas as frequências para as categorias válidas (não foram para os dados em falta).

Para comparação dos métodos de diagnóstico utilizados em canídeos, com vista à determinação da doença, calculou-se a sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, bem como o Kappa e respetivo intervalo de confiança (95%) e o teste de McNemar. Nas variáveis analíticas, além de serem resumidas pela média, mediana, mínimo, máximo e desvio padrão, determinaram-se os intervalos de confiança (95%) para a média.

Para a comparação dos cães e os gatos com resultado positivo de dirofilária nas diferentes variáveis qualitativas, utilizou-se o teste do Qui-Quadrado e, na variável Hematócrito o teste t.

Na análise multivariada dos fatores de risco da dirofilariose canina , utilizou-se a regressão logística (categórica) pelo método STEPWISE (insere somente nas regressões as variáveis com significância estatística).

Na análise multivariada dos fatores de risco da dirofilariose felina, utilizou-se a regressão logística (categórica), tendo como variáveis independentes a caracterização do gato e o ambiente, com significância estatística inferior a 0,2 na análise bivariada. Para os demais grupo de questões, não foram estimados modelos de regressão logística devido ao elevado número de valores em falta.

Para a comparação das diferentes classes de dirofilária canina, no que respeita às variáveis do exame físico, história clínica e alterações hematológicas/bioquímicas, utilizou-se o teste do Qui-Quadrado. Para a comparação das diferentes classes de dirofilária, no que respeita às variáveis hematológicas/bioquímicas, utilizou-se o teste One-way ANOVA, ou no caso de não ser verificado o pressuposto de normalidade, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e, em termos de comparações múltiplas, para determinação das diferenças encontradas na ANOVA, foi utilizado o teste Post-Hoc LSD. Para validação da normalidade dos dados, utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors.

Com vista à determinação dos fatores que influenciam a ocorrência de dirofilariose e classificação (para os cães infetados), estimou-se uma regressão ordinal com base no modelo *Complementary Log-log,* em que a variável dependente possuía as categorias Sem dirofilariose, Ligeira, Moderada, Severa e Muito Severa.

Foram igualmente determinados, para os cães infetados, quais os fatores que influenciam a classificação da dirofilariose, através de uma regressão ordinal com base no modelo *Cauchit,* em que a variável dependente possuía as categorias Ligeira, Moderada, Severa e Muito Severa.

Em todas as análises consideraram-se *p-value*s inferiores a 0.05 para avaliar as diferenças estatisticamente significativas.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO IV – RESULTADOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. RESULTADOS

1.1. DIROFILARIOSE CANINA

1.1.1. Prevalência da *Dirofilaria Immitis*

A infeção por *Dirofilaria immitis* foi detetada em 83 dos cães examinados (n=304), em pelo menos um dos testes realizados, constituindo uma prevalência total de 27,3% (tabela 1).

	N	%	95% IC	
			LI	LS
Negativo	221	72,7%	67,35	77,6%
Positivo	83	27,3%	22,4%	32,7%
Total	304	100%		

Tabela 1 : Prevalência de dirofilariose canina (*Dirofilaria immitis)* no concelho da Figueira da Foz. IC: Intervalo de Confiança; LI: Limite Inferior; LS: Limite Superior.

1.1.1.1 *Prevalência de D. immitis por freguesia*

Quanto à prevalência por freguesias do concelho da Figueira da Foz (tabela 2 e figura 1), destacam-se as freguesias da Marinhas das Ondas (66,7%), Paião (60%), Vila Verde e Lavos (52,6%), Alhadas (36,8%) e Alqueidão (33,3%) por terem uma prevalência superior à do concelho da Figueira da Foz. As outras freguesias obtiveram valores inferiores, destacando-se Buarcos com 3,3% e Quiaios com 10%. Não foram tidas em conta as prevalências das freguesias de Bom Sucesso, Ferreira-à-Nova, Maiorca e Moinhos da Gândara, devido ao reduzido número da amostra. Na tabela 2 estão ainda descritos os valores da densidade da população canina por freguesia, de acordo com os critérios da OMS [1].

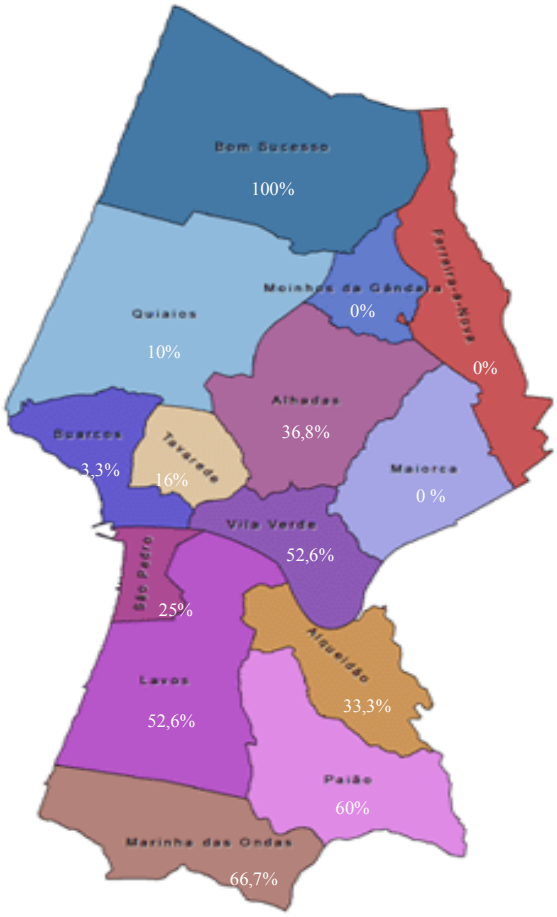


Figura 1: Prevalência de *Dirofilaria immits* das freguesias do concelho da Figueira da Foz (n=276)

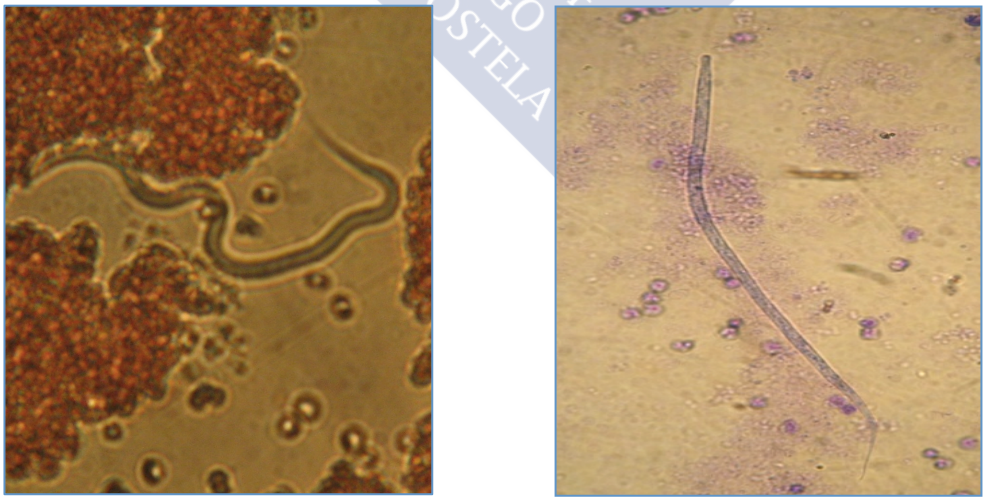
	Estado Dirofilária				Densidade População Canina	
	Positivo		Negativo		Cães/km^2	Hab/km^2
	N	%	N	%	(10% Hab/km^2)	
Alhadas	21	36,8%	36	63,2%	14,9	149,4
Alqueidão	3	33,3%	6	66,7%	8,9	89,1
Bom Sucesso	1	100,0%	0	0,0%	3,5	35,3
Buarcos	2	3,3%	58	96,7%	118,8	1188,3
Ferreira Nova	0	0,0%	2	100,0%	9,2	91,5
Lavos	20	52,6%	18	47,4%	9,5	95,2
Maiorca	0	0,0%	1	100,0%	10,5	104,8
Marinha das Ondas	4	66,7%	2	33,3%	11,6	116
Moinhos da Gândara	0	0,0%	1	100,0%	11,8	117,8
Paião	6	60,0%	4	40,0%	10	99,9
Quiaios	1	10,0%	9	90,0%	5,8	58,2
S. Pedro	3	25,0%	9	75,0%	42	41,2
Tavarede	8	16,0%	42	84,0%	88	880,7
Vila Verde	10	52,6%	9	47,4%	17,1	171,7

Tabela 2: Prevalência da dirofilariose canina por freguesia e respetiva densidade da população canina de acordo com os critérios da OMS [405] (n=276).

1.1.2. Métodos laboratoriais de diagnóstico

Todas as amostras foram submetidas a quatro técnicas laboratoriais de diagnóstico de *Dirofilaria immitis*:

- pesquisa de microfilárias circulantes: técnica de exame direto de sangue fresco, técnica do tubo de microhematócrito, técnica de Knott modificado (figura 2);
- pesquisa de antigénio: teste de imunodiagnóstico de ELISA Snapp® Idexx (figura 3).



A B

Figura 2: A - Microfilária de *D. immitis*, no exame directo de sangue fresco (400 x); B - Microfilária de *D.Immitis no* método de Knott modificado (400 x) (Original)

A B

Figura 3: Teste ELISA Snapp® Idexx – resultado negativo (A) ; resultado positivo (B) (Original).

Mediante a técnica de exame direto de sangue fresco e a técnica de tubo de microhematócrito, a prevalência de dirofilariose canina foi de 19,4% e 18,1%, respetivamente; na técnica de Knott modificado foi de 20,1% e no teste de ELISA Snapp® Idexx foi de 25,7% (tabela 3).

A sensibilidade da técnica de exame direto de sangue fresco foi de 71,1%, da técnica do microhematócrito foi de 66,3%, da técnica de Knott modificado foi de 73,5% e do teste de ELISA Snapp® Idexx foi de 94%. A especificidade foi de 100% para todos os testes (tabela 3 e gráfico 1).

Em relação aos valores preditivos dos testes laboratoriais constatou-se que o valor preditivo positivo de 100% foi idêntico em todos os testes e o valor preditivo negativo foi superior no teste de ELISA Snapp® Idexx (97,8%), seguido da técnica Knott modificado (90,9%) e, por fim, pela técnica de microhematocrito (88,8%) e exame direto de sangue fresco (90,2%).

Técnica	VP	VN	FP	FN	Se (%)	Sp (%)	VPP(%)	VPN(%)	Prevalência (%)
Sangue fresco	59	221	0	24	71,1	100	100	90,2	19,4
Microhematócrito	55	221	0	28	66,3	100	100	88,8	18,1
Knott modificado	61	221	0	22	73,5	100	100	90,9	20,1
ELISA Snapp® Idexx	78	221	0	5	94	100	100	97,8	25,7

Tabela 3: Resultado das diferentes técnicas laboratoriais e respectiva prevalência de *Dirofilaria immitis* por técnica (n=304). VP: verdadeiro positivo; VN: verdadeiro negativo; FP: falso positivo; FN: falso negativo; Se: sensibilidade; Sp: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.

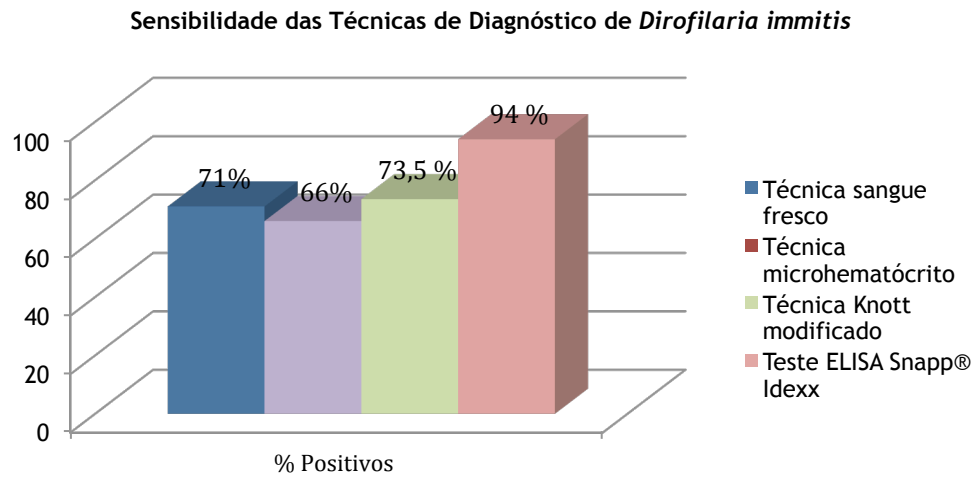


Gráfico 1: Sensibilidade das diferentes técnicas de diagnóstico de *Dirofilaria immitis*.

As medidas de avaliação dos testes de diagnóstico mostram que o teste ELISA Snapp® Idexx é largamente o mais fiável com 100% de especificidade e de valor preditivo positivo, com 94% de sensibilidade e com 97.8% de valor preditivo negativo.

Na tabela 4, observa-se o nível de concordância das diferentes técnicas de diagnóstico e o estado da infeção por *D. immitis*. Observa-se que o nível de concordância entre o exame sangue fresco (Kappa = 0.781; IC 95%: 0.699 e 0.863) e o estado efetivo da infeção com dirofilária era substancial, tal como a técnica do microhematócrito (Kappa = 0.741; IC 95%: 0.652 - 0.829). O método Knott modificado apresentava um nível de concordância elevado (Kappa = 0.801; IC 95%: 0.723 - 0.880) com o estado real, enquanto o Teste ELISA Snapp® Idexx (Kappa = 0.958; IC 95%: 0.921 - 0.994) apresentava uma concordância quase perfeita com o estado da dirofilária. Somente o Teste ELISA Snapp® Idexx não apresentou diferenças estatisticamente significativa (p>0.05) em relação ao estado da infeção de dirofilária.

		Estado Dirofilária		Total	Kappa	Kappa 95% CI		p^1
		Positivo	Negativo			LB	UB	
Exame sangue fresco	Negativo	24	221	245	0,781	0,699	0,863	0,000***
	Positivo	59	0	59				
	Total	83	221	304				
Exame microhematócrito	Negativo	28	221	249	0,741	0,652	0,829	0,000***
	Positivo	55	0	55				
	Total	83	221	304				
Método Knott modificado	Negativo	22	221	243	0,801	0,723	0,880	0,000***
	Positivo	61	0	61				
	Total	83	221	304				
Teste ELISA Snapp antigénio	Negativo	5	221	226	0,958	0,921	0,994	0,063
	Positivo	78	0	78				
	Total	83	221	304				

Tabela 4: Testes diagnóstico. [1]Teste do McNemar; * p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001.

As amostras dos 61 animais positivos na técnica de Knott modificado foram submetidas à técnica de coloração histoquímica por fosfatase ácida (kit Leucognost SP®). 59 das amostras demonstraram uma distribuição da actividade de fosfatase ácida típica da espécie *Dirofilaria immitis* (actividade limitada a faixas estreitas no poro excretor e anal) (figura 4) [199, 253]. Apenas em dois canídeos não foi possível obter uma coloração. Não se detectou nenhuma infecção mista, ou seja, infecção por mais de uma espécie de filária.

Figura 4: Coloração histoquímica por fosfatase ácida da *Dirofilaria immitis* (atividade limitada ao poro excretor e anal, indicados por setas vermelhas) (400 x) (Original).

O teste ELISA Snapp® Idexx é um teste semiquantitativo que permite quantificar o nível de antigénio (a carga parasitária) presente no animal infetado. Dos 78 animais que obtiveram uma resposta positiva no teste ELISA Snapp® Idexx, 27 (34,6%) tinham nível de antigénio baixo e 51 (65,4%) obtiveram nível antigénio alto (gráfico 2 e figura 5).

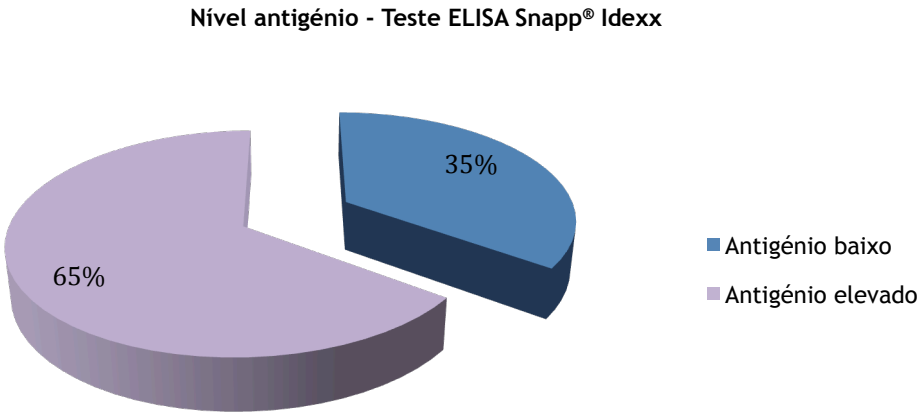
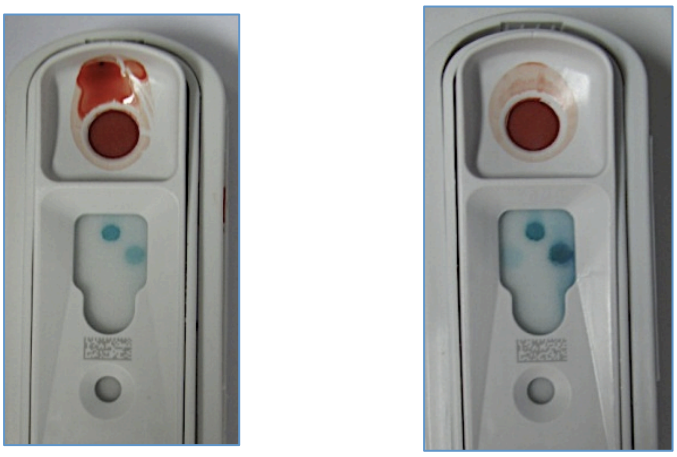


Gráfico 2: Representação gráfica da percentagem dos níveis de antigénio baixo e elevado do Teste ELISA Snapp® Idexx (n=78).



A. B.

Figura 5: Resultado do Teste ELISA Snapp® Idexx. A – Nível antigénio baixo; B- Nível antigénio elevado (Original).

1.1.3. Tipo de infeção

Dos 83 cães parasitados, 68,7% apresentavam resultado positivo na pesquisa de antigénio e microfilárias circulantes; 25,3% obtiveram resultados positivo na pesquisa de antigénio e negativa na pesquisa de microfilárias circulantes (infeção oculta), 6% não obtiveram um resultado positivo na pesquisa de antigénio mas obtiveram um resultado positivo na pesquisa de microfilárias (gráfico 3).

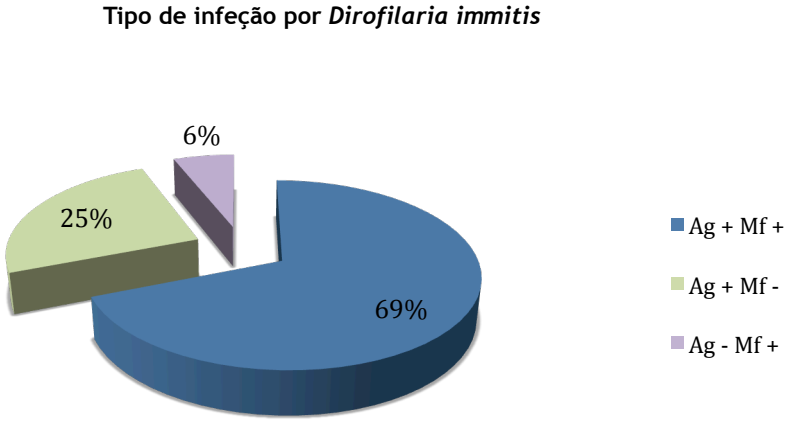


Gráfico 3: Prevalência da dirofilariose canina de acordo com o tipo de infeção por *D. immitis* (n=83).

1.1.3.1. Nível de antigénio segundo o tipo de infeção

Na tabela 5 apresenta-se a associação entre o nível de antigénio e o tipo de infeção por *D. immitis*. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tipos de infeção relativamente ao nível de antigénio (baixo *vs* alto).

		Nível Antigénio					p^1
		Baixo		Alto		Total	
		N	%	N	%	N	
Tipo de Infeção	Ag+/mf+	18	31,6%	39	68,4%	57	0,353
	Ag+/mf-	9	42,9%	12	57,1%	21	
	Total	27	34,6%	51	65,4%	78	

Tabela 5 - Nível de antigénio segundo o tipo de infeção por *Dirofilaria immitis*. Ag:antigénio, Mf:microfilárias. [1]Teste do Qui-Quadrado.

1.1.4. Fatores de risco

No presente estudo foram avaliados um total de 304 canídeos, 140 eram machos (46,1%) e 164 eram fêmeas (53,9%). Dos 104 machos, 40 obtiveram resultado positivo para *Dirofilaria immitis* (13,2%) e 43 fêmeas tiveram resultado positivo (14%) (tabela 6 e gráfico 4). A diferença da prevalência de dirofilariose canina entre os animais do género masculino e feminino não foi estatisticamente significativa (p=0,646).

Género	N	Positivo	Negativo
Masculino	140	40	100
Feminino	164	43	121
Total	304	83	221

Tabela 6: Distribuição relativa da dirofilariose canina de acordo com o género

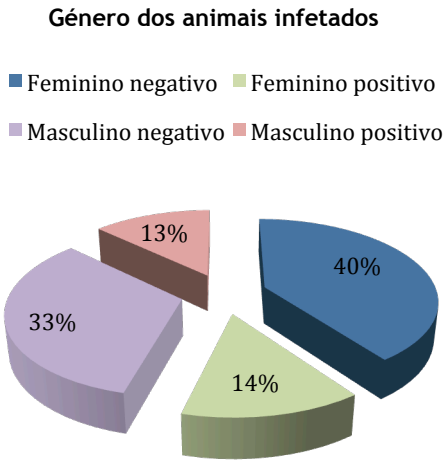


Gráfico 4: Percentagem de animais infetados e não infetados por *Dirofilaria immitis* de acordo com o género (n=304).

Relativamente à idade dos cães examinados (n = 297), foram testados animais com idades compreendidas entre 1 e 19 anos (anexo I.13). Foram agrupados em três faixas etárias: a primeira compreendeu os animais com idade inferior aos 4 anos; a segunda os animais com idade entre os 4 a 9 anos; e a terceira os animais com idade igual ou superior aos 10 anos. A prevalência da dirofilariose canina foi estimada para as três faixas, tal como consta na tabela 7, destacando-se uma prevalência entre 4 a 9 anos superior à média (p= 0,001) (gráfico 5).

Faixa Etária	Estado de Dirofilária				
	N	Positivos N	Positivos %	Negativos N	Negativos %
< 4 anos	78	11	14,1	67	85,9
Entre 4-9 anos	127	48	37,8	79	62,2
≥10 anos	92	23	25	69	75

Tabela 7: Distribuição relativa da dirofilariose canina consoante a faixa etária.

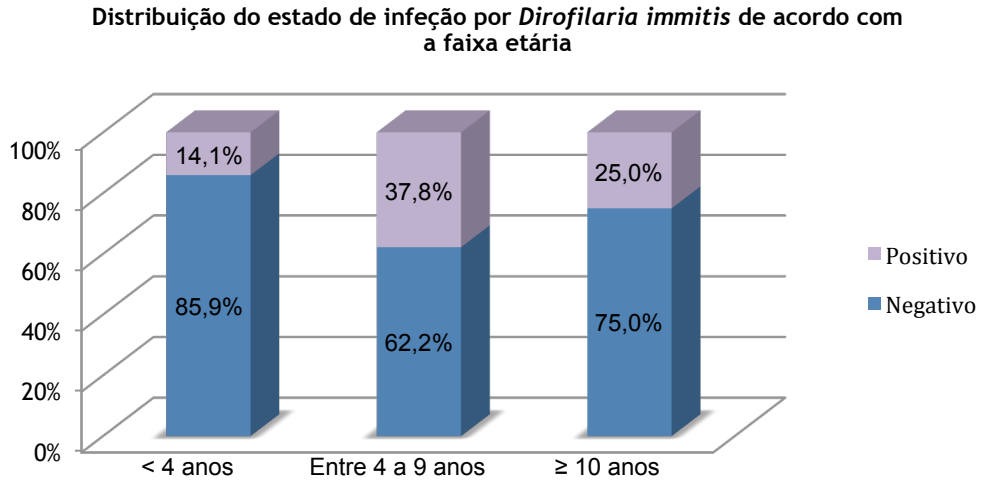


Gráfico 5: Distribuição relativa do estado de infeção por *D. immitis* de acordo com a faixa etária (n=297).

Em relação às caraterísticas dos cães que são fatores de risco com influência estatisticamente significativa (p <0.05) na infeção destacam-se o porte do cão, em que os cães de porte médio (34,7%) e porte grande (30,9%) obtiveram uma prevalência superior à média. A raça e tamanho do pelo não demonstraram influência estatisticamente significativa (tabela 8).

		Estado Dirofilária					p^1
		Positivo		Negativo		Total	
		N	%	N	%	N	
Raça- Pura / Indeterminada	Pura	35	27,6%	92	72,4%	127	0,932
	Indeterminada	48	27,1%	129	72,9%	177	
Porte do cão	Pequena (9,99kg)	20	17,4%	95	82,6%	115	0,009**
	Média - (10 a 24,99kg)	42	34,7%	79	65,3%	121	
	Grandes (≥25kg)	21	30,9%	47	69,1%	68	
Tamanho do Pelo	Curto	49	31,2%	108	68,8%	157	0,337
	Médio	20	23,8%	64	76,2%	84	
	Comprido	14	23,3%	46	76,7%	60	

Tabela 8: Caraterização epidemiológica da amostra de estudo em relação à infeção por *D. Immitis*.
[1]Teste do Qui-Quadrado; ** p < 0.01

Em relação às condições onde o cão vive (tabela 9), os cães que habitam em zona rural (38%) têm uma prevalência significativamente superior, bem como os cães que vivem em zonas com presença de vegetação (35,6%), em campos agrícolas (37,8%) e que vivem no exterior (37,7%). Em relação à atividade, os cães que são mantidos como cães de guarda (52,2%) e cães de caça (36,2%) mostraram uma prevalência

significativamente superior. A presença de proprietário não mostrou ter influência na prevalência da infecção. Por último, os cães que coabitam com outros animais vacinados de acordo como o esquema vacinal anual recomendado pelo médico veterinário (31%) têm uma prevalência significativamente superior (anexo I.14).

		Estado Dirofilária					p^1
		Positivo		Negativo		Total	
		N	%	N	%	N	
Presença Proprietário	Não	14	24,1%	44	75,9%	58	0,577
	Sim	68	27,8%	177	72,2%	245	
Zona urbana/rural	Zona Urbana	10	10,2%	88	89,8%	98	0,000***
	Zona Rural	49	38,0%	80	62,0%	129	
Presença Vegetação	Não	1	5,3%	18	94,7%	19	0,008**
	Sim	42	35,6%	76	64,4%	118	
Característica Geográfica	Mar	4	13,8%	25	86,2%	29	0,040*
	Rio	6	23,1%	20	76,9%	26	
	Campo agrícola	28	37,8%	46	62,2%	74	
Tipo Ambiente	Interior	11	10,3%	96	89,7%	107	0,000***
	Exterior	72	37,7%	119	62,3%	191	
Utilização	Estimação	32	20,3%	126	79,7%	158	0,001**
	Guarda	12	52,2%	11	47,8%	23	
	Caça	17	36,2%	30	63,8%	47	
Coabitante vacinado	Não	2	7,4%	25	92,6%	27	0,015*
	Sim	22	31,0%	49	69,0%	71	

Tabela 9: Caracterização epidemiológica do ambiente e utilização dos canídeos da amostra de estudo em relação à infeção por *D. Immitis*. [1]Teste do Qui-Quadrado; * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

	B	EP	*p*	OR	IC 95% - OR		Pseudo-R^2 Nagelkerke
					LI	LS	
Idade	0,12	0,05	,024*	1,12	1,02	1,24	0,377
Zona Rural	1,57	0,44	,000***	4,81	2,02	11,46	
Porte médio	0,89	0,44	,044*	2,44	1,03	5,81	
Porte grande	1,13	0,50	,025*	3,11	1,16	8,36	
Exterior	2,32	0,49	,000***	10,15	3,89	26,51	
Constante	-5,24	0,78	,000***	0,01			

Tabela 10 – Regressão logística: Variável dependente – estado dirofilaria (negativo vs positivo). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$; B: coeficiente estimado; EP: erro padrão do B; OR: *Odds Ratio*; IC: intervalo de confiança; LI: limite inferior; LS: limite superior.

A regressão logística permitiu identificar, em termos multivariados, como fatores de risco significativos para a presença de dirofilariose, a idade (OR = 1.12; IC 95%: 1.02 – 1.24; $p < 0.05$), viver em meio rural (OR = 4.81; IC 95%: 2.02 – 11.46; $p < 0.001$), ter porte médio (OR = 2.44; IC 95%: 1.03 – 5.81; $p < 0.05$) ou grande (OR =

3.11; IC 95%: 1.16 – 8.36; $p < 0.05$) e viver no exterior (OR = 10.15; IC 95%: 3.89 – 26.51; $p < 0.001$) (tabela 10).

Foram avaliados outros parâmetros clínicos, como a presença de outras doenças concomitantes, medicações realizadas, história prévia de cirurgia de esterilização, vacinação e desparasitação interna e externa, mas não mostraram alterações estatisticamente significativas, não sendo por isso considerados factores de risco (tabela 11).

		Estado Dirofilária					p^1
		Positivo		Negativo		Total	
		N	%	N	%	N	
Doença Anterior	Não	57	27,9%	147	72,1%	204	0,580
	Sim	8	33,3%	16	66,7%	24	
Medicação Anterior	Não	60	27,6%	157	72,4%	217	0,871
	Sim	3	30,0%	7	70,0%	10	
Castração	Não	61	30,5%	139	69,5%	200	0,075
	Sim	4	14,3%	24	85,7%	28	
Faz desparasitação interna	Não	31	27,9%	80	72,1%	111	0,751
	Sim	49	29,7%	116	70,3%	165	
Faz desparasitação externa	Não	32	31,1%	71	68,9%	103	0,608
	Sim	47	28,1%	120	71,9%	167	
Vacinação	Não	3	12,0%	22	88,0%	25	0,131
	Sim	18	26,9%	49	73,1%	67	

Tabela 11 - Dados clínicos dos cães testados para *Dirofilaria immitis*. [1]Teste do Qui-Quadrado.

Em relação à recolha de amostras pelos diferentes meses do ano (novembro de 2009 e janeiro de 2011), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (p =0,527) (gráfico 6).

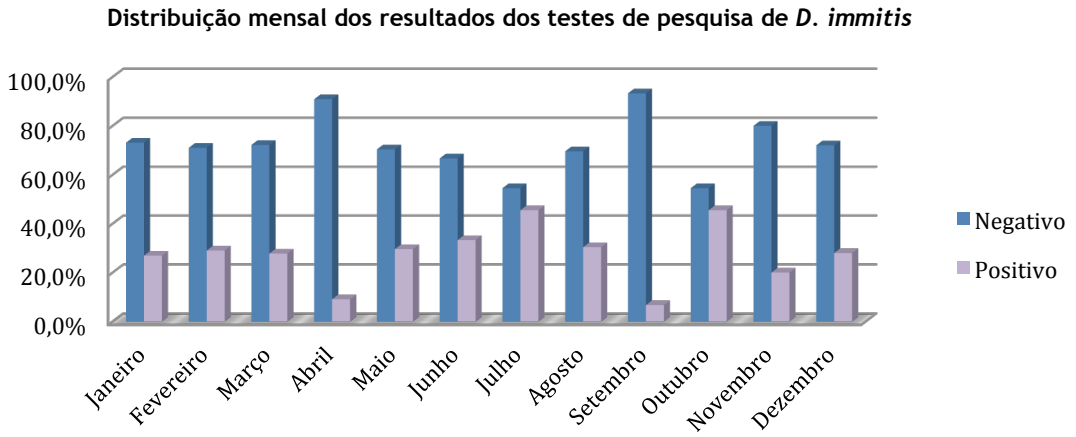


Gráfico 6: Distribuição dos resultados dos cães investigados de acordo com os meses do ano de 2010 (n=304).

1.1.5. História clínica e Exame físico.

Os resultados da aplicação do questionário da **história clínica** (anexo I.6) encontram-se descritos na tabela 12. Da sua aplicação é de salientar que 50% dos cães sintomáticos possuíam um estado positivo de dirofilária, significativamente superior (p<0.05) aos cães assintomáticos. Também é de realçar que 22,7% dos animais assintomáticos se encontravam parasitados (gráfico 7).

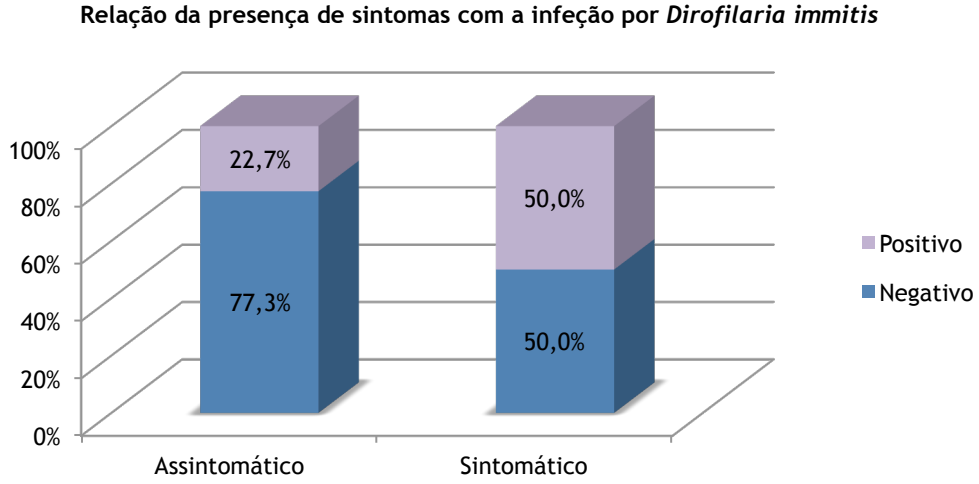


Gráfico 7: Relação da presença de sintomas com a infeção por *Dirofilaria immitis* (n=243).

Os sintomas mais frequente, neste estudo, foram sintomas gerais, como anorexia (63,6%), apatia (63,2%), perda de peso (50%), e sintomas cardiorespiratórios (53,3%), como a tosse e a dispneia. A presença de tosse e sinais neurológicos foram estatisticamente significativos em cães com dirofilariose (p<0,05) (tabela 12).

		Estado Dirofilária				Total	p^1
		Positivo		Negativo			
		N	%	N	%	N	
Sintomas	Assintomático	45	22,7%	153	77,3%	198	0,000***
	Sintomático	25	50,0%	25	50,0%	50	
Perda Peso	Não	29	65,9%	15	34,1%	44	0,212
	Sim	11	50,0%	11	50,0%	22	
Anorexia	Não	29	64,4%	16	35,6%	45	0,948
	Sim	14	63,6%	8	36,4%	22	
Apatia	Não	31	63,3%	18	36,7%	49	0,750
	Sim	12	63,2%	7	36,8%	19	
Sintomas Cardíacos e Respiratórios	Não	27	67,5%	13	32,5%	40	0,228
	Sim	16	53,3%	14	46,7%	30	
Intolerância Exercício	Não	34	69,4%	15	30,6%	49	0,109
	Sim	7	46,7%	8	53,3%	15	
Tosse	Não	35	72,9%	13	27,1%	48	0,006**
	Sim	8	38,1%	13	61,9%	21	
Dispneia	Não	38	63,3%	22	36,7%	60	0,327
	Sim	5	83,3%	1	16,7%	6	
Síncope	Não	43	66,2%	22	33,8%	65	0,168
	Sim	0	,0%	1	100,0%	1	
Distensão abdominal	Não	39	62,9%	23	37,1%	62	0,131
	Sim	4	100,0%	0	,0%	4	
Sintomas Gastrointestinais	Não	37	62,7%	22	37,3%	59	0,819
	Sim	6	66,7%	3	33,3%	9	
Vómitos	Não	37	63,8%	21	36,2%	58	0,867
	Sim	6	66,7%	3	33,3%	9	
Diarreia	Não	39	66,1%	20	33,9%	59	0,638
	Sim	4	57,1%	3	42,9%	7	
Sintomas Neurológicos	Não	41	67,2%	20	32,8%	61	0,035*
	Sim	1	20,0%	4	80,0%	5	

Tabela 12: Parâmetros da historia clínica dos animais testados.[1]Teste do Qui-Quadrado; * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

Em relação **ao exame físico** realizado (anexo I.7), os cães com atitude alterada (43.6%) tinham uma prevalência significativamente superior ($p<0.05$), estando a dirofilária presente, principalmente, em cães deprimidos (45.9%) (tabela 13).

		Estado Dirofilária				Total	p^1
		Positivo		Negativo			
		N	%	N	%	N	
Atitude	Normal	66	24,9%	199	75,1%	265	0,014*
	Alterada	17	43,6%	22	56,4%	39	
Tipo Atitude	Alerta	66	24,9%	199	75,1%	265	0,018*
	Deprimido	17	45,9%	20	54,1%	37	
	Hiperexcitado	0	,0%	2	100,0%	2	

Tabela 13: Atitude os cães testados de acordo com o estado de dirofilária.
[1]Teste do Qui-Quadrado; * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

Em relação aos parâmetros do **exame físico,** os cães com aumento do TRC (66.7%), com sinais de desidratação (50%), com diminuição da condição corporal (38.2%) também tinham uma prevalência significativamente superior ($p < 0,05$) (tabela 14).

		Estado Dirofilária				Total	p^1
		Positivo		Negativo			
		N	%	N	%	N	
Mucosas	Normal	69	25,7%	200	74,3%	269	0,056
	Anormal	14	41,2%	20	58,8%	34	
Alteração da mucosa	Normal	67	25,1%	200	74,9%	267	0,013*
	Hiperémica	4	23,5%	13	76,5%	17	
	Pálida	7	53,8%	6	46,2%	13	
	Cianótica	1	100,0%	0	,0%	1	
	Ictérica	3	75,0%	1	25,0%	4	
TRC	Normal	61	26,1%	173	73,9%	234	0,027*
	Aumentado	4	66,7%	2	33,3%	6	
Hidratação	Normal	71	25,6%	206	74,4%	277	0,024*
	Desidratado	9	50,0%	9	50,0%	18	
Condição corporal	Normal	34	21,7%	123	78,3%	157	0,016*
	Aumentada	12	23,5%	39	76,5%	51	
	Diminuída	34	38,2%	55	61,8%	89	
Escala Condição Corporal	Muito baixo	10	55,6%	8	44,4%	18	0,014*
	Baixo	24	34,3%	46	65,7%	70	
	Normal	33	21,2%	123	78,8%	156	
	Aumentado	8	22,2%	28	77,8%	36	
	Muito aumentado	4	26,7%	11	73,3%	15	

Tabela 14:Parâmetros do exame físico de acordo com o estado de dirofilária. [1]Teste do Qui-Quadrado; * $p<0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

Alterações na auscultação cardíaca (48.8%), como a presença de sopro cardíaco (48.7%), tal como alterações na auscultação pulmonar (66.7%), alteração de pulso

(85.7%), alterações na temperatura corporal e alterações na palpação abdominal (48.1%), como a presença de ascite (100%) e má condição do pelo (42,4%) tinham uma prevalência significativamente superior ($p < 0.05$) (tabela 15).

		Estado Dirofilária				Total	p^1
		Positivo		Negativo			
		N	%	N	%	N	
Auscultação Cardíaca	Normal	62	24,3%	193	75,7%	255	0,001**
	Alterada	21	48,8%	22	51,2%	43	
Sopro cardíaco	Não	64	24,9%	193	75,1%	257	0,002**
	Sim	19	48,7%	20	51,3%	39	
Auscultação Pulmonar	Normal	75	26,5%	208	73,5%	283	0,002**
	Alterada	8	66,7%	4	33,3%	12	
Pulso	Normal	70	25,9%	200	74,1%	270	0,000***
	Alterado	6	85,7%	1	14,3%	7	
Distensão Jugular	Ausente	69	27,3%	184	72,7%	253	0,022*
	Presente	2	100,0%	0	,0%	2	
Tipo Temp.	Normal	40	25,0%	120	75,0%	160	0,001**
	Aumentado	10	40,0%	15	60,0%	25	
	Diminuído	9	75,0%	3	25,0%	12	
Pelo	Normal	69	25,6%	201	74,4%	270	0,040*
	Alterado	14	42,4%	19	57,6%	33	
Palpação Abdominal	Normal	69	25,2%	205	74,8%	274	0,011*
	Alterado	13	48,1%	14	51,9%	27	
Ascite	Ausente	78	26,4%	218	73,6%	296	0,000***
	Presente	5	100,0%	0	,0%	5	
Hepato/Esplenomegália	Ausente	81	27,3%	216	72,7%	297	0,527
	Presente	2	40,0%	3	60,0%	5	
Gânglio Linfáticos	Normal	78	27,0%	211	73,0%	289	0,365
	Alterado	5	38,5%	8	61,5%	13	

Tabela 15: Parâmetro do exame físico de acordo com o estado de infeção por *Dirofilaria immitis*.[1]Teste do Qui-Quadrado; * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

1.1.6. Classificação da severidade da dirofilariose nos cães de acordo com os sinais clínicos.

Dos 83 cães que testaram positivo para *Dirofilaria immitis,* 37 (44,6%) apresentavam sinais clínicos ligeiros (grau I); 28 (33,7%) sinais clínicos moderados (grau II); 11 (13,3%) sinais clínicos severos (grau III) e 7 (8,4%) sinais clínicos muito severos (grau IV – síndrome da veia cava) (gráfico 8).

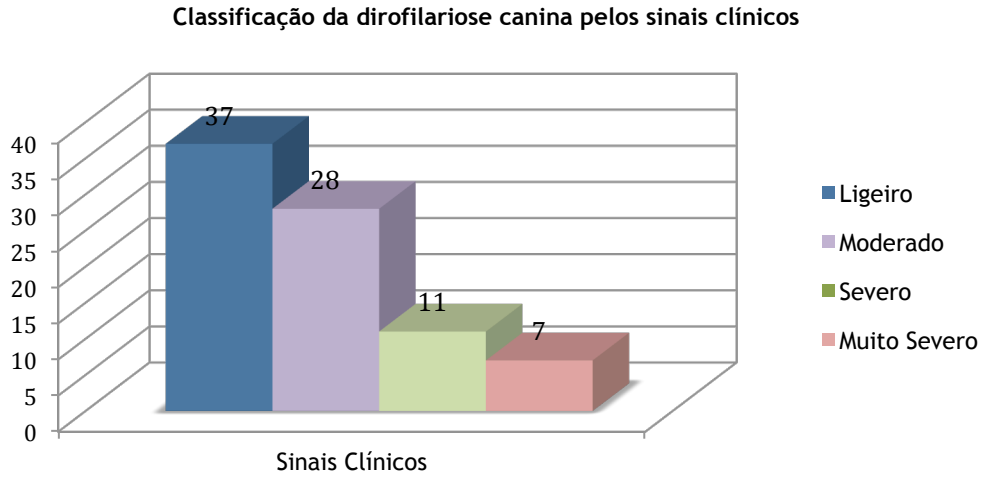


Gráfico 8: Classificação da dirofilariose canina de acordo com os sinais clínicos (n=83).

Em relação à associação entre o nível de antigénio e a classificação da severidade da dirofilariose, verifica-se uma associação estatisticamente significativa (p<0.05) (tabela 16). Nos cães com nível baixo de antigénio, em 66.7% a classificação era ligeira. Enquanto que em cães com níveis altos de antigénio só em 29,4% deles, a classificação era ligeira. A classificação severa e muito severa apenas está presente em cães com níveis de infeção elevada (p= 0,002) (gráfico 9).

		Ligeira		Moderada		Severa		Muito Severo		Total	p^1
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	
Nível Antigénio	Baixo	18	66,7%	9	33,3%	0	,0%	0	,0%	27	0,002**
	Alto	15	29,4%	18	35,3%	11	21,6%	7	13,7%	51	
	Total	33	42,3%	27	34,6%	11	14,1%	7	9,0%	78	

Tabela 16: Associação entre o nível de antigénio e a classificação da severidade da dirofilariose.[1]Teste do Qui-Quadrado; * p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001.

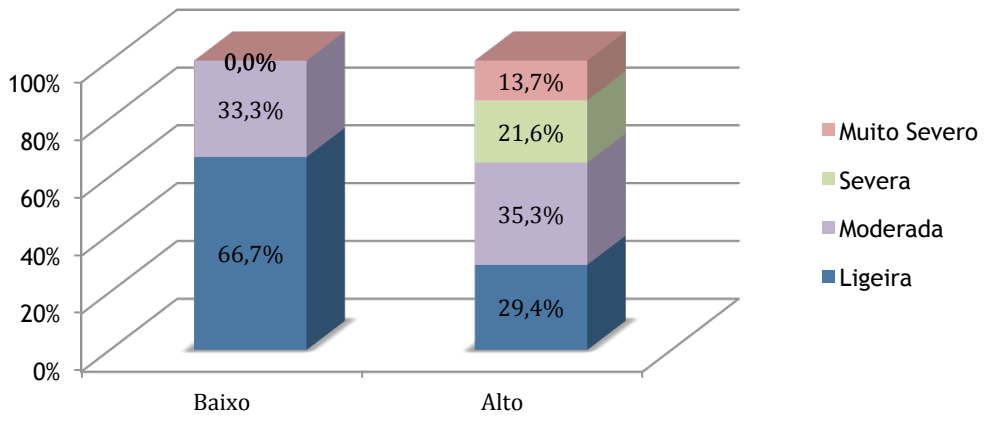


Gráfico 9: Associação entre o nível de antigénio e a classificação da severidade da dirofilariose (n=78).

Não se verificou relação estatisticamente significativa entre a classificação da severidade de dirofilariose com o tipo de infeção (tabela 17).

		Ligeira		Moderada		Severa		Muito Severo		Total	p^1
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	
Tipo de Infeção Dirofilária	Ag+/Mf+	23	40,4%	21	36,8%	7	12,3%	6	10,5%	57	0,599
	Ag+/Mf-	10	47,6%	6	28,6%	4	19,0%	1	4,8%	21	
	Ag-/Mf+	4	80,0%	1	20,0%	0	,0%	0	,0%	5	
	Total	37	44,6%	28	33,7%	11	13,3%	7	8,4%	83	

Tabela 17: Relação da classificação da severidade de dirofilariose com o tipo de infeção. Ag: antigénio.Mf: microfilárias. [1]Teste do Qui-Quadrado; * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

1.1.6.1. Classe de severidade da dirofilariose vs Fatores de riscos

	B	EP	*p*	IC 95% - B		Pseudo-R^2 Nagelkerke
				LI	LS	
Idade	0,07	0,02	0,003**	0,02	0,11	0,654
Zona Rural	0,68	0,19	0,000***	0,31	1,05	
Tamanho médio	0,40	0,19	0,039*	0,02	0,78	
Tamanho grande	0,43	0,22	0,049*	0,01	0,87	
Exterior	1,13	0,20	0,000***	0,74	1,52	

Tabela 18: Regressão Ordinal: Variável dependente - Estado Dirofilária (Sem dirofilariose, Ligeira, Moderada, Severa e Muito Severa). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$; B: Coeficiente estimado; EP: Erro Padrão do B; IC: Intervalo de Confiança; LI: Limite Inferior; LS: Limite Superior.

O primeiro modelo de regressão ordinal (tabela 18) estimado permitiu identificar, em termos multivariados, como fatores de risco estatisticamente significativos ($p < 0.05$) para a presença e classificação de dirofilariose: a idade (B = 0.07; IC 95%: 0.02 – 0.11; $p < 0.01$), viver em meio rural (B = 0.68; IC 95%: 0.31 – 1.05; $p < 0.001$), ter tamanho médio (B = 0.40; IC 95%: 0.02 – 0.78; $p < 0.05$) ou grande (B = 0.43; IC 95%: 0.01 – 0.87; $p < 0.05$) e viverem no exterior (B = 1.13; IC 95%: 0.74 – 1.52; $p < 0.001$). Estes resultados estão de acordo com os observados na regressão logística.

Em relação à regressão ordinal com vista à determinação dos fatores que influenciam estatisticamente a classificação de dirofilariose, a idade (B = 0.23; IC 95%: 0.06 – 0.40; $p < 0.001$) e viverem em meio rural (B = 1.56; IC 95%: 0.07 – 3.04; $p < 0.05$) são as variáveis que aumentam a probabilidade de se verificarem as classes mais elevadas de dirofilariose (tabela 19).

	B	EP	*p*	IC 95% - B		Pseudo-R^2 Nagelkerke
				LI	LS	
Idade	0,23	0,09	0,008**	0,06	0,40	0,109
Zona Rural	1,56	0,76	0,040*	0,07	3,04	

Tabela 19: Regressão Ordinal: Variável dependente - Classificação da Dirofilária (Ligeira, Moderada, Severa e Muito Severa) * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$; B: Coeficiente estimado; EP: Erro Padrão do B; IC: Intervalo de Confiança; LI: Limite Inferior; LS: Limite Superior.

1.1.6.2. Classe de severidade da doença vs história clínica

Na tabela 20, está representada a relação entre os diferentes sintomas recolhidos na aplicação do questionário da história clínica (anexo I.7) e a classificação da severidade da doença. Observam-se diferenças estatisticamente significativa (p <0.05), realçando que 90% e 100% dos cães de classe severa e muito severa, respectivamente, eram sintomáticos (tabela 20).

		Classificação								p^1
		Ligeiro		Moderado		Severo		Muito Severo		
		N	%	N	%	N	%	N	%	
Sintomas	Assintomático	26	89,7%	18	75,0%	1	9,1%	0	,0%	0,000***
	Sintomático	3	10,3%	6	25,0%	10	90,9%	6	100,0%	

Tabela 20: Presença de sintomas segundo a classe da doença. [1]Teste do Qui-Quadrado; * p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001.

		Classificação								p^1
		Ligeiro		Moderado		Severo		Muito Severo		
		N	%	N	%	N	%	N	%	
Perda Peso	Não	8	88,9%	14	93,3%	5	50,0%	2	33,3%	0,009**
	Sim	1	11,1%	1	6,7%	5	50,0%	4	66,7%	
Anorexia	Não	10	100,0%	12	75,0%	5	45,5%	2	33,3%	0,013*
	Sim	0	,0%	4	25,0%	6	54,5%	4	66,7%	
Apatia	Não	9	90,0%	13	76,5%	7	63,6%	2	33,3%	0,096
	Sim	1	10,0%	4	23,5%	4	36,4%	4	66,7%	
Sintomas Cardíacos e Respiratórios	Não	10	100,0%	14	87,5%	3	27,3%	0	,0%	0,000***
	Sim	0	,0%	2	12,5%	8	72,7%	6	100,0%	
Intolerância Exercício	Não	9	100,0%	15	100,0%	5	45,5%	5	83,3%	0,001**
	Sim	0	,0%	0	,0%	6	54,5%	1	16,7%	
Tosse	Não	10	100,0%	14	87,5%	7	63,6%	4	66,7%	0,120
	Sim	0	,0%	2	12,5%	4	36,4%	2	33,3%	
Dispneia	Não	10	100,0%	16	100,0%	10	90,9%	2	33,3%	0,000***
	Sim	0	,0%	0	,0%	1	9,1%	4	66,7%	
Distensão abdominal	Não	10	100,0%	16	100,0%	11	100,0%	2	33,3%	0,000***
	Sim	0	,0%	0	,0%	0	,0%	4	66,7%	
Sintomas Gastrointestinais	Não	9	90,0%	14	87,5%	9	81,8%	5	83,3%	0,949
	Sim	1	10,0%	2	12,5%	2	18,2%	1	16,7%	
Vómitos	Não	9	90,0%	14	87,5%	9	81,8%	5	83,3%	0,949
	Sim	1	10,0%	2	12,5%	2	18,2%	1	16,7%	
Diarreia	Não	9	90,0%	15	93,8%	10	90,9%	5	83,3%	0,904
	Sim	1	10,0%	1	6,3%	1	9,1%	1	16,7%	
Sintomas Neurológico	Não	9	90,0%	15	100,0%	11	100,0%	6	100,0%	0,351
	Sim	1	10,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%	

Tabela 21. Parâmetros da história clínica segundo a classe da doença. [1]Teste do Qui-Quadrado; p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001.

Em relação aos diferentes sintomas, observaram-se diferenças estatisticamente significativas (p <0.05) entre as classes de severidade da dirofilariose com a perda de peso, anorexia, sintomas cardiacos e respiratórios, intolerância ao exercício, dispneia e distensão abdominal (tabela 21). Foram avaliados outros parâmetros na história clínica, mas não mostraram significados estatístico.

1.1.6.3. Classe da severidade da doença vs exame físico.

Na tabela 22, são apresentados os resultados do exame físico (anexo I.7) segundo a classificação da doença. Existem diferenças estatisticamente significativas (p< 0.05) entre as classificações da doença na atitude, nas mucosas, na TRC, na condição corporal, na auscultação cardíaca, na presença de sopro cardíaco, na auscultação pulmonar, no pulso, na presença de distensão jugular, na temperatura, na palpação abdominal, na presença de ascite e na presença de hepato-esplenomegalia. Foram avaliados outros parâmetros clínicos que não mostraram significado estatístico

		Classificação								p^1
		Ligeiro		Moderado		Severo		Muito Severo		
		N	%	N	%	N	%	N	%	
Atitude	Normal	31	93,9%	26	81,3%	7	58,3%	2	33,3%	0,001**
	Anormal	2	6,1%	6	18,8%	5	41,7%	4	66,7%	
Tipo Atitude	Alerta	31	93,9%	26	81,3%	7	58,3%	2	33,3%	0,001**
	Deprimido	2	6,1%	6	18,8%	5	41,7%	4	66,7%	
Mucosas	Normal	31	93,9%	29	90,6%	8	66,7%	1	16,7%	0,000***
	Anormal	2	6,1%	3	9,4%	4	33,3%	5	83,3%	
Alteração da mucosa	Normal	31	93,9%	28	87,5%	7	63,6%	1	16,7%	0,000***
	Hiperémica	2	6,1%	2	6,3%	0	,0%	0	,0%	
	Pálida	0	,0%	2	6,3%	2	18,2%	3	50,0%	
	Cianótica	0	,0%	0	,0%	1	9,1%	0	,0%	
	Ictérica	0	,0%	0	,0%	1	9,1%	2	33,3%	
TRC	Normal	28	100,0%	21	95,5%	9	100,0%	3	50,0%	0,000***
	Anormal	0	,0%	1	4,5%	0	,0%	3	50,0%	
Hidratação	Normal	29	96,7%	29	90,6%	11	91,7%	2	33,3%	0,000***
	Anormal	1	3,3%	3	9,4%	1	8,3%	4	66,7%	
Condição corporal	Normal	15	50,0%	11	34,4%	7	58,3%	1	16,7%	0,009**
	Aumentada	9	30,0%	2	6,3%	0	,0%	1	16,7%	
	Diminuída	6	20,0%	19	59,4%	5	41,7%	4	66,7%	
Porte do Cão	Pequena	9	27,3%	8	25,0%	2	16,7%	2	33,3%	0,916
	Média	16	48,5%	16	50,0%	5	41,7%	3	50,0%	
	Grande	8	24,2%	8	25,0%	5	41,7%	1	16,7%	
Auscultação Cardíaca	Normal	29	87,9%	28	87,5%	4	33,3%	1	16,7%	0,000***
	Anormal	4	12,1%	4	12,5%	8	66,7%	5	83,3%	

Sopro cardíaco	Não	29	87,9%	29	90,6%	5	41,7%	1	16,7%	0,000***
	Sim	4	12,1%	3	9,4%	7	58,3%	5	83,3%	
Auscultação Pulmonar	Normal	33	100,0%	32	100,0%	7	58,3%	3	50,0%	0,000***
	Anormal	0	,0%	0	,0%	5	41,7%	3	50,0%	
Pulso	Normal	32	100,0%	29	96,7%	7	77,8%	2	40,0%	0,000***
	Anormal	0	,0%	1	3,3%	2	22,2%	3	60,0%	
Distensão Jugular	Ausente	30	100,0%	27	100,0%	8	100,0%	4	66,7%	0,000***
	Presente	0	,0%	0	,0%	0	,0%	2	33,3%	
Temp.	Normal	16	64,0%	13	76,5%	10	90,9%	1	16,7%	0,004**
	Aumentado	7	28,0%	2	11,8%	0	,0%	1	16,7%	
	Diminuído	2	8,0%	2	11,8%	1	9,1%	4	66,7%	
Pelo	Normal	30	90,9%	25	78,1%	9	75,0%	5	83,3%	0,464
	Anormal	3	9,1%	7	21,9%	3	25,0%	1	16,7%	
Palpação Abdominal	Normal	29	87,9%	28	90,3%	10	83,3%	2	33,3%	0,005**
	Anormal	4	12,1%	3	9,7%	2	16,7%	4	66,7%	
Presença Ascite	Ausente	33	100,0%	31	96,9%	12	100,0%	2	33,3%	0,000***
	Presente	0	,0%	1	3,1%	0	,0%	4	66,7%	
Hepato Esplenomegália	Ausente	33	100,0%	32	100,0%	12	100,0%	4	66,7%	0,000***
	Presente	0	,0%	0	,0%	0	,0%	2	33,3%	
Gânglio Linfáticos	Normal	30	90,9%	31	96,9%	12	100,0%	5	83,3%	0,393
	Anormal	3	9,1%	1	3,1%	0	,0%	1	16,7%	

Tabela 22 – Parâmetros do exame físico segundo a classe da doença. [1]Teste do Qui-Quadrado; $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.0011$.

1.1.7. Análises sanguíneas

1.1.7.1. Análises hematológicas

Na tabela 23, são apresentadas as estatísticas descritivas e intervalos com 95% de confiança (IC) para a média das variáveis hematológicas do hemograma. Apenas nos glóbulos brancos se observou uma média (17.6 m/mm^3) superior aos valores normais desta variável (6 – 17 m/mm^3), contudo o IC 95% variava entre 15.7 m/mm^3 e 19.5 m/mm^3.

No que respeita às alterações nas variáveis do hemograma (anexo I.15), 41,8% dos animais apresentava aumento dos glóbulos brancos, 24,1% apresentava aumento dos granulócitos, 44,3% hemoconcentração e 44,9% trombocitopénia.

	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	DP	IC 95% - Média		Valores de referência
						LI	LS	
GB m/mm^3	17,6	15,7	5,9	43,3	8,6	15,7	19,5	6-17
Linfócito %	24,0	22,2	7,7	51,3	8,8	22,0	26,0	10-30
Monócito %	2,5	2,5	0,8	4,5	0,8	2,3	2,7	2-10
Granulócito %	73,5	75,5	45,0	91,2	9,3	71,4	75,6	50-80
Linfócitos m/mm^3	4,1	3,6	1,2	20,6	2,7	3,5	4,7	0,6-5,1
Monócito m/mm^3	0,4	0,4	0,2	1,5	0,3	0,4	0,5	0,1-1,7
Granulócito m/mm^3	13,2	11,4	4,2	35,4	6,9	11,6	14,7	3-13,6
GV m/mm^3	7,7	7,6	2,4	12,3	1,9	7,3	8,2	5,5-8,5
VCM fl	69,6	70,2	51,9	78,8	4,4	68,6	70,6	58-73
Hematócrito %	54,0	52,7	16,0	94,6	14,2	50,8	57,2	35-55
MCH pg	19,7	19,6	15,4	27,4	1,8	19,3	20,1	19,5-24,5
MCCH g/dl	28,3	28,6	20,5	34,8	2,1	27,9	28,8	28-40
IDV	10,3	10,3	8,0	12,5	0,9	10,1	10,5	8-12
Hgb g/dl	15,2	15,1	3,9	23,5	3,6	14,4	16,0	10-18
Plaquetas m/mm^3	144,6	125,5	24,0	373,0	83,9	125,7	163,5	120-600
VMP plaq fl	8,4	8,4	5,4	9,3	0,5	8,3	8,5	5-12
IDP	9,2	9,5	0,0	11,3	2,0	8,7	9,7	6-10

Tabela 23: Estatística descritiva e intervalo de confiança de 95% para as variáveis hematológicas nos cães parasitados por *Dirofilaria immitis* (n=79). DP: Desvio Padrão; IC: Intervalo de Confiança; LI: Limite Inferior; LS: Limite Superior;GB: glóbulos brancos; GV: glóbulos vermelhos; VCM: volume corpuscular médio; MCH: hemoglobina corpuscular média; MCCH: concentração média de hemoglobina; IDP: índice de distribuição das plaquetas.

Na tabela 24, são apresentadas as estatísticas descritivas das variáveis hematológicas para cada uma das classificações de severidade da dirofilária. Através do teste LSD observou-se que somente existem diferenças estatisticamente significativas ($p< 0.05$) entre as classes de severidade de dirofilária nos glóbulos brancos, nos monócitos mm/m^3 e nos granulócitos mm/ m^3.

	Classificação								p^1
	Ligeiro		Moderado		Severo		Muito Severo		
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Hematócrito %	51,58	11,83	47,86	13,94	46,73	15,92	42,42	7,13	0,609
GB m/mm^3	16,45	7,76	15,71	5,95	17,25	7,43	36,91	7,85	0,000***
Linfócito %	26,47	9,68	24,49	6,89	19,38	9,00	16,02	5,38	0,071
Monócito %	2,56	0,78	2,53	0,61	2,45	1,01	1,96	0,72	0,741
Granulócito %	70,97	10,24	72,98	7,29	78,17	9,56	82,02	6,00	0,092
Linfócitos m/mm^3 [2]	4,30	3,29	3,78	1,58	3,46	2,90	5,99	2,64	0,072
Monócito m/mm^3	0,41	0,27	0,39	0,16	0,42	0,28	0,74	0,38	0,004**
Granulócito m/mm3	11,92	5,70	11,54	4,77	13,36	5,51	30,18	6,05	0,000***
GV m/mm^3	8,23	1,81	7,43	1,69	7,94	2,29	6,18	1,17	0,118
VCM fl	70,18	4,69	69,53	3,99	68,78	4,89	68,52	3,63	0,950
MCH pg	19,72	1,60	19,75	1,96	19,22	2,02	20,06	1,29	0,950
MCCH g/dl	28,20	2,11	28,43	1,90	28,04	2,64	29,42	2,51	0,995
IDV	10,11	0,93	10,29	0,79	10,87	0,94	10,14	0,62	0,081
Hgb g/dl	16,23	3,58	14,69	3,50	14,80	4,09	12,34	1,96	0,096
Plaquetas m/mm^3	162,32	81,37	129,33	81,45	149,92	102,49	113,60	57,61	0,909
VMP plaq fl	8,36	0,61	8,40	0,33	8,39	0,27	8,36	0,58	0,911
IDP [2]	9,37	1,18	9,54	0,98	7,91	4,20	9,63	0,15	0,986

Tabela 24: Estatística descritiva para as variáveis hematológicas segundo a classe da doença (n=79). GB: glóbulos brancos; GV: glóbulos vermelhos; VCM: volume corpuscular médio; MCH: hemoglobina corpuscular média; MCCH: concentração média de hemoglobina; IDP: índice de distribuição das plaquetas. [1]Teste one-way ANOVA; [2] Teste Kruskal-Wallis; DP: Desvio Padrão * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

No que respeita às alterações nas variáveis hematológicas (tabela 25), observam-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) entre as classes de dirofilária no que respeita aos glóbulos brancos, aos monócitos em % e em m/m^3, bem como aos granulócitos em m/m^3.

		Classificação								p^1
		Ligeiro		Moderado		Severo		Muito Severo		
		N	%	N	%	N	%	N	%	
GB m/mm^3	Normal	21	65,6%	20	66,7%	4	33,3%	0	,0%	0,012*
	Aumentado	11	34,4%	10	33,3%	7	58,3%	5	100,0%	
	Diminuído	0	,0%	0	,0%	1	8,3%	0	,0%	
Linfócitos %	Normal	20	62,5%	24	80,0%	8	66,7%	4	80,0%	0,088
	Aumentado	11	34,4%	6	20,0%	2	16,7%	0	,0%	
	Diminuído	1	3,1%	0	,0%	2	16,7%	1	20,0%	
Monócito %	Normal	23	71,9%	24	80,0%	6	50,0%	1	20,0%	0,025*
	Aumentado	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%	
	Diminuído	9	28,1%	6	20,0%	6	50,0%	4	80,0%	
Monócito m/mm^3	Normal	23	71,9%	25	83,3%	7	58,3%	1	20,0%	0,023*
	Aumentado	0	,0%	0	,0%	1	8,3%	0	,0%	
	Diminuído	9	28,1%	5	16,7%	4	33,3%	4	80,0%	
Granulócitos m/mm^3	Normal	25	78,1%	25	83,3%	7	58,3%	1	20,0%	0,038*
	Aumentado	6	18,8%	5	16,7%	4	33,3%	4	80,0%	
	Diminuído	1	3,1%	0	,0%	1	8,3%	0	,0%	

Tabela 25: Alteração nas variáveis hematológicas segundo a classe da doença (n=79). GB:glóbulos brancos [1]Teste do Qui-Quadrado; * $p < .05$ ** $p < .01$ *** $p < .001$.

1.3.7.2. Análises bioquímicas

Na tabela 26, são apresentadas as estatísticas descritivas e intervalos com 95% de confiança para a média das variáveis bioquímicas. Apenas nas globulinas se verificou uma média (4,7 g/dl) superior aos valores normais desta variável (2,3 – 4,5 g/dl), e o IC 95% variava entre 4,47 e 4,9 g/dl.

	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	DP	IC 95% - Média		Valores de Referência
							LI	LS	
ALT UI/L	60	58,1	24,0	10,0	557,0	99,5	32,6	83,6	< 100
Fosfatase Alcalina UI/L	65	101,7	60,0	12,0	1440,0	180,4	57,0	146,4	0 - 62
Creatinina mg/dl	68	1,3	1,0	0,5	5,1	0,9	1,1	1,5	0,8 -2
Albumina g/dl	67	2,8	2,8	1,1	3,7	0,5	2,7	2,9	1,8 - 3,6
Proteínas Totais g/dl	73	7,5	7,6	4,0	10,0	1,0	7,3	7,8	5,9-7,6
Globulinas g/dl	66	4,7	4,7	2,9	7,1	0,9	4,5	4,9	3,4 - 5,2

Tabela 26 - Estatisticas descritivas e intervalo de confiança 95% para as variáveis bioquímicas nos cães parasitados por *Dirofilaria immitis*. DP: Desvio Padrão; IC: Intervalo de Confiança; LI: Limite Inferior; LS: Limite Superior; ALT: Alanina aminotransferase

No que respeita às alterações nas variáveis do bioquímicas (anexo I.16), 51,5 % apresentava aumento das globulinas, 42,5% aumento das proteinas totais, 14,9% diminuição da albumina.

Na tabela 27, estão representadas as estatísticas descritivas das variáveis

bioquímicas para cada uma das classes de dirofilária. Através do teste LSD observou-se que somente existem diferenças estatisticamente significativas (p<0.05) entre as classes de severidade de dirofilária na fosfatase alcalina, na albumina e nas proteínas totais.

	N Válido	Classificação								p^1
		Ligeiro		Moderado		Severo		Muito Severo		
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
ALT UI/L[2]	60	39,30	51,73	81,30	135,01	24,11	25,80	81,75	97,86	0,207
Fosfatase Alcalina UI/L	65	88,76	65,46	61,55	37,02	201,90	436,15	188,40	120,29	0,002**
Creatinina mg/dl[2]	68	1,28	0,91	1,30	0,93	1,32	0,97	1,10	0,32	0,949
Albumina g/dl	67	2,97	0,42	2,76	0,43	2,65	0,61	2,22	0,34	0,012*
Proteínas Totais g/dl	73	7,78	0,73	7,45	1,15	7,66	0,84	6,48	1,03	0,031*
Globulinas g/dl	66	4,82	0,94	4,62	0,91	4,79	0,69	4,26	0,84	0,477

Tabela 27: Estatística descritiva para as variáveis bioquímicas segundo a classe da doença. ALT: alanina aminotransferase. [1] Teste one-way ANOVA; [2]Teste Kruskal-Wallis; DP: Desvio Padrão * p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001.

Em relação à alteração das variáveis bioquímicas (tabela 28), identificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre as classificações da dirofilária na fosfatase alcalina e na albumina.

		N Válido	Classificação								p^1
			Ligeiro		Moderado		Severo		Muito Severo		
			N	%	N	%	N	%	N	%	
ALT UI/L	Normal	52	17	89,5%	23	85,2%	9	100,0%	3	60,0%	0,200
	Aumentado	8	2	10,5%	4	14,8%	0	,0%	2	40,0%	
Fosfatase Alcalina UI/L	Normal	58	20	95,2%	27	93,1%	9	90,0%	2	40,0%	0,006**
	Aumentado	6	1	4,8%	1	3,4%	1	10,0%	3	60,0%	
	Diminuído	1	0	,0%	1	3,4%	0	,0%	0	,0%	
Creatinina mg/dl	Normal	62	21	91,3%	27	90,0%	9	90,0%	5	100,0%	0,907
	Aumentado	6	2	8,7%	3	10,0%	1	10,0%	0	,0%	
Albumina g/dl	Normal	57	21	91,3%	28	96,6%	6	60,0%	2	40,0%	0,001**
	Diminuído	10	2	8,7%	1	3,4%	4	40,0%	3	60,0%	
Proteínas Totais g/dl	Normal	41	14	51,9%	16	55,2%	7	58,3%	4	80,0%	0,817
	Aumentado	31	13	48,1%	12	41,4%	5	41,7%	1	20,0%	
	Diminuído	1	0	,0%	1	3,4%	0	,0%	0	,0%	
Globulinas g/dl	Normal	31	10	43,5%	13	46,4%	4	40,0%	4	80,0%	0,689
	Aumentado	34	13	56,5%	14	50,0%	6	60,0%	1	20,0%	
	Diminuído	1	0	,0%	1	3,6%	0	,0%	0	,0%	

Tabela 28: Variáveis bioquímicas segundo a classe da doença. ALT: alanina aminotransferase. [1]Teste do Qui-Quadrado; * p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001.

1.1.8. Caracterização dos proprietários

Da aplicação do questionário aos proprietários dos cães examinados (anexo I.12) não se observaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0.05$) entre os proprietários de cães com e sem dirofilária em nenhuma das caraterísticas sociodemográficas (idade e habilitações literárias) (tabela 29), e conhecimentos da doença (tabela 30).

Em relação às características sociodemográficas obtidas, verificou-se que a distribuição entre os diferentes grupos etários foi semelhante e que apenas 6% dos inquiridos não tinha a escolaridade obrigatória (tabela 29).

		Estado Dirofilária				p^1
		Positivo		Negativo		
		N	%	N	%	
Grupo Etário	Menos 20	1	33,3%	2	66,7%	0,997
	20-29	5	20,8%	19	79,2%	
	30-39	5	20,8%	19	79,2%	
	40-49	5	21,7%	18	78,3%	
	50-59	4	19,0%	17	81,0%	
	Mais 60	8	25,0%	24	75,0%	
	Total	28	22,0%	99	78,0%	
Habilitações Literárias	Sem escolaridade	3	42,9%	4	57,1%	0,775
	Escolaridade obrigatória	7	20,0%	28	80,0%	
	Ensino secundário	10	20,4%	39	79,6%	
	Ensino superior	4	20,0%	16	80,0%	
	Mestrado/doutoramento	1	20,0%	4	80,0%	
	Total	25	21,6%	91	78,4%	

Tabela 29: Caracterização sociodemográfica dos proprietários de acordo com o estado de infeção por *Dirofilaria immitis*.

Em relação aos conhecimentos acerca da parasitose, observou-se que 69,1% tinha conhecimento da mesma, e obtivera o conhecimento pelo médico veterinário (55,3%), através de um amigo ou por já ter tido um animal doente (11,8%) ou pela internet (8,2%). Apenas 3,5% afirmou ter tido conhecimento através de folheto informativo e 1,2% por meio da comunicação social ou revista da especialidade. 73,2% refere que a dirofilariose apenas infeta cães e 22% refere que infeta cães e gatos. Apenas 4,9% refere que pode afectar igualmente o ser humano. 88% refere conhecer e identificar a forma de transmissão, 65% descreveu correctamente os sintomas que os cães podem apresentar e 64,3% referiu ter conhecimento acerca do modo de prevenção e tratamento da doença (tabela 30).

		Estado Dirofilária				P
		Negativo		Positivo		
		N	%	N	%	
Conhecimento da doença	Não	10	26,3%	28	73,7%	0,642
	Sim	18	21,2%	67	78,8%	
	Total	28	22,8%	95	77,2%	
Como teve conhecimento	Médico veterinário	7	14,9%	40	85,1%	0,358
	Animal doente	2	20,0%	8	80,0%	
	Amigo	6	40,0%	9	60,0%	
	Internet	3	42,9%	4	57,1%	
	Revista da especialidade	0	0,0%	1	100,0%	
	Folheto informativo	0	0,0%	3	100,0%	
	Meio comunicação social	0	0,0%	1	100,0%	
	Outro	0	0,0%	1	100,0%	
	Total	18	21,2%	67	78,8%	
Espécie que afeta	Cães	16	26,7%	44	73,3%	0,547
	Humanos	0	0,0%	1	100,0%	
	Cão e gato	2	11,1%	16	88,9%	
	Cão e homem	0	0,0%	2	100,0%	
	Cão, gato e homem	0	0,0%	1	100,0%	
	Total	18	22,0%	64	78,0%	
Forma de Transmissão	Não	0	0,0%	10	100,0%	0,110
	Sim	18	24,3%	56	75,7%	
	Total	18	21,4%	66	78,6%	
Sinais cães	Não	7	24,1%	22	75,9%	0,782
	Sim	11	20,4%	43	79,6%	
	Total	18	21,7%	65	78,3%	
Prevenção e tratamento	Não	9	30,0%	21	70,0%	0,174
	Sim	9	16,7%	45	83,3%	
	Total	18	21,4%	66	78,6%	

Tabela 30: Conhecimentos da doença pelos proprietários de acordo com o estado de infeção por *Dirofilaria immitis*.

1.2. DIROFILARIOSE FELINA

1.2.1. Prevalência da *Dirofilaria Immitis.*

A infeção por *Dirofilaria immitis* foi detetada em 16 dos gatos examinados, em pelo menos um dos testes realizados, constituíndo uma prevalência total de 16% (tabela 31).

	N	%	95% IC	
			LI	LS
Negativo	84	84%	75,3%	90,6%
Positivo	16	16%	9,4%	24,7%
Total	100	100%		

Tabela 31: Prevalência da dirofilariose felina (*D.* immitis) no concelho da Figueira da Foz
IC: Intervalo de Confiança; LI: Limite Inferior; LS: Limite Superior.

1.2.1.1. Prevalência da Dirofilaria immitis por freguesia.

Quanto à prevalência por freguesias do concelho da Figueira da Foz (tabela 32), obtiveram-se resultados em 9 das 14 freguesias, destacando-se as freguesias de Marinha das Ondas (25%), Vila Verde (25%), Buarcos (21,4%) e Lavos (20%), por terem um prevalência superior à prevalência do concelho da Figueira da Foz. A freguesia de Tavarede (12,9%) obteve uma prevalência inferior ao valor do concelho. Nas freguesias de Alhadas, Quiaios, Paião e São Pedro não se obtiveram resultados positivos (figura 6).

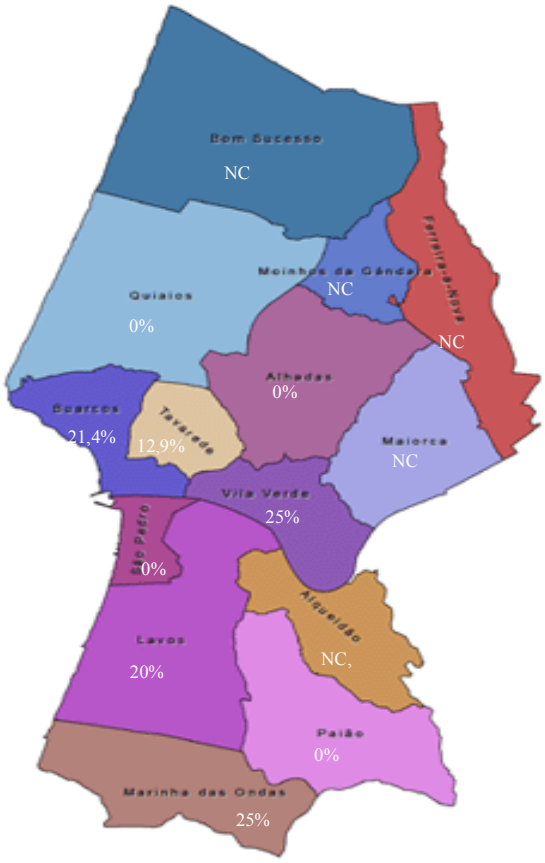


Figura 6: Prevalência da dirofilariose felina por nove freguesias do concelho da Figueira da Foz (n=99)

	Estado Dirofilária			
	Positivo		Negativo	
	N	%	N	%
Alhadas	0	0%	4	100%
Buarcos	9	21,4%	33	78,6%
Lavos	1	20%	4	80%
Marinha das Ondas	1	25%	3	75%
Paião	0	0%	2	100%
Quiaios	0	0,0%	2	100%
S. Pedro	0	0%	5	100%
Tavarede	4	12,9%	27	87,1%
Vila Verde	1	25%	3	75%

Tabela 32: Prevalência da dirofilariose felina em nove freguesias do concelho da Figueira da Foz.

1.2.2. Métodos laboratoriais de diagnóstico.

Neste estudo, todas as amostras foram submetidas às seguintes técnicas laboratoriais: (a) pesquisa de microfilárias pelo exame direto de sangue fresco e pela técnica de Knott modificada; (b) pesquisa de antigénio de *D. immitis* (SNAP® Feline Triple Test® – Idexx); e (c) pesquisa de anticorpo anti-*D. immitis* (Teste Solo® Step Feline Heartworm – Heska®), tendo verificado os resultados descritos na tabela 33.

	Positivo	Negativo	Total	Prevalência
Exame Direto Sangue Fresco	0	100	100	0%
Técnica Knott Modificado	0	100	100	0%
Anticorpo *D. immitis*	16	84	100	16%
Antigénio D. immitis	2	98	100	2%
FIV	17	83	100	17%
FeLV	8	92	100	8%

Tabela 33: Resultado das diferentes técnicas laboratoriais e respectiva prevalência por técnica (n=100).
FIV: vírus imunodeficiência felina; FeLV: vírus leucose felina.

Em relação à pesquisa de microfilárias, tanto o teste de exame direto de sangue fresco como a técnica de Knott modificado, não apresentaram nenhum resultado positivo, ou seja, nenhum dos gatos apresentava microfilarémia.

Em relação ao teste de pesquisa de anticorpo anti-*D. immitis* (teste Solo Step Feline HW® Heska), 16 gatos (16%) apresentaram um resultado positivo (figura 7), mostrando que houve exposição ao parasita.

Figura 7: Resultado positivo do teste Solo Step Feline HW® - Heska.
C - linha de controlo, T - linha do teste (Original).

O teste ELISA Snap® Feline Triple Test® Idexx, permitiu pesquisar a presença de antigénio de dirofilariose, tendo sido positivo em 2 gatos (2%); permitiu pesquisar a presença de antigénio do vírus de leucose felina, tendo sido positivo em 8 gatos (8%); e permitiu pesquisar a presença de anticorpos do vírus de imunodeficiência felina, tendo sido positivo em 17 gatos (17%). Não se obteve nenhum resultado postivo, para a pesquisa de antigénio e negativo, para a pesquisa de anticorpo anti-*D. immitis* (tabela 34).

Anticorpo/Antigénio	Positivo	Negativo	Total
Positivo	2	14	16
Negativo	0	84	84
Total	2	98	100

Tabela 34: Resultados do teste de pesquisa de antigénio *D. immitis* e teste de pesquisa de anticorpo anti-*D.immitis* (n=100).

1.2.3. Fatores de risco.

No presente estudo, foram avaliados um total de 100 felinos, 35 eram machos (35%) e 65 eram fêmeas (65%). Dos 35 machos, 3 obtiveram resultado positivo para *D. immitis* (3%) e 13 fêmeas tiveram resultado positivo (13%) (tabela 35 e gráfico 10). A diferença da prevalência de dirofilariose felina entre os animais do género masculino e feminino não foi estatisticamente significativa (p=0,137).

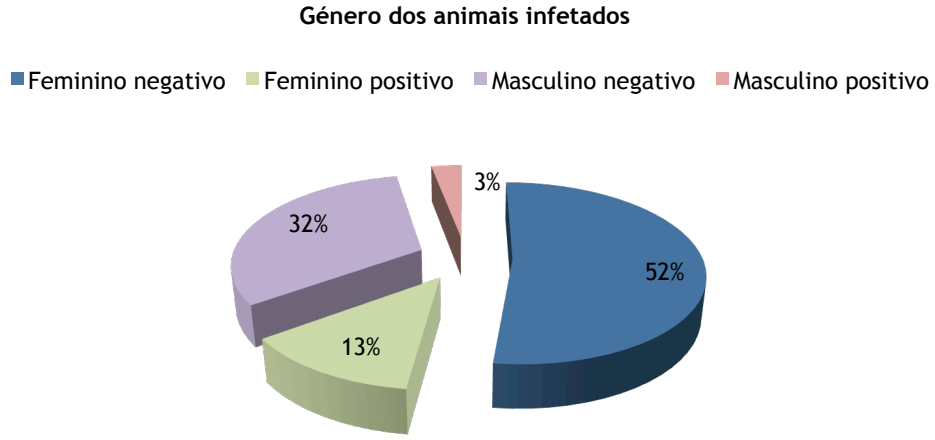


Gráfico 10: Frequência relativa dos géneros de animais infetados e não infetados por *Dirofilaria immitis* de acordo com o género (n=100).

Género	n	Positivos	Negativos
Masculino	35	3	32
Feminino	65	13	52
Total	100	16	84

Tabela 35: Distribuição da dirofilariose felina de acordo com o género.

A idade dos gatos examinados variou entre 1 a 18 anos (anexo I.17), sendo a idade média dos animais não infetados de 8,4 ± 4,9 anos, e a idade média dos animais infetados de 10,7 ± 5 anos. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos animais (p=0,173).

Em relação às caraterísticas epidemiológicas e do ambiente (tabela 36), que são fatores de risco de dirofilariose felina e com influência estatisticamente significativa

(p<0.05), destaca-se o peso do gato: em que os gatos infetados (3,3±0,9 kg) possuiam um peso médio significativamente inferior aos gatos não infetados (4,0 ± 1,2 kg) (p=0,024). Verificou-se ainda que os gatos com dirofilariose tinham o apetite diminuído (p=0,023). Outro fator de risco é esterilização dos gatos, em que os gatos não esterilizados (22,6%) têm uma prevalência superior aos gatos esterilizados (3,0%) (p= 0,013).

		Estado de Dirofilaria					p^1
		Positivo		Negativo		Total	
		N	%	N	%	N	
Presença de Proprietário[1]	Não	5	27,8%	13	72,2%	18	0,132
	Sim	11	13,4%	71	86,6%	82	
Zona[1]	Zona Urbana	8	14,0%	49	86,0%	57	0,756
	Zona Rural	3	11,5%	23	88,5%	26	
Presença vegetação[1]	Não	7	18,9%	30	81,1%	37	0,539
	Sim	4	13,3%	26	86,7%	30	
Tipo de ambiente	Interior	2	10,5%	17	89,5%	18	0,329
	Exterior	8	23,5%	26	76,5%	34	
	Misto	6	12,8%	41	87,2%	47	
Característica geográfica[1]	Mar	1	5,3%	18	94,7%	19	0,260
	Rio	3	23,1%	10	76,9%	13	
	Campo agrícola	1	7,7%	12	92,3%	13	
Raça - Pura[1]	Indeterminada	16	16,7%	80	83,3%	96	0,373
	Pura	0	0,0%	4	100,0%	4	
Peso[2] (M + DP)		3,3 + 0,9		4,0 + 1,2			4,0 + 1,2
Idade[2] (M + DP)		10,7 + 5,0		8,4 + 4,9			8,4 + 4,9
Sexo[1]	Masculino	3	8,6%	32	91,4%	35	0,137
	Feminino	13	20,0%	52	80,0%	65	
Esterilização[1]	Não	14	22,6%	48	77,4%	62	0,013*
	Sim	1	3,0%	32	97,0%	33	
Tamanho do Pelo[1]	Curto	15	16,5%	76	83,5%	91	0,444
	Médio	1	33,3%	2	66,7%	3	
	Comprido	0	0,0%	5	100,0%	5	
Apetite	Normal	2	4,9%	39	95,1%	41	0,023*
	Aumentado	0	0,0%	0	0,0%	0	
	Diminuído	9	22,0%	13	72,2%	41	

Tabela 36- Caracterização epidemiológica da amostra de estudo em relação à infeção por *D. immitis*
M: Média; DP: Desvio Padrão; [1]Teste do Qui-Quadrado; [2]Teste t; * p < 0.05 **.

Foram avaliados outros parâmetros como as características do ambiente (tabela 37) a presença de proprietário, tipo de habitat, as características do gato como a raça, tamanho do pelo e as características clínicas como a presença de outras doenças, medicações realizadas, vacinação e desparasitação interna e externa (anexo I.18), mas

não mostraram diferencas estatisticamente significativas, não sendo por isso considerados fatores de risco.

81 dos animais englobados no estudo viviam ou tinham acesso ao exterior, dos quais 14 gatos foram positivos para a dirofilariose felina; 26 vivam em zona rural e 57 vivam em zona urbana, dos quais 3 e 8 gatos, respetivamente, foram positivos para a dirofilariose. Os parâmetros relativos às características do ambiente do animal (viver no interior/exterior; viver numa zona urbana/rural; presença de vegetação) (tabela 36) não mostraram diferenças estatisticamente significativas. Na amostra de estudo, a raça predominante foi o Europeu Comum, apresentando uma percentagem de 96%. Em relação ao pelo, não houve alterações estatisticamente significativa.

A regressão logística permitiu identificar, em termos de características epidemiológicas e do ambiente (tabela 37), como fatores preditores significativos para a presença de dirofilariose: o peso (OR = 0,40; IC 95%: 0,16 – 0,97; $p < 0.05$); e esterilização (OR = 0,09; IC 95%: 0,01 – 0,87; $p < 0.05$). Os gatos com peso mais baixo e não esterilizados têm significativamente uma maior probabilidade de estarem infetados e quanto mais elevada a idade maior a probabilidade de estarem infetados, reforçando os resultados anteriormente descritos

	B	EP	*p*	OR	IC 95% - OR		Pseudo-R^2 Nagelkerke
					LI	LS	
Peso	-0,93	0,46	0,042*	0,40	0,16	0,97	0,318
Sexo - Masculino	-1,02	0,95	0,282	0,36	0,06	2,32	
Castração	-2,45	1,18	0,038*	0,09	0,01	0,87	
Constant	1,18	1,88	0,530	3,25			

Tabela 37 – Regressão logística: Variável dependente – Estado dirofilária (negativo vs positivo); Variáveis independentes – características epidemiológicas e do ambiente * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$; B: Coeficiente estimado; EP: Erro Padrão do B; OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de Confiança; LI: Limite Inferior; LS: Limite Superior.

Os resultados de pesquisa de FIV e FeLV realizada nas amostras de sangue dos gatos do estudo mostraram uma prevalência de FIV de 17% e de FeLV de 8%. Observou-se que dois gatos tinha coinfeção (FIV e dirofilariose) mas nenhum gato com FeLV tinha infecção por *D. immitis*. Face aos valores de prevalência obtidos, não foi demonstrada qualquer associação entre a infeção por *D. immitis* e a co-infeção com o vírus de FIV e FeLV (tabela 38)

		Estado de Dirofilaria		Total	*p*[1]
		Positivo	Negativo		
Teste FIV[1]	Negativo	14	69	83	0,601
	Positivo	2	15	17	
	Total	16	84	100	
Teste FeLV[1]	Negativo	16	76	92	0,348
	Positivo	0	8	8	
	Total	16	84	100	

Tabela 38: Resultados dos teste de FIV e FeLV e a sua relação com a infeção por *D. immitis*.
[1]Teste do Qui-Quadrado.

1.2.4. História clínica e Exame físico.

Os resultados da aplicação do questionário da **história clínica** (anexo I.6) encontram-se descritos na tabela 39. Oservou-se que dos gatos assintomáticos (45 gatos), 8,9% apresentavam um estado positivo de dirofilariose; e dos 37 gatos sintomáticos, 18,9% apresentavam um estado positivo de dirofilariose. No entanto, não havia diferenças estatisticamente significativas, na prevalência de dirofilariose entre os animais assintomáticos e sintomáticos (gráfico 11).

		Estado de Dirofilaria					p^1
		Positivo		Negativo		Total	
		N	%	N	%	N	
Presença sintomas	Assintomático	4	8,9%	41	91,1%	45	0,185
	Sintomático	7	18,9%	30	81,1%	37	
Perda Peso	Não	3	13,0%	20	87,0%	23	0,197
	Sim	4	30,8%	9	69,2%	13	
Anorexia	Não	0	0,0%	13	100,0%	13	0,027*
	Sim	7	30,4%	16	69,6%	23	
Apatia	Não	0	0,0%	16	100,0%	16	0,008**
	Sim	7	35,0%	13	65,0%	20	
Sintomas cardíacos e respiratórios	Não	4	19,0%	17	81,0%	21	0,912
	Sim	3	17,6%	14	82,4%	17	
Intolerância ao exercício	Não	3	16,7%	15	83,3%	18	0,862
	Sim	1	20,0%	4	80,0%	5	
Tosse	Não	4	18,2%	18	81,8%	22	0,509
	Sim	0	0,0%	2	100,0%	2	
Dispneia	Não	1	10,0%	9	90,0%	10	0,459
	Sim	3	21,4%	11	78,6%	14	
Síncope	Não	4	17,4%	19	82,6%	23	NC
	Sim	0	0,0%	0	0,0%	0	
Distensão abdominal	Não	4	17,4%	19	82,6%	23	0,648
	Sim	0	0,0%	1	100,0%	1	
Sintomas gastrointestinais	Não	5	18,5%	22	81,5%	27	0,919
	Sim	2	20,0%	8	80,0%	10	
Vómitos	Não	1	12,5%	7	87,5%	8	0,929
	Sim	1	11,1%	8	88,9%	9	
Diarreia	Não	1	7,7%	12	92,3%	13	0,101
	Sim	1	50,0%	1	50,0%	2	
Sintomas neurológicos	Não	6	17,1%	29	82,9%	35	0,249
	Sim	1	50,0%	1	50,0%	2	

Tabela 39: Parâmetros da historia clínica dos animais testados.[1]Teste do Qui-Quadrado; * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

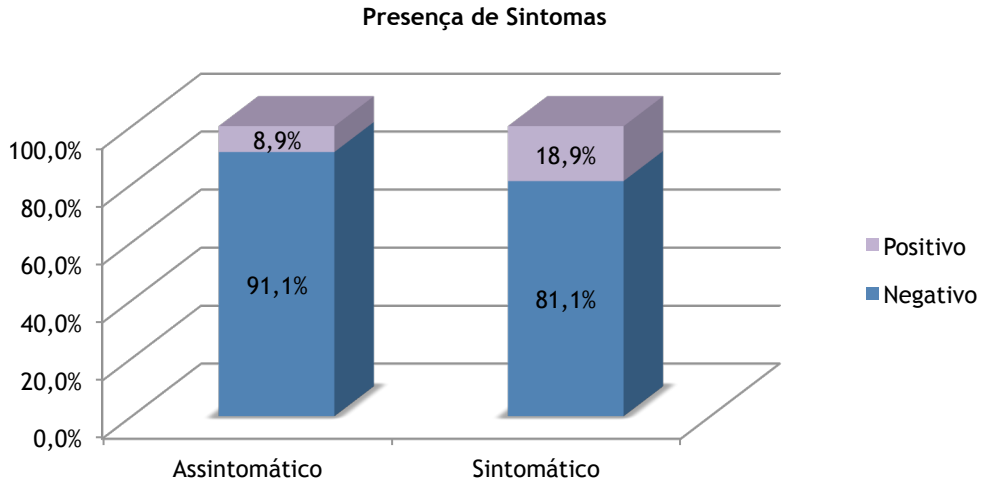


Gráfico 11: Relação da ausência/presença de sintomas com o estado de infeção para a *D. immitis* (n=82).

Em relação aos sintomas, salienta-se que os gatos com anorexia (30,4%) e apatia (35,0%) possuíam um estado positivo de dirofilária significativamente superior ($p < 0.05$) aos gatos que não tinham anorexia e apatia, em que nenhum destes estava infetado. Em relação aos demais sintomas, não se observa qualquer associação estatisticamente significativa (tabela 39).

Apenas foi possível recolher informação fidedigna acerca da história clínica em onze dos dezasseis gatos parasitados (68,75%). Tendo em conta a informação relativa a estes onze gatos, observou-se que 63,6% apresentava sintomas (gráfico 12), sendo os mais representativos: anorexia, apatia, perda de peso, presença de sintomas cardio-respiratórios, como a dispneia e intolerância ao exercício, presença de sintomas gastrointestinais, como vómito e diarreia e de sintomas neurológicos. A tosse e distensão abdominal não foi descrita em nenhum gato sintomático (gráfico 13).

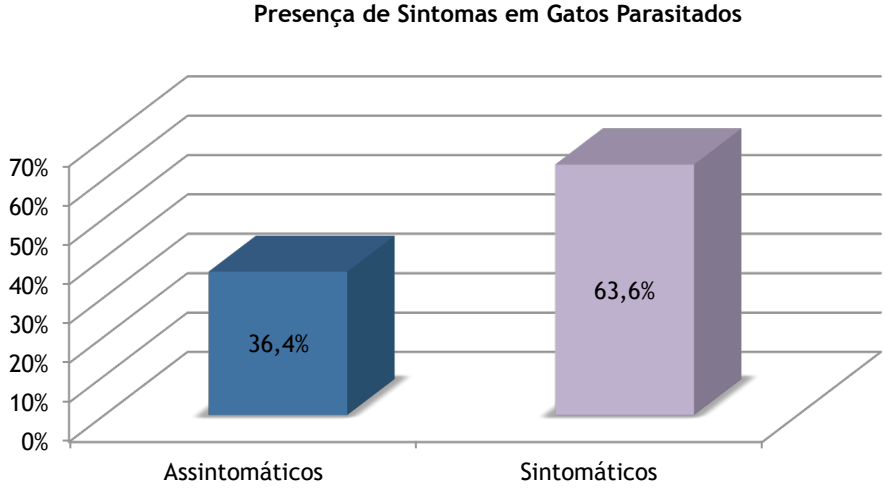


Gráfico 12: Frequência relativa da presença/ausência de sintomas em gatos parasitados com *D. immitis* (n=11).

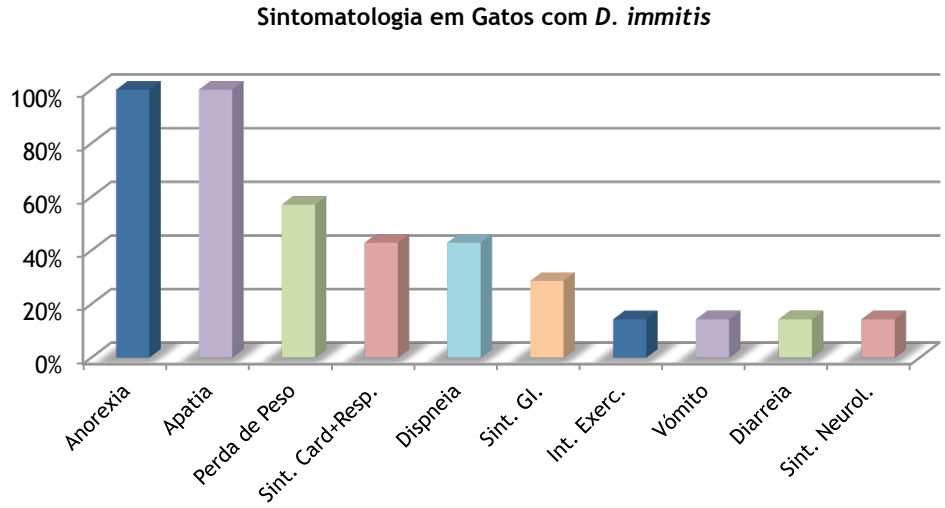


Gráfico 13: Frequência relativa dos sintomas apresentados pelos gatos parasitados (n=7). Sint. Card+Resp: sintomas cardio-respiratórios. Sint. GI: sintomas gastrointestinais. Int. Exerc: intolerância ao exercício.

Em relação ao **exame físico** (anexo I.7) realizado (tabela 40), os gatos com atitude anormal (prostração) (29,2%) tinham uma prevalência significativamente superior ($p < 0.05$) àqueles que tinham uma atitude normal (11,8%). Os gatos com TRC superior a 1,5 segundos (44,4%) detinham uma prevalência significativamente superior ($p < 0.05$) àqueles que tinham TRC normal (13,5%). Os gatos com temperatura diminuída (35,3%) possuíam uma prevalência significativamente superior aos demais e os gatos com pelo em mau estado (57,1%) detinham uma prevalência significativamente superior ($p < 0.05$) aos que possuíam pelo normal (13,0%). Os sintomas mais frequentes foram a condição corporal diminuída, alteração na atitude, frequência cardíaca e respiratória aumentada e temperatura diminuída.

		Estado da Dirofilaria					p[1]
		Positivo		Negativo		Total	
		N	%	N	%	N	
Atitude	Normal	9	11,8%	67	88,2%	76	0,044*
	Anormal	7	29,2%	17	70,8%	24	
Mucosa	Normal	13	16,5%	66	83,5%	79	0,809
	Anormal	3	14,3%	18	85,7%	21	
TRC	Normal	12	13,5%	77	86,5%	89	0,017*
	Anormal	4	44,4%	5	55,6%	9	
Hidratação	Normal	6	11,8%	45	88,2%	51	0,239
	Anormal	10	20,4%	39	79,6%	49	
Condição Corporal	Normal	6	12,5%	42	87,5%	48	0,232
	Aumentada	9	23,7%	29	76,3%	38	
	Diminuída	1	7,1%	13	92,9%	14	
Auscultação Cardiaca	Normal	14	15,4%	77	84,6%	91	0,933
	Anormal	1	16,7%	5	83,3%	6	

Presença Sopro Cardíaco	Não	0	0,0%	0	0,0%	0	NC
	Sim	0	0,0%	3	100,0%	3	
Frequência Cardiaca	Normal	9	15,0%	51	85,0%	60	0,089
	Anormal	7	31,8%	15	68,2%	22	
Auscultação Pulmonar	Normal	13	16,3%	67	83,8%	80	0,966
	Anormal	3	16,7%	15	83,3%	18	
Frequência Respiratória	Normal	9	17,0%	44	83,0%	53	0,463
	Anormal	6	24,0%	19	76,0%	25	
Pulso	Normal	13	15,1%	73	84,9%	86	0,165
	Anormal	3	33,3%	6	66,7%	9	
Tipo Tº	Normal	8	11,4%	62	88,6%	70	0,048*
	Aumentado	1	11,1%	8	88,9%	9	
	Diminuído	6	35,3%	11	64,7%	17	
Pelo	Normal	12	13,0%	80	87,0%	92	0,002**
	Anormal	4	57,1%	3	42,9%	7	
Palpação Abdominal	Normal	14	16,1%	73	83,9%	87	0,948
	Anormal	2	15,4%	11	84,6%	13	
Ascite	Normal	16	16,3%	82	83,7%	98	0,533
	Anormal	0	0,0%	2	100,0%	2	
Hepatoesplenomegália	Normal	16	16,0%	84	84,0%	100	NC
	Anormal	0	0,0%	0	0,0%	0	
Gânglio Linfático	Normal	16	16,8%	79	83,2%	95	0,317
	Anormal	0	0,0%	5	100,0%	5	
Presença de Parasitas Externos (Pulgas)	Não	10	14,5%	59	85,5%	69	0,540
	Sim	6	19,4%	25	80,6%	31	
Presença de Parasitas Internos (Ténias)	Não	15	15,6%	81	84,4%	96	0,616
	Sim	1	25,0%	3	75,0%	4	

Tabela 40: Parâmetros do exame físico e a sua relação com o estado de infeção por *D. Immitis*.

Analisando os 16 animais parasitados observou-se que 31,25% não apresentavam alterações no exame físico, na altura do rastreio e 68,75% apresentavam alterações. No gráfico 31, observam-se os achados do exame físico, salientando-se que os sinais gerais e inespecíficos estavam presentes na maioria dos gatos parasitados (desidratação, alteração da atitude, diminuição da temperatura e mau estado do pelo). As alterações do sistema cardiovascular (aumento da frequência respiratória, cardíaça e TRC, assim como alterações na auscultação cardíaca e pulmonar) apresentavam frequências relativas entre 6,25 e 43,75% (gráfico 14) .

Dos 7 gatos que apresentavam sintomas na história clínica, observou-se que apresentavam concomitantemente alterações no exame físico. Todos os gatos apresentavam desidratação; 85,7% dos gatos apresentavam atitude alterada (prostração) e diminuição da temperatura; 57,1% aumento do tempo de repleção capilar e diminuição da condição corporal; 42,9% a alteração da auscultação pulmonar e aumento da frequência respiratória; 28,6% dos gatos pelo em mau estado, mucosas pálidas,

alterações no pulso e na palpação abdominal; e 14,3% apresentavam alterações na auscultação cardíaca e aumento da frequência cardíaca (gráfico 15).

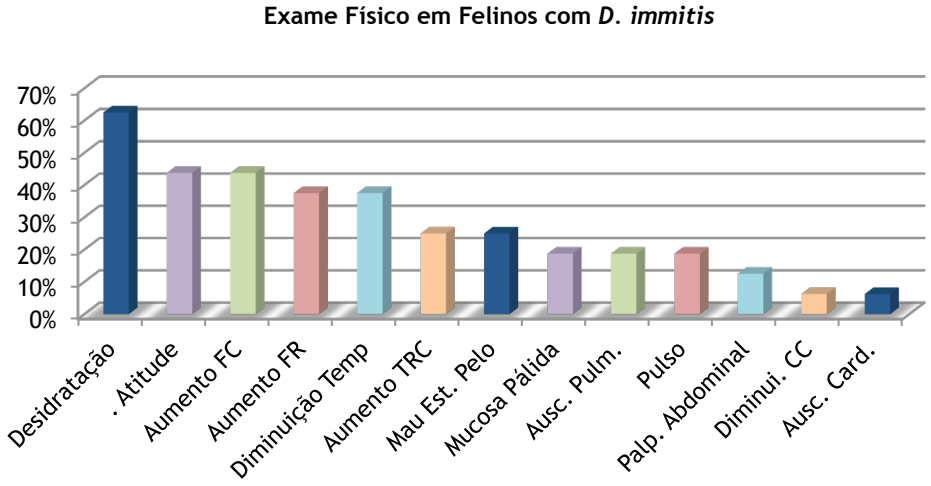


Gráfico 14. Frequência relativa das alterações do exame físico apresentada pelos felinos positivos em pelo menos um teste serologico (n=16). FC: frequência respiratória, FC: frequência cardíaca, Temp: temperatura, TRC: tempo repleção capilar, Ausc. Pulm: Auscultação pulmonar, Palp.: palpação, CC: condição corporal, Ausc. Card.: auscultação cardíaca.

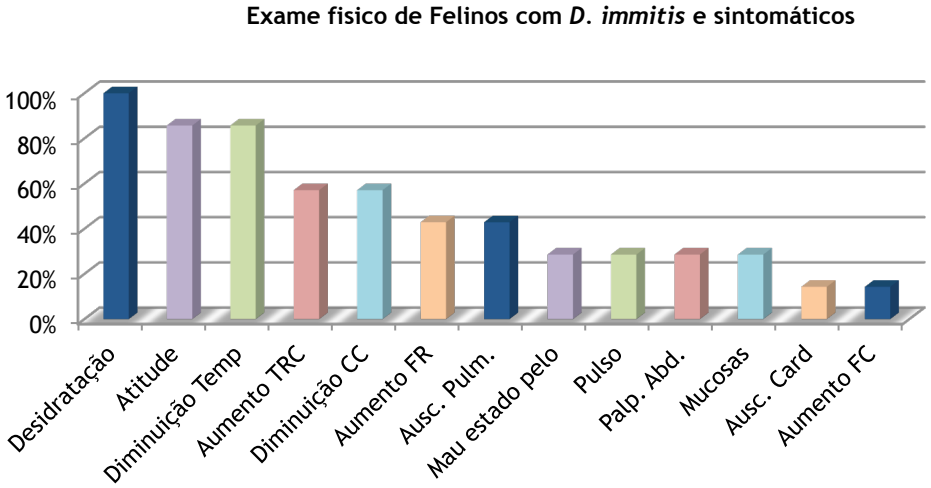


Gráfico 15: Frequência relativa das alterações detetadas no exame físico nos felinos positivos em pelo menos um teste serológico e com sintomas na história clínica (n=7). FC: frequência respiratória, FC: frequência cardíaca, Temp: temperatura, TRC: tempo repleção capilar, Ausc. Pulm: auscultação pulmonar, Palp.: palpação, CC: condição corporal, Ausc. Card.: auscultação cardíaca.

1.2.5. Análises Sanguíneas

Na tabela 41 são apresentadas as estatísticas descritivas e intervalos com 95% de confiança para a média das variáveis hematológicas do hemograma e bioquímicas. As variáveis de glóbulos brancos, linfócitos, granulócitos e VMP apresentavam valores médios superiores ao limite superior de valores normais, enquanto que as variáveis MCH e MCCH apresentavam valores médios inferiores ao limite inferior dos valores normais. As restantes variáveis apresentavam valores médios dentro do limites normais.

	N válidos	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	DP	IC 95% - Média		Valores de Referência
							LI	LS	
GB m/m^3	11	28,7	33,9	6,7	46,1	12,8	21,00	36,48	5-18
Linfócitos %	11	36,7	35,8	17,0	65,8	14,3	28,09	45,39	5-30
Monócito %	11	3,7	4,0	1,5	5,6	1,2	3,00	4,40	2-6
Granulócitos %	11	59,6	61,1	28,6	80,6	15,4	50,30	68,83	40-80
Linfócitos m/m^3	11	10,8	9,5	3,2	26,9	7,4	6,36	15,33	0,2-5,4
Monócitos m/m^3	11	1,1	0,9	0,3	2,3	0,6	0,69	1,45	0,1-1
Granulócitos m/m^3	11	16,8	13,4	2,9	29,0	7,9	12,05	21,60	2-14,4
GV m/m^3	11	8,8	8,8	6,7	10,3	1,2	8,07	9,54	4-9
VCM fl	11	47,3	47,7	38,4	53,9	4,5	44,61	49,99	35,5-55
HT %	11	41,7	43,6	31,0	50,1	7,4	37,27	46,17	24-45
MCHpg	11	12,0	11,5	9,5	15,1	2,0	10,86	13,22	16-24
MCCH g/dl	11	25,6	26,8	20,7	30,7	3,8	23,34	27,87	28-40
IDV	11	12,1	12,3	10,2	13,1	1,0	11,48	12,65	8-12
Hgb g/dl	11	10,6	10,1	7,0	14,0	2,1	9,34	11,89	9.5-15
Plaq m/m^3	11	155,6	137,0	75,0	305,0	67,1	115,18	196,10	120-500
VMP fl	11	9,5	9,9	8,4	10,3	0,6	9,20	9,89	4-7
IDP	11	8,4	10,1	0,0	11,0	4,2	5,93	10,95	8-12
GGT	12	0,2	0,0	0,0	1,8	0,6	0,00	0,56	0-1
FAS	11	36,0	30,0	21,0	72,0	16,2	26,20	45,80	14-111
CREAT	13	1,4	1,2	0,3	3,8	0,8	0,91	1,80	0,8-2,4
ALB	12	3,0	3,0	1,8	4,4	0,6	2,60	3,32	2,2-4
PT	12	7,9	7,8	5,0	11,0	1,6	7,03	8,85	5,6-9,2
Glob	12	5,2	5,1	3,2	7,0	1,1	4,53	5,77	3,4-5,2

Tabela 41- Estatística descritiva e intervalo de confiança de 95% para a média das váriaveis hematológicas e bioquímicas de gatos com *D. immitis*. DP: Desvio Padrão; IC: Intervalo de Confiança; LI: Limite Inferior; LS: Limite Superior.

No que respeita às alterações nas variáveis do hemograma e bioquímicas (anexo I.19), 72,7% % dos animais apresentavam aumento dos glóbulos brancos; 63,6% aumento dos linfócitos; 45,5% dos granulócitos; 100% MCH diminuido; 90,9% aumento do VMP e 41,7% aumento das globulinas.

.

1.2..6. Exames imagiológicos

1.2.6.1. Radiografia

Neste estudo, foram realizadas duas projeções radiográficas (latero-lateral e ventro-dorsal) aos gatos que testaram positivo no teste de pesquisa de anticorpo anti-*Dirofilaria immitis* e/ou no teste de pesquisa de antigénio *Dirofilaria immitis*. As características das radiografias nos animais positivos encontram-se descritas na tabela 42.

		N	%
Dilatação das artérias pulmonares	Não	10	62,5%
	Sim	6	37,5%
Dilatação das artérias pulmonares	Leve	6	100,0%
	Moderada	0	0,0%
Infiltrado focal ou difuso	Não	10	62,5%
	Local	0	0,0%
	Difuso	6	37,5%
Tipo infiltrado	Broncointersticial	2	33,3%
	Intersticial	4	66,7%
Doença parênquima pulmonar	Não	14	87,5%
	Sim	2	12,5%
Hiperinsuflação	Não	10	62,5%
	Sim	6	37,5%
Cardiomegália	Não	4	25,0%
	Sim	12	75,0%
Tipo de cardiomegália	Esquerda	0	0,0%
	Direita	12	100,0%

Tabela 42 - Caraterização das alterações radiograficas realizadas aos gatos infetados.

De acordo com a classificação de Brawner *et al*., (2000) (gráfico 16), observou-se que 37,5% dos gatos apresentava score 0 (sem sinais radiográficos compatíveis com dirofilariose felina); 25% dos gatos apresentava um score 0,5 (consistente mas inespecífico de dirofilariose felina); 31,3% dos gatos apresentava um score 1 (ligeiramente indicativo de dirofilariose felina); 6,3% um score 2 (moderadamente indicativo de dirofilariose felina) e nenhum gato apresentava alterações radiográficas fortemente indicativas de dirofilariose felina (score 3) [356].

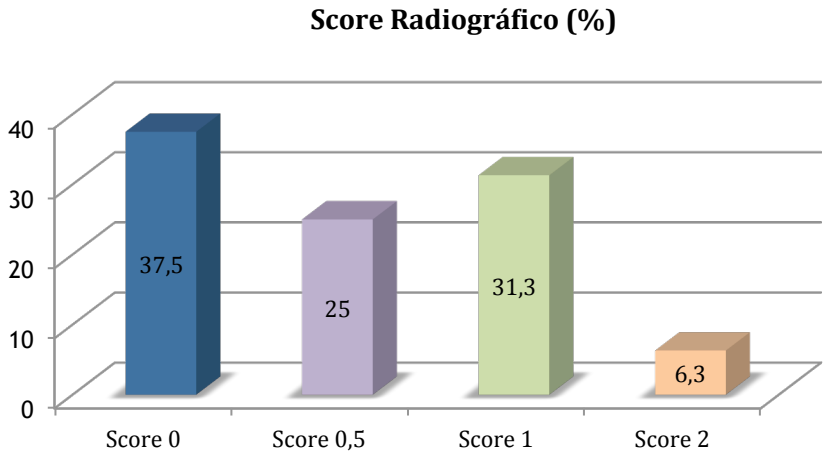


Gráfico 16: Frequência relativa da alterações radiográficas dos gatos parasitados (n=16), classificadas de acordo com o Score Brawner *et al.*, (2000)[356].

O score radiográfico dos gatos com infeção ativa (teste de pesquisa de antigénio, ecocardiografia e necrópsia positiva) consistiu em que 50% dos gatos apresentaram um

score 0; 6,7% um score de 0,5; e 33,3% um score 1. Neste estudo, observou-se que os dois animais positivos para pesquisa de antigénio não apresentavam sinais radiográficos compatíveis com dirofilariose felina (score 0).

Dos onze gatos em que foi possível recolher uma historia clínica, seis gatos eram sintomáticos e, destes, quatro apresentavam alterações radiográficas, mas apenas um gato apresentava alterações radiográficas ligeiramente compatíveis com dirofilária (score 1) (gráfico 17).

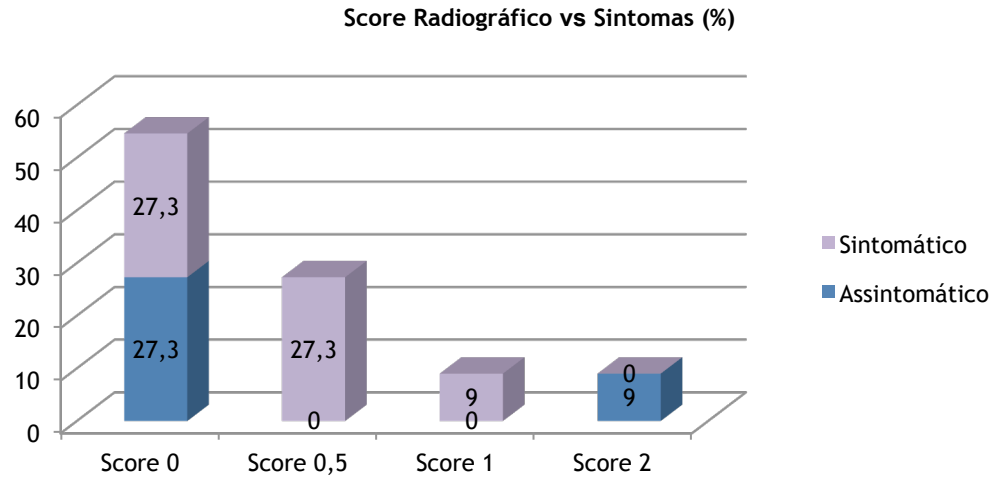


Gráfico 17: Classificação radiográfica Brawner *et al.*, (2000) [356] e a sua relação com a presença de sintomas em gatos infetados por *Dirofilaria* immitis (n=11).

Podemos observar que gatos parasitados sem alterações no exame físico apresentava algumas alterações a nível radiográfico (score 0,5 e score 1) e que 18,75% dos gatos parasitados com alterações no exame físico não apresentava alterações radiológicas (score 0) (gráfico 18).

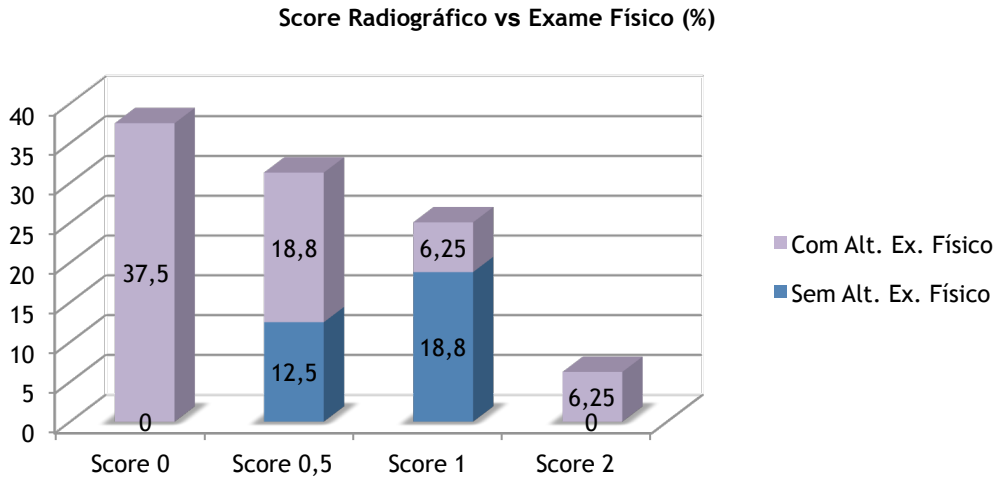


Gráfico 18: Classificação radiográfica Brawner *et al.*, (2000) [356] e a sua relação com a presença de alterações no exame físico (alt. ex. físico) em gatos infetados por *Dirofilaria* immitis (n=16).

1.2.6.2. Ecocardiografia

A ecocardiografia apenas foi possível realizar-se a oito dos gatos parasitados (devido ao necessário consentimento do proprietário). Nas ecocardiografias realizadas,

foi possível a visualização dos parasitas na artérias pulmonares, em quatro gatos, confirmando a presença do parasita adulto no gato (figura 8).

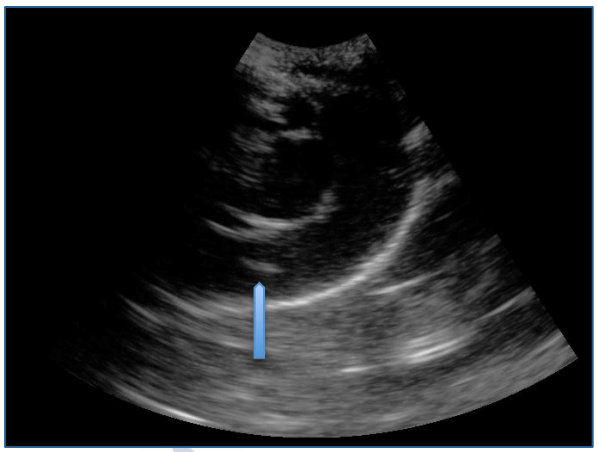


Figura 8: Imagem ecográfica. Corte parasternal direito em eixo curto da base do coração e grandes vasos. Identifica-se uma estrutura linear ecogénica compatível com dirofilária adulta na zona da bifurcação da artéria pulmonar (seta azul) (Original).

1.2.7. Análise histopatológica.

Neste estudo, o exame de necrópsia e histopatologia foi realizado em quatro gatos com teste de pesquisa de anticorpo anti-*D. immitis* positivo. Em termos macroscópicos, detetou-se a presença de um parasita adulto no átrio direito do coração num gato. Em termos histológicos, foram observadas alterações compatíveis com a presença de dirofilariose na árvore pulmonar em três gatos. Esses achados foram a presença de infiltrado leucocitário nos 3 gatos; presença de sinais de tromboembolismo (enfarte/hemorragia pulmonar) nos 3 gatos; proliferação da íntima em 2 gatos; e hipertrofia da muscular em 1 gato (tabela 43).

		N	%
Hipertrofia oclusiva da artéria pulmonar	Negativa	4	100,0%
	Positiva	0	0,0%
Tromboembolismo (enfarte pulmonar/hemorragia)	Negativa	1	25,0%
	Positiva	3	75,0%
Proliferação da íntima	Negativa	2	50%
	Positiva	2	50%
Infiltrado leucocitário	Negativa	0	0,0%
	Positiva	4	100,0%
Trombose	Negativa	1	25%
	Positiva	3	75%
Hipertrofia muscular	Negativa	3	75%
	Positiva	1	25%
Presença parasitas	Negativa	4	100,0%
	Positiva	0	0,0%
Resultado	Negativa	1	25,0%
	Positiva	3	75,0%

Tabela 43: Alterações descritas na análise histopatológica realizada em 4 gatos positivos para *D. immitis*.

1.2.8. Classificação da dirofilariose felina.

No estudo realizado verificou-se que 16 gatos eram positivos para o teste de pesquisa de anticorpo anti-*D. immitis* e 2 gatos positivos no teste de pesquisa de antigénio. Em quatro gatos foi possível observar a presença de um parasita adulto na ecocardiografia e num gato foi possível a observação de um parasita adulto na necrópsia. Também se obteve resultados compatíveis com a infeção em três análises histopatológicas (tabela 44).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Ac	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ag	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Rx	0,5	0	0	1	0,5	0,5	1	0,5	1	1	1	0	0	0	2	0
Eco	+					-	+		+	-			-	+		-
Histo			+	+	+						-					
Necr			-	-	-						-			+		

Tabela 44: Resultado dos vários exames de diagnóstico realizados em gatos positivos nos testes serológicos. Ac: anticorpo. Ag: antigénio. Rx: radiografia. Eco: ecocardiografia. Histo: histopatologia. Necr: necrópsia.

Tendo em conta que a população de estudo consistiu em 100 gatos, observou-se que 16% dos gatos foram expostos ao parasita *D. immitis* e 6% dos gatos tinham infeção pela *D. immitis* (gráfico 19).

Prevalência da exposição/infeção à D. immitis

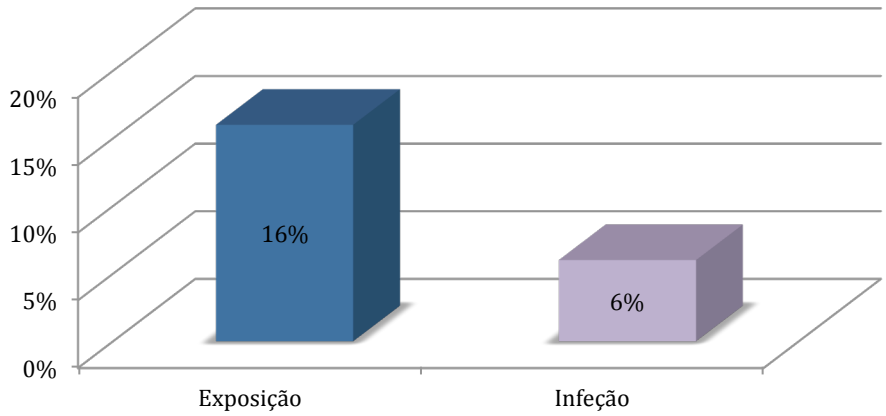


Gráfico 19: Prevalência da exposição/infeção à dirofilariose felina (n=100).

Este estudo foi desenhado para detetar anticorpos anti-*D. immitis* e antigénio de *D. immitis*. Os resultados do teste de pesquisa de anticorpo (prevalência de exposição) foram superiores aos resultados de pesquisa de antigénio de *D. immitis* (prevalência de infeção). Calculou-se a prevalência verdadeira de exposição (*P)*, tendo em conta a sensibilidade (84,2%) e especificidade (80,8%) do Teste Solo Step Feline Heartworm® – Heska [363], através da seguinte fórmula:

$$P = \frac{Pteste + Especificidade - 1}{Sensibilidade + Especificidade - 1} = 6{,}83\%$$

P= prevalência verdadeira
Pteste= prevalência do teste (16%)

Verificou-se que a prevalência de exposição verdadeira é semelhante à prevalência de infeção.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO V – DISCUSSÃO

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. DISCUSSÃO

1.1. Material e Métodos

O presente trabalho consistiu num estudo epidemiológico transversal, cujo objetivo foi o de determinar a prevalência de dirofilariose canina e felina, no concelho da Figueira da Foz. O dimensionamento da amostra e a incorporação de animais com proprietário, que recorreram aos cuidados veterinários na Clinicão – Hospital Veterinário, e de animais sem proprietário provenientes da APAFF permitiram obter uma amostra representativa, de forma a poder extrapolar os resultados para a população canídea e felídea.

Os critérios de elegibilidade para a inclusão no estudo tiveram por base a seleção de animais que apresentassem risco de estarem parasitados e que vivessem na zona de estudo. Todos os proprietários dos animais assinaram um formulário de autorização.

Os dados resultantes foram analisados no programa informático "SPSS" (versão 22), com o objetivo de obter uma análise estastística das variavéis utilizadas e realizar os testes adequados aos objetivos delineados para a investigação.

A metodologia utilizada teve por base o conhecimento prévio das particularidades da parasitose e do seu diagnóstico na espécie canina e felina, de forma a selecionar as técnicas laboratoriais que, *a priori,* permitiriam o diagnóstico de *Dirofilaria immitis*.

As limitações sentidas na realização deste estudo foram a impossibilidade de realização de técnicas moleculares de modo a corroborar os resultados obtidos pelas outras técnicas e a distribuição não equitativa dos animais do estudo por freguesia, o que impediu a obtenção de resultados em algumas freguesias do concelho.

1.2. Resultados

1.2.1. Prevalência da *Dirofilaria immitis*

1.2.1.1. Dirofilariose canina

A informação disponível, acerca da prevalência da dirofilariose canina em Portugal, tem aumentado nos últimos anos. O primeiro estudo, que pretendeu conhecer a prevalência da dirofilariose em Portugal, foi realizado entre os anos 1988 e 1990 e testou amostras de 561 animais recolhidas em 21 clínicas veterinárias do país, mas apenas realizou o teste de Knott modificado, não sendo, por isso, determinadas as infeções ocultas, subdiagnosticando a doença. Esse estudo reportou uma prevalência de 16,7% no Ribatejo, 16,5% no Alentejo, 12% no Algarve e uma prevalência de 30% na ilha da Madeira (figura 1) [3, 92, 185, 186, 311].

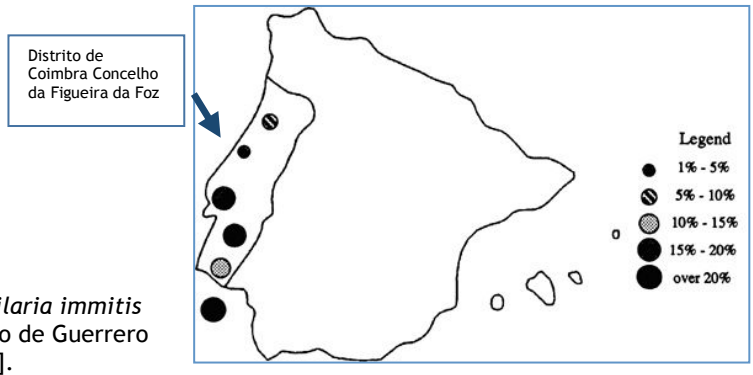


Figura 1: Prevalência de *Dirofilaria immitis* em Portugal em 1990. Adaptado de Guerrero *et al.*, (1992) [311].

No entanto, em 1943, Cambournac & Simões já tinham descrito a presença do parasita em cães de Água de Moura (Palmela) com 63,8% de prevalência e na Herdade do Pinheiro (Álcácer do Sal) com 52,6% de prevalência [130].

Na Ilha Madeira, foi realizado um estudo retrospetivo, entre 1990 e 1996, determinando-se um total de 22% de animais com microfilárias, sendo 89% (48/55) deste animais parasitados com *D. immitis* [131].

Foram posteriormente realizados outros estudos, em que se determinaram as seguintes prevalências:

- 13% de dirofilariose, em 2008, no distrito de Coimbra (distrito onde se insere o concelho da Figueira da Foz) [187];
- 9,3%, entre setembro de 2005 e janeiro de 2010, na região do Baixo-Vouga, distrito de Aveiro [188];
- 2,1%, no norte e norte centro de Portugal, em 2011, com as prevalências mais elevadas a corresponderem ao distrito de Aveiro (6,8%) e Coimbra (8,8%) [29, 189];
- 3,8% em cães assintomáticos, entre outubro 2010 e abril de 2011, num rastreio realizado em Portugal: região norte (2,9%), 0,9% na região centro (0,9%), na região do Alentejo (4,7%), na região de Lisboa (2,4%), no Algarve (5,1%), 0% nos Açores (0%) e na Ilha da Madeira (40%). Obteve-se ainda a prevalência global de dirofilariose de 8,9%, em cães com sintomas suspeitos da presença de uma doença transmitida por vetores: região norte (3,4%), região centro (7,4%), Alentejo (14%), Lisboa (5,8%), Algarve (17,1%), Açores (0%). Não foi determinado este parâmetro na Ilha da Madeira [186];
- durante 3 anos (2011, 2012, 2013) avaliou-se três distritos de Portugal: Coimbra (13,8%), Santarém (13,2%) e Setúbal (24,8%), confirmando o estado endémico destas regiões [190];
- Em 2014, Alho *et al.,* (2014) descreveram uma prevalência de 12,8% em Beja, 6,7% na Guarda, 2,7% em Faro e 2,5% em Castelo Branco. Não detetaram casos de dirofilariose em Bragança, Portalegre e Évora [192];
- 9,4% em cães da região do Algarve, entre novembro de 2011 e maio de 2014 [193].

Na amostra analisada, a prevalência de dirofilaria canina foi estimada em 27,3%. A prevalência obtida foi superior aos valores de prevalência de Portugal Continental obtida nos estudos recentes, descritos anteriormente, à exceção da Ilha da Madeira que obteve uma prevalência de 30%. É de realçar que a prevalência obtida foi superior à do distrito de Coimbra (onde se insere o concelho da Figueira da Foz). Bowman *et al.,* (2009) descreveram que as áreas com amostras positivas formavam "ilhas", rodeadas por áreas com prevalências mais baixas [8].

Em relação à prevalência por freguesia, observou-se que as freguesias com prevalência mais elevada apresentavam características rurais, forte atividade agrícola, ricas em fontes de água, com população humana de baixo recursos económicos e escolaridade, não estando ainda sensibilizada para os cuidados de saúde a ter com os animais de companhia. No entanto, verificou-se que as freguesias com prevalências superiores não correspondiam às com maior densidade de cães, logo não deve ser este um fator que justifique a maior prevalência nestas freguesias.

Os fatores ambientais e sócio-económicos têm um papel determinante nas diferenças encontradas nas prevalências, pois influenciam a densidade de população de

vetores e de população canina, exposição ao vector (ex: cães de guarda), recursos dos seus proprietários e o conhecimento e sensibilização sobre a doença [3].

A *Dirofilaria immitis* encontra na região da Figueira da Foz óptimas condições para o seu densenvolvimento, como a presença abundante de água (região costeira atravessada pelo rio Mondego), clima mediterrâneo tipo Csb de acordo com a classificação climática de Köppen-Geiger, presença do vetor de dirofilariose (*Oc. caspius, Cx. pipiens, Cx. theileri, An. maculipennis)* e do hospedeiro definitivo, o que permite a perpetuação da parasitose.

1.2.1.2. Dirofilariose felina

Os estudos da dirofilariose felina em Portugal são recentes e escassos. Vieira *et al,* (2014), mostraram uma prevalência de exposição de dirofilariose felina, na região norte e centro de Portugal, de 15%. A prevalência foi superior em Aveiro (18,7%), seguida de Viseu (17,6%), Porto (16%), Viana do Castelo (14,3%), Coimbra (13,3%), Vila Real (12,9%), Braga (7,1%) e Bragança (0%) [189].

Foram realizados outros estudos em Portugal, mas que apenas detetaram a presença de antigénio de dirofilariose no soro de gatos, obtendo as seguintes prevalências: 1,43% na área metropolitana de Lisboa [324]; 1,2% na região do Sado [325]; 1,4% na sub-região do Baixo Vouga [326]; e 5,9% na região de Olhão [327].

No presente estudo, obteve-se uma prevalência de exposição de dirofilariose em gatos de 16%, obtida pelo resultado positivo no teste de pesquisa de anticorpo anti-*D. immitis*, e uma prevalência de infeção de dirofilariose felina de 6%, obtida por um resultado positivo no teste de pesquisa de antigénio de dirofilariose felina, e/ou ecocardiografia e/ou necrópsia.

Podemos verificar que a prevalência de exposição é superior à prevalência média felina de 15%, na região norte e centro de Portugal, descrita por Vieira *et al.* (2014) e à descrita pelos mesmos autores para Coimbra, Vila Real, Braga e Bragança [189]. É de realçar que a prevalência da área estudada foi superior à obtida em Coimbra. A prevalência obtida foi, no entanto, inferior à obtida em Aveiro e Viseu.

A prevalência de exposição obtida foi superior à expectável, quando comparada com a prevalência da população canina de 27,3%, na mesma região geográfica [403]. O valor obtido é mais elevado que o sugerido por alguns autores, que afirmam que a prevalência da exposição por *D. immitis,* em gatos, em áreas endémicas de dirofilariose canina, corresponde entre 5 a 20% da prevalência canina [25, 298, 302, 303, 306]. De acordo com estes autores, seria expectável obter uma prevalência entre 1,37-5,5%. No entanto, a prevalência obtida representa 59% da prevalência canina na mesma região, sendo esta bastante superior à estimada.

A prevalência de infeção obtida no estudo foi superior à obtida nos estudos em que apenas se pesquisou o antigénio de *D. immitis* realizados em Portugal, o que pode dever-se ao facto de terem sido utilizados vários métodos de deteção da infeção ativa de *D. immitis* (teste de pesquisa de antigénio, ecocardiografia e necrópsia).

Observou-se que a prevalência de dirofilariose felina por freguesia nem sempre refletia a prevalência de dirofilariose canina na mesma freguesia, havendo freguesias com elevada prevalência de dirofilariose felina e canina (Marinha das Ondas, Vila Verde e Lavos) e outras com elevada prevalência de dirofilariose felina e baixa prevalência canina (Buarcos). No entanto, era necessário uma amostra maior por freguesia, de modo a fortalecer os resultados. É de realçar que as freguesias com prevalência superior têm características rurais e estão localizadas próximo do rio

Mondego (Marinha da Onda, Vila Verde e Lavos), assim como características urbanas e localizadas perto do Oceano Atlântico (Buarcos), mostrando que, independentemente das características do habitat, os gatos apresentam risco de exposição à infeção.

O estudo apresentado veio documentar a presença da infeção por *D. immitis* na população felina do concelho da Figueira da Foz, região centro de Portugal, até então desconhecida.

1.2.2. Métodos laboratoriais de diagnóstico

1.2.2.1. Dirofilariose canina

O diagnóstico de *Dirofilaria immitis* em cães consistiu na pesquisa de microfilárias circulantes (técnica de exame direto de sangue fresco, técnica do tubo de microhematócrito, técnica de Knott modificado) e na pesquisa de antigénio de *D. immitis* (teste de imunodiagnóstico de ELISA Snapp® Idexx).

A técnica que apresentou maior sensibilidade foi o teste de ELISA Snapp® Idexx (94%), seguido da técnica de Knott modificado (73,5%), seguido da técnica de exame direto de sangue fresco (71,1%) e, por fim, da técnica do microhematócrito (66,3%).

A técnica de exame direto de sangue fresco é uma técnica simples de executar e económica, pois apenas requer uma pequena amostra de sangue do paciente, um microscópio ótico e não necessita de grande especialização do executante. Tem como desvantagem uma sensibilidade baixa, pois apenas observa uma pequena amostra de sangue, havendo um risco elevado de falsos negativos, devido às infeções ocultas e não permite distinguir o tipo de microfilária presente no sangue [249].

A sensibilidade de 71,1% estimada para a esta técnica foi mais baixa do que a referida na bibliografia (80,9%) [250]. Este facto talvez fique a dever-se, por um lado, à pequena quantidade de amostra que é analisada e, por outro lado, à existência de um número elevado de infeções ocultas (25,3%).

Em relação à técnica do tubo de microhematócrito, esta permitiu identificar uma menor percentagem de animais positivos que a técnica de exame direto de sangue fresco. Esta técnica testa, também, uma pequena quantidade de sangue, mas é um pouco mais demorada, pois é necessário centrifugar a amostra, antes de a observar ao microscópio. Apesar de permitir uma concentração das microfilárias circulantes antes da sua observação ao microscópio, não apresentou vantagens em relação à técnica de exame direto de sangue fresco.

A técnica de Knott modificado permitiu identificar 61 dos pacientes positivos para *D. immitis*, sendo estimada uma sensibilidade de 73,5%. Este valor é superior à das técnicas anteriores, por se analisar uma amostra de sangue maior (1 ml), por fazer hemólise do eritrócitos e fixação das microfilárias e pela sua concentração pela força centrífuga. Após a centrifugação, as microfilárias são coradas com azul de metileno, o que permite a sua identificação e distinção de outras espécies de microfilárias.

Esta técnica é mais demorada que as anteriores, exige um executante especializado que saiba distinguir entre as diferentes espécies de dirofilárias e existindo, ainda, um risco de falsos positivos pela presença de detritos, por identificação errónea de outras espécies de microfilárias e por infeções ocultas [249].

Martini *et al*., cit. Datz, (2003), demonstraram uma sensibilidade de 66,4% para a técnica de Knott modificado, inferior à estimada neste estudo (73,5%) [250].

Comparando as técnicas de pesquisa de microfilárias circulantes, o teste de Knott apresentou uma maior sensibilidade, ou seja, uma maior capacidade de identificar

animais positivos na amostra total. A especificidade foi de 100% para todos os testes descritos.

O teste de ELISA Snapp® Idexx (pesquisa de antigénio *D.* immitis) tem como vantagens ter uma elevada especificidade e sensibilidade. É específico para a deteção de *D. immitis*, não havendo reação cruzada com outros parasitas e permite detetar infeções ocultas. Como desvantagem apresenta a incapacidade de detetar infeções precoces (menores de 6,5 meses de duração), infeções leves (carga parasitária baixa ≤ 3 fêmeas adultas) ou infeções por parasitas machos [3].

A sensibilidade de 94% é inferior à apresentada pelo fabricante Idexx [sensibilidade de 98% (IC 94-100%) e especificidade de 97% (IC 84-100%)], mas superior à apresentada num estudo realizado por McCall *et al.* (2001) de 85%. Pode dever-se ao facto das amostras analisadas terem sido obtidas de animais infetados com cargas parasitárias elevadas. O único método de o comprovar seria através da realização de necrópsia a todos os animais [268].

O valor preditivo positivo de 100% foi idêntico em todos os testes, ou seja, um animal do concelho da Figueira da Foz, quando obtém um resultado positivo em qualquer um dos testes, é verdadeiramente positivo.

O valor preditivo negativo segue a mesma tendência da sensibilidade, ou seja, a probabilidade de um animal testar negativo, sendo verdadeiramente negativo na população em estudo, é superior no teste ELISA Snapp ® Idexx, seguido do teste de Knott modificado e, por fim, pelo exame direto de sangue fresco e pela técnica de microhematócrito.

As medidas de avaliação dos testes de diagnóstico mostram que o teste ELISA Snapp® Idexx é largamente o mais fiável com 100% de especificidade e de valor preditivo positivo, com 94% de sensibilidade e com 97.8% de valor preditivo negativo.

O teste estatístico McNemar permitiu comparar entre si as diferentes técnicas de diagnóstico. A capacidade de diagnóstico entre a técnica de exame direto de sangue fresco, microhematócrito e técnica de Knott modificado não mostrou diferenças estatisticamente significativas e o nível de concordância entre elas e o estado efetivo de infeção com dirofilária era substancial. O teste de ELISA Snapp ® Idexx apresentou uma capacidade muito superior de diagnóstico e uma concordância quase perfeita com a infeção por dirofilária e não mostrou diferenças significaticas em relação ao estado de infeção, devido à capacidade do teste de ELISA Snapp ® Idexx de diagnosticar as infeções ocultas.

As amostras dos 61 animais positivos na técnica de Knott modificado foram submetidas à técnica de coloração histoquímica por fosfatase ácida (kit Leucognost SP®). Esta técnica de coloração permite distinguir as diferentes espécies de microfilárias através do padrão de distribuição da atividade da fosfatase ácida. É uma técnica específica, mas dispendiosa, demorada e que requer experiência laboratórial [249].

Neste estudo, utilizou-se o kit Leucognost SP® (utilizado no diagnóstico de leucemia em humanos) em detrimento do método Barka, por serem necessários menos passos no procedimento, diminuindo assim o risco de erro laboratorial e por ser mais económico. Este método demonstrou ser eficaz e específico, permitindo identificar 59 das amostras por apresentarem uma distribuição da atividade de fosfatase ácida típica da espécie *D. immitis* (atividade limitada ao poro excretor e anal) [199, 253]. Apenas em duas amostras não foi possível demonstrar a atividade por fosfatase ácida: uma das amostras apenas mostrou a presença de uma microfilária no teste Knott modificado, ou

seja, era uma amostra quase oculta e, na realização da coloração por fosfatase ácida, não se detetou presença de nenhuma microfilária e não foi possível corar a outra amostra, devido a má conservação da mesma.

Apesar de estarem descritas na bibliografia infeções mistas, ou seja, por mais do que uma espécie de microfilária, não se obteve nenhuma infeção mista neste estudo.

A técnica de coloração histoquímica por fosfatase ácida permitiu identificar 96,7% das amostras positivas no teste Knott modificado, ou seja, as microfilárias em circulação pertenciam à espécie de *D. immitis*, demonstrando que a técnica de coloração histoquímica por fosfatase ácida é uma excelente técnica para identificar as microfilárias no sangue periférico.

A escolha do teste de pesquisa de antigénio recaiu sobre o teste ELISA Snapp® Idexx, por este ser um teste semiquantitativo, permitindo diferenciar as infeções com baixa carga parasitária (nível de antigénio) ou elevada carga parasitária (nível de antigénio). Este parâmetro é importante, principalmente, quando se planeia o tratamento, pois o risco de tromboembolismo aumenta com o número de parasitas adultos presentes nas artérias pulmonares, ou seja, quando a carga parasitária é mais elevada. A concentração de antigénio é diretamente proporcional à carga parasitária. Neste estudo, 34,6% dos animais parasitados apresentavam nível de antigénio baixo e 65,4% apresentavam nível de antigénio elevado, mostrando que os canídeos que vivem na Figueira da Foz estão em risco de infeções com elevada carga parasitária e com risco de repercurssões severas para a sua saúde.

Dos 83 cães parasitados, 68,7% apresentavam resultado positivo na pesquisa de antigénio e microfilárias circulantes; 25,3% obtiveram resultados positivo na pesquisa de antigénio e negativa na pesquisa de microfilárias circulantes (infeção oculta), 6% não obtiveram um resultado positivo na pesquisa de antigénio mas obtiveram um resultado positivo na pesquisa de microfilárias.

As infeções ocultas são as infeções em que estão presentes os parasitas adultos nas artérias pulmonares (e cavidades cardíacas em casos de infeções massivas), mas não existem microfilárias em circulação. Pode dever-se a uma infeção pré-patente por adultos jovens, infeções por fêmeas adultas idosas com fecundidade diminuída, infeção só por parasitas machos, resposta imune de hipersensibilidade do hospedeiro contra as microfilárias, resposta imune provocada por medicamentos ou parasitas em localizações ectópicas. A percentagem de infeções ocultas foi de 25,3% estando dentro do intervalo (5 a 67%) referido na bibliografia consultada [3, 199].

Apenas 5 amostras não obtiveram resultado positivo para o teste de ELISA Snapp® Idexx (6%), mas obtiveram um resultado positivo nas técnicas de pesquisa de microfilárias circulante. Os cenários possíveis para este facto são uma carga parasitária baixa (≤3 fèmeas adultas), devido a uma infeção apenas por machos, erro laboratorial e devido a uma infeção por outra espécie de microfilária. Esta última hipótese foi descartada, após a identificação da espécie de *D. immitis* pela coloração histoquímica por fosfatase ácida. As outras hipóteses só podiam ser comprovadas através da realização de uma necrópsia ao animal.

1.2.2.2. Dirofilariose felina

As análises serológicas que visam avaliar o risco de exposição dos felinos à infeção por *D. immitis* podem auxiliar a decisão de implementar medidas profiláticas, na população felina.

Neste estudo, todas as amostras foram submetidas a pesquisa de microfilárias circulantes (exame direto de sangue fresco e técnica de Knott modificada), pesquisa de antigénio de *D. immitis* (SNAP® Feline Triple Test® – Idexx); e pesquisa de anticorpo anti-*D. immitis* (Teste Solo® Step Feline Heartworm – Heska®).

Em relação à pesquisa de microfilárias, tanto o teste de exame direto de sangue fresco como a técnica de Knott modificado, não apresentaram nenhum resultado positivo, ou seja, nenhum dos gatos apresentava microfilarémia. Estes resultados estão de acordo com o descrito na bibliografia. A presença de microfilárias em gatos é rara, baixa e transitória (1 a 2 meses de duração) e presente em apenas 20% das infeções [300, 332]. A maioria das infeções naturais por *D. immitis* são amicrofilarémicas [317]. Este facto deve-se à capacidade do sistema imunitário do gato em eliminar as microfilárias da circulação sanguínea [299]. Assim sendo, as técnicas de deteção e concentração de microfilárias não são completamente fiáveis no rastreio epidemiológico.

Em relação ao teste de pesquisa de anticorpo anti-*D. immitis* (Teste Solo Step Feline HW® – Heska), 16 gatos (16%) apresentaram um resultado positivo (figura 21), mostrando que houve exposição ao parasita.

Os teste de deteção de anticorpo anti-*D. immitis* têm a vantagem de detetar tanto as infeções por estádios larvares como por adultos, uma vez que o contacto com o parasita provoca uma resposta imunitária do hospedeiro, a partir dos dois meses pós infeção; e deteta infeções por ambos os sexos [252, 328, 330, 406]. Mesmo quando há eliminação do parasita na fase larvar (infeção imatura), o teste de pesquisa de anticorpos anti- *D. immitis* pode manter-se positivo entre nove a doze meses [328]. As infeções ectópicas também obtêm um resultado positivo [262].

O facto de a infeção poder ser eliminada pelo sistema imunitário na sua fase larvar L3 e L4 mantendo-se o nível de anticorpos e a possível presença de anticorpos devido a infeções anterior por *D. immitis* contribuem para a diminuição da especificidade destes testes [300, 363].

O teste de pesquisa de anticorpos indica que houve exposição ao parasita permitindo obter informação acerca da distribuição da doença e risco de infeção numa população de gatos.

O teste ELISA Snap® Feline Triple Test® Idexx, permitiu pesquisar a presença de antigénio de dirofilariose (2%); presença de antigénio do vírus de leucose felina (8%); e pesquisar a presença de anticorpos do vírus de imunodeficiência felina (17%). Não se obteve nenhum resultado postivo, para a pesquisa de antigénio e negativo para a pesquisa de anticorpo anti-*D. immitis.*

A obtenção de um resultado positivo no teste de pesquisa antigénio em 2% dos gatos pode dever-se ao facto de (a) o número de parasitas adultos, que infetam os gatos, ser normalmente baixo (cerca de 2 a 4 parasitas) e a sensibilidade do teste aumentar proporcionalmente com o número de parasitas fêmeas presentes; (b) de que 2/3 das infeções serem uni-sexo, sendo mais frequente as infeções apenas com parasitas machos, dado que este teste apenas deteta antigénios provenientes dos úteros das fêmeas; e (c), por fim, pode dever-se a infeção imatura [300, 332, 349], pois muitos

felinos não desenvolvem infeção ativa, uma vez que o sistema imunitário impede o desenvolvimento das formas L3 até à sua fase adulta [332, 349].

Os testes de antigénio apenas detetam a "ponta do icebergue" relativamente, a um maior número de gatos que estão em risco de infeção, sendo a frequência de falsos negativos elevada [352], por isso, apesar de apenas 2% dos animais testarem positivo no teste de pesquisa de antigénio, a infeção foi comprovada em 6 gatos (6%) com o recurso à ecografia e à necrópsia. No entanto, a taxa de falsos positivos é baixa [363]. Por estas razões, o teste de antigénio não é considerado apropriado, quando usado isoladamente para rastreio da infeção por dirofilariose em gatos [363]. Todos os gatos positivos no teste de pesquisa de antigénio foram positivos no teste de pesquisa de anticorpos anti-*D. immitis*, refletindo que a resposta imunitária ocorre em todos os estádios de desenvolvimento do parasita.

Os gatos são hospedeiros acidentais, o que pode justificar uma baixa prevalência de antigenémia de *D. immitis* (2%), quando comparada com a obtida em cães (25,7%), na mesma zona de atuação (concelho da Figueira da Foz) [403].

Tendo em conta as limitações das técnicas de pesquisa de microfilárias e do teste de pesquisa de antigénio no diagnóstico da dirofilariose felina, a utilização do teste de pesquisa do anticorpo teve o seu interesse renovado, sendo por isso o método de escolha no rastreio da doença [262].

Este estudo foi desenhado para detetar anticorpos anti-*D. immitis* e antigénio de *D. immitis.* Tendo em conta que tanto as formas juvenis como as formas adultas são capazes de provocar lesões nos gatos, a utilização de ambos os testes de pesquisa aumenta a probabilidade de identificar correctamente a infeção. Os resultados do teste de pesquisa de anticorpo (prevalência de exposição) foram superiores aos resultados de pesquisa de antigénio de *D. immitis* (prevalência de infeção). No entanto fez-se o acerto da a prevalência verdadeira de exposição (*P)*, tendo em conta a sensibilidade (84,2%) e especificidade (80,8%) do Teste Solo Step Feline Heartworm® – Heska [363], verificando-se prevalência de exposição verdadeira é semelhante à prevalência de infecção.

Os gatos que habitam na zona geográfica do estudo mostram uma taxa de exposição e infeção por *D. immitis* importante e, consequentemente, um risco elevado de desenvolvimento da doença. Portanto, os médicos veterinários e os proprietários devem estar sensibilizados para a necessidade de diagnósticos adicionais e medidas profiláticas.

1.2.3. Factores de risco

1.2.3.1. Dirofilariose canina

Tendo em conta a distribuição global da *D. immitis* é importante identificar quais os fatores de risco que poderão potenciar a transmissão da doença e perpetuar a sua disseminação.

Neste estudo não houve diferença dignificativa entre o género dos animais, como descrito por alguns autores [3, 44, 84, 92-110]. Outros investigadores descrevem uma prevalência superior nos machos, dado que estes passam mais tempo no exterior, na defesa do território, estando mais expostos ao vetor [111-121]. Em relação ao risco, Rosa *et al*., (2012) mostraram que os cães do género masculino tinham um risco de 1,8 vezes superior que os do género feminino e Byeont *et al.,* (2007) mostraram um risco

duas vezes superior para os machos [122, 126]. Ao contrário dos outros estudos, Bólio-Gonzalez *et al.,* (2007) revelaram uma regressão logística em que as fêmeas têm maior risco de serem parasitada por *D. immitis* do que os machos (OR:2,85, IC=1,5-5,5 *p*=0,01) [124].

Em relação à idade dos cães examinados verificou-se que a dirofilariose pode ser detectada em cães com qualquer idade, no entanto, a sua expressão foi superior nos cães com idade entre os 4 a 9 anos. Alguns autores admitem que a idade é um fator de risco importante, pois está relacionada com a exposição à doença. O risco de infeção provavelmente fica estável ao longo da vida, por isso, a probabilidade de adquirir infeção por *Dirofilara immitis* aumenta com o período de exposição ao mosquito. Logo, à medida que a idade aumenta, os cães têm uma maior janela de oportunidade de serem infetados [95-98, 102, 107, 110-113, 115, 116, 122-125]. Muitos estudos demonstraram que a prevalência da dirofilariose aumenta até à meia idade (por volta dos 8 anos) e depois sofre um declínio. Este padrão de prevalência pode ser consequência da morte seletiva dos cães infetados ou do seu tratamento [103, 107, 120, 126]. Noutros estudos, não se verificaram diferenças na prevalência com a idade [101, 104, 108]. No presente estudo a prevalência foi superior nos animais entre 4 a 9 anos (37,8%) e mais baixa em animais com menos de 3 anos (14,1%) (tabela 8).

Outro fator de risco com influência estatisticamente significativa na infeção, foi o porte do cão, em que os cães de porte médio e porte grande tiveram uma prevalência superior à média. Em vários estudos os cães de porte grande estão mais predispostos a serem parasitados pela *Dirofilaria immitis* do que os cães de porte pequeno [111, 115, 116, 127]. As razões apontadas para esse facto foram que, por norma, os cães de porte grande passam mais tempo no exterior [128] e tem uma maior superfície corporal exposta ao mosquito [117].

Não foram identificada diferenças na prevalência entre cães de raça determinada e cães de raça indeterminada, o que está de acordo com alguns estudos [84, 120, 124, 130, 131, 185]. No entanto, Almeida *et al*., (2005) mostraram uma presença de microfilárias superior em cães de raça (11,1%), principalmente no dogue alemão e boxer [407].

Em relação ao tamanho do pelo, foi hipotetizado que cães com pelagens compridas ou espessas eram menos predispostos a serem picados pelo mosquito, por estes terem maior dificuldade de acesso à pele [128]. Mas a maioria dos estudos, como o presente, não demonstraram diferenças na prevalência, tendo em conta o tipo de pelo [92, 128, 130, 131].

Em relação às condições onde o cão vive os cães que habitam em zona rural, com presença de vegetação e no exterior obtiveram prevalências superiores. Em vários estudos, foi demonstrada uma prevalência superior nos cães que vivem no exterior, pois estão mais expostos à picada dos mosquitos [56, 97, 109, 115, 116, 119]. Byeon *et al.,* (2007) demonstraram que o risco de viver no exterior é 10 vezes superior ao risco de viver dentro de casa [102, 126].

Em relação à atividade dos cães, os cães de guarda e de caça mostraram uma maior prevalência de dirofilariose, o que está de acordo com vários estudos que demonstraram que cães de guarda, pastores e de caça tinham uma maior prevalência de dirofilariose, principalmente, por passarem mais tempo expostos aos vetores [56, 84, 92, 111, 113, 116].

Em relação à presença de proprietário, alguns estudos mostraram uma prevalência superior em cães sem proprietário em relação a cães com proprietário, por

passarem mais tempo no exterior, expostos aos mosquito [95] [56, 132, 408]. Outros estudos, como o presente, não comprovaram essa diferença, obtendo prevalências semelhantes entre cães sem proprietário e cães com proprietário [103].

Por último, é de referir que cães que coabitam com cães vacinados de acordo com o esquema vacinal anual recomendado pelo médico veterinário demonstraram prevalências superiores. Este facto desmontra que, possivelmente, estão a ocorrer falhas na sensibilização eficaz dos proprietários pelos médicos veterinários.

Portanto, neste estudo, foram determinados os seguintes fatores de risco: idade entre 4 a 9 anos, raça porte médio e grande, cães que habitam em ambientes rurais, cães que vivem no exterior, cães de guarda e cães de caça ($p < 0.05$), enquanto que não se encontraram diferenças estatisticamente significativas relativamente à presença de proprietário, raça pura versus raça indeterminada, sexo e tamanho do pelo.

A regressão logística permitiu identificar, em termos multivariados, como fatores de risco significativos para a presença de dirofilariose, a idade (OR = 1.12; IC 95%: 1.02 – 1.24; $p < 0.05$), viver em meio rural (OR = 4.81; IC 95%: 2.02 – 11.46; $p < 0.001$), ter porte médio (OR = 2.44; IC 95%: 1.03 – 5.81; $p < 0.05$) ou grande (OR = 3.11; IC 95%: 1.16 – 8.36; $p < 0.05$) e viver no exterior (OR = 10.15; IC 95%: 3.89 – 26.51; $p < 0.001$) (tabela 11), reforçandos os resultados anteriormente descritos.

Foram avaliados outros parâmetros clínicos, como a presença de outras doenças concomitantes, medicações realizadas, história prévia de cirurgia de esterilização, vacinação e desparasitação interna e externa, mas não mostraram alterações estatisticamente significativas, não sendo por isso considerados factores de risco. É de realçar que dos cães positivos, 49 encontravam-se desparasitados internamente, 47 desparasitados externamente e 18 vacinados de acordo com o esquema vacinal recomendado pelo médico veterinário. Observando estes dados, podemos ter dois cenários presentes: um dos cenários implica que a aquisição dos produtos de prevenção (desparasitante interno e externo) foi realizada num consultório médico veterinário, mostrando que houve perda de oportunidade de transmitir e sensibilizar o proprietário para a doença. No caso da vacinação, esta deve ser realizada por um médico veterinário, mostrando que houve dificuldade na sensibilização para a presença da doença no concelho; Outro cenário possível é a aquisição de produtos de prevenção fora do ambiente médico veterinário (ex: farmácia, loja de animais), mostrando a necessidade de implementação de medidas que permitam a educação de outros profissionais, para que estes possam alertar o proprietário e aconselhá-lo a consultar um médico veterinário.

Em relação à recolha de amostras pelos diferentes meses do ano (novembro de 2009 e janeiro de 2011), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Embora o período de transmissão seja restrito a um período do ano, devido à relação entre o ciclo de vida do vetor e o clima, o parasita desenvolve-se durante 7-9 meses nos cães antes de ser detetado. Este facto, associado ao facto de maioria dos cães infetados serem assintomáticos durante meses ou anos torna difícil de estabelecer uma curva de prevalência durante o ano [3].

1.2.3.2. Dirofilariose felina

Em relação aos fatores de risco, alguns autores afirmam que quanto mais tempo um gato vive numa área de risco de dirofilariose, mais exposto fica à inoculação do parasita [330], por isso, é importante identificar quais os fatores de risco que poderão potenciar a transmissão da doença e perpetuar a sua disseminação.

No presente estudo, não se detectou diferenças na prevalência de dirofilariose felina entre os animais do género masculino e feminino. Apesar de alguns autores referirem que há uma maior susceptibilidade dos gatos machos para a infeção por *D. immitis,* devido à maior tendência de explorar e andar no exterior, o que aumenta a sua exposição aos vetores [299, 322, 328], a predisposição pelo sexo não foi sido suportada por outros estudos serológicos [29, 308, 329].

A idade dos gatos examinados variava entre 1 a 18 anos, sendo idade média dos animais não infetados de 8,4 ± 4,9 anos, e a idade média dos animais infetados de 10,7 ± 5 anos. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre as médias da idade dos animais. Venco *et al.*, (2008) constataram que a idade média e mediana dos gatos infetados por dirofilariose numa área endémica era elevada (9 e 10,5 anos, respetivamente), sugerindo que quanto mais tempo um gato vive numa área de risco, maior é o risco de infeção [330]. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos num estudo realizado em Barcelona que não demonstrou diferenças significativas entres as diferentes faixas etárias [322].

Em relação às caraterísticas epidemiológicas e do ambiente, que são fatores de risco de dirofilariose felina e com influência estatisticamente significativa destaca-se o peso do gato: em que os gatos infetados (3,3±0,9 kg) possuiam um peso médio significativamente inferior aos gatos não infetados (4,0 ± 1,2 kg). O facto da dirofilariose felina ser uma doença de carácter predominantemente crónico e ser acompanhada em muitos animais de sintomas gerais e gastrointestinais (letargia, anorexia, perda de peso e vómito) pode justificar a presença deste fator de risco [3, 77, 349].

Outro fator de risco foi a não esterilização dos gatos. Este facto pode dever-se à maior tendência dos gatos não esterilizados de explorarem e andarem no exterior, e ao facto do proprietário não estar sensibilizado para a medicina preventiva. No entanto, seriam necessário mais dados para poder reforçar esta hipótese.

Foram avaliados outros parâmetros como as características do ambiente a presença de proprietário, tipo de habitat, as características do gato como a raça, tamanho do pelo e as características clínicas como a presença de outras doenças, medicações realizadas, vacinação e desparasitação interna e externa, mas não mostraram diferencas estatisticamente significativas, não sendo por isso considerados fatores de risco.

Os parâmetros relativos às características do ambiente do animal (viver no interior/exterior; viver numa zona urbana/rural; presença de vegetação) não mostraram diferenças estatisticamente significativas. Está descrito que a utilização de medidas ambientais para reduzir o risco de infeção têm pequenos benefícios nos gatos. De facto, manter o animal no interior é uma das medidas importantes na redução das taxas de infeção nos cães, mas parece ser inefetiva na proteção da doença em gatos. Apesar dos gatos de exterior estarem mais suscetíveis a serem picados pelo vetor, parecem ser capazes de responder com uma resposta imunitária efetiva, que pode ser parcialmente protetora. Por outro lado, os gatos mantidos no interior, quando se encontram com o

vetor, desenvolvem a doença até ao estado adulto [299]. Logo, o facto de viver exclusivamente no interior não providencia uma proteção completa à exposição à doença [312].

Na amostra de estudo, a raça predominante foi o Europeu Comum, apresentando uma percentagem de 96%. Este valor elevado deve-se ao facto de ser a raça mais representada em Portugal, ao grande número de animais errantes e à inexistência de controlo reprodutivo eficaz, o que conduz à sua procriação seja elevada. Outra raça, o Persa (4 gatos), obteve menor representação, por ser menos frequente em Portugal. Apenas se obteveram resultados positivos nos gatos de raça Europeu Comum.

Em relação ao pelo, não houve alterações estatisticamente significativas, o que está em consonância com Levy (2007) que descreveu que tanto gatos de pelo longo como curto podem apresentar diagnóstico de dirofilariose [306].

A regressão logística permitiu identificar, em termos de características epidemiológicas e do ambiente, como fatores preditores significativos para a presença de dirofilariose: o peso (OR = 0,40; IC 95%: 0,16 – 0,97; $p < 0.05$); e esterilização (OR = 0,09; IC 95%: 0,01 – 0,87; $p < 0.05$). Os gatos com peso mais baixo e não esterilizados têm significativamente uma maior probabilidade de estarem infetados, reforçando os resultados anteriormente descritos.

Apesar da avaliação das prevalências do vírus da imunodeficiência felina e da leucemia felina não estarem incluídas como objecto de estudo, foram alvo de atenção, uma vez que são doenças detetadas pelo Teste SNAP® Feline Triple Test® – Idexx. Observou–se uma prevalência de FIV de 17% e de FeLV de 8%. Face aos valores de prevalência obtidos, não foi demonstrada qualquer associação entre a infeção por *D. immitis* e a co-infeção com o vírus de FI e FeLV, o que está em conformidade com o descrito por vários autores [328, 332, 409]. Atualmente pensa-se que estes vírus felinos não aumentam o risco de infeção pelo parasita da dirofilariose [328, 332].

Neste estudo demonstrou-se que o risco de infeção pelo vírus FIV (17%) e a exposição ao parasita *D. immitis* (16%) é semelhante e superior ao risco de infeção por FeLV (8%). No entanto, o risco de infeção ativa por *D. immitis* (6%) é inferior ao de infeção por FIV e FeLV, ou seja, o risco aparente de infeção com dirofilárias adultas no gato é semelhante ao de FeLV, mas inferior ao de FIV e o risco de infeção com parasitas imaturos é superior ao risco de infeção por FelV e semelhante ao risco por FIV.

1.2.4. História clínica e Exame físico.

1.2.4.1. Dirofilariose canina

Em relação à informação recolhida com o questionário da história clínica é de salientar que 50% dos cães sintomáticos possuíam um estado positivo de dirofilária. Também é de realçar que 22,7% dos animais assintomáticos se encontravam parasitados.

A infeção por dirofilariose é uma doença severa e potencialmente fatal, provocada principalmente pelos estados adultos de *D. immitis* e pela bactéria simbiótica *Wolbachia spp.*. A apresentação clínica de dirofilariose é usualmente crónica. Muitos dos cães são assintomáticos durante meses a anos, dependendo do número de parasitas presentes, da reatividade individual e da intensidade de exercício a que o hospedeiro é sujeito. Na maioria dos estudos, os cães portadores de dirofilária são maioritariamente assintomáticos. Labarthe *et al.,* (2003) obtiveram que 58,5% dos cães eram

assintomáticos e 41,2% sintomáticos; Meriem-Hind & Mohamed (2009) obtiveram 75,56% assintomáticos e 24,44% sintomáticos; Mortarino *et al*., (2008) obtiveram uma maior percentagem nos assintomáticos e Villeneuve *et al.,* (2011) obtiveram 84,4% de cães assintomáticos e 12,2% sintomáticos [84, 97, 106]. No presente estudo, obteve-se que 64% dos cães positivos para a *Dirofilaria immitis* eram assintomáticos, com o risco de serem portadores silenciosos e disseminarem a doença, o que reforça, a importância do rastreio dos cães que vivem nas zonas endémicas, como a Figueira da Foz, e que não se encontram a fazer a prevenção.

Os sintomas da doença desenvolvem-se gradualmente e devem-se à endoarterite provocada pela presença dos parasitas adultos nas arterias pulmonares e, em casos avançados nas câmaras direitas do coração, à presença da *Wolbachia spp.* e à presença de microfilárias em circulação. Os sintomas mais frequente, neste estudo, foram sintomas gerais, como apatia (63,2%), perda de peso (50%), anorexia (63,6%) e sintomas cardiorespiratórios (53,3%), como a tosse e a dispneia. A presença de tosse e sinais neurológicos foram estatisticamente significativos em cães com dirofilariose.

A tosse é um sintoma frequente devido à irritação da árvore pulmonar. A dispneia costuma ser secundária à hipóxia. A hipóxia deve-se provavelmente à incapacidade de ventilação/perfusão, em algumas áreas lesionadas do parênquima pulmonar. Em cães com dirofilária, as regiões hipoventiladas podem não se encontrarem hipoperfundidas, uma vez que a dirofilária interfere com a capacidade de vasoconstrição das artérias pulmonares. Consequentemente, o sangue continua a fluir nas áreas do pulmão que não são ventiladas, resultando em sangue desoxigenado que retorna ao coração esquerdo e é bombeado para a circulação sistémica. Noutras situações, a hipóxia pode ser secundária ao tromboembolismo, levando a que o sangue não chegue às zonas embolizadas, o que leva a um aumento do fluxo e incapacidade de ventilar/perfundir [7, 71]. A insuficiência respiratória agrava-se com a progressão da doença [7].

Outro sintoma descrito foi a distenção abdominal, podendo esta ser secundária a hepatomegália, esplenomegália ou presença de ascite, que podem surgir se estiver presente um quadro de insuficiência cardiaca congestiva, secundário à doença pulmonar e tromboembolismo que levam à hipertensão pulmonar, o que, por sua vez, leva a um aumento do pós-carga ventricular direito, com hipertrofia ventricular direita compensatória, inicialmente excêntrica, com dilatação da câmara e estreitamento da parede, como resposta ao aumento da pressão sanguínea pulmonar [3, 195, 196].

A maioria dos animais com sintomatologia apresentam um quadro crónico, refletindo a presença de nemátodes adultos nas artérias pulmonares e coração [309, 410].

Em relação ao exame físico observou-se que cães deprimidos, com aumento do TRC, sinais de desidratação e diminuição da condição corporal apresentavam uma prevalência superior de dirofilariose. Outros achados de exame físico importante foram a presença de sinais cardiacos e pulmonares.

Os achados de exame físico também refletem a patogenia da doença e o seu carácter crónico. A prevalência de dirofilariose foi superior e com significado estatístico em cães deprimidos, com diminuição da condição corporal, com sinais de desidratação, mau estado do pelo, mostrando o carácter crónico, insidioso e evolutivo da doença.

As alterações na auscultação pulmonar devem-se à presença do parasita nas artérias pulmonares e endoarterite que estes provocam; a presença de alterações na auscultação cardiaca, a presença de sopro cardíaco e alteração de pulso, podem dever-se

à presença de insuficiência cardíaca congestiva com alterações na válvula tricuspide, assim como, as alterações na palpação abdominal e a presença de ascite.

Os resultados do presente estudo vão ao encontro dos obtidos na literatura científica. Na maioria dos casos, os sintomas relatados na história clínica e observados ao exame físico são muito variáveis, destacando-se intolerância ao exercício, perda de peso, tosse, má condição corporal e distensão abdominal [239]. A ausência de sinais patgnomónicos dificulta o diagnóstico e torna importante a recolha detalhada da história pregressa e efetuar um exame físico pormenorizado.

É importante referir-se que a maioria dos animais diagnosticados com infeção por *D. immitis* é assintomática. As manifestações clínicas dependem, igualmente, da carga parasitária, da resposta imunitária individual e da aptidão do animal (animais sujeitos a exercício físico intenso tendem a apresentar sinais clínicos mais severos) [212, 232].

Foi realizada a classificação da severidade da dirofilariose canina de acordo com os sinais clínicos, observando que 44,6% dos cães apresentavam sinais clínicos ligeiros (grau I), 33,7% sinais clínicos moderados (grau II), 13,3% sinais clínicos severos (grau III) e 8,4% sinais clínicos muito severos (grau IV).

Em relação à associação entre o nível de antigénio e a classificação da severidade da dirofilariose, verificou-se que os cães com nível baixo de antigénio, 66.7% a classificação era ligeira. Enquanto que em cães com níveis altos de antigénio só em 29,4% a classificação era ligeira. A classificação severa e muito severa apenas estava presente em cães com níveis de infeção elevada. Este resultados fortalecem que o grau de lesão e respetivo quadro clínico depende do número de parasitas presentes [8], por isso, quanto maior a carga parasitária (elevado nível de antigénio), mais severo é o quadro clínico.

Da relação entre a classificação da severidade de dirofilariose com o tipo de infeção não se verificou relação estatisticamente significativa, no entato, observou-se que nas infeções em que o teste de pesquisa de antigénio era negativo, a classificação da doença, em 80% dos casos, era ligeira. Sendo à partida infeções com baixa carga parasitária (< 3 adultos), refletem a importância da carga parasitária no aparecimento da sintomatologia.

A presença de factores de risco como a idade, tamanho médio ou grande, viverem em zonas rurais e no exterior aumentam a probabilidade de se observarem quadros clínicos mais severos, podendo dever-se à maior possibilidade de serem infetados e reinfetados e, por isso, apresentarem cargas parasitárias superiores.

1.2.4.2. Dirofilariose felina

Os sinais clínicos compatíveis com dirofilariose felina foram registados para cada animal do rastreio, observando-se que 8,9% dos gatos assintomáticos apresentavam um estado positivo de dirofilariose. O facto de haver gatos parasitados assintomáticos reforça a importância do rastreio da parasitose, em todos os gatos que habitem zonas endémicas, devendo fazer parte da listagem de diagnósticos diferenciais nos gatos que se apresentem com sinais clínicos compatíveis [3, 328].

Em relação aos sintomas, salienta-se que os gatos com anorexia e apatia possuíam um estado positivo de dirofilária significativamente superior. Em relação aos demais sintomas, não se observa qualquer associação estatisticamente significativa.

Apenas foi possível recolher informação fidedigna acerca da história clínica em onze dos dezasseis gatos parasitados, o que limitou a obtenção da informação. Tendo

em conta a informação relativa a estes onze gatos, observou-se que 63,6% apresentava sintomas), sendo os mais representativos: anorexia, apatia, perda de peso, presença de sintomas cardio-respiratórios, como a dispneia e intolerância ao exercício, presença de sintomas gastrointestinais, como vómito e diarreia e de sintomas neurológicos. A tosse e distensão abdominal não foi descrita em nenhum gato sintomático. A maioria dos gatos tolera a infeção sem sinais clínicos aparentes (36,4%), ou com sinais clínicos transitórios e ligeiros [77]. Venco *et al.,* (2008) descreveram que 28% dos gatos pode ser assintomático, no entanto, 10-20% pode apresentar morte súbita. Neste estudo, nenhum animal teve morte súbita [330].

Quando presentes, os sintomas são normalmente de natureza cardiorrespiratória, como se verificou em 42,9 % dos gatos parasitados sintomáticos que apresentavam queixas de dispneia e intolerância ao exercício. No entanto, nenhum animal apresentava tosse. As manifestações cardiorrespiratórias podem surgir em dois estádios: aquando da chegada dos parasitas adultos imaturos (L5) às artérias pulmonares, ou devido à morte do parasita adulto. Normalmente são diagnosticados, com asma ou bronquite alérgica, mas atualmente fazem parte do síndrome HARD [304].

Outras manifestações comuns são os sintomas gastrointestinais, como acontecia em 28,6% dos gatos parasitados sintomáticos, que apresentavam queixas de anorexia, vómito e diarreia. Desconhece-se a etiologia do vómito, mas pensa-se estar associada à libertação de mediadores inflamatórios pelo pulmão [77, 349].

Os sintomas neurológicos podem estar presentes, mas normalmente com menor frequência. Neste estudo, apenas um gato parasitado apresentava sintomatologia neurológica.

Como alguns dos animais parasitados eram animais sem proprietário, existe a possibilidade de ter havido manifestações sintomatológicas, mas estas não poderam ser descritas por falta de dados. Esta hipotese é reforçada pelo facto dos sinais clínicos na dirofilariose felina serem muitas vezes transitórios ou inespecíficos [349].

Em relação ao exame físico observou-se que os animais com atitude anormal. aumento do TRC, temperatura diminuida e pelo em mau estado possuiam uma prevalência superior de dirofilariose. Os sintomas mais frequentes foram a condição corporal diminuída, alteração na atitude, frequência cardíaca e respiratória aumentada e temperatura diminuída.

Analisando os 16 animais parasitados observou-se que 31,25% não apresentavam alterações no exame físico na altura do rastreio enquanto 68,75% apresentavam sinais gerais e inespecíficos que estavam presentes na maioria dos gatos parasitados (desidratação, alteração da atitude, diminuição da temperatura e mau estado do pelo), mostrando o carácter crónico e inespecífico da parasitose. As alterações do sistema cardiovascular (aumento da frequência respiratória, cardíaca e TRC, assim como alterações na auscultação cardíaca e pulmonar) se encontravam descritas com frequências relativas entre 6,25 e 43,75%, o que está em concordância com a fisiopatologia da parasitose.

Dos 7 gatos que apresentavam sintomas na história clínica, observou-se que apresentavam concomitantemente alterações no exame físico: desidratação, alteração de atitude, diminuição da temperatura, aumento do TRC, diminuição da condição corporal, presença de sinais cario-respiratórias demonstrando que a sintomatologia reflete alterações dos parâmetros físicos.

Por norma, a infeção por dirofilariose tem um carácter sub-clínico, o que permite ao gato conviver com a infeção sem sintomatologia aparente, no entanto,

quando esta surge, costuma refletir alterações patológicas secundárias à presença do parasita. O leque de sinais clínicos é largo, podendo ser transitório e inespecífico e podem mimetizar outras doenças como a asma e a bronquite alérgica [252, 332, 349].

1.2.5. Análises sanguíneas

As alterações hematológicas e bioquímicas, sendo de uso limitado no estabelecimento do diagnóstico da infeção por *D. immitis,* podem, no entanto, ser bastante úteis ao fornecer informações que servem de suporte ao diagnóstico e ainda permitem avaliar processos fisiopatológicos, que podem ou não ser associados à doença [239].

1.2.5.1. Dirofilariose canina

Em relação as variáveis hematológicas nos cães parasitados apenas se observou uma média superior aos valores normais nos glóbulos brancos. Em relação as variáveis hematológicas por classe de severidade observou-se diferenças estatisticamente significativas entre as classes de severidade de dirofilária nos glóbulos brancos, nos monócitos mm/m^3 e nos granulócitos mm/ m^3.

A leucocitose, presenciada no leucograma, aponta para a existência de um processo inflamatório agudo ou crónico, estando de acordo com a afirmação validada por Atkins (2005), que cães com dirofilariose podem apresentar granulocitose (20-80% dos casos), eosinofilia (85% dos casos) e basofilia (60 % dos casos) [8, 240]. Uma das limitações do aparelho de Hemograma MS4e® - Vet Hematology Analyzer–Melet Scholesing foi a não diferenciação da linhagem de granulócitos, logo não foi possível determinar a presença de eosinofilia. A observação de neutrofilia e monocitose pode dever-se à remoção fagocítica, resultante da destruição tecidular provocada pela migração das microfilárias, da libertação de produtos do parasita, ou ainda, devido à morte das microfilárias [240]. No entanto, também pode estar presente trombocitopénia e anemia normocrómica e normocítica, o que não foi encontrado no presente estudo.

Em relação às plaquetas, a média dos valores de cães com dirofilariose grau IV era inferior ao limite mínimo de normalidade das plaquetas, apesar de não haver diferença significativa e mais inferior que as outras classes, apresentando 60% dos animais valores inferiores ao normal. Calvert & Thomason (2008), afirmam que os cães com síndrome da veia cava (grau IV) ou com tromboembolismo grave, podem manifestar uma trombocitopénia associada a uma hemoglobinúria [411].

Em relação as variáveis bioquímicas observou-se que as globulinas apresentavam uma média superior aos valores normais desta variável. Em relação as variáveis bioquímicas por classe de severidade observou-se diferenças estatisticamente significativas entre as classes de severidade de dirofilária na fosfatase alcalina, na albumina e nas proteínas totais.

Em relação às bioquímicas, em casos de insuficiência cardíaca direita, pode haver um aumento da atividade das enzimas hepáticas (FAS, AST, ALT, GGT) em 10% dos casos [8, 240], o que está de acordo com o presente estudo, pois os valores de FAS são mais elevados com a severidade da doença, apresentando 60% dos cães com dirofilariose grau IV um aumento na FAS. Tabrizi (2012) também mostrou que os valores de FAS eram significativamente mais elevados em cães com dirofilariose, mostrando que a dirofilária causa lesão a nível do figado, mais particularmente a nível dos ductos biliares [241].

A hipoalbuminémia está presente em classes mais severas e poderá ser secundária à anorexia que acompanha o quadro mais severo, à caquexia que acompanha

as insuficiências cardíacas, normalmente presente em classes mais severas, ou à perda de proteína pelo rim, secundário a glomerulonefrite [8, 206, 233].

1.2.5.2 Dirofilariose felina

As variáveis de glóbulos brancos, linfócitos, granulócitos e VMP apresentavam valores médios superiores ao limite superior de valores normais, enquanto que as variáveis MCH e MCCH apresentavam valores médios inferiores ao limite inferior dos valores normais. As restantes variáveis apresentavam valores médios dentro do limites normais.

A leucocitose, descrita por alguns autores, costuma dever-se à presença de eosinofilia [328, 354]. Uma das limitações do aparelho de Hemograma MS4e® - Vet Hematology Analyzer –Melet Scholesing foi a não diferenciação da linhagem de granulócitos, logo não foi possível determinar a presença de eosinofilia. Este parâmetro era importante, uma vez que Levy (2007) descreve que a eosinofilia suporta o diagnóstico de dirofilariose [332]. No entanto, a maioria dos gatos infetados com o parasita *D. immitis* apresenta contagens de eosinófilos normais, devido ao carácter inconstante da sua presença na circulação. Normalmente, esta ocorre 4 a 7 meses pós-infeção e, posteriormente, de forma intermitente [252, 328].

Donahoe *et al.,* (1976) referiram que o valor dos glóbulos vermelhos e da hemoglobina não sofria alterações com a parasitose [354]. No entanto, no estudo apresentado, a hemoglobina corpuscular média encontrava-se diminuída em 100% dos gatos parasitados, indicando uma hipocromia; 54,5% dos gatos parasitados mostrou uma diminuição da concentração de hemoglobina corpuscular média; e 90,9% aumento do volume médio plaquetário. Estes achados não estão descritos na bibliografia consultada. Algumas hipóteses a serem consideradas são o facto da infeção parasitária ser crónica e poder influenciar os níveis de hemoglobina a nível dos eritrócitos, levando à sua espoliação; ou a presença do parasita na circulação sanguínea poder interferir diretamente com os eritrócitos e plaquetas; ou a resposta do sistema imunitário à presença do parasita poder exercer alguma influência sobre as células. No entanto, seriam necessários estudos dirigidos, para poder concluir se alguma destas hipóteses é viável.

Em relação aos parâmetro de bioquímicos, é de realçar o aumento das globulinas em 41,7% dos gatos parasitados, sendo esta uma das poucas alterações observadas nos parâmetros bioquímicos e inconstante, em gatos com dirofilariose [328].

1.2.6. Exames imagiológicos

1.2.6.1. Radiografia

A radiografia providencia uma forte evidência de infeção por dirofilaria felina, sendo uma ferramenta importante no diagnóstico, pois permite avaliar a severidade da doença e monitorizar a progressão ou regressão da mesma [77, 352].

Neste estudo, foram realizadas duas projeções radiográficas (latero-lateral e ventro-dorsal) aos gatos que testaram positivo no teste de pesquisa de anticorpo anti-*Dirofilaria immitis* e/ou no teste de pesquisa de antigénio *Dirofilaria immitis*.

37,5% dos gatos parasitados não apresentaram alterações radiográficas. As alterações radiográficas podem estar presentes, mas ocorrem de forma menos consistente na dirofilariose felina, comparativamente com a canina, e a sua ausência não deve excluir o diagnóstico [330]. As alterações imunológicas e as alterações visíveis na

radiografia não ocorrem ao mesmo tempo, logo pode haver gatos com anticorpo positivo e sem alterações radiográficas. Brawner *et al.,* (2000) mostrou que 46% dos gatos com anticorpo positivo não apresentava alterações radiográficas, representando gatos cujas alterações anatómicas ainda não são visíveis, ou por não ter ocorrido, ou por não irem ocorrer, ou por serem sub-radiográficas [356].

Foram observadas alterações radiográficas em 62,5% dos gatos com anticorpo positivo. Os achados radiográficos mais característicos de dirofilariose em felinos são os seguintes: 1) dilatação e tortuosidade das artérias pulmonares e dos seus ramos caudais, podendo estar presente em 76% dos gatos infetados, segundo Atkins *et al.,* (2000) [329]. No estudo realizado, a dilatação das artérias pulmonares estava presente em 62,5% dos gatos parasitados, sendo considerada leve em todos os casos; 2) presença de padrão pulmonar broncointersticial (por vezes alveolar) focal ou multifocal, que pode desaparecer espontaneamente [77]. Neste estudo, 37,5% dos gatos tinha padrão pulmonar difuso, sendo em 33,3% um padrão broncointersticial e em 66,7% intersticial, não tendo sido observado padrão alveolar em nenhum dos gatos; 3) pode estar presente hiperinsuflação pulmonar, como acontecia em 37,5% dos gatos parasitados [77]; 4) em relação à silhueta cardíaca, que se encontrava ligeiramente aumentada ao nível direito em 12 gatos parasitados, está descrito que a sua avaliação não é uma ferramenta clínica fiável para o diagnóstico da infeção por dirofilariose felina, apesar de se observar um tendência para esta medida aumentar de tamanho, quando o animal se encontra infetado [77, 330].

Segundo Dillon *et al.*, (2000), apenas 55% dos gatos com antigenémia apresenta sinais compatíveis no exame radiográfico, refletindo que as alterações imunológicas e radiográficas podem não ocorrer ao mesmo tempo [357], no presente estudo observou-se que os dois animais positivos para pesquisa de antigénio não apresentavam sinais radiográficos compatíveis com dirofilariose felina (score 0).

Neste estudo observamos que não há uma relação entre a ausência/presença de sintomas, ou ausência/presença de alterações a nível de exame físico com a presença e gravidade de alterações radiográficas. As diferenças temporais no desenvolvimento do parasita, na resposta imunitária do hospedeiro e da doença orgânica, como a regressão espontânea das lesões, pode levar a discrepâncias entre os achados radiográficos, clínicos e serológicos [357].

Em alguns gatos, a radiografia torácica não fornece evidências de doença, mas não deve ser excluído o diagnóstico de dirofilariose felina, apenas com base neste exame complementar [349].

1.2.6.2. Ecocardiografia

A ecocardiografia apenas foi possível realizar-se a oito dos gatos parasitados (devido ao necessário consentimento do proprietário). Nas ecocardiografias realizadas, foi possível a visualização dos parasitas na artérias pulmonares, em quatro gatos, confirmando a presença do parasita adulto no gato (figura 22).

A ecografia pode dar o diagnóstico em mais de 50% dos casos de dirofilaria felina (Miller, 1998). As câmaras do lado direito do coração felino, a artéria pulmonar principal, um segmento relativamente longo das artérias pulmonares direita e uma pequena porção das artérias pulmonares esquerda podem ser investigadas por ecocardiografia 2D [308, 328, 349]. Na ecocardiografia, os adultos de *D. immitis* apresentam-se como pequenos artefactos lineares paralelos, fortemente hiperecogénicos [307, 375]. A quantificação exata da carga parasitária pode não ser possível, devido ao

facto do parasita poder adquirir uma posição em espiral, sendo intercetados pelos ecos em vários locais, sobrestimando assim o número de parasitas realmente existente [328, 349], ou não ser possível observar, devido a localização nos ramos das artérias pulmonares mais periféricas, sendo, neste caso subdiagnosticado.

Em casos suspeitos, a elevada especificidade deste exame permite a confirmação da infeção por dirofilárias com mais de 5 meses de duração [323]. A ecocardiografia deve ser sempre realizada quando há suspeita de infeção por dirofilariose [295], identificando o parasita em 40-80% dos gatos infetados [358].

1.2.7. Análise histopatológica

Neste estudo, o exame de necrópsia e histopatologia foi realizado em quatro gatos com teste de pesquisa de anticorpo anti-*D. immitis* positivo. Em termos macroscópicos, detetou-se a presença de um parasita adulto no átrio direito do coração num gato. Em termos histológicos, foram observadas alterações compatíveis com a presença de dirofilariose na árvore pulmonar em três gatos (presença de infiltrado leucocitário, sinais de tromboembolismo, proliferação da íntima e hipertrodia muscular)

A necrópsia permite a confirmação da infeção pós-morte. Deve-se procurar cuidadosamente a presença de parasitas na veia cava, câmaras do coração direito e artérias pulmonares. A infeção pode passar despercebida, pois consiste, na maioria dos casos, em apenas 1 ou 2 parasitas, principalmente se estes forem imaturos, ou estiverem mortos ou fragmentados.

As alterações histopatológicas encontradas são compatíveis com as lesões induzidas pela presença do parasita na árvore pulmonar felina descrita: endoarterite eosinofílica moderada a severa das artérias pulmonares, seguido de hipertrofia muscular severa das artérias de tamanho médio e de pequeno calibre em todos os lobos pulmonares, juntamente com a obstrução completa em algumas arteríolas devido à presença de trombos [337]. No entanto, a presença de hipertrofia da camada muscular também foi descrita em gatos infetados com *Aelerostrongylus abstrusus* e *Toxocara cati*, não sendo por isso patgnomónico [336].

1.2.8. Caracterização dos proprietários.

Da aplicação do questionário aos proprietários dos cães examinados não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os proprietários de cães com e sem dirofilária em nenhuma das caraterísticas sociodemográficas (idade e estudos) e conhecimentos da doença.

Em relação às características sociodemográficas obtidas, verificou-se que a distribuição entre os diferentes grupos etários foi semelhante e que apenas 6% dos inquiridos não tinha a escolaridade obrigatória.

Destes resultados é de salientar que, apesar de 69,1% dos proprietários terem conhecimento acerca da doença, 88% saber a forma de transmissão e 64,3% referir saber que a doença tem prevenção, não estão a aplicá-la nos seus animais (tendo em conta que um dos critérios de inclusão era o animal não efetuar prevenção de dirofilariose). Era importante, em estudos futuros, determinar as razões que impedem os proprietários de fazer a prevenção.

A fonte de transmissão de conhecimento da doença foi, na maioria dos casos o médico veterinário, realçando do seu papel na proteção da saúde animal e saúde pública e a importância de o mesmo ter dados epidemiológicos que possam servir de ferramenta de sensibilização para o proprietário.

Por fim, é de realçar o desconhecimento dos proprietários acerca do carácter zoonótico da dirofilariose. Provavelmente, se for reforçado o risco para a saúde pública que a parasitose representa, poderá aumentar-se a adesão à profilaxia da mesma.

CAPÍTULO VI – CONCLUSÃO

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CONCLUSÃO

1. A Figueira da Foz reúne as condições ideais para o parasita *D. immitis*: abundantes recursos hídricos, clima mediterrâneo, presença de vetores e do hospedeiro definitivo, apresentando, assim, um dos valores mais altos de prevalência de dirofilariose canina de Portugal, assim como de prevalência de dirofilariose felina.

2. Os fatores ambientais e sócio-económicos têm um papel importante nas diferenças de prevalência de dirofilariose canina. Assim, as freguesias rurais, com forte atividade agrícola, ricas em fontes de água, entre outras características, apresentaram valores mais elevados. No entanto, em relação à dirofilariose felina, o risco de exposição e infeção foi independente das características do habitat, apresentando tanto as freguesias com características rurais como urbanas elevados valores de prevalência.

3. Os testes laboratoriais disponíveis para o diagnóstico da infeção por *Dirofilaria immitis* em cães são mais precisos, quando usados em combinação. O ideal é realizar em simultâneo uma técnica de laboratório para pesquisa de microfilárias circulantes, preferencialmente, a técnica de Knott modificado, por apresentar uma maior sensibilidade e permitir fazer a identificação da espécie de microfilária e um teste de pesquisa de antigénio do parasita fêmea adulta (ex: teste de imunodiagnóstico ELISA), para identificação das infeções ocultas. O teste semiquantitativo ELISA fornece informação muito útil em relação à carga parasitária, mostrando uma alta consistência com a infeção, permitindo quantificar o nível de antigénio. Essa informação facilita a avaliação do risco de tromboembolisno, no caso do tratamento em cães, pois quanto maior o nível de antigénio, maior a carga parasitaria e mais severo é o grau de lesão e o respectivo quadro clínico.

4. A técnica de coloração histoquímica por fosfatase ácida revelou ser precisa na identificação das microfilárias circulantes na espécie canina.

5. As técnicas de deteção de microfilárias não são complemente fiáveis no rastreio epidemiológico de dirofilariose felina (infeções ocultas). A fim de obter um rastreio da parasitose mais eficaz, deve-se realizar em conjugação um teste de pesquisa de anticorpo anti-*D. immitis* e um teste de pesquisa de antigénio de *D. immitis*. No caso dos resultados não corresponderem à suspeita clínica, é aconselhável a realização de uma radiografia torácica e uma ecocardiografia cardíaca. Esta é um bom método de diagnóstico, no entanto, nem sempre é possível a visualização do parasita, podendo este estar alojado nos ramos pulmonares mais periféricos, ou então ser uma infeção por parasitas imaturos.

6. A prevenção da dirofilariose felina é tão ou mais importante que a prevenção das viroses dos gatos (FIV e FeLV), uma vez que, apesar de não haver associação entre a infeção pelo parasita e a co-infeção pelos vírus, a prevalência de exposição de dirofilariose felina é semelhante à prevalência do FIV e superior à prevalência do FeLV.

7. Os principais fatores de risco da infeção em cães foram os seguintes: idade de 4-9 anos, raça de porte médio e grande, os que habitam em ambientes rurais, que vivem no exterior, cães de guarda e de caça. Por sua vez, os gatos apresentaram os seguintes fatores de risco: gatos não esterilizados e com menor peso.

8. A profilaxia de dirofilariose no concelho da Figueira da Foz deve ser anual, apesar da transmissão da parasitose ser sazonal, pois não se verificaram flutuações significativas da prevalência ao longo do ano. O facto do parasita ter um ciclo de vida longo e, especialmente, por ser uma infecção assintomática, durante um longo período de tempo, impede o estabelecimento de uma curva de prevalência mensal.

9. O rastreio da parasitose deve ser realizado a todos os cães e gatos que vivam em zonas endémicas, como a Figueira da Foz, mesmo que assintomáticos, devido ao risco elevado de serem portadores silenciosos e de poderem disseminar a doença. Além disso, a ausência de sinais patognomónicos e alterações inespecíficas nas análises sanguíneas dificulta o diagnóstico e torna importante a recolha detalhada de dados clínicos e epidemiológicos, assim como um exame físico detalhado.

10. A existência de *D. immitis* em cães vacinados, desparasitados internamente e externamente e com coabitantes vacinados demonstra que estão a ocorrer falhas na sensibilização dos proprietários. Estes, num inquérito realizado, mostraram desconhecer o carácter zoonótico da doença, sabiam, no entanto, da sua existência, mas não realizavam a sua prevenção, sendo importante, em estudos futuros, determinar as razões deste comportamento.

11. O presente trabalho evidencia que a população de cães e gatos da Figueira da Foz se encontra em risco considerável de ser parasitado pela *D. immitis*. Dado as repercussões para a saúde animal, assim como para a saúde humana, é importante que esta parasitose esteja incluída nos diagnósticos diferenciais de doenças cardiopulmonares nestas espécies.

Perspectivas Futuras

A difusão dos resultados obtidos visa permitir sensibilizar os médicos veterinários e profissionais de saúde, para a presença da parasitose em Portugal.

É essencial elaborar planos de rastreio a nível local e nacional de *Dirofilaria immitis*, que englobem tanto canídeos como felídeos, para obter conhecimento da realidade epidemiológica da dirofilariose em Portugal, podendo assim, implementar campanhas de sensibilização e controlo, de modo a reduzir o risco para a saúde pública.

O estudo da dirofilariose poderá servir de modelo para o estudo da disseminação de outras doenças transmitidas por mosquitos, podendo ajudar na formulação de protocolos e esquemas de controlo destas doenças, preparando as autoridades de saúde e os responsáveis pela saúde pública para a sua eventual entrada no país, como por exemplo, o West Nile Virus, Dengue e a Malária.

O conhecimento epidemiológico da dirofilariose humana em Portugal ainda é escasso, existindo um desconhecimento geral dos clínicos sobre esta parasitose. Integrando o conceito "One Health" (Winslow, 1957) adoptado pela Organização Internacional de Epizotias (OIE), reforça-se a necessidade de uma estratégia multidisciplinar e a necessidade de divulgação da zoonose à comunidade médica.

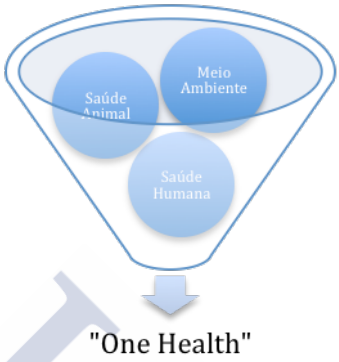


Figura 1: Conceito "One Health" Adaptado de OIE [213].

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CAPÍTULO VII – BIBLIOGRAFIA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

BIBLIOGRAFIA

1. Wikipédia (Online) [12/01/2013]. Available from: http://pt.wikipedia.org/wiki/Figueira_da_Foz.
2. Leidy, J. (1856). A Synopsis of Entozoa: And Some of Their Ecto-congeners, Observed by the Author. Merrihew & Thompson.
3. McCall, J.W., Genchi, C., Kramer, L.H., Guerrero, J., Venco, L. (2008). Heartworm disease in animals and humans. *Advances in parasitology*. **66**:193-285.
4. Manfredi, M., Di Cerbo, A., Genchi, M. (2007). Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats. In: Cringoli, G., editors. Proceedings of First European Dirofilaria Days; Fev 22-25 Zagreb.
5. Genchi, C., Rinaldi, L., Cascone, C., Mortarino, M., Cringoli, G. (2005). Is heartworm disease really spreading in Europe? *Veterinary parasitology*. **133**:137-48.
6. Genchi, C., Venco, L., Ferrari, N., Mortarino, M., Genchi, M. (2008). Feline heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection: a statistical elaboration of the duration of the infection and life expectancy in asymptomatic cats. *Veterinary parasitology*. **158**:177-82.
7. Simon, F., Siles-Lucas, M., Morchon, R., Gonzalez-Miguel, J., Mellado, I., Carreton, E*., et al.* (2012). Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clinical microbiology reviews*. **25**:507-44.
8. Bowman, D.D., Atkins, C.E. (2009). Heartworm biology, treatment, and control. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice*. **39**:1127-58.
9. Rodrigues-Silva, R., Moura, H., Dreyer, G., Rey, L. (1995). Human pulmonary dirofilariasis: a review. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. **37**:523-30.
10. da Silva, R.C., LangoniI, H. (2009). Dirofilariose. Zoonose emergente negligenciada. *Ciência Rural*. **39**:1614-23.
11. Railliet, A., Henry, A. (1911). Sur une filaire péritonéale des porcins. *Bull Soc Path Exot*. **4**:386-9.
12. Cancrini, G., Kramer, L. (2001) Insect Vectors of *Dirofilaria spp.* In: Simón, F., Genchi, C., editors. Heartworm infection in humans and animals. 1ª ed. Salamanca: Ed. Univ. de Salamanca. p. 63-76.
13. Rinaldi, L., Musella, V., Genchi, C., Cringoli, G. (2007). Geographical information system in health applications: experience on filariosis. In: Cringoli, G., editors. Proceedings of First European Dirofilaria Days; Fev, 22-25; Zagreb.
14. Manfredi, M., Vieira, C., Bandi, C., Casiraghi, M., Simon, F. (2001) Phylogeny, systematic and structural aspects. In: Simón, F., Genchi, C., editors. Heartworm infection in humans and animals. 1ª ed. Salamanca: Ed. Univ. de Salamanca. p. 19-40.
15. Bowman, D.D. (2014). Georgis' parasitology for veterinarians. 10ª ed. Missouri. Elsevier Health Sciences.
16. To, K.K., Wong, S.S., Poon, R.W., Trendell-Smith, N.J., Ngan, A.H., Lam, J.W*., et al.* (2012). A novel Dirofilaria species causing human and canine infections in Hong Kong. *Journal of clinical microbiology*. **50**:3534-41.
17. Furtado, A.P., Melo, F.T., Giese, E.G., dos Santos, J.N. (2010). Morphological redescription of *Dirofilaria immitis*. *The Journal of parasitology*. **96**:499-504.

18. Song, K.H., Tanaka, S., Hayasaki, M. (2009). Scanning electron microscopic observation of ultrastructure of *Dirofilaria immitis* microfilaria. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*. **71**:779-83.
19. Hoch, H., Strickland, K. (2008). Canine and feline dirofilariasis: life cycle, pathophysiology, and diagnosis. *Compendium (Yardley, PA)*. **30**:133-40.
20. Kosek, W. (2014). Know your (*Dirofilaria*) enemy…at the ultrastructural level. Proceedings of Fourth European Dirofilaria and Angiostrongylus Days (FEDAD); Jul, 2-4; Budapeste.
21. American Heartworm Society (AHS) (Online) [15/08/2014]. Available from: https://www.heartwormsociety.org/.
22. Dantas-Torres, F., Otranto, D. (2013). Dirofilariosis in the Americas: a more virulent *Dirofilaria immitis*? *Parasites & vectors*. **6**:288.
23. Kronefeld, M., Kampen, H., Sassnau, R., Werner, D. (2014). Molecular detection of *Dirofilaria immitis, Dirofilaria repens* and *Setaria tundra* in mosquitoes from Germany. *Parasites & vectors*. **7**:30.
24. Cancrini, G., Gabrielli, S. (2007). Vectors of *Dirofilaria* nematodes: biology, behaviour and host/parasite relationship. In: Cringoli, G., editors. Proceedings of the First European Dirofilaria Days; Fev 22-25; Zagreb.
25. Simon, F., Morchon, R., Gonzalez-Miguel, J., Marcos-Atxutegi, C., Siles-Lucas, M. (2009). What is new about animal and human dirofilariosis? *Trends in parasitology*. **25**:404-9.
26. Gouveia de Almeida, A.P. (2011). Mosquitoes (Diptera, Culicidae) and their medical importance for Portugal: challenges for the 21st century. *Acta medica portuguesa*. **24**:961-74.
27. Institute of de Entomotology - Check Republic (Online) [15/06/2014]. Available from: http://www.entu.cas.cz.
28. Archivo Digital especializado en Naturaleza y Geografía (Online) [16/06/2013]. Available from: http://barresfotonatura.com/.
29. Morchon, R., Carreton, E., Gonzalez-Miguel, J., Mellado-Hernandez, I. (2012). Heartworm Disease (*Dirofilaria immitis*) and Their Vectors in Europe - New Distribution Trends. *Frontiers in physiology*. **3**:196.
30. Yildirim, A., Inci, A., Duzlu, O., Biskin, Z., Ica, A., Sahin, I. (2011). *Aedes vexans* and *Culex pipiens* as the potential vectors of *Dirofilaria immitis* in Central Turkey. *Veterinary parasitology*. **178**:143-7.
31. Labarthe, N., Guerrero, J. (2005). Epidemiology of heartworm: what is happening in South America and Mexico? *Veterinary parasitology*. **133**:149-56.
32. Paras, K.L., O'Brien, V.A., Reiskind, M.H. (2014). Comparison of the vector potential of different mosquito species for the transmission of heartworm, *Dirofilaria immitis*, in rural and urban areas in and surrounding Stillwater, Oklahoma, U.S.A. *Medical and veterinary entomology*. **28 Suppl 1**:60-7.
33. Brown, H.E., Harrington, L.C., Kaufman, P.E., McKay, T., Bowman, D.D., Nelson, C.T.*, et al.* (2012). Key factors influencing canine heartworm, *Dirofilaria immitis*, in the United States. *Parasites & vectors*. **5**:245.

34. Labarthe, N., Ferreira, A.M., Guerrero, J., Newcomb, K., Paes-de-Almeida, E. (1997). Survey of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) in random source cats in metropolitan Rio de Janeiro, Brazil, with descriptions of lesions. *Veterinary parasitology*. **71**:301-6.
35. Cancrini, G., Frangipane di Regalbono, A., Ricci, I., Tessarin, C., Gabrielli, S., Pietrobelli, M. (2003). *Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy. *Veterinary parasitology*. **118**:195-202.
36. Bargues, M.D., Morchon, R., Latorre, J.M., Cancrini, G., Mas-Coma, S., Simon, F. (2006). Ribosomal DNA second internal transcribed spacer sequence studies of Culicid vectors from an endemic area of *Dirofilaria immitis* in Spain. *Parasitology research*. **99**:205-13.
37. Capelli, G., Frangipane di Regalbono, A., Simonato, G., Cassini, R., Cazzin, S., Cancrini, G.*, et al.* (2013). Risk of canine and human exposure to *Dirofilaria immitis* infected mosquitoes in endemic areas of Italy. *Parasites & vectors*. **6**:60.
38. Lima, P.M., Ahid, S.M.M. (2004). Vetor natural da *Dirofilaria immitis* (nematoda) em Mossoró-RN. *Caatinga*. **17**:109-14.
39. Wang, D., Bowman, D.D., Brown, H.E., Harrington, L.C., Kaufman, P.E., McKay, T.*, et al.* (2014). Factors influencing U.S. canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) prevalence. *Parasites & vectors*. **7**:264.
40. Manrique-Saide, P., Escobedo-Ortegon, J., Bolio-Gonzalez, M., Sauri-Arceo, C., Dzib-Florez, S., Guillermo-May, G.*, et al.* (2010). Incrimination of the mosquito, *Aedes taeniorhynchus*, as the primary vector of heartworm, *Dirofilaria immitis,* in coastal Yucatan, Mexico. *Medical and veterinary entomology*. **24**:456-60.
41. Labarthe, N., Serrao, M.L., Melo, Y.F., de Oliveira, S.J., Lourenco-de-Oliveira, R. (1998). Mosquito frequency and feeding habits in an enzootic canine dirofilariasis area in Niteroi, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. **93**:145-54.
42. Labarthe, N., Serrao, M.L., Melo, Y.F., de Oliveira, S.J., Lourenco-de-Oliveira, R. (1998). Potential vectors of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) in Itacoatiara, oceanic region of Niteroi municipality, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. **93**:425-32.
43. Ahid, S.M., Lourenco-De-Oliveira, R. (1999). Mosquitoes potential vectors of canine heartworm in the Northeast Region from Brazil. *Revista de saude publica*. **33**:560-5.
44. Ahid, S.M., Lourenco-de-Oliveira, R., Saraiva, L.Q. (1999). Canine heartworm on Sao Luis Island, Northeastern Brazil: a potential zoonosis. *Cadernos de saude publica*. **15**:405-12.
45. Ahid, S.M., Vasconcelos, P.S., Lourenco-de-Oliviera, R. (2000). Vector competence of *Culex quinquefasciatus* say from different regions of Brazil to *Dirofilaria immitis*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. **95**:769-75.
46. Vezzani, D., Carbajo, A.E. (2006). Spatial and temporal transmission risk of *Dirofilaria immitis* in Argentina. *International journal for parasitology*. **36**:1463-72.
47. Ogawa, G.M., da Cruz, E.N., Cunha, P.N., Camargo, L.M. (2013). Canine heartworm disease in Porto Velho: first record, distribution map and occurrence of positive mosquitoes. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*. **22**:559-64.

48. Vezzani, D., Mesplet, M., Eiras, D.F., Fontanarrosa, M.F., Schnittger, L. (2011). PCR detection of *Dirofilaria immitis* in *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* from urban temperate Argentina. *Parasitology research*. **108**:985-9.
49. Vezzani, D., Eiras, D.F., Wisnivesky, C. (2006). Dirofilariasis in Argentina: historical review and first report of *Dirofilaria immitis* in a natural mosquito population. *Veterinary parasitology*. **136**:259-73.
50. Lee, S.E., Kim, H.C., Chong, S.T., Klein, T.A., Lee, W.J. (2007). Molecular survey of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* by direct PCR for wild caught mosquitoes in the Republic of Korea. *Veterinary parasitology*. **148**:149-55.
51. Lai, C.H., Tung, K.C., Ooi, H.K., Wang, J.S. (2001). Susceptibility of mosquitoes in central Taiwan to natural infections of *Dirofilaria immitis*. *Medical and veterinary entomology*. **15**:64-7.
52. Otranto, D., Dantas-Torres, F., Brianti, E., Traversa, D., Petric, D., Genchi, C.*, et al.* (2013). Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. *Parasites & vectors*. **6**:16.
53. Schaffner, F., Bellini, R., Petric, D., Scholte, E.J., Zeller, H., Rakotoarivony, L.M. (2013). Development of guidelines for the surveillance of invasive mosquitoes in Europe. *Parasites & vectors*. **6**:209.
54. Otranto, D., Dantas-Torres, F. (2010). Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives. *Parasites & vectors*. **3**:2.
55. Latrofa, M.S., Montarsi, F., Ciocchetta, S., Annoscia, G., Dantas-Torres, F., Ravagnan, S.*, et al.* (2012). Molecular xenomonitoring of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in mosquitoes from north-eastern Italy by real-time PCR coupled with melting curve analysis. *Parasites & vectors*. **5**:76.
56. Giangaspero, A., Marangi, M., Latrofa, M.S., Martinelli, D., Traversa, D., Otranto, D.*, et al.* (2013). Evidences of increasing risk of dirofilarioses in southern Italy. *Parasitology research*. **112**:1357-61.
57. Montarsi, F., Ciocchetta, S., Ravagnan, S., Simonato, G., Mutinelli, F., Camuffo, S.*, et al.* (2014). Laboratory evidence on vector competence of the invasive mosquito *Aedes koreicus [Hulecoeteomyia koreica*] for *Dirofilaria immitis*. *Parasites & vectors*. **7**:1-.
58. Latorre, J.M., Morchon, R., Pou-Barreto, C., Melero-Alcíbar, R., Molina, R., Mas-Coma, S.*, et al.* (2009). Ribossomal DNA haplotyping of *Culex theileri* a potential natural vector of *Dirofilaria immitis* in a endemic area of Canary Island, Spaon. In: Morchon, R., simon, F., Montoya-Alonso, J.A., Genchi, C., editors. Proceedings of Seconf European Dirofilaria Days; Set, 16-18; Salamanca.
59. Osório, H.C., Amaro, F., Zé-Zé, L., Pardal, S., Mendes, L., Ventim, R.*, et al.* (2010). Mosquito species distribution in mainland Portugal 2005-2008. *European Mosquito Bulletin*. **28**:187-93.
60. Ribeiro, H., Ramos, H.C., Pires, C.A. (1983). Contribuição para o estudo de vectores da filaríases animais em Portugal. Sociedade Portuguesa de Medicina Tropical. *J Soc Ciênc Med*. **147**:143-6.
61. Latrofa, M.S., Weigl, S., Dantas-Torres, F., Annoscia, G., Traversa, D., Brianti, E.*, et al.* (2012). A multiplex PCR for the simultaneous detection of species of filarioids infesting dogs. *Acta tropica*. **122**:150-4.

62. Pires, C.A., Ribeiro, H., Capela, R.A., Ramos, H.C. (1982). Research on the mosquitoes of Portugal (Diptera: Culicidae) VI. The mosquitoes of Alentejo. *An do Inst de Hig e Med Trop*. **8**:79-102.
63. Ribeiro, H., Ramos, H.C., Novo, M.T. (1993). Prevalências hemáticas dos vectores da dirofilariose no sudeste de Portugal. *Acta Parasitológica Portuguesa*. **1**:21-4.
64. Alves, M.J., Osório, H.C., Amaro, F., Zé-Zé, L. (2012). Revive 2012 - Culicídeos e Ixodideos. *Instituto Nacional de Saúde - Doutor Ricardo Jorge*.
65. Osório, H.C., Zé-Zé, L., Alves, M.J. (2012). Host-feeding patterns of *Culex pipien*s and other potential mosquito vectors (Diptera: Culicidae) of West Nile virus (Flaviviridae) collected in Portugal. *Journal of medical entomology*. **49**:717-21.
66. Santa-Ana, M., Khadem, M., Capela, R. (2006). Natural infection of *Culex theileri* (Diptera: Culicidae) with *Dirofilaria immitis* (Nematoda: Filarioidea) on Madeira Island, Portugal. *J Med Entomol*. **43**:104-6.
67. Gouveia, M.I.M.S.A. (2007). Susceptibility of mosquito vectors to *Dirofilaria immitis* on Madeira Island, Portugal. Dissertação para a obtenção do grau de Doutoramento. Madeira, U.d.
68. Ferreira, C.A., de Pinho Mixao, V., Novo, M.T., Calado, M.M., Goncalves, L.A., Belo, S.M*., et al.* (2015). First molecular identification of mosquito vectors of *Dirofilaria immitis* in continental Portugal. *Parasites & vectors*. **8**:760.
69. Mixão, V., Ferreira, A.C., Calado, M., Belo, S., Almeida, A., Gouveia de Almeida, A.P*., et al.* (2014). Potenciais vetores de dirofilariose canina nos distritos de Coimbra, Santarém e Setúbal 2011-2013. *Acta Parasitológica Portuguesa*. **20**:146-7.
70. Genchi, C., Rinaldi, L., Mortarino, M., Genchi, M., Cringoli, G. (2009). Climate and Dirofilaria infection in Europe. *Veterinary parasitology*. **163**:286-92.
71. Kittleson, M.D. (1998) Heartworm infection and disease (Dirofilariasis). In: Kittleson, M.D., Kienle, R.D., editors. Small animal cardiovascular medicine textbook. 1ª ed: Elsevier.
72. Vieira, C., Villar, E., Ceciliani, F., Simon, F. (2001) The biology and biochemistry of the species of the genus *Dirofilaria* In: Simón, F., Genchi, C., editors. Heartworm infection in humans and animals. Salamanca: Heartworm infection in humans and animals. p. 42-62.
73. Lai, C.H., Tung, K.C., Ooi, H.K., Wang, J.S. (2000). Competence of *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* as vector of *Dirofilaria immitis* after blood meal with different microfilarial density. *Veterinary parasitology*. **90**:231-7.
74. Genchi, C., Guerrero, J., McCall, J., Venco, L. (2007). Epidemiology and prevention of *Dirofilaria* infections in dogs and cats. In: Cringoli, G. Proceedings of First European Dirofilaria Days; Fev, 22-25; Zagreb.
75. Theis, J.H. (2005). Public health aspects of dirofilariasis in the United States. *Veterinary parasitology*. **133**:157-80.
76. Nayar, J.K., Rutledge, C.R. (1998). Mosquito-borne dog heartworm disease. University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, EDIS.
77. Montoya-Alonso, J.A., Gómez, E. (2012). Dirofilariosis - Pautas de manejo clinico. 1ª ed. Barcelona. Multimédica Ediciones Veterinarias.

78. Rhee, J.K., Yang, S.S., Kim, H.C. (1998). Periodicity exhibited by *Dirofilaria immitis* microfilariae identified in dogs of Korea. *The Korean journal of parasitology*. **36**:235-9.
79. Nelson, R.W., Couto, C.G. (2014). Small animal internal medicine. 5ª ed. Missouri. Elsevier Health Sciences.
80. Reifur, L., Thomaz-Soccol, V., Montiani-Ferreira, F. (2004). Epidemiological aspects of filariosis in dogs on the coast of Parana state, Brazil: with emphasis on *Dirofilaria immitis*. *Veterinary parasitology*. **122**:273-86.
81. Genchi, C., Mortarino, M., Rinaldi, L., Cringoli, G., Traldi, G., Genchi, M. (2011). Changing climate and changing vector-borne disease distribution: the example of Dirofilaria in Europe. *Veterinary parasitology*. **176**:295-9.
82. Otranto, D., Capelli, G., Genchi, C. (2009). Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniosis vs. dirofilariosis. *Parasites & vectors*. **2 Suppl 1**:S2.
83. Kramer, F. (2006). Alterações climáticas estão abrir caminho para a expansão das CVBD? *CVBD Digest*. **3**.
84. Mortarino, M., Musella, V., Costa, V., Genchi, C., Cringoli, G., Rinaldi, L. (2008). GIS modeling for canine dirofilariosis risk assessment in central Italy. *Geospatial health*. **2**:253-61.
85. Colwell, D.D., Dantas-Torres, F., Otranto, D. (2011). Vector-borne parasitic zoonoses: emerging scenarios and new perspectives. *Veterinary parasitology*. **182**:14-21.
86. Rinaldi, L., Musella, V., Marzatico, G., Mortarino, M., Claudio, G., Cringoli, G. (2014). Mapping and modeling Dirofilaria infections in Europe. *Parasites & vectors*. **7**:O20.
87. Musella, V., Rinaldi, L., Marzatico, G., Mortarino, M., Cringoli, G., Genchi, C. (2014). Mapping and modeling *Dirofilaria immitis* infections in Europe. Proceedings of Fourth European Dirofilaria and Angiostrongylus Days (FEDAD); Jul, 2-4; Budapeste.
88. Cuervo, P.F., Fantozzi, M.C., Di Cataldo, S., Cringoli, G., Mera, Y.S.R., Rinaldi, L. (2013). Analysis of climate and extrinsic incubation of *Dirofilaria immitis* in southern South America. *Geospatial health*. **8**:175-81.
89. Fok, E. (2007). The importance of dirofilariosis in carnivores and human in Hungry, past and present. In: Cringoli, G.e. Proceedings of the First European Dirofilaria Days; Fev, 22-25; Zagreb.
90. Medlock, J.M., Barrass, I., Kerrod, E., Taylor, M.A., Leach, S. (2007). Analysis of climatic predictions for extrinsic incubation of Dirofilaria in the United kingdom. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, NY)*. **7**:4-14.
91. Alho, A., Nunes, T., Rinaldi, L., Meireles, J., Belo, S., Deplazes, P*., et al.* (2014). Transmission risk of Dirofilariosis in Portugal. *Parasites & vectors*. **7**:O16.
92. Pereira da Fonseca, I., Madeira de Carvalho, L., Carvalho, S., Carvalho-Varela, M. (1991). Prevalência da dirofilariose na população canina portuguesa. Detecção de microfilárias sanguíneas. *Vet Técnica*. **Set/Out**:36-8.
93. Aranda, C., Panyella, O., Eritja, R., Castella, J. (1998). Canine filariasis. Importance and transmission in the Baix Llobregat area, Barcelona (Spain). *Veterinary parasitology*. **77**:267-75.
94. Brito, A.C., Vila-Nova, M.C., Martins Rocha, D.A., Gomes Costa, L., Pinheiro de Almeida, W.A., da Silva Viana, L*., et al.* (2001). Prevalence of canine filariasis by

Dirofilaria immitis and *Dipetalonema reconditum* in Maceio, Alagoas State, Brazil. *Cadernos de saude publica*. **17**:1497-504.
95. Fan, C.K., Su, K.E., Lin, Y.H., Liao, C.W., Du, W.Y., Chiou, H.Y. (2001). Seroepidemiologic survey of *Dirofilaria immitis* infection among domestic dogs in Taipei City and mountain aboriginal districts in Taiwan (1998-1999). *Veterinary parasitology*. **102**:113-20.
96. Araujo, R.T., Marcondes, C.B., Bastos, L.C., Sartor, D.C. (2003). Canine dirofilariasis in the region of Conceicao Lagoon, Florianopolis, and in the Military Police kennel, Sao Jose, State of Santa Catarina, Brazil. *Veterinary parasitology*. **113**:239-42.
97. Labarthe, N., de Campos Pereira, M., Barbarini, O., McKee, W., Coimbra, C.A., Hoskins, J. (2003). Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis, Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. *Veterinary therapeutics : research in applied veterinary medicine*. **4**:67-75.
98. Song, K.H., Lee, S.E., Hayasaki, M., Shiramizu, K., Kim, D.H., Cho, K.W. (2003). Seroprevalence of canine dirofilariosis in South Korea. *Veterinary parasitology*. **114**:231-6.
99. Wu, C.C., Fan, P.C. (2003). Prevalence of canine dirofilariasis in Taiwan. *Journal of helminthology*. **77**:83-8.
100. Duran-Struuck, R., Jost, C., Hernandez, A.H. (2005). *Dirofilaria immitis* prevalence in a canine population in the Samana Peninsula (Dominican Republic) - June 2001. *Veterinary parasitology*. **133**:323-7.
101. Öncel, T., Vural, G. (2005). Seroprevalence of *Dirofilaria immitis* in stray dogs in Istanbul and Izmir. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. **29**:785-9.
102. Boonyapakorn, C., Srikitjakarn, L., Morakote, N., Hoerchner, F. (2008). The epidemiology of *Dirofilaria immitis* infection in outpatient dogs at Chiang Mai University Small Animal Hospital, Thailand. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. **39**:33-8.
103. Simsek, S., Utuk, A.E., Koroglu, E., Rishniw, M. (2008). Serological and molecular studies on *Dirofilaria immitis* in dogs from Turkey. *Journal of helminthology*. **82**:181-6.
104. Tasic, A., Rossi, L., Tasic, S., Miladinovic-Tasic, N., Ilic, T., Dimitrijevic, S. (2008). Survey of canine dirofilariasis in Vojvodina, Serbia. *Parasitology research*. **103**:1297-302.
105. Furtado, A.P., Do Carmo, E.S., Giese, E.G., Vallinoto, A.C., Lanfredi, R.M., Santos, J.N. (2009). Detection of dog filariasis in Marajo Island, Brazil by classical and molecular methods. *Parasitology research*. **105**:1509-15.
106. Meriem-Hind, B., Mohamed, M. (2009). Prevalence of canine *Dirofilaria immitis* infection in the city of Algiers, Algeria. *African Journal of Agricultural Research*. **4**:1097-100.
107. Montoya-Alonso, J.A., Mellado, I., Carreton, E., Cabrera-Pedrero, E.D., Morchon, R., Simon, F. (2010). Canine dirofilariosis caused by *Dirofilaria immitis* is a risk factor for the human population on the island of Gran Canaria, Canary Islands, Spain. *Parasitology research*. **107**:1265-9.
108. Rapti, D., Rehbein, S. (2010). Seroprevalence of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in Albania. *Parasitology research*. **107**:481-5.

109. Hou, H., Shen, G., Wu, W., Gong, P., Liu, Q., You, J.*, et al.* (2011). Prevalence of *Dirofilaria immitis* infection in dogs from Dandong, China. *Veterinary parasitology*. **183**:189-93.
110. Kose, M., Erdogan, M. (2012). Serological screening of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) infections in Turkey. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift*. **125**:503-8.
111. Selby, L.A., Corwin, R.M., Hayes, H.M., Jr. (1980). Risk factors associated with canine heartworm infection. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **176**:33-5.
112. Perez-Sanchez, R., Gomez-Bautista, M., Grandes, A.E. (1989). Canine filariasis in Salamanca (northwest Spain). *Annals of tropical medicine and parasitology*. **83**:143-50.
113. Montoya, J.A., Morales, M., Ferrer, O., Molina, J.M., Corbera, J.A. (1998). The prevalence of *Dirofilaria immitis* in Gran Canaria, Canary Islands, Spain (1994-1996). *Veterinary parasitology*. **75**:221-6.
114. Alves, L.C., de Almeida Silva, L.V., Faustino, M.A., McCall, J.W., Supakonderj, P., Labarthe, N.W.*, et al.* (1999). Survey of canine heartworm in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. **94**:587-90.
115. Yildirim, A., Ica, A., Atalay, O., Duzlu, O., Inci, A. (2007). Prevalence and epidemiological aspects of *Dirofilaria immitis* in dogs from Kayseri Province, Turkey. *Res Vet Sci*. **82**:358-63.
116. Yaman, M., Guzel, M., Koltas, I.S., Demirkazik, M., Aktas, H. (2009). Prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs from Hatay province, Turkey. *Journal of helminthology*. **83**:255-60.
117. Traversa, D., Aste, G., Milillo, P., Capelli, G., Pampurini, F., Tunesi, C.*, et al.* (2010). Autochthonous foci of canine and feline infections by *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in central Italy. *Veterinary parasitology*. **169**:128-32.
118. Montoya-Alonso, J.A., Carreton, E., Corbera, J.A., Juste, M.C., Mellado, I., Morchon, R.*, et al.* (2011). Current prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs, cats and humans from the island of Gran Canaria, Spain. *Veterinary parasitology*. **176**:291-4.
119. Simsek, S., Ozkanlar, Y., Balkaya, I., Aktas, M.S. (2011). Microscopic, serologic and molecular surveys on *Dirofilaria immitis* in stray dogs, Turkey. *Veterinary parasitology*. **183**:109-13.
120. Vezzani, D., Carbajo, A.E., Fontanarrosa, M.F., Scodellaro, C.F., Basabe, J., Cangiano, G.*, et al.* (2011). Epidemiology of canine heartworm in its southern distribution limit in South America: Risk factors, inter-annual trend and spatial patterns. *Veterinary parasitology*. **176**:240-9.
121. Mircean, V., Dumitrache, M.O., Gyorke, A., Pantchev, N., Jodies, R., Mihalca, A.D.*, et al.* (2012). Seroprevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis* and tick-borne infections (*Anaplasma phagocytophilum, Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Ehrlichia canis*) in dogs from Romania. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, NY)*. **12**:595-604.
122. Rosa, A., Ribicich, M., Betti, A., Kistermann, J.C., Cardillo, N., Basso, N.*, et al.* (2002). Prevalence of canine dirofilariosis in the City of Buenos Aires and its outskirts (Argentina). *Veterinary parasitology*. **109**:261-4.

123. Garcez, L.M., de Souza, N.F., Mota, E.F., Dickson, L.A., Abreu, W.U., Cavalcanti Vde, F.*, et al.* (2006). Focus of canine heartworm disease in Marajo Island, North of Brazil: A risk factor for human health. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. **39**:333-6.
124. Bolio-Gonzalez, M.E., Rodriguez-Vivas, R.I., Sauri-Arceo, C.H., Gutierrez-Blanco, E., Ortega-Pacheco, A., Colin-Flores, R.F. (2007). Prevalence of the *Dirofilaria immitis* infection in dogs from Merida, Yucatan, Mexico. *Veterinary parasitology*. **148**:166-9.
125. Yildiz, K., Duru, S.Y., Yagci, B.B., Ocal, N., Gazyagci, A.N. (2008). The prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs in Kirikkale. *Turkiye parazitolojii dergisi / Turkiye Parazitoloji Dernegi = Acta parasitologica Turcica / Turkish Society for Parasitology*. **32**:225-8.
126. Byeon, K.H., Kim, B.J., Kim, S.M., Yu, H.S., Jeong, H.J., Ock, M.S. (2007). A serological survey of *Dirofilaria immitis* infection in pet dogs of Busan, Korea, and effects of chemoprophylaxis. *The Korean journal of parasitology*. **45**:27-32.
127. Montoya, J.A., Morales, M., Juste, M.C., Banares, A., Simon, F., Genchi, C. (2006). Seroprevalence of canine heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) on Tenerife Island: an epidemiological update. *Parasitology research*. **100**:103-5.
128. Miller, L.L., Crosbie, P.R. (2011). Canine heartworm (*Dirofilaria immitis)* in Fresno and Madera Counties, California: prevalence differences between foothill and valley habitats. *Veterinary parasitology*. **175**:84-91.
129. Traversa, D., Di Cesare, A., Conboy, G. (2010). Canine and feline cardiopulmonary parasitic nematodes in Europe: emerging and underestimated. *Parasites & vectors*. **3**:62.
130. Cambournac, F., Pitta Simões, J. (1943). Sobre a frequência da infestação dos cães por *Dirofilaria immitis* Leidy, em Águas de Moura. *Anais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical*. **1**:115-25.
131. Clemente, M.L.T. (1996). Prevalence of canine dirofilariosis on Madeira Island. Detection and identification of microfilariae. *Veterinária Técnica*. **6**:34-7.
132. Ng, K.L., Lee, E.L., Sani, R.A. (2012). Low prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs in Johor Bahru, Malaysia as a reflection of vector availability? *Tropical biomedicine*. **29**:187-90.
133. Companion vector-borne diseases (CVBD) [Online]. [acedido a 08/05/2010]. Available from: http://www.cvdb.org.
134. Bowman, D., Little, S.E., Lorentzen, L., Shields, J., Sullivan, M.P., Carlin, E.P. (2009). Prevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis, Borrelia burgdorferi, Ehrlichia canis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in the United States: results of a national clinic-based serologic survey. *Veterinary parasitology*. **160**:138-48.
135. Little, S.E., Beall, M.J., Bowman, D.D., Chandrashekar, R., Stamaris, J. (2014). Canine infection with *Dirofilaria immitis, Borrelia burgdorferi, Anaplasma spp*., and *Ehrlichia spp.* in the United States, 2010-2012. *Parasites & vectors*. **7**:257.
136. Villeneuve, A., Goring, J., Marcotte, L., Overvelde, S. (2011). Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi, Anaplasma phagocytophilum, Ehrlichia canis,* and *Dirofilaria immitis* among dogs in Canada. *The Canadian veterinary journal La revue veterinaire canadienne*. **52**:527-30.

137. Scorza, A.V., Duncan, C., Miles, L., Lappin, M.R. (2011). Prevalence of selected zoonotic and vector-borne agents in dogs and cats in Costa Rica. *Veterinary parasitology*. **183**:178-83.
138. Fernandes, C.G.N., de Moura, S.T., Dias, A.R., de Souza Vieira Filho, W. (1999). Ocorrência de dirofilariose canina na região da Grande Cuiabá, Estado de Mato Grosso-Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. **36**:258-61.
139. Serra-Freire, N.V. (1997). Prevalencia de *Dirofilaria immitis* em cães no município de Belém-Pa, com base na microfilaremia *Rev Bras Parasitol Vet*. **6**:83-6.
140. McCown, M.E., Monterroso, V.H., Cardona, W. (2014). Surveillance for *Ehrlichia canis, Anaplasma phagocytophilum, Borrelia burgdorfer*i, and *Dirofilaria immitis* in Dogs From Three Cities in Colombia. *Journal of special operations medicine : a peer reviewed journal for SOF medical professionals*. **14**:86-90.
141. Hosseini, S.H., Malmasi, A., Aramoon, M. (2012). Survey of canine *Dirofilaria immitis* infection in Caspian provinces of Iran. In: Genchi, G., Kramer, F., Genchi, C., editors. Proceedings of Third European Dirofilaria Days; Jun, 21-22; Parma.
142. Oi, M., Yoshikawa, S., Ichikawa, Y., Nakagaki, K., Matsumoto, J., Nogami, S. (2014). Prevalence of *Dirofilaria immitis* among shelter dogs in Tokyo, Japan, after a decade: comparison of 1999-2001 and 2009-2011. *Parasite (Paris, France)*. **21**:10.
143. Wang, L.C. (1997). Canine filarial infections in north Taiwan. *Acta tropica*. **68**:115-20.
144. Liu, C., Yang, N., He, J., Yang, M., Sun, M. (2013). Prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs in Shenyang, Northeastern China. *The Korean journal of parasitology*. **51**:375-7.
145. Wang, S., He, J., Zhang, L. (2012). Serological investigation of vector-borne disease in dogs from rural areas of China. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. **2**:102-3.
146. Megat Abd Rani, P.A., Irwin, P.J., Gatne, M., Coleman, G.T., McInnes, L.M., Traub, R.J. (2010). A survey of canine filarial diseases of veterinary and public health significance in India. *Parasites & vectors*. **3**:30.
147. Theis, J.H., Tran, S.T., Carlos, M.P., Carlos, E.T., Carlos, S.M.E. (2008). Incidence of *Dirofilaria Immitis* (Leidy) in Client Owned Dogs from the Greater Metropolitan Manila Area of Luzon Island in The Philippines. *Open Veterinary Science Journal*. **2**:50-4.
148. Schwan, E.V., Durand, D.T. (2002). Canine filariosis caused by *Dirofilaria immitis* in Mozambique: a small survey based on the identification of microfilariae. *Journal of the South African Veterinary Association*. **73**:124-6.
149. Pereira, C., Almeida, C., Malta, M., Vilaca, R., Payo-Puente, P. (2013). First report of *Dirofilaria immitis* in the Republic of Cape Verde. *Veterinary parasitology*. **192**:290-1.
150. Macchioni, F., Dell'Omodarme, M., Prati, M.C., Tozzini, G., Masetti, M., Bruschi, F.*, et al.* (2009). Epidemiological investigation on the canine filarial infections in Tuscany,. In: Morchon, R., simon, F., Montoya-Alonso, J.A., Genchi, C., editors. Proceedings of Seconf European Dirofilaria Days; Set, 16-18.
151. Magi, M., Guardone, L., Prati, M.C., Tozzini, G., Torracca, B., Monni, G.*, et al.* (2012). Canine filarial infections in Tuscany, central Italy. *Journal of helminthology*. **86**:113-6.

152. Cringoli, G., Rinaldi, L., Veneziano, V., Capelli, G. (2001). A prevalence survey and risk analysis of filariosis in dogs from the Mt. Vesuvius area of southern Italy. *Veterinary parasitology*. **102**:243-52.
153. Rinaldi, L., Maurelli, M.P., Auriemma, S., Sorrentino, M., Musella, V., Pepe, P.*, et al.* (2012). *Dirofilaria immitis* i dogs from the Campania region of Southern Italy. In: Genchi, G., Kramer, F., Genchi, C., editors. Proceedings of Third European Dirofilaria Days; Jun, 21-22; Parma.
154. Scala, A., Pazzola, M., Giobbe, M., Sanna, G., Briguglio, P., Lutzu, M.*, et al.* (2009). Is a heartworm preventive treatment also advisable in Sardinia? In: Morchon, R., Simon, F., Montoya-Alonso, J.A., Genchi, C., editors. Proceedings of Second European Dirofilaria Days; Set, 16-18; Salamanca.
155. Pipia, A.P., Varcasia, A., Tosciri, G., Seu, S., Manunta, M.L., Mura, M.C.*, et al.* (2014). New insights onto cardiopulmonary nematodes of dogs in Sardinia, Italy. *Parasitology research*. **113**:1505-9.
156. Magi, M., Guardone, L., Prati, M.C., Mignome, W., Tozzini, G., Macchioni, F. (2014). Canine filaroid infections in an area of north-west Italy (Liguria) traditionally considered free from the disease. Proceedings of Fourth European Dirofilaria and Angiostrongylus Days (FEDAD); Jul, 2-4; Budapeste.
157. Ortega, A., Monteserrat, P., Diez Banos, P., Morrondo, P. (1994). Estado actual de la filariosis canina en el sur de la provincial de Pontevedra. Proceedings of XIX Congresso Nacional AVEPA; Set, 14-16; Barcelona.
158. Morchon, R., Garcia-Guasch, L., Manubens-Grau, J., Armario, B., Mellado-Hernandez, I., Carreton, E.*, et al.* (2012). Prevalence of canine and feline dirofilariosis in Barcelona province (northeastern Spain). In: Genchi, G., Kramer, F., Genchi, C., editors. Proceedings of Third European Dirofilaria Days; Jun, 21-22; Parma.
159. Solano-Gallego, L., Llull, J., Osso, M., Hegarty, B., Breitschwerdt, E. (2006). A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Veterinary research*. **37**:231-44.
160. Gonzalez-Miguel, J., Mellado-Hernandez, I., Botarri, R., Rota, E., Hernandez, M.V., Andrés-Perez, C.*, et al.* (2009). Current prevalence of *Dirofilaria immitis* in Salamanca (western Spain). In: Morchon, R., Simon, F., Montoya-Alonso, J.A., Genchi, C., editors. Proceedings of Second European Dirofilaria Days; Set, 16-18; Salamanca.
161. Morchon, R., Moya, I., Gonzalez-Miguel, J., Montoya, M.N., Simon, F. (2010). Zoonotic *Dirofilaria immitis* infections in a province of Northern Spain. *Epidemiology and infection*. **138**:380-3.
162. Morchon, R., Gonzalez-Miguel, J., Simon, F., Rodes-Moltó, D. (2009). First epidemiological survey on canine dirofilariosis in Galícia (northwestern of Spain). In: Morchon, R., simon, F., Montoya-Alonso, J.A., Genchi, C., editors. Proceedings of Second European Dirofilaria Days; Set, 16-18.
163. Miro, G., Montoya, A., Roura, X., Galvez, R., Sainz, A. (2013). Seropositivity rates for agents of canine vector-borne diseases in Spain: a multicentre study. *Parasites & vectors*. **6**:117.
164. Pantchev, N., Schaper, R., Limousin, S., Norden, N., Weise, M., Lorentzen, L. (2009). Occurrence of *Dirofilaria immitis* and tick-borne infections caused by *Anaplasma phagocytophilum, Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia canis* in domestic dogs in

France: results of a countrywide serologic survey. *Parasitology research*. **105 Suppl 1**:S101-14.
165. Diakou, A., Kapantaidakis, E. (2014). Epidemiology of dirofilariosis in dogs in Greece previous and latest information. Proceedings of Fourth European *Dirofilaria* and *Angiostrongylus* Days (FEDAD); Jul, 2-4; Budapeste.
166. Avcioglu, H., Guyen, E. (2014). Prevalence of *Dirofilaria immitis* in pet and stry dogs in Belgrade area in period 2012-2013. Proceedings of Fourth European *Dirofilaria* and *Angiostrongylus* Days (FEDAD); July 2-4; Budapest.
167. Ionica, A., Matei, I., Mircean, V., Dumitrache, M.O., Annoscia, G., Otranto, D.*, et al.* (2014). Filaroide infections in dogs from Romenia: a broader view. Proceedings of Fourth European Dirofilaria and Angiostrongylus Days (FEDAD); Jul, 2-4; Budapeste.
168. Florea, C., Olaru, S., Dobrica, A., Tudor, P. (2014). Epidemiologically study about natural infestation with *Dirofilaria* in shelters located in the southern part of Romania. Proceedings of Fourth European Dirofilaria and Angiostrongylus Days (FEDAD); Jul. 2-4; Budapeste.
169. Girdan, G., Ionija, M., Mitrea, I. (2014). Serological survey on canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection and other vector-borne pathogens in dogs from Bucharest, Romania. Proceedings of Fourth European Dirofilaria and Angiostrongylus Days (FEDAD); Jul, 2-4; Budapeste.
170. Pavlovic, I., Terzin, V., Curcin, L., Petkovic, D., Terzin, D., Curcin, K. (2009). Dirofilariosis prevalence at stray and pet dogs at Belgrade area in period 2007-2008. In: Morchon, R., Simon, F., Montoya-Alonso, J.A., Genchi, C., editors. Proceedings of Second European Dirofilaria Days; Set, 16-18; Salamanca.
171. Gabrielli, S., Tasic, A., Miladinovic-Tasic, N., Tasic-Otasevic, S.A., Cancrini, G. (2012). Seroprevalence of dirofilariosis in Serbia. In: Genchi, G., Kramer, F., Genchi, C.e. Proceedings of Third European Dirofilaria Days; Jun, 21-22; Parma.
172. Kosek, W., Simin, S., Lalosevic, V., Kuruca, L., Nikolic, S., Nerac, D. (2014). Updating the prevalence of canine dirofilariosis in pet dogs in Novisad, Vojvodina, Serbia. Proceedings of Fourth European Dirofilaria and Angiostrongylus Days (FEDAD); Jul, 2-4; Budapeste.
173. Svobodova, V., Misonova, P. (2005). The potential risk of *Dirofilaria immitis* becoming established in the Czech Republic by imported dogs. *Veterinary parasitology*. **128**:137-40.
174. Miterpakova, M., Antolova, D., Hurnikova, Z., Dubinsky, P., Pavlacka, A., Nemeth, J. (2010). Dirofilaria infections in working dogs in Slovakia. *Journal of helminthology*. **84**:173-6.
175. Kartashev, V., Batashova, I., Kartashov, S., Ermakov, A., Mironova, A., Kuleshova, Y.*, et al.* (2011). Canine and Human Dirofilariosis in the Rostov Region (Southern Russia). *Veterinary Medicine International*. **2011**:5.
176. Volgina, N.S., Romashov, B.V., Romashova, N.B., Shtannikov, A.V. (2013). Prevalence of borreliosis, anaplasmosis, ehrlichiosis and *Dirofilaria immitis* in dogs and vectors in Voronezh Reserve (Russia). *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. **36**:567-74.

177. Pantchev, N., Norden, N., Lorentzen, L., Rossi, M., Rossi, U., Brand, B.*, et al.* (2009). Current surveys on the prevalence and distribution of *Dirofilaria* spp. in dogs in Germany. *Parasitology research*. **105 Suppl 1**:S63-74.
178. Bellamy, R., Salmon, R. (1999). Risk of importation of diseases exotic to Great Britain following the relaxation of quarantine regulations. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. **92**:683-7.
179. Goodfellow, M., Shaw, S. (2005). Exotic diseases of dogs and cats at risk of importation to Ireland. *Irish veterinary journal*. **58**:271-7.
180. Jacsó, O., Mándoki, M., Majoros, G., Pétsch, M., Mortarino, M., Genchi, C.*, et al.* (2009). First autochthonous *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) infection in a dog in Hungary. *Helminthologia*. **46**:159-61.
181. Fok, É. (2012). The spreading of *Dirofilaria immitis* infections in Eastern European countries. . In: Genchi, G., Kramer, F., Genchi, C., editors. Proceedings of Third European Dirofilaria Days; Jun, 21-22; Parma.
182. Tolnai, Z., Szell, Z., Sproch, A., Szeredi, L., Sreter, T. (2014). *Dirofilaria immitis*: an emerging parasite in dogs, red foxes and golden jackals in Hungary. *Veterinary parasitology*. **203**:339-42.
183. Farkas, R., Gyurkovszky, M., Lukacs, Z., Aladics, B., Solymosi, N. (2014). Seroprevalence of some vector-borne infections of dogs in Hungary. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, NY)*. **14**:256-60.
184. Kramer, F., Schaper, R., Schunack, B., Polozowski, A., Piekarska, J., Szwedko, A.*, et al.* (2014). Serological detection of *Anaplasma phagocytophilum, Borrelia burgdorfer*i sensu lato and *Ehrlichia canis* antibodies and *Dirofilaria immitis* antigen in a countrywide survey in dogs in Poland. *Parasitology research*. **113**:3229-39.
185. Araújo, A.M. (1996). Canine and Human *Dirofilaria immitis* infection in Portugal. A review. VII European Multicolloquium of Parasitology. Parma, Italy, 2-6 September 1996. Abstracts. *Parassitologia*. **38**:1-479.
186. Cardoso, L., Mendao, C., Madeira de Carvalho, L. (2012). Prevalence of *Dirofilaria immitis, Ehrlichia canis, Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma spp.* and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal--a national serological study. *Parasites & vectors*. **5**:62.
187. Sousa, S., Pimentel, M., Silva, A., Madeira de Carvalho, L. (2008). Dirofilariose Canina no distrito de Coimbra. In: SPCV. Proceedings do Congresso de Ciências Veterinárias; Nov, 27-29; Santarém.
188. Rendall-Rocah, C., Fonseca, I., Cardoso, L. (2012). *Dirofilaria immitis* infection and dirofilariosis in dogs from Baixo Vouga (Central Portugal) (Poster). In: Genchi, G., Kramer, F., Genchi, C., editors. Proceedings of Third European Dirofilaria Days; Jun, 21-22; Parma.
189. Vieira, L., Silvestre-Ferreira, A.C., Fontes-Sousa, A.P., Balreira, A.C., Morchon, R., Carreton, E.*, et al.* (2014). Seroprevalence of heartworm (*Dirofilaria immitis*) in feline and canine hosts from central and northern Portugal. *Journal of helminthology*.1-5.
190. Alho, A.M., Landum, M., Ferreira, C., Meireles, J., Goncalves, L., de Carvalho, L.M.*, et al.* (2014). Prevalence and seasonal variations of canine dirofilariosis in Portugal. *Veterinary parasitology*. **206**:99-105.

191. Alho, A.M., Landum, M., Madeira de Carvalho, L., Meireles, J., Gonçalves, L., Belo, S. (2012). Updating the epidemiological satus of canine dirofilariosis in Portugal - preliminary results. In: Genchi, G., Kramer, L., Genchi, C., editors. Proceedings of the Third European Dirofilaria Days; 21-22 Jun; Parma.
192. Alho, A.M., Féliz, L., Meireles, J., Belo, S., Madeira de Carvalho, L. (2014). Parasitoses gastrointestinais e cardiopulmonares em canídeos - estudo epidemiológico em canis de Portugal Continental. *Acta Parasitológica Portuguesa*. **20**:122-3.
193. Maia, C., Coimbra, M., Ramos, C., Cristóvão, J.M., Cardoso, L., Campino, L. (2015). Serological investigation of *Leishmania infantum, Dirofilaria immitis* and *Angiostrongylus vasorum* in dogs from southern Portugal. *Age (months)*. **155**:0.530.
194. McCall, J.W., Genchi, C., Kramer, L., Guerrero, J., Dzimianski, M.T., Supakorndej, P*., et al.* (2008). Heartworm and *Wolbachia*: therapeutic implications. *Veterinary parasitology*. **158**:204-14.
195. Kramer, L. (2009). Pathogenesis of *Dirofilaria* spp. In: Morchon, R., Simon, F., Montoya-Alonso, J.A., Genchi, C., editors. Proceedings of Second European Dirofilaria Days; Set, 16-18; Salamanca.
196. Grandi, G., Zivienjak, T., Beck, R. (2007). Pathogenesis of *Dirofilaria spp.* infection. In: Cringoli, G., editors. Proceedings of First European Dirofilaria Days; Fev, 22-25; Zabreb.
197. Morchon, R., Simon, F., Gonzalez-Miguel, J., Mellado-Hernandez, I. (2009). Relationship *Dirofilaria*/host: cellular and molecular mechanism of the heartworm disease vascular pathology. In: Morchon, R., Simon, F., Montoya-Alonso, J.A., Genchi, C., editors. Proceedings of Second European Dirofilaria Days; Set, 16-18.
198. Kitagawa, H., Sasaki, Y., Sukigara, T., Ishihara, K. (1987). Clinical studies on canine dirofilarial hemoglobinuria: changes in right heart hemodynamics inducing heartworm migration from pulmonary artery. *Nihon juigaku zasshi The Japanese journal of veterinary science*. **49**:485-9.
199. Schrey, F., Trautvetter, E. (1998). Canine and feline heartworm disease-diagnosis and therapy. *Focus*. **8**.
200. Venco, L. (2009). New insight into HW disease management: from old legends to the present looking to the future. In: Morchon, R., Simon, F., Montoya-Alonso, J.A., Genchi, C., editors. Proceedings of Second European Dirofilaria Days; Set,16-18; Salamanca.
201. Wang, J.S., Tung, K.C., Huang, C.C., Lai, C.H. (2005). Alteration of extracellular collagen matrix in the myocardium of canines infected with *Dirofilaria immitis*. *Veterinary parasitology*. **131**:261-5.
202. Castleman, W.L., Wong, M.M. (1982). Light and electron microscopic pulmonary lesions associated with retained microfilariae in canine occult dirofilariasis. *Veterinary pathology*. **19**:355-64.
203. Simpson, C.F., Gebhardt, B.M., Bradley, R.E., Jackson, R.F. (1974). Glomerulosclerosis in canine heartworm infection. *Veterinary pathology*. **11**:506-14.
204. Casey, H.W., Splitter, G.A. (1975). Membranous glomerulonephritis in dogs infected with Dirofilaria immitis. *Veterinary pathology*. **12**:111-7.
205. Kamiie, J., Shirota, K., Yamaki, M., Kitagawa, H., Wasaki, M., Ooi, H.K. (2000). Abnormal distribution of anionic sites in the glomerular basement membrane in

glomerulonephritis of dogs infected with *Dirofilaria immitis*. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*. **62**:1193-5.
206. Paes-de-Almeida, E.C., Ferreira, A.M., Labarthe, N.V., Caldas, M.L., McCall, J.W. (2003). Kidney ultrastructural lesions in dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). *Veterinary parasitology*. **113**:157-68.
207. Dantas-Torres, F., Lia, R.P., Barbuto, M., Casiraghi, M., Crovace, A., Caligiani, L., *et al.* (2009). Ocular dirofilariosis by *Dirofilaria immitis* in a dog: first case report from Europe. *The Journal of small animal practice*. **50**:667-9.
208. Hayasaki, M., Ueno, M., Ejima, H., Munakata, A., Tamura, Y. (2013). A possible port of entry into the eye of dog during erratic canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) parasitism. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*. **75**:355-9.
209. Venco, L., Kramer, L., Genchi, C. (2005). Heartworm disease in dogs: unusual clinical cases. *Veterinary parasitology*. **133**:207-18.
210. Oh, H.W., Jun, H.K., You, M.J., Hayasaki, M., Song, K.H. (2008). Ectopic migration of an adult heartworm in a dog with dirofilariasis (case report). *The Korean journal of parasitology*. **46**:171-3.
211. Gonzalez-Miguel, J., Morchon, R., Mellado-Hernandez, I., Carreton, E., Montoya-Alonso, J.A., Simon, F. (2012). Surface antigen from *Dirofilaria immitis* adult worms interact with host fibrinolytic system. In: Genchi, G., Kramer, F., Genchi, C., editors. Proceedings of Third European Dirofilaria Days; Jun, 21-22; Parma.
212. Morchon, R., Gonzalez-Miguel, J., Mellado, I., Velasco, S., Rodriguez-Barbero, A., Simon, F. (2010). Adult *Dirofilaria immitis* excretory/secretory antigens upregulate the production of prostaglandin E2 and downregulate monocyte transmigration in an "in vitro" model of vascular endothelial cell cultures. *Veterinary parasitology*. **170**:331-5.
213. Gonzalez-Miguel, J., Morchon, R., Mellado, I., Carreton, E., Montoya-Alonso, J.A., Simon, F. (2012). Excretory/secretory antigens from *Dirofilaria immitis* adult worms interact with the host fibrinolytic system involving the vascular endothelium. *Molecular and biochemical parasitology*. **181**:134-40.
214. Gonzalez-Miguel, J., Larrazabal, C., Morchon, R., Carreton, E., Montoya-Alonso, J.A., Simon, F. (2014). Can the activation of plasminogen/plasmin system of the host by metabolic products of *Dirofilaria immitis* participate in heartworm disease endarteritis? Proceedings of Fourth European Dirofilaria and Angiostrongylus Days (FEDAD); Jul, 2-4; Budapeste.
215. Gonzalez-Miguel, J., Martin, L., Rossi, A., Morchon, R., Mellado-Hernandez, I., Siles-Lucas, M., *et al.* (2014). Molecular and functional characterization of the plasminogen-binding of *Dirofilaria immitis* ACT, FBAL, GADHP and GAL. Proceedings of Fourth European Dirofilaria and Angiostrongylus Days (FEDAD); Jul, 2-4; Budapeste.
216. Gonzalez-Miguel, J., Morchon, R., Carreton, E., Montoya-Alonso, J.A., Simon, F. (2013). Surface associated antigens of *Dirofilaria immitis* adult worms activate the host fibrinolytic system. *Veterinary parasitology*. **196**:235-40.
217. Morchon, R., Bazzocchi, C., Lopez-Belmonte, J., Martin-Pacho, J.R., Kramer, L.H., Grandi, G., *et al.* (2007). iNOs expression is stimulated by the major surface protein (rWSP) from Wolbachia bacterial endosymbiont of *Dirofilaria immitis* following subcutaneous injection in mice. *Parasitology international*. **56**:71-5.

218. Simon, F., Kramer, L.H., Roman, A., Blasini, W., Morchon, R., Marcos-Atxutegi, C.*, et al.* (2007). Immunopathology of *Dirofilaria immitis* infection. *Veterinary research communications*. **31**:161-71.
219. Oleaga, A., Perez-Sanchez, R., Pages, E., Marcos-Atxutegi, C., Simon, F. (2009). Identification of immunoreactive proteins from the dog heartworm (*Dirofilaria immitis*) differentially recognized by the sera from dogs with patent or occult infections. *Molecular and biochemical parasitology*. **166**:134-41.
220. Kramer, L., Grandi, G., Leoni, M., Passeri, B., McCall, J., Genchi, C.*, et al.* (2008). Wolbachia and its influence on the pathology and immunology of *Dirofilaria immitis* infection. *Veterinary parasitology*. **158**:191-5.
221. Kramer, L. (2014). *Wolbachia* in canine and feline heartworm infection. Proceedings of Fourth European Dirofilaria and Angiostrongylus Days (FEDAD); Jul, 2-4; Budapeste.
222. Kozek, W.J., Gonzalez-Miguel, J., Amigo, L. (2007). *Wolbachia* of *Dirofilaria immitis:* an historical perspective and morphological characteristics. In: Cringoli, G., editors. Proceedings of First European Dirofilaria Days; Fev, 22-25; Zagreb.
223. Kozek, W.J. (2005). What is new in the Wolbachia/Dirofilaria interaction? *Veterinary parasitology*. **133**:127-32.
224. Bandi, C., Trees, A.J., Brattig, N.W. (2001). Wolbachia in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases. *Veterinary parasitology*. **98**:215-38.
225. McHaffie, J. (2012). *Dirofilaria immitis* and *Wolbachia pipientis*: a thorough investigation of the symbiosis responsible for canine heartworm disease. *Parasitology research*. **110**:499-502.
226. Simon, F., Kramer, L., Morchon, R., Genchi, C. (2007). A possible role for *Wolbachia* in the diagnosis of *Dirofilaria* infections. In: Cringoli, G.e. Proceedings of First European Dirofilaria Days; Fev, 22-25.
227. Genchi, C., Bazzochi, C., Kramer, L., Genchi, M., Bandi, C. (2005). *Dirofilaria/Wolbachia* Symbiosis a Friend Or a Foe. Memorias Congreso WSAVA; Cidade do México.
228. Kramer, L.H., Tamarozzi, F., Morchon, R., Lopez-Belmonte, J., Marcos-Atxutegi, C., Martin-Pacho, R.*, et al.* (2005). Immune response to and tissue localization of the *Wolbachia* surface protein (WSP) in dogs with natural heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection. *Veterinary immunology and immunopathology*. **106**:303-8.
229. Morchon, R., Carreton, E., Grandi, G., Gonzalez-Miguel, J., Montoya-Alonso, J.A., Simon, F.*, et al.* (2012). Anti-Wolbachia Surface Protein antibodies are present in the urine of dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis* with circulating microfilariae but not in dogs with occult infections. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, NY)*. **12**:17-20.
230. Grandi, G., Quintavalla, C., Mavropoulou, A., Genchi, M., Gnudi, G., Bertoni, G.*, et al.* (2010). A combination of doxycycline and ivermectin is adulticidal in dogs with naturally acquired heartworm disease (*Dirofilaria immitis*). *Veterinary parasitology*. **169**:347-51.
231. Landum, M., Ferreira, C.C., Calado, M., Alho, A.M., Mauricio, I.L., Meireles, J.S.*, et al.* (2014). Detection of *Wolbachia* in Dirofilaria infected dogs in Portugal. *Veterinary parasitology*. **204**:407-10.

232. Venco, L. (2007). Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs. In: Cringoli, G., editors. Proceedings of First European Dirofilaria Days; Fev, 22-25; Zagreb.
233. Sevimli, F.K., Kozan, E., Bulbul, A., Birdane, F.M., Kose, M., Sevimli, A. (2007). *Dirofilaria immitis* infection in dogs: unusually located and unusual findings. *Parasitology research*. **101**:1487-94.
234. Miller, M., Gordon, S. (2009) Canine Heartworm Disease. In: Bonagura, J.D., Twedt, D.C., editors. Kirk's Current Veterinary Therapy XIV. Missouri: Elsevier Health Sciences. p. 837-42.
235. Marcucci, B., Berzon, J. (2007). A Comparison of Canine and Feline Heartworm Disease. *Veterinary Techinician*. **28**:216.
236. Venco, L., McCall, J.W., Guerrero, J., Genchi, C. (2004). Efficacy of long-term monthly administration of ivermectin on the progress of naturally acquired heartworm infections in dogs. *Veterinary parasitology*. **124**:259-68.
237. McCall, J. (2009). Update American Heartworm Society Canine Guidelines with emphasis on the role of doxycycline in adulticidal therapy. In: Morchon, R., Simon, F., Montoya-Alonso, J.A., Genchi, C., editors. Proceedings of Second European Dirofilaria Days; Ser, 16-18; Salamanca.
238. Venco, L. (2014). Radiology vs Ecocardiography. How to squeeze the best from each of them for staging, monitoring and choosing the best therapy in heartworm disease in dogs. Proceedings of Fourth European Dirofilaria and Angiostrongylus Days (FEDAD); Jul, 2-4; Budapeste.
239. Atkins, C. (2009) Canine Heartworm Disease. In: Ettinger, S.J., Feldman, E.C., editors. Textbook of veterinary internal medicine. 7ª ed. UK: Elsevier Health Sciences. p. 1118-36.
240. Niwetpathomwat, A., Kaewthamasorn, M., Tiawsirisup, S., Techangamsuwan, S., Suvarnvibhaja, S. (2007). A retrospective study of the clinical hematology and the serum biochemistry tests made on canine dirofilariasis cases in an animal hospital population in Bangkok, Thailand. *Research in Veterinary Science*. **82**:364-9.
241. Tabrizi, B.A. (2012). Evaluation of Calcium, Phosphorus and Alkaline Phosphatase in *Dirofilaria immitis* Infection in Dogs. *World Journal of Zoology*. **7**:79-82.
242. Carreton, E., Corbera, J.A., Jutes, M., Morchon, R., Montoya-Alonso, J.A. (2009). Cardiopulmonar biomarkers in dogs infected by *Dirofilaria immitis* In: Morchon, R., Simon, F., Montoya-Alonso, J.A., Genchi, C., editors. Proceedings of Second European Dirofilaria Days; Set. 16-18; Salamanca.
243. Carreton, E., Méndez, J., Morchon, R., Simon, F., Montoya-Alonso, J.A. (2009). Variation of cardiopulmonart biomarkers and other metabolic parameters during adulticide treatment in dogs with heartworm disease. In: Genchi, G., Kramer, L., Genchi, C., editors. Proceeding of Third European Dirofilaria Day; Jun 21-22; Parma.
244. Carreton, E., Grandi, G., Morchon, R., Simon, F., Passeri, B., Cantoni, A.M*., et al.* (2012). Myocardial damage in dogs affected by heartworm disease (*Dirofilaria immitis*): immunohistochemical study of cardiac myoglobin and troponin I in naturally infected dogs. *Veterinary parasitology*. **189**:390-3.
245. Carreton, E., Grandi, G., Gonzalez-Miguel, J., Montoya-Alonso, J.A., Morchon, R., Simon, F*., et al.* (2012). Expression of D-dimer in lung and kidney of heartworm-infected

dogs. In: Genchi, G., Kramer, L., Genchi, C., editors. Proceeding of Third European Dirofilaria Days; Jun 21-22; Parma.
246. Carreton, E., Gonzalez-Miguel, J., Montoya-Alonso, J.A., Morchon, R., Simon, F., Passeri, B.*, et al.* (2013). D-dimer deposits in lungs and kidneys suggest its use as a marker in the clinical workup of dogs with heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease. *Veterinary parasitology*. **191**:182-6.
247. Carreton, E., Corbera, J.A., Juste, M.C., Morchon, R., Simon, F., Montoya-Alonso, J.A. (2011). *Dirofilaria immitis* infection in dogs: cardiopulmonary biomarker levels. *Veterinary parasitology*. **176**:313-6.
248. Venco, L., Bartozzolo, W., Giordano, G. (2012). Evaluation of C-reactive protein (CRP) as clinical biomarkers naturally heartworm infected dogs, field study. In: Genchi, G., Kramer, F., Genchi, C., editors. Proceedings of Third European Dirofilaria Days; Jun, 21-22; Parma.
249. Genchi, C., Venco, L., Genchi, M. (2007). Guideline for the laboratory diagnosis of canine and feline *Dirofilaria* infection. In: Cringoli, G., editors. Proceedings of First European Dirofilaria Days; Fev, 22-25; Zagreb.
250. Datz, C. (2003). Update on canine and feline heartworm tests. *Compendium*. **25**:30-41.
251. Magnis, J., Lorentz, S., Guardone, L., Grimm, F., Magi, M., Naucke, T.J.*, et al.* (2013). 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**:48.
252. American Heartworm Society. (2014). Curret canine guidelines for the diagnosis, prevention, and management of heartworm (Dirofilaria immitis) infection in dogs and cats [Online]. [acedido a 15/05/2014]. Available from: http://www.heartwormsociety.org/.
253. Peribanez, M.A., Lucientes, J., Arce, S., Morales, M., Castillo, J.A., Gracia, M.J. (2001). Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis, Dirofilaria repens* and *Acanthocheilonema dracunculoides* microfilariae by staining with a commercial kit, Leucognost-SP. *Veterinary parasitology*. **102**:173-5.
254. Chalifoux, L., Hunt, R.D. (1971). Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **158**:601-5.
255. Mar, P.H., Yang, I.C., Chang, G.N., Fei, A.C. (2002). Specific polymerase chain reaction for differential diagnosis of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* using primers derived from internal transcribed spacer region 2 (ITS2). *Veterinary parasitology*. **106**:243-52.
256. Casiraghi, M., Bazzocchi, C., Mortarino, M., Ottina, E., Genchi, C. (2006). A simple molecular method for discriminating common filarial nematodes of dogs (Canis familiaris). *Veterinary parasitology*. **141**:368-72.
257. Rishniw, M., Barr, S.C., Simpson, K.W., Frongillo, M.F., Franz, M., Dominguez Alpizar, J.L. (2006). Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Veterinary parasitology*. **135**:303-14.
258. Gioia, G., Lecová, L., Genchi, M., Ferri, E., Genchi, C., Mortarino, M. (2010). Highly sensitive multiplex PCR for simultaneous detection and discrimination of

Dirofilaria immitis and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood. *Veterinary parasitology*. **172**:160-3.
259. Silbermayr, K., Eigner, B., Duscher, G., Joachim, A., Fuehrer, H.P. (2014). Direct PCR for detection of different *Dirofilaria* spp. and stages in diferrent substrate. Proceedings of Fourth European Dirofilaria and Angiostrongylus Days (FEDAD); Jul, 2-4; Budapeste.
260. Atkins, C.E. (2003). Comparison of results of three commercial heartworm antigen test kits in dogs with low heartworm burdens. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **222**:1221-3.
261. McTier, T.L., McCall, J.W., Supakorndej, N., Soll, M.D., Knight, D. (1995). Features of adult heartworm antigen test kits. In: AHS. Proceedings of the heartworm symposium; Batavia.
262. Goodwin, J.K. (1998). The serologic diagnosis of heartworm infection in dogs and cats. *Clinical techniques in small animal practice*. **13**:83-7.
263. McCall, J.W. (2005). The safety-net story about macrocyclic lactone heartworm preventives: a review, an update, and recommendations. *Veterinary parasitology*. **133**:197-206.
264. Schnyder, M., Deplazes, P. (2012). Cross-reactions of sera from dogs infected with *Angiostrongylus vasorum* in commercially available *Dirofilaria immitis* test kits. *Parasites & vectors*. **5**:258.
265. Little, S.E., Munzing, C., Heise, S.R., Allen, K.E., Starkey, L.A., Johnson, E.M.*, et al.* (2014). Pre-treatment with heat facilitates detection of antigen of *Dirofilaria immitis* in canine samples. *Veterinary parasitology*. **203**:250-2.
266. Velasquez, L., Blagburn, B.L., Duncan-Decoq, R., Johnson, E.M., Allen, K.E., Meinkoth, J.*, et al.* (2014). Increased prevalence of *Dirofilaria immitis* antigen in canine samples after heat treatment. *Veterinary parasitology*. **206**:67-70.
267. Toma, B., Dufour, B., Sanaa, M., Benet, J., Shaw, A., Moutou, F.*, et al.* (2004). Epidemiologia aplicada: à luta colectiva contra as principais doenças animais transmissíveis. Fundação Calouste Gulbenkian.
268. McCall, J.W., Supakorndej, N., Donoghue, A.R., Turnbull, R.K., Radecki, S.V. (2001). Evaluation of the performance of canine heartworm antigen test kits licensed for use by veterinarians and canine heartworm antigen tests conducted by diagnostic laboratories. In: AHS. Recent Advances in Heartworm Disease: Symposium'01; Texas.
269. Genchi, C., Ferrari, N., Venco, L., Billi, M., Savary Bataille, K., Genchi, M. (2012). Evaluation of the performance of heartworm antigen test kits and heartworm antibody test kits for the diagnosis of the infection in dogs and cats. In: Genchi, G., Kramer, F., Genchi, C., editors. Proceedings of Third European Dirofilaria Days; Jun, 21-22; Parma.
270. Vezzani, D., Fontanarrosa, M.F., Eiras, D.F. (2008). Are antigen test kits efficient for detecting heartworm-infected dogs at the southern distribution limit of the parasite in South America? Preliminary results. *Res Vet Sci*. **85**:113-5.
271. Courtney, C.H. (2001). Comparing the performance of heartworm antigen tests in dogs. In: AHS. Proceedings Heartworm Symposium; Texas.
272. Courtney, C.H. (1992). Guidelines for the use of parasitologic and serologic screening for heartworm infection. In: AHS. Proceedings of Heartworm Symposium; Austin.

273. Shaw, D.H., Ihle, S.L. (2013). Small animal internal medicine. 2ª ed. John Wiley & Sons.
274. Nelson, C.T., McCall, J.W., Rubin, S.B., Buzhardt, L.F., Dorion, D.W., Graham, W.*, et al.* (2005). 2005 Guidelines for the diagnosis, prevention and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. *Veterinary parasitology*. **133**:255-66.
275. American Heartworm Society. (2010). Diagnosis, prevention and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs [Online]. [acedido a 15/08/2013]. Available from: http://www.heartwormsociety.org/.
276. Hoch, H., Strickland, K. (2008). Canine and feline dirofilariasis: prophylaxis, treatment, and complications of treatment. *Compendium (Yardley, PA)*. **30**:146-51; quiz 51-2.
277. Boy, M.G., Six, R.H., Thomas, C.A., Novotny, M.J., Smothers, C.D., Rowan, T.G.*, et al.* (2000). Efficacy and safety of selamectin against fleas and heartworms in dogs and cats presented as veterinary patients in North America. *Veterinary parasitology*. **91**:233-50.
278. Clemence, R.G., Sarasola, P., Genchi, C., Smith, D.G., Shanks, D.J., Jernigan, A.D.*, et al.* (2000). Efficacy of selamectin in the prevention of adult heartworm (Dirofilaria immitis) infection in dogs in northern Italy. *Veterinary parasitology*. **91**:251-8.
279. McTier, T.L., Shanks, D.J., Watson, P., McCall, J.W., Genchi, C., Six, R.H.*, et al.* (2000). Prevention of experimentally induced heartworm (*Dirofilaria immitis*) infections in dogs and cats with a single topical application of selamectin. *Veterinary parasitology*. **91**:259-68.
280. Blagburn, B.L., Dillon, A.R., Arther, R.G., Butler, J.M., Newton, J.C. (2011). Comparative efficacy of four commercially available heartworm preventive products against the MP3 laboratory strain of *Dirofilaria immitis*. *Veterinary parasitology*. **176**:189-94.
281. Bowman, D.D. (2012). Heartworms, macrocyclic lactones, and the specter of resistance to prevention in the United States. *Parasites & vectors*. **5**:138.
282. Genchi, C., Rossi, L., Cardini, G., Kramer, L.H., Venco, L., Casiraghi, M.*, et al.* (2002). Full season efficacy of moxidectin microsphere sustained release formulation for the prevention of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. *Veterinary parasitology*. **110**:85-91.
283. Holm-Martin, M., Atwell, R. (2004). Evaluation of a single injection of a sustained-release formulation of moxidectin for prevention of experimental heartworm infection after 12 months in dogs. *American journal of veterinary research*. **65**:1596-9.
284. Lok, J.B., Knight, D.H., Nolan, T.J., Grubbs, S.T., Cleale, R.M., Heaney, K. (2005). Efficacy of an injectable, sustained-release formulation of moxidectin in preventing experimental heartworm infection in mongrel dogs challenged 12 months after administration. *Veterinary parasitology*. **128**:129-35.
285. Lok, J.B., Knight, D.H., Wang, G.T., Doscher, M.E., Nolan, T.J., Hendrick, M.J.*, et al.* (2001). Activity of an injectable, sustained-release formulation of moxidectin administered prophylactically to mixed-breed dogs to prevent infection with *Dirofilaria immitis*. *American journal of veterinary research*. **62**:1721-6.
286. Veterinary Network Information (VIN) [Online]. [acedido a 08/05/2012]. Available from: http://www.vin.com.

287. Otranto, D., de Caprariis, D., Lia, R.P., Tarallo, V., Lorusso, V., Testini, G.*, et al.* (2010). Prevention of endemic canine vector-borne diseases using imidacloprid 10% and permethrin 50% in young dogs: a longitudinal field study. *Veterinary parasitology*. **172**:323-32.
288. Hettlich, B.F., Ryan, K., Bergman, R.L., Marks, S.L., Lewis, B.C., Bahr, A.*, et al.* (2003). Neurologic complications after melarsomine dihydrochloride treatment for *Dirofilaria immitis* in three dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **223**:1456-61, 34.
289. McCall, J.W., Kramer, L., Genchi, C., Guerrero, J., Dzimianski, M.T., Supakorndej, P.*, et al.* (2011). Effects of doxycycline on early infections of *Dirofilaria immitis* in dogs. *Veterinary parasitology*. **176**:361-7.
290. Kramer, L., Grandi, G., Passeri, B., Gianelli, P., Genchi, M., Dzimianski, M.T.*, et al.* (2011). Evaluation of lung pathology in *Dirofilaria immitis*-experimentally infected dogs treated with doxycycline or a combination of doxycycline and ivermectin before administration of melarsomine dihydrochloride. *Veterinary parasitology*. **176**:357-60.
291. Bendas, A.J., Paiva, J.P., Rossi, M.I.D., Knackfuss, F.B., Silvano, D.R., Mendes-de-Almelda, F.*, et al.* (2008). The use of doxycycline in micro-filaremic *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) naturally infected dogs. *International Journal of Applied Research in Veterinart Medicine* **6**:55-9.
292. Rossi, M.I., Paiva, J., Bendas, A., Mendes-de-Almeida, F., Knackfuss, F., Miranda, M.*, et al.* (2010). Effects of doxycycline on the endosymbiont *Wolbachia* in *Dirofilaria immitis (*Leidy, 1856)--naturally infected dogs. *Veterinary parasitology*. **174**:119-23.
293. Passeri, B., Vismarra, A., Cricri, G., Bazzocchi, C., Kramer, L., Bacci, C. (2014). The adulticide effect of a combination of doxycycline and ivermectin in *Dirofilaria immitis*-experimentally infected dogs is associated with reduction in local T regulatory cell populations. *Veterinary parasitology*. **205**:208-10.
294. Takahashi, A., Yamada, K., Kishimoto, M., Shimizu, J., Maeda, R. (2008). Computed tomography (CT) observation of pulmonary emboli caused by long-term administration of ivermectin in dogs experimentally infected with heartworms. *Veterinary parasitology*. **155**:242-8.
295. Venco, L. (2007). Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in cats. In: Cringoli, G., editors. Proceedings of the First European Dirofilaria Days; Fev, 22-25; Zagreb.
296. Lee, S.G., Moon, H.S., Hyun, C. (2008). Percutaneous heartworm removal from dogs with severe heart worm (*Dirofilaria immitis*) infestation. *Journal of veterinary science*. **9**:197-202.
297. Miller, M.W. (1998). Canine heartworm disease. *Clinical techniques in small animal practice*. **13**:113-8.
298. Nelson, C.T. (2008). *Dirofilaria immitis* in cats: anatomy of a disease. *Compendium (Yardley, PA)*. **30**:382-9; quiz 9.
299. Ryan, W., Gross, S., Soll, M.D. (1995). Diagnosis of feline heartworm infection. In: Soll, M.D., Knight, D.H. Proceedings of the Heartworm Symposium; Auburn.
300. Kramer, L., Genchi, C. (2002). Feline heartworm infection: serological survey of asymptomatic cats living in northern Italy. *Veterinary parasitology*. **104**:43-50.
301. Guerrero, J. (2009). AHS guidelines for the diagnosis, treatment and prevention of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in cats. From my perspective. In: Morchon, R.,

Simon, F., Montoya-Alonso, J.A., Genchi, C., editors. Proceedings of Second European Dirofilaria Days; Set, 16-18; Salamanca.
302. Genchi, C., Guerrero, J., McCall, J., Venco, L. (2007). Epidemiology and prevention of Dirofilaria infections in dogs and cats. In: Cringoli, G., editors. Proceedings of the First European Dirofilaria Days; Fev, 22-25; Zagreb.
303. Atkins, C. (2007). Feline heartworm disease: what's new? Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association; Sidney.
304. Lee, A.C., Atkins, C.E. (2010). Understanding feline heartworm infection: disease, diagnosis, and treatment. *Top Companion Anim Med*. **25**:224-30.
305. Favole, P., Cauduro, A., Opreni, M., Zanzani, S., Albonico, F., Manfredi, M.*, et al.* (2013). Epidural dirofilariosis in a paraparetic cat: case report of *Dirofilaria immitis* infection. *Journal of feline medicine and surgery*. **15**:1160-4.
306. Levy, J.K. (2007). Cats versus Heartworm: how real is the threat? Proceeding of NAVC North American Veterinary Conference; Jan, 13-27; Orlando.
307. European scientific council companion animal parasites (Online) [16/06/2013]. Available from: http://www.esccap.org.
308. Litster, A.L., Atwell, R.B. (2008). Feline heartworm disease: a clinical review. *Journal of feline medicine and surgery*. **10**:137-44.
309. Atkins, C., Moresco, A., Litster, A. (2005). Prevalence of naturally occurring *Dirofilaria immitis* infection among nondomestic cats housed in an area in which heartworms are endemic. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **227**:139-43.
310. Gomes, L.A., Serrao, M.L., Duarte, R., Bendas, A., Labarthe, N. (2007). Attraction of mosquitoes to domestic cats in a heartworm enzootic region. *Journal of feline medicine and surgery*. **9**:309-12.
311. Guerrero, J., de la Hitte, J.D., Genchi, C., Rojo, F., Gomez-Bautista, M., Varela, M.C.*, et al.* (1992). Update on the distribution of *Dirofilaria immitis* in dogs from Southern Europe and Latin America. In: AHS. Proceedings of Heartworm Symposium Austin.
312. Miller, M.W., Atkins, C.E., Stemme, K., Robertson-Plouch, C., Guerrero, J. (2000). Prevalence of exposure to *Dirofilaria immitis* in cats in multiple areas of the United States. *Veterinary therapeutics : research in applied veterinary medicine*. **1**:169-75.
313. Kalkstein, T.S., Kaiser, L., Kaneene, J.B. (2000). Prevalence of heartworm infection in healthy cats in the lower peninsula of Michigan. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **217**:857-61.
314. Robertson-Plouch, C.K., Dillon, A.R., Brawner, W.R., Guerrero, J. (2000). Prevalence of feline heartworm infections among cats with respiratory and gastrointestinal signs: results of a multicenter study. *Veterinary therapeutics : research in applied veterinary medicine*. **1**:88-95.
315. Carleton, R.E., Tolbert, M.K. (2004). Prevalence of *Dirofilaria immitis* and gastrointestinal helminths in cats euthanized at animal control agencies in northwest Georgia. *Veterinary parasitology*. **119**:319-26.
316. Levy, J.K., Lappin, M.R., Glaser, A.L., Birkenheuer, A.J., Anderson, T.C., Edinboro, C.H. (2011). Prevalence of infectious diseases in cats and dogs rescued following Hurricane Katrina. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **238**:311-7.

317. Nogami, S., Murasugi, E., Shimazaki, K., Maeda, R., Harasawa, R., Nakagaki, K. (2000). Quantitative analysis of microfilarial periodicity of *Dirofilaria immitis* in cats. *Veterinary parasitology*. **92**:227-32.
318. Roncalli, R.A., Yamane, Y., Nagata, T. (1998). Prevalence of *Dirofilaria immitis* in cats in Japan. *Veterinary parasitology*. **75**:81-9.
319. Liu, J., Song, K.H., Lee, S.E., Lee, J.Y., Lee, J.I., Hayasaki, M.*, et al.* (2005). Serological and molecular survey of *Dirofilaria immitis* infection in stray cats in Gyunggi province, South Korea. *Veterinary parasitology*. **130**:125-9.
320. Sukhumavasi, W., Bellosa, M.L., Lucio-Forster, A., Liotta, J.L., Lee, A.C., Pornmingmas, P.*, et al.* (2012). Serological survey of *Toxoplasma gondii, Dirofilaria immitis*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) infections in pet cats in Bangkok and vicinities, Thailand. *Veterinary parasitology*. **188**:25-30.
321. Morchon, R., Garcia-Guasch, L., Manubens-Grau, J., Armario, B., Mellado-Hernandez, I., Varretón, E.*, et al.* (2012). Prevalence of canine and feline dirofilariosis in Barcelona province (Northeastern Spain). In: Genchi, G., Kramer, L., Genchi, C., editors. Proceedings of the Third European Dirofilaria Days; Jun, 21-22; Parma.
322. Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., García-Guasch, L., Expósito, J., Armario, B., Morchón, R.*, et al.* (2014). First epidemiological report of feline heartworm infection in the Barcelona metropolitan area (Spain). *Parasites & vectors*. **7**:506.
323. Venco, L., Genchi, M., Genchi, C., Gatti, D., Kramer, L. (2011). Can heartworm prevalence in dogs be used as provisional data for assessing the prevalence of the infection in cats? *Veterinary parasitology*. **176**:300-3.
324. Rosa, N. (2009). Rastreio de dirofilariose e de leishmaniose em gatos da Área Metropolitana de Lisboa. Dissertação para obtençao do grau de Mestrado Integrado de Medicina Veterinária. Lisboa, F.M.V.-U.T.
325. Almeida, C. (2010). Prevalência de dirofilariose felina na região do Sado. Dissertação para a obtenção do grau de Mestrado Integrado de Medicina Veterinária. Lisboa, F.M.V.-U.T.
326. Miranda, B.O. (2011). Contribuição para o estudo da prevalência de Dirofilariose Felina na Sub-Região do Baixo Vouga. Dissertação para a otenção do grau de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Tecnologia, F.M.V.-U.L.H.
327. Ramos, C. (2012). A importância da infecção por *Leishmania spp.* e *Dirofilaria immitis* em gatos na região de Olhão. Dissertação para a otenção do grau de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa, F.M.V.-U.T.
328. Miller, M.W. (1998). Feline dirofilariasis. *Clinical techniques in small animal practice*. **13**:99-108.
329. Atkins, C.E., DeFrancesco, T.C., Coats, J.R., Sidley, J.A., Keene, B.W. (2000). Heartworm infection in cats: 50 cases (1985-1997). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **217**:355-8.
330. Venco, L., Genchi, C., Genchi, M., Grandi, G., Kramer, L.H. (2008). Clinical evolution and radiographic findings of feline heartworm infection in asymptomatic cats. *Veterinary parasitology*. **158**:232-7.

331. Lorentzen, L., Caola, A.E. (2008). Incidence of positive heartworm antibody and antigen tests at IDEXX Laboratories: trends and potential impact on feline heartworm awareness and prevention. *Veterinary parasitology*. **158**:183-90.
332. Levy, J.K. (2007). Diagnostic challenges in feline heartworm infection. Proceedings of NAVC North American Veterinary Conference; Jan, 13-27; Orlando.
333. Dillon, A.R. (2007). The Nature of Heatworm Disease in Cats: different from the dog. Proceedings of NAVC North american Veterinary Conferance; Jan, 13-27; Orlando.
334. Rawlings, C.A., Farrell, R.L., Mahood, R.M. (1990). Morphologic changes in the lungs of cats experimentally infected with *Dirofilaria immitis*. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. **4**:292-300.
335. Atkins, C. (2014). Feline dirofilariosis: pathogenesis, signs, treatment and prognosis. Proceedings of Fourth European Dirofilaria and Angiostrongylus Days (FEDAD); Jul, 2-4; Budapeste.
336. McCracken, M.D., Patton, S. (1993). Pulmonary arterial changes in feline dirofilariasis. *Veterinary pathology*. **30**:64-9.
337. Maia, F.C., McCall, J.W., Jr, V.A., Peixoto, C.A., Supakorndej, P., Supakorndej, N.*, et al.* (2011). Structural and ultrastructural changes in the lungs of cats *Felis catus* (Linnaeus, 1758) experimentally infected with *D. immitis* (Leidy, 1856). *Veterinary parasitology*. **176**:304-12.
338. Gonzalez-Miguel, J., Gonzalez, M., De Jesús Rojas, W., Simon, F., Morchon, R. (2009). Proteomic and immunomic sutdies in cats naturally and experimentally infected by *Dirofilaria immitis* In: Morchon, R., Simon, F., Montoya-Alonso, J.A., Genchi, C., editors. Proceedings of Second European Dirofilaria Days; Set, 16-18; Salamanca.
339. Gonzalez-Miguel, J., Morchon, R., Siles-Lucas, M., Oleaga, A., Simon, F. (2010). Identification of *Dirofilaria immitis* immunoreactive proteins recognized by sera from infected cats using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Molecular and biochemical parasitology*. **174**:78-82.
340. Morchon, R., Roca, F., Lopez-Belmonte, J., Genchi, M., Venco, L., Rodriguez-Barbero, A.*, et al.* (2007). Changes in the levels of eicosanoids in cats naturally and experimentally infected with *Dirofilaria immitis*. *Veterinary parasitology*. **147**:271-5.
341. Kramer, L. (2007). Immunopathogenesis of filarial infections in dogs and cats: a role for *Wolbachia* endosymbiont? In: Cringoli, G., editors. Proceedings of the First European Dirofilaria Days; Fev, 22-25; Zagreb.
342. Morchon, R., Ferreira, A.C., Martin-Pacho, J.R., Montoya, A., Mortarino, M., Genchi, C.*, et al.* (2004). Specific IgG antibody response against antigens of *Dirofilaria immitis* and its Wolbachia endosymbiont bacterium in cats with natural and experimental infections. *Veterinary parasitology*. **125**:313-21.
343. Kramer, L. (2006). The role of *Wolbachia* in the inflammatory and imune response in *D. immitis* infected animals. Proceedings of the NAVC North American Veterinary Conference Orlando.
344. Kramer, L. (2006). How *Wolbachia/Dirofilaria immitis* interact? Proceedings of the NAVC North American Veterinary Conference Orlando.
345. Prieto, C., Venco, L., Simon, F., Genchi, C. (1997). Feline heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection: detection of specific IgG for the diagnosis of occult infections. *Veterinary parasitology*. **70**:209-17.

346. Garcia-Guasch, L., Caro-Vadillo, A., Manubens-Grau, J., Carreton, E., Morchon, R., Simon, F*., et al.* (2013). Is *Wolbachia* participating in the bronchial reactivity of cats with heartworm associated respiratory disease? *Veterinary parasitology*. **196**:130-5.
347. Garcia-Guasch, L., Car-Vadillo, A., Montoya-Alonso, J.A., Carreton, E., Morchon, R., Simon, F*., et al.* (2012). Worsening of breathing patterns in HW-infected cats with the presence of *Wolbachia* antibodies. In: Genchi, G., Kramer, L., Genchi, C., editors. Proceedings of the Third European Dirofilaria Days; Jun, 21-22; Parma.
348. Atkins, C. (2007). Heartworm disease: state of art. Proceedings of the NAVC North American Veterinary Conference; Jan, 13-27; Orlando.
349. Nelson, C.T. (2008). *Dirofilaria immitis* in cats: diagnosis and management. *Compendium (Yardley, PA)*. **30**:393-400; quiz
350. Litster, A., Atkins, C., Atwell, R. (2008). Acute death in heartworm-infected cats: unraveling the puzzle. *Veterinary parasitology*. **158**:196-203.
351. Atkins, C. (2002). Feline heartworm disease: what's different. In: USA, W. Proceedings of 26th Waltham Diets/OSU Symposium - Small animal cardiology; Ohio.
352. Berdoulay, P., Levy, J.K., Snyder, P.S., Pegelow, M.J., Hooks, J.L., Tavares, L.M*., et al.* (2004). Comparison of serological tests for the detection of natural heartworm infection in cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*. **40**:376-84.
353. Litster, A., Atkins, C., Atwell, R., Buchanan, J. (2005). Radiographic cardiac size in cats and dogs with heartworm disease compared with reference values using the vertebral heart scale method: 53 cases. *Journal of veterinary cardiology : the official journal of the European Society of Veterinary Cardiology*. **7**:33-40.
354. Donahoe, J.M., Kneller, S.K., Lewis, R.E. (1976). Hematologic and radiographic changes in cats after inoculation with infective larvae of *Dirofilaria immitis*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **168**:413-7.
355. Selcer, B., Newell, S., Mansour, A., McCall, J. (1996). Radiographic and 2-D echocardiographic findings in eighteen cats experimentally exposed to *D. immitis* via mosquito bites. *Veterinary Radiology & Ultrasound*. **37**:37-44.
356. Brawner, W.R., Dillon, A.R., Robertson-Plouch, C.K., Guerrero, J. (2000). Radiographic diagnosis of feline heartworm disease and correlation to other clinical criteria: results of a multicenter clinical case study. *Veterinary therapeutics : research in applied veterinary medicine*. **1**:81-7.
357. Dillon, A.R., Brawner, A.R., Jr., Robertson-Plouch, C.K., Guerrero, J. (2000). Feline heartworm disease: correlations of clinical signs, serology, and other diagnostics--results of a multicenter study. *Veterinary therapeutics : research in applied veterinary medicine*. **1**:176-82.
358. Atkins, C.E., Arther, R.G., Ciszewski, D.K., Davis, W.L., Ensley, S.M., Guity, P.S*., et al.* (2008). Echocardiographic quantification of *Dirofilaria immitis* in experimentally infected cats. *Veterinary parasitology*. **158**:164-70.
359. DeFrancesco, T.C., Atkins, C.E., Miller, M.W., Meurs, K.M., Keene, B.W. (2001). Use of echocardiography for the diagnosis of heartworm disease in cats: 43 cases (1985-1997). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **218**:66-9.
360. Venco, L., Calzolari, D., Mazzocchi, D., Morini, S., Genchi, C. (1998). The use of echocardiography as a diagnostic tool for detection of feline heartworm (*Dirofilaria immitis*) infections. *Feline practice*. **26**:6-9.

361. Hayasaki, M., Okajima, J., Song, K.H., Shiramizu, K. (2003). Diurnal variation in microfilaremia in a cat experimentally infected with larvae of *Dirofilaria immitis*. *Veterinary parasitology*. **111**:267-71.
362. Little, S.E., Raymond, M.R., Thomas, J.E., Gruntmeir, J., Hostetler, J.A., Meinkoth, J.H.*, et al.* (2014). Heat treatment prior to testing allows detection of antigen of *Dirofilaria immitis* in feline serum. *Parasites & vectors*. **7**:1.
363. Snyder, P.S., Levy, J.K., Salute, M.E., Gorman, S.P., Kubilis, P.S., Smail, P.W.*, et al.* (2000). Performance of serologic tests used to detect heartworm infection in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **216**:693-700.
364. Snap Heartworm Test (Online) [08/05/2010]. Available from: http://www.idexx.com/view/xhtml/en_us/smallanimal/inhouse/snap/heartworm.jsf?selectedTab=Benefits.
365. Prieto, G., Simon, F., Genchi, C., McCall, J.W., Venco, L. (1999). Utility of adult antigens of *Dirofilaria immitis* for the early detection of dirofilariosis and for the evaluation of chemoprophylactic treatment in experimentally infected cats. *Veterinary parasitology*. **86**:5-13.
366. Atkins, C., Paul, M. (2006). Heartbreakers: dodging the difficulties of *Dirofilaria immitis*. Proceedings of the NAVC North American Veterinary Conference; Orlando.
367. Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G. (2007). Mappe Parassitologiche 8. *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in Dog and Cat and Human Infections. *Rolando Editore*.
368. Arther, R.G., Atkins, C., Ciszewski, D.K., Davis, W.L., Ensley, S.M., Settje, T.L. (2005). Safety of imidacloprid plus moxidectin topical solution applied to cats heavily infected with adult heartworms (Dirofilaria immitis). *Parasitology research*. **97 Suppl 1**:S70-5.
369. Arther, R.G., Charles, S., Ciszewski, D.K., Davis, W.L., Settje, T.S. (2005). Imidacloprid/moxidectin topical solution for the prevention of heartworm disease and the treatment and control of flea and intestinal nematodes of cats. *Veterinary parasitology*. **133**:219-25.
370. Arther, R.G., Bowmann, D.D., McCall, J.W., Hansen, O., Young, D.R. (2003). Feline Advantage Heart (imidacloprid and moxidectin) topical solution as monthly treatment for prevention of heartworm infection (*Dirofilaria immitis*) and control of fleas (C*tenocephalides felis*) on cats. *Parasitology research*. **90 Suppl 3**:S137-9.
371. Venco, L., Mortarino, M., Carro, C., Genchi, M., Pampurini, F., Genchi, C. (2008). Field efficacy and safety of a combination of moxidectin and imidacloprid for the prevention of feline heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection. *Veterinary parasitology*. **154**:67-70.
372. Genchi, C., Cody, R., Pengo, G., Buscher, G., Cavalleri, D., Bucci, V.*, et al.* (2004). Efficacy of a single milbemycin oxime administration in combination with praziquantel against experimentally induced heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in cats. *Veterinary parasitology*. **122**:287-92.
373. Baker, C.F., Tielemans, E., Pollmeier, M.G., McCall, J.W., McCall, S.D., Irwin, J.*, et al.* (2014). Efficacy of a single dose of a novel topical combination product containing eprinomectin to prevent heartworm infection in cats. *Veterinary parasitology*. **202**:49-53.
374. Bowman, D.D., Hendrix, C.M., Lindsay, D.S., Barr, S.C. (2008). Feline clinical parasitology. Iowa. John Wiley & Sons. 321-34 p.

375. Atkins, C. (2007). Dirofilariiosis: the cutting edge. Proceedings of NAVC North American Veterinary Conference; Jan, 13-27; Orlando.
376. Atwell, R.B., Litster, A.L. (2002). Surgical extraction of transplanted adult *Dirofilaria immitis* in cats. *Veterinary research communications*. **26**:301-8.
377. Small, M.T., Atkins, C.E., Gordon, S.G., Birkenheuer, A.J., Booth-Sayer, M.A., Keene, B.W.*, et al.* (2008). Use of a nitinol gooseneck snare catheter for removal of adult *Dirofilaria immitis* in two cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **233**:1441-5.
378. Iizuka, T., Hoshi, K., Ishida, Y., Sakata, I. (2009). Right atriotomy using total venous inflow occlusion for removal of heartworms in a cat. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*. **71**:489-91.
379. Levy, J.K. (2007). Heartworm treatment to cats: adulticides, antibiotics or surgery? Proceedings of NAVC North American Veterinary Conference; Jan, 13-27; Orlando.
380. Knauer, K.W. (1998). Human dirofilariasis. *Clinical techniques in small animal practice*. **13**:96-8.
381. Lee, A.C., Montgomery, S.P., Theis, J.H., Blagburn, B.L., Eberhard, M.L. (2010). Public health issues concerning the widespread distribution of canine heartworm disease. *Trends in parasitology*. **26**:168-73.
382. Simon, F., Lopez-Belmonte, J., Marcos-Atxutegi, C., Morchon, R., Martin-Pacho, J.R. (2005). What is happening outside North America regarding human dirofilariasis? *Veterinary parasitology*. **133**:181-9.
383. Ciferri, F. (1981). Human pulmonary dirofilariasis in the West. *Western Journal of Medicine*. **134**:158.
384. Cavallazzi, R.S., Cavallazzi, A.C., Souza, I.V., Cardoso, J.D. (2002). Dirofilariose pulmonar humana: relato de sete casos. *J Pneumol*. **28**:101.
385. Simon, F., Gonzalez-Miguel, J., Kartashev, V., Morchon, R., Carreton, E., Montoya-Alonso, J.A. (2012). Human dirofilarisis: what is changing. In: Genchi, G., Kramer, L., Genchi, C., editors. Proceedings of the Third European Dirofilaria Days; Jun, 21-22; Parma.
386. Hirano, H., Kizaki, T., Sashikata, T., Matsumura, T. (2002). Pulmonary dirofilariasis - clinicopathological study. *The Kobe journal of medical sciences*. **48**:79-86.
387. Lee, K.J., Park, G.M., Yong, T.S., Im, K., Jung, S.H., Jeong, N.Y.*, et al.* (2000). The first Korean case of human pulmonary dirofilariasis. *Yonsei medical journal*. **41**:285-8.
388. Narine, K., Brennan, B., Gilfillan, I., Hodge, A. (1999). Pulmonary presentation of *Dirofilaria immitis* (canine heartworm) in man. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. **16**:475-7.
389. Muro, A., Genchi, C., Cordero, M., Simon, F. (1999). Human dirofilariasis in the European Union. *Parasitology today (Personal ed)*. **15**:386-9.
390. Tasic-Otasevic, S.A., Gabrielli, S.V., Tasic, A.V., Miladinovictasic, N.L., Kostic, J.T., Ignjatovic, A.M.*, et al.* (2014). Seroreactivity to Dirofilaria antigens in people from different areas of Serbia. *BMC infectious diseases*. **14**:68.
391. Belo, S., Afonso, A., Gonçalves, A. (2014). Dirofilariose Humana em Portugal: parasitose desconhecida ou negligenciada? *Acta Parasitológica Portuguesa*. **20**:105-6.

392. Baptista-Fernandes, T., Rodrigues, M., Domingues, D., Monteiro, L., Paixao, P., Pereira, P.*, et al.* (2015). Dirofilariasis by *Dirofilaria repens:* an imported case and a brief review. *Parasitology international*. **64**:261-3.
393. Echeverri, A., Long, R., Check, W., Burnett, C. (1999). Pulmonary dirofilariasis. *The Annals of thoracic surgery*. **67**:201-2.
394. Kim, M.K., Kim, C.H., Yeom, B.W., Park, S.H., Choi, S.Y., Choi, J.S. (2002). The first human case of hepatic dirofilariasis. *Journal of Korean medical science*. **17**:686-90.
395. Rodrigues-Silva, R., Guerra, R.J., de Almeida, F.B., Machado-Silva, J.R., de Paiva, D.D. (2004). Human pulmonary dirofilariasis at Rio de Janeiro, Brazil: a case report. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. **37**:56-9.
396. Jamshidi, A., Jamshidi, M., Mobedi, I., Khosroara, M. (2008). Periocular dirofilariasis in a young woman: a case report. *The Korean journal of parasitology*. **46**:265-7.
397. Miliaras, D., Meditskou, S., Kelekis, A., Papachristos, I. (2010). Human pulmonary Dirofilariasis: one more case in Greece suggests that Dirofilaria is a rather common cause of coin lesions in the lungs in endemic areas of Europe. *Int J Immunopathol Pharmacol*. **23**:345-8.
398. Dantas-Torres, F., Otranto, D. (2014). Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. *Parasites & vectors*. **7**:22.
399. Kang, H.J., Park, Y.S., Lee, C.H., Lee, S.M., Yim, J.J., Yoo, C.G.*, et al.* (2013). A case of human pulmonary dirofilariasis in a 48-year-old Korean man. *The Korean journal of parasitology*. **51**:569-72.
400. Perera, L., Perez-Arellano, J.L., Cordero, M., Simon, F., Muro, A. (1998). Utility of antibodies against a 22 kD molecule of *Dirofilaria immitis* in the diagnosis of human pulmonary dirofilariasis. *Tropical medicine & international health : TM & IH*. **3**:151-5.
401. Censos 2011 (Online) [15/04/2013]. Available from: https://www.censos.ine.pt.
402. Thrusfield, M. (2013). Veterinary epidemiology. Elsevier.
403. Vieira, A.L., Vieira, M.J., Oliveira, J.M., Simões, A.R., Diez-Baños, P., Gestal, J. (2014). Prevalence of canine heartworm (D*irofilaria immitis*) disease in dogs of central Portugal. *Parasite (Paris, France)*. **21**.
404. SPSS 2012. PASW Statistic for Window, v.C., SPSS. Ink.
405. Organization, W.H. (1992). WHO Expert Committee on Rabies - eighth report. World Health Organization Set, 24-30; Geneva.
406. Cohn, L. (2006). Serologic testing concepts. Proceedings of international Congress of the Italian Association of Companion Animal Veterinarians; May, 19-21; Rimi.
407. Almeida, M., Barros, M., Santos, E., Ayres, M., Guimarães, J., Gondim, L. (2005). Parasitismo de cães por microfilárias de Dirofilaria immitis: influência da raça, sexo e idade. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. **2**.
408. Tzipory, N., Crawford, P.C., Levy, J.K. (2010). Prevalence of *Dirofilaria immitis, Ehrlichia canis,* and *Borrelia burgdorfer*i in pet dogs, racing greyhounds, and shelter dogs in Florida. *Veterinary parasitology*. **171**:136-9.
409. Levy, J.K., Snyder, P.S., Taveres, L.M., Hooks, J.L., Pegelow, M.J., Slater, M.R.*, et al.* (2003). Prevalence and risk factors for heartworm infection in cats from northern Florida. *Journal of the American Animal Hospital Association*. **39**:533-7.

410. Ferasin, L., Knight, D.H. (2005) Filarial infections. In: Shaw, S., Day, M., editors. Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat. London: CRC Press. p. 51-61.
411. Calvert, C.A., Thomason, J. (2008) Heartworm disease. In: Tilley, L.P., editor. Manual of canine and feline cardiology. 4 ed: Elsevier Health Sciences. p. 183-99.
412. World Organisation for Animal Health (Online) [13/06/2014]. Available from: http://www.oie.int/.
413. Instituto Português do Mar e da Atmosfera (Online) [13/02/2013]. Available from: http://www.ipma.pt.
414. Heska (Online) [10/08/2011]. Available from: http://www.heska.com.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

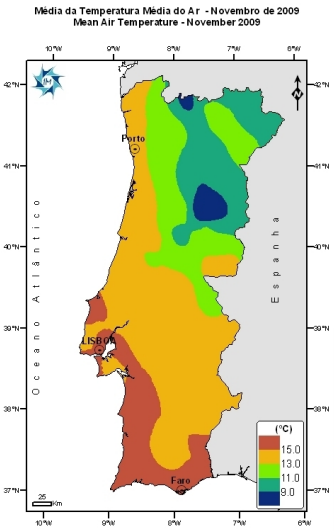
CAPITULO VIII – ANEXOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

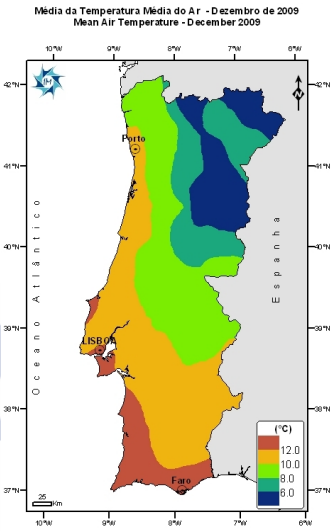
Anexo I

I.1. Distribuição da temperatura média em Portugal Continental entre novembro de 2009 e janeiro de 2011

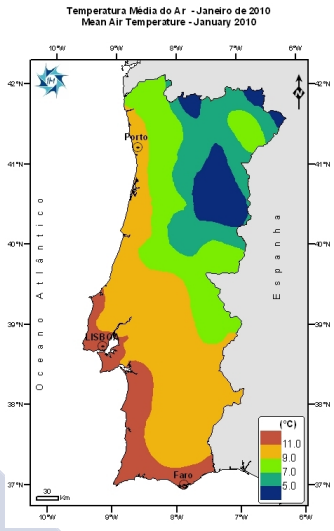
Novembro 2009



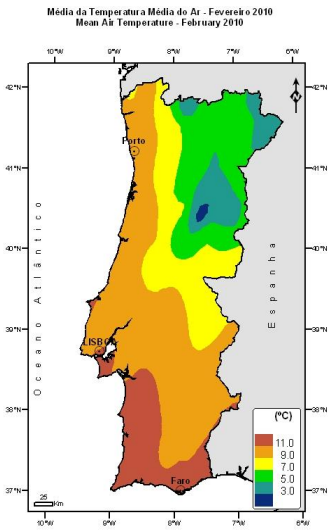
Dezembro 2009



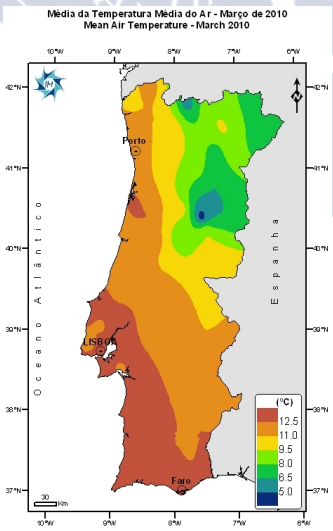
Janeiro 2010



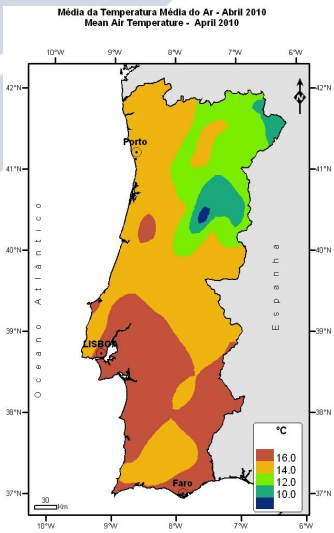
Fevereiro 2010



Março 2010



Abril 2010



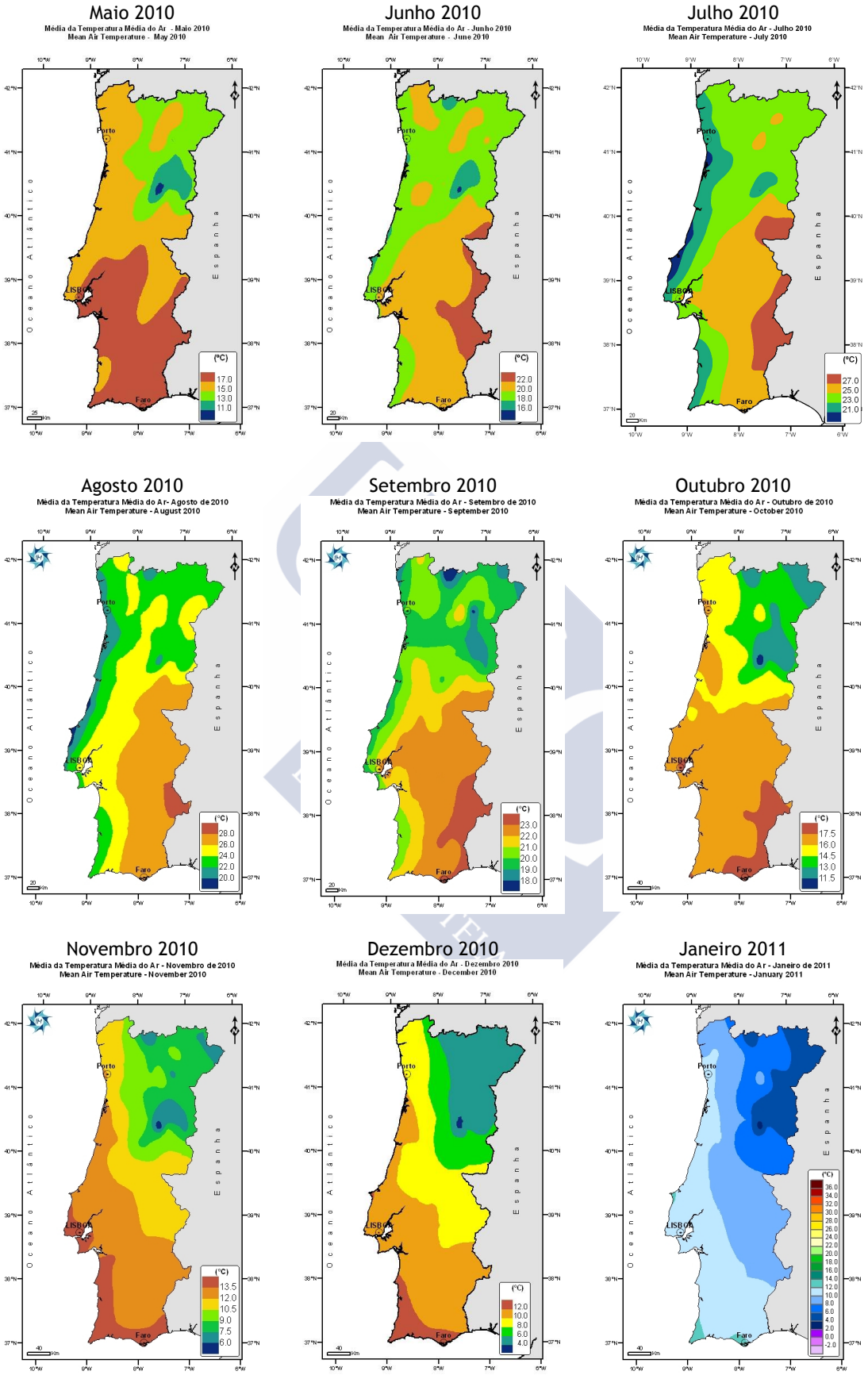
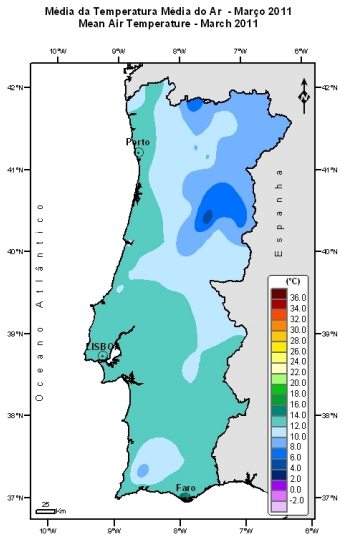


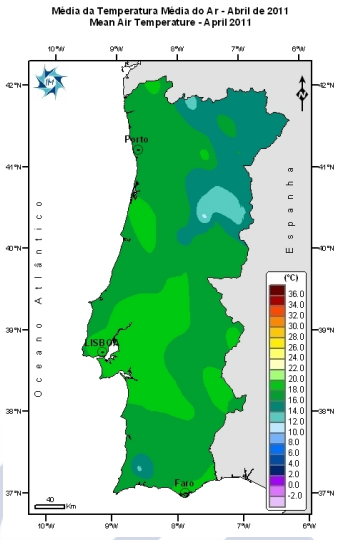
Figura 1: Distribuição da temperatura média em Portugal Continental entre novembro de 2009 e janeiro de 2011. Adaptado de Instituto Português do Mar e Atmosfera [413].

Distribuição média da temperatura em Portugal Continental entre março 2011 e julho de 2012

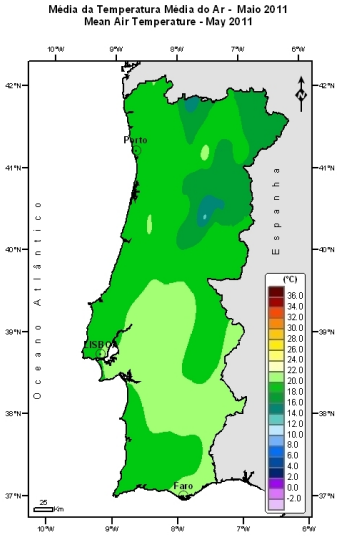
Março 2011



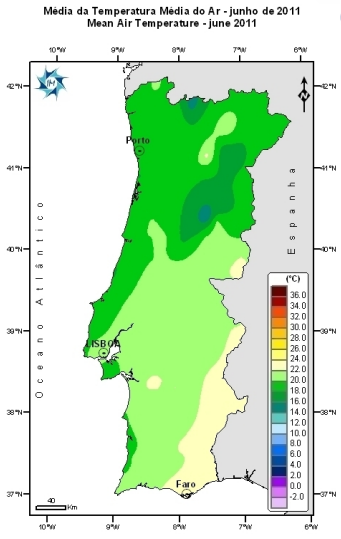
Abril 2011



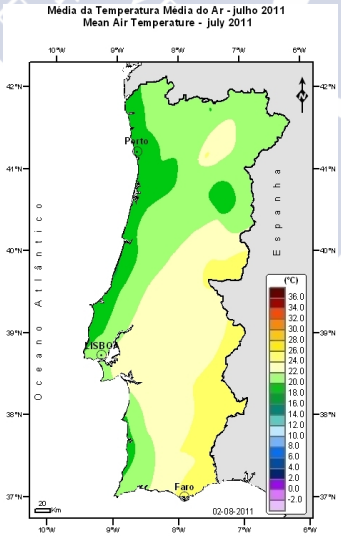
Maio 2011



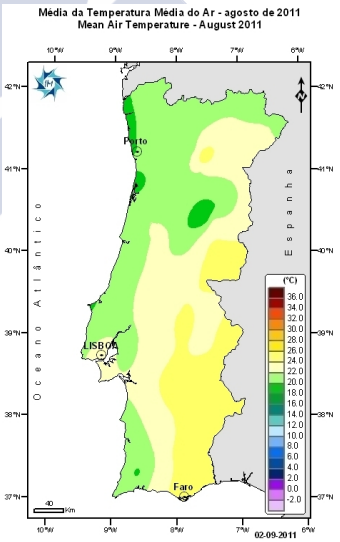
Junho 2011



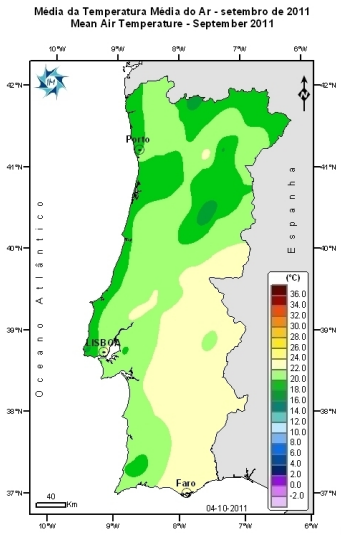
Julho 2011



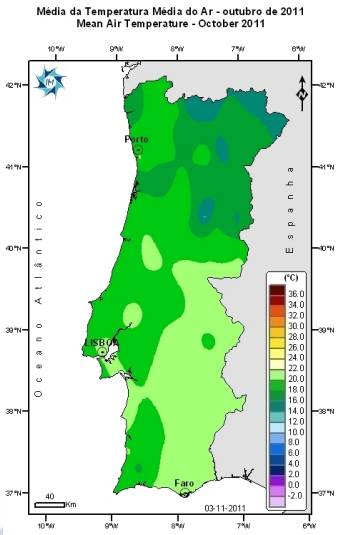
Agosto 2011



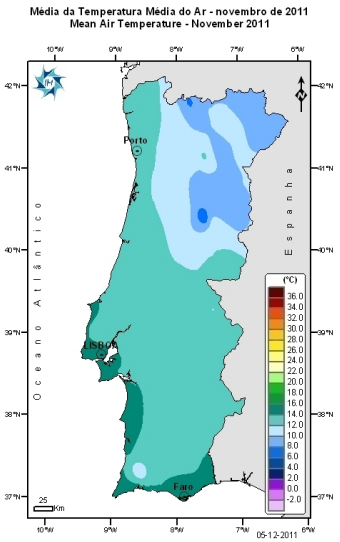
Setembro 2011



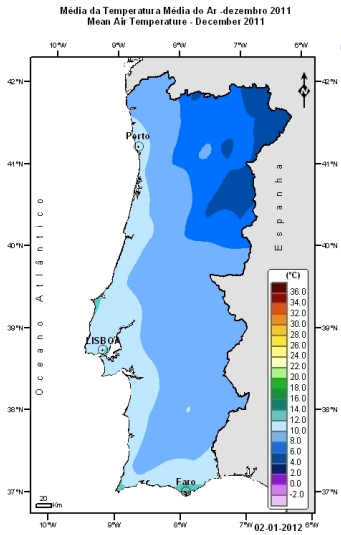
Outubro 2011



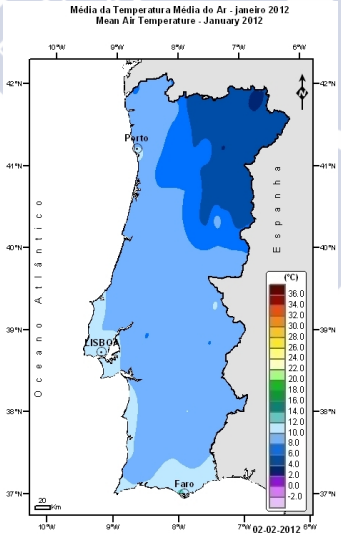
Novembro 2011



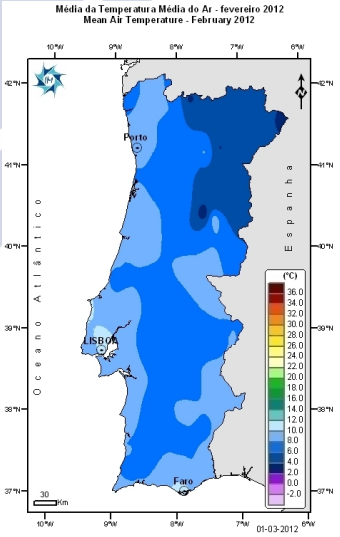
Dezembro 2011



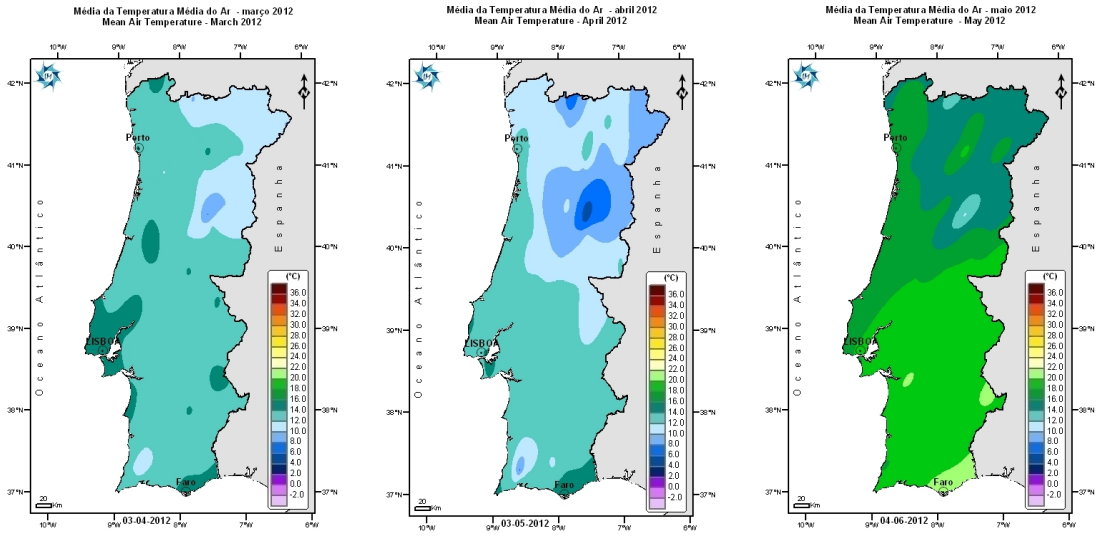
Janeiro 2012



Fevereiro 2012



Março 2012 Abril 2012 Maio 2012



Junho 2012 Julho 2012

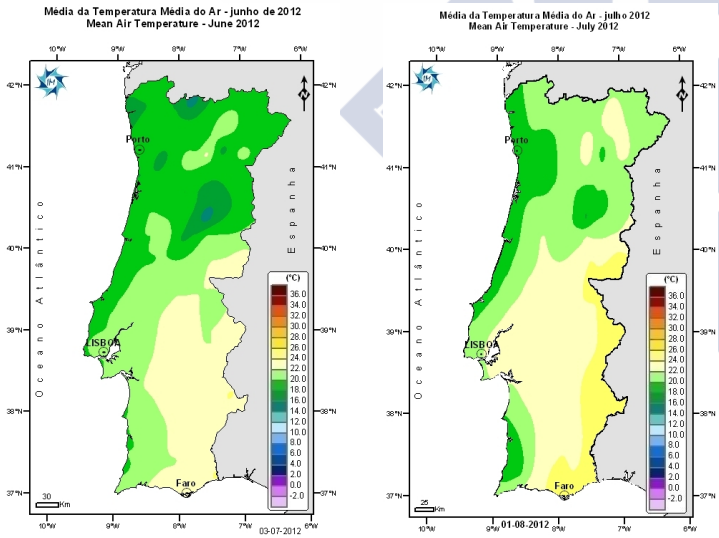


Figura 2: Distribuição média da temperatura em Portugal Continental entre março 2011 e julho de 2012 Adaptado do Instituto Portugues do Mar e da Atmosfera [413]

I.2. Formulário dos critérios de inclusão/exclusão no estudo

Tarefa - Canina

Nome do animal:_____

Código do animal: TRC_ _ _

► **Critérios de inclusão**

Cães com idade superior a 1 ano.

Cães domiciliados no Concelho da Figueira da Foz (pelo menos há 1 ano)

Cães que não fizeram profilaxia da dirofilariose

Cães sem história prévia de infecção por dirofilariose

Conhecimento do proprietário do estudo, através do folheto informativo

Autorização do proprietário, consentindo o estudo

Todos os critérios de inclusão são preenchidos? Sim ☐ Não ☐ _____

► **Critérios de exclusão**

Cães com diagnóstico prévio de dirofilariose.

Cães com menos de 1 ano.

Cães não domiciliados no Concelho da Figueira da Foz

Cães que fizeram profilaxia de dirofilariose

Verifica-se algum dos critérios de exclusão? Não ☐ Sim ☐ _____

O animal só pode ser incluído no estudo se todos os critérios de inclusão forem verificados e nenhum dos critérios de exclusão ocorrer.

Este animal preenche os requisitos necessários para entrar no projecto?

Sim ☐ Não ☐

Tarefa - Felina

Nome do animal:_____

Código do animal: TRF _ _

► **Critérios de inclusão**.

Gatos com idade superior a 1 ano.

Gatos domiciliados na Figueira da Foz (pelo menos há 1 ano)

Gatos que não fazem profilaxia da dirofilariose (pelo menos há 1 ano)

Gatos sem história prévia de infecção por dirofilariose

Proprietário leu folheto de informação sobre o estudo

Proprietário assinou o formulário de autorização

Todos os critérios de inclusão são preenchidos? Sim ☐ Não ☐ _____

► **Critérios de exclusão**

Gatos com diagnóstico prévio de dirofilariose.

Gatos não domiciliados na Figueira da Foz (pelo menos há 1 ano)

Gatos com menos de 1 ano.

Gatos que fizeram profilaxia de dirofilariose (pelo menos há 1 ano)

Verifica-se algum dos critérios de exclusão? Não ☐ Sim ☐ _____

O animal só pode ser incluído no estudo se todos os critérios de inclusão forem verificados e nenhum dos critérios de exclusão ocorrer.

Este animal preenche os requisitos necessários para entrar no projeto?

Sim ☐ Não ☐

I.3. Folha informação ao proprietário sobre o estudo realizado

Informação ao Proprietário

Estudo sobre Dirofilariose

E^{xmo} proprietário:

Este é um convite para que o seu animal participe num estudo clínico realizado pela Clinicão- Hospital Veterinário, integrado num projecto de doutoramento sobre Dirofilariose Canina e Felina no concelho da Figueira da Foz.

A Dirofilariose é uma doença parasitária que afecta um elevado número de cães e gatos. É uma doença séria e potencialmente fatal mas pode ser prevenida. Devido à maioria dos animais não apresentarem sinais na fase inicial da doença, é de extrema importância o seu despiste. Os sinais mais frequentes são cansaço, tosse, perda de peso, dificuldade respiratória, entre outros. O tratamento deve ser realizado nas fases iniciais para minimizar os riscos. Se a doença não for detectada e controlada, a infecção por dirofilárias pode levar a insuficiência cardíaca e morte.

O objectivo deste estudo consiste em determinar através de análises sanguíneas, a presença de dirofilariose nos animais testados na zona da Figueira da Foz.

Se concordar com a participação do seu animal neste estudo, as amostras sanguíneas serão recolhidas no Hospital Veterinário - Clinicão.

Se for necessário uma recolha de amostras numa data posterior à consulta, está será indicada pelo seu médico veterinário.

Este estudo não implica a alteração dos esquemas de tratamento convencionais, nem introduz qualquer tipo de procedimento de experimentação.

Pode retirar o seu animal do estudo a qualquer altura. Pedimos-lhe contudo que contacte com o Médico Veterinário de imediato, caso o decida fazer.

Finalmente, gostaríamos de lhe agradecer por participar no estudo. A sua colaboração é muito importante no desenvolvimento e avanço das técnicas de combate a esta doença e da Medicina Veterinária

Com os melhores agradecimentos

Dra Ana Luísa Vieira CP: 3184

I.4. Formulário de autorização do proprietário do animal

Formulário de Autorização do Proprietário do Animal

Descrição do estudo:

Seroprevalência de Dirofilariose Canina no Concelho da Figueira da Foz

Nome do animal:_____
Código do animal:_____

► Por este meio eu asseguro que sou o proprietário (respectivo representante autorizado) do animal acima referido.

► Eu recebi, li e compreendi o " Formulário de Informação ao proprietário".

► O Médico Veterinário explicou-me a natureza do estudo e respondeu a cada uma das minhas questões relativamente ao estudo

► Eu informei o Médico Veterinário acerca de todas as medicações que foram administradas, sob meu conhecimento, ao meu animal.

► Eu concordo que o Médico Veterinário faça as colheitas de sangue ao meu animal

► Eu concordo em cooperar com o meu Médico Veterinário de forma que fique assegurado que o estudo é conduzido de acordo com as instruções fornecidas.

► Eu estou informado da possibilidade de retirar o meu animal do estudo em qualquer altura e informarei de imediato o Médico Veterinário caso isso aconteça.

► Eu concordo em avisar imediatamente o meu Médico Veterinário, caso o meu animal demonstre algum sinal de doença ou comportamento anormal.

► Eu concordo em apresentar o meu animal, caso seja necessário.

► Eu concordo que os dados obtidos com este estudo possam ser utilizados e publicados.

Concordo e autorizo voluntariamente a participação do meu animal neste estudo
Assinatura: _____**Data:**_____

Formulário de Autorização do Proprietário do Animal

Descrição do estudo:

Seroprevalência de Dirofilariose Felina no Concelho da Figueira da Foz

Nome do animal:_____

Código do animal:_____

► Por este meio eu asseguro que sou o proprietário (respectivo representante autorizado) do animal acima referido.

► Eu recebi, li e compreendi o " Formulário de Informação ao proprietário".

► O veterinário explicou-me a natureza do estudo e respondeu a cada uma das minhas questões relativamente ao estudo

► Eu informei o veterinário acerca de todas as medicações que foram administradas, sob meu conhecimento, ao meu animal.

► Eu concordo que o veterinário faça as colheitas de sangue ao meu animal

► Eu concordo em cooperar com o meu veterinário de forma que fique assegurado que o estudo é conduzido de acordo com as instruções fornecidas.

► Eu estou informado da possibilidade de retirar o meu animal do estudo em qualquer altura e informarei de imediato o veterinário caso isso aconteça.

► Eu concordo em avisar imediatamente o meu veterinário, caso o meu animal demonstre algum sinal de doença ou comportamento anormal.

► Eu concordo em apresentar o meu animal, caso seja necessário.

► Eu concordo que os dados obtidos com este estudo possam ser utilizados e publicados.

Concordo e autorizo voluntariamente a participação do meu animal neste estudo

Assinatura: _____Data:_____

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

I.5. Questionário epidemiológico efectuado aos proprietários dos animais examinados no estudo

Tarefa - Canino

Código do Animal: TRC _ _ _ **Data:_____**

Identificação do Animal

Nome Animal:

Nome do Proprietário:

Morada do Proprietário: **Freguesia:_____**

Zona urbana: □ **Rural:** □ **Com Vegetação: Sim** □ **Não** □

Caract. Geográfica: Mar □ Rio □ Campo agrícola □ Outra _____

_____

Raça: Indeterminada □ Cruzado de:_____ Pura □ _____

Raça: Pequena □ Média □ Grande □ Gigante □ **Peso:** _____

Data de Nascimento:_____ **Idade:** _____

Sexo: Fêmea □ Macho □

Utilização: Estimação □ Guarda □ Caça □ Pastor □ Outra:_____

Tamanho do pêlo: Curto □ Médio □ Comprido □ _____

História do Animal

Ambiente:

Interior □

Exterior □:

Jardim Privado□ Varanda □Canil □ Acesso à rua(cidade) □ Acesso à rua(campo)□ Misto □:

Jardim Privado□ Varanda □ Canil □ Acesso à rua(cidade) □ Acesso à rua(campo) □

Quantas horas passa em média no exterior: _____

Em que altura do dia passa no exterior: _____

Manhã: □ Tarde: □ Fim da Tarde: □ Noite: □

Alimentação

Apetite: Normal □ Aumentado □ _____ Diminuído □ _____

Seca comercial □ _____ Húmida comercial □ _____

Caseira □ _____ Mista □ _____

História Médica

Doenças anteriores: Não □ Sim □ _____

Medicações Anteriores: Não □ Sim □ _____

Castração: Não ☐ Sim ☐ _____

Desparasitação:

Interna: Não ☐ Sim ☐ Com: _____ Frequência aplicação:_____

Produto microfilaricida: _____

Externa: Não ☐ Sim ☐ Com: _____ Frequência aplicação:_____

Produto repelente de mosquitos: _____

Spray ☐ Spot On ☐ Coleira ☐ Champo ☐

Cohabitantes

Não ☐ Sim ☐

Cães: _____Vacinados:_____

Gatos: _____ Vacinados:_____

Saudáveis: Sim ☐ Não ☐ _____

Tarefa - Felina

Código do Animal: TRF _ _ _ **Data:_____**

Identificação do Animal

Nome Animal:

Nome do Proprietário:

Morada do Proprietário:

Freguesia:_____

Zona Urbana: ☐ Sub-urbana: ☐ Rural: ☐ Com Vegetação: Sim ☐ Não ☐

Caract. Geográfica: Mar ☐ Rio ☐ Campo agrícola ☐ Outra _____

_____

Raça: Europeu Comum ☐ Pura ☐ _____

Peso: _____

Data de Nascimento:_____ Idade: _____

Sexo: Fêmea ☐ Macho ☐ **Esterilização:** Sim ☐ Não ☐

Tamanho do pêlo: Curto ☐ Médio ☐ Comprido ☐ _____

Origem: Criador ☐ Loja ☐ Amigo ☐ Rua ☐ Outra ☐ _____

História do Animal

Ambiente:

Interior ☐

Exterior ☐

Jardim Privado Varanda Gatil Acesso à rua(cidade) Acesso à rua(campo)

Misto

Jardim Privado Varanda Gatil Acesso à rua(cidade) Acesso à rua(campo)

Quantas horas passa em média no exterior: _____

% Tempo que passa no exterior:

0%: 1-49%: 50-99%: 100%:

Em que altura do dia passa no exterior: _____

Manhã: Tarde: Fim da Tarde: Noite:

Alimentação

Apetite: Normal Aumentado _____ Diminuído _____

Seca comercial _____ Húmida comercial _____

Caseira _____ Mista _____

História Médica

Doenças anteriores: Não Sim _____

Medicações Anteriores: Não Sim _____

Desparasitação:

Interna: Não Sim Com: _____ Frequência aplicação:_____

Produto microfilaricida: _____

Externa: Não Sim Com: _____ Frequência aplicação:_____

Produto repelente de mosquitos: _____

Spray Spot On Coleira Champo

Vacinado: Não Sim Quando? _____

Qual vacina: _____

Vacinado contra: Leucose: Não Sim

_____

Cohabitantes

Não Sim

Cães: _____Vacinados:_____

Gatos: _____ Vacinados:_____

Saudáveis: Sim Não _____

I.6. Formulário da história clínica efetuada aos proprietários dos animais examinados no estudo

TAREFA CANINA - HISTÓRIA CLÍNICA

Assintomático □ Sintomático □
Sinais Inespecíficos:
Perda de Peso:
Início:
Anorexia:
Início
Tipo: Total □ Parcial □ _____
Apatia:
Início:
Sinais Respiratórios/cardíacos → AUSENTE □ PRESENTE □
Intolerância ao Exercício
Início: Em repouso □ Após exercício □
Tosse:
Início: Em repouso □ Após exercício □
Descrição: Nº de episódios por dia:
Dispneia:
Início: Em repouso □ Após exercício □
Descrição: Nº de episódios por dia:
Síncope:
Início: Em repouso □ Após exercício □
Descrição: Nº de episódios por dia:
Distenção Abdominal: Início:

Sinais Gastrointestinais → AUSENTE □ PRESENTE □
Vómito:
Início:
Descrição:
Alimentar □ Espumoso □ Biliar □ Fecalóide □ Outro □ _____
Nº de episódios por dia:
Diarreia:
Início:
Descrição:
Nº de episódios por dia:
Melena □ Hematosquézia □ Sem sangue □ Outro □ _____
Sinais Neurológicos → AUSENTE □ PRESENTE □
Alteração Estado Mental □ Ataxia □ Convulsão □ Outro□ _____
Outros:
Urinário_____
Dermatológico_____
Locomotor:_____
Comportamento:_____
Reprodutor:_____
Outros:_____

TAREFA FELINA - HISTÓRIA CLÍNICA

Assintomático ☐ **Sintomático** ☐

Sinais Inespecíficos:
Perda de Peso:
Início:
Anorexia:
Início:
Tipo: Total ☐ Parcial ☐ _____
Apatia/Letargia:
Início:

Sinais Respiratórios/cardíacos → AUSENTE ☐ **PRESENTE** ☐
Intolerância ao Exercício
Início: Em repouso ☐ Após exercício ☐
Tosse:
Início: Em repouso ☐ Após exercício ☐
Descrição: Nº de episódios por dia:
Dispneia:
Início: Em repouso ☐ Após exercício ☐
Descrição: Nº de episódios por dia:
Respiração com a boca aberta: Sim ☐ Não☐
Síncope:
Início: Em repouso ☐ Após exercício ☐
Descrição: Nº de episódios por dia:
Distenção Abdominal:
Início:
Outros:
Hemoptise: ☐ Taquipneia ☐ Taquicardia ☐ Sons respiratórios ☐ _____

Sinais Gastrointestinais → AUSENTE ☐ **PRESENTE** ☐
Vómito:
Início: Agudo ☐ Crónico ☐
Frequência:
Diário ☐ Semanal ☐ Mensal ☐ Esporádico ☐
Descrição:
Alimentar ☐ Espumoso ☐ Biliar ☐ Fecalóide ☐ Outro ☐ _____
Nº de episódios por dia:

Diarreia:
Início:
Descrição:
Nº de episódios por dia:
Melena ☐ Hematosquézia ☐ Sem sangue ☐ Outro ☐ _____
Salivação:
Início:
Sinais Neurológicos → AUSENTE ☐ **PRESENTE** ☐
Alteração Estado Mental ☐ Ataxia ☐ Convulsão ☐ Head Tilt ☐ Outro☐ _____

Morte Súbita
Sim: □ Não: □ _____

Urinário_____
Dermatológico_____
Locomotor:_____
Comportamento:_____
Reprodutor:_____
Outros:_____

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

I.7. Formulário do exame físico realizado aos animais examinados no estudo

TAREFA CANINA

Exame Físico **TRC**_____

Atitude: Alerta: □ Deprimido: □ Hiperexcitado: □ _____
Mucosas: Normais □ Hiperémicas □ Pálidas □ Cianóticas □ Ictéricas □
Hidratação: Normal □ Desidratação : □ _____%
Estado corporal: Peso_____Condição corporal: 1 □ 2 □ 3 □ 4 □ 5 □
Auscultação cardíaca: Normal □ Anormal □ _____
Sopro presente □ Esquerdo □ Direito □ _____
Auscultação pulmonar: Normal □ Anormal □ _____
Pulso: Normal □ Anormal □ _____**Distenção jugular** □
Temperatura:_____
Olhos: Normal □ Anormal □ _____
Ouvidos: Normal □ Anormal □ _____
Boca: Normal □ Anormal □ _____ **Nariz:** Normal □ Anormal □ _____
Órgãos genitais: Normal □ Anormal □ _____
Pele/Pêlo: Normal □ Anormal □ _____
Palpação abdominal: Normal □ Anormal □ _____
Ascite □ Hepatoesplenomegalia □
Gânglios Linfáticos Normal □ Anormal □ _____
Observações:

TAREFA FELINA

Exame Físico **TRF: _____**

Atitude: Alerta: □ Deprimido: □ Hiperexcitado: □ _____
Mucosas: Normais □ Hiperémicas □ Pálidas □ Cianóticas □ Ictéricas □
TRC_____
Hidratação: Normal □ Desidratação : □ _____%
Estado corporal: Peso_____ Condição corporal: 1 □ 2 □ 3 □ 4 □ 5 □
Auscultação cardíaca: Normal □ Anormal □ _____
Sopro presente □ Esquerdo □ Direito □ _____
FC: _____Normal □ Aumentada □ Diminuída □
Auscultação pulmonar: Normal □ Anormal □ _____
FR: _____Normal □ Aumentada □ Diminuída □ Efusão: _____
Pulso: Normal □ Anormal □ _____
Distenção jugular □
Temperatura:_____
Olhos: Normal □ Anormal □ _____
Ouvidos: Normal □ Anormal □ _____
Boca: Normal □ Anormal □ _____ **Nariz:** Normal □ Anormal □ _____
Órgãos genitais: Normal □ Anormal □ _____
Pele/Pêlo: Normal □ Anormal □ _____
Palpação abdominal: Normal □ Anormal □ _____
Ascite □ Hepatoesplenomegalia □

Gânglios Linfáticos Normal ☐ Anormal ☐ _____
Presença de parasitas externos: Sim ☐ Não ☐ Quais:_____
Presença de parasitas internos: Sim ☐ Não ☐ Quais:_____
Observações:

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

I.8. Formulário dos resultados das técnicas laboratoriais de diagnóstico de *Dirofilaria immitis*

Tarefa Canina

Código do Animal: TRC _ _ _
Data da recolha do sangue:
Hora de recolha do sangue:
Exames Diagnóstico:
Data dos exames de sangue:
Exame directo de sangue fresco:
Positivo □ Negativo □ Foto nº _____
Espécie de microfilária: _____
Tubo capilar:
Positivo □ Negativo □ Foto nº _____
Espécie de microfilária: _____ Hematócrito:_____
Método Knott modificado:
Positivo □ Negativo □ Foto nº _____
Espécie de microfilária: _____
Teste Antigenio Dirofilariose:
Positivo □ Negativo □ Foto nº _____
Método Histoquímica
Positivo □ Negativo □ Foto nº _____
Espécie de microfilária: _____
Estado Infecção Dirofilária:
Positivo □ Negativo □ Oculta □

Tarefa Felina

Código do Animal: TRF _ _ _

Data de recolha de sangue:
Hora de recolha do sangue:

Exames Diagnóstico:
Exame directo de sangue fresco:
Positivo □ Negativo □ Foto nº _____
Espécie de microfilaria: _____

Método Knott modificado
Positivo □ Negativo □ Foto nº _____
Espécie de microfilaria: _____

Teste Antigenio Dirofilariose:
Snap: Positivo □ Negativo □ Foto nº _____
Teste Anticorpo Dirofilariose:
Heska: Positivo □ Negativo □ Foto nº _____
Teste FIV:
Snap: Positivo □ Negativo □ Foto nº _____
Teste FeLV:

Snap: Positivo ☐ Negativo ☐ Foto nº _____
Estado Infecção Dirofilaria:
Negativo ☐ Positivo Ac ☐ Positivo Ag ☐ Positivo Ac+Ag ☐ Oculta ☐

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

I.9. Instruções do Fabricante do Teste Imunodiagnóstico ELISA semiquantitativo (Test Snap® Heartworm HTWM® - Idexx)

Kit para a detecção de antígeno de *Dirofilaria immitis* canina

Uso Veterinário.

Versão Portuguesa

SNAP® HTWM

Diagnóstico in vitro para a detecção semiquantitativa de antígeno da *Dirofilaria immitis (D. immitis)* em sangue total, soro ou plasma de caninos e felinos. O teste SNAP é um ensaio imunoenzimático: quando o conjugado e a amostra são misturados e adicionados ao recipiente de amostra, o dispositivo é ativado, liberando reagentes armazenados no dispositivo. O aparecimento de cor nos pontos indicadores de antígeno é proporcional à concentração de antígenos na amostra.

Precauções e avisos

- Durante a fabricação, os pontos bioativos são tingidos para fins de controle de qualidade. Isso não interfere nos resultados ou interpretação do teste.
- Todos os resíduos devem ser devidamente descontaminados antes do descarte.
- Não misturar componentes de kits com números de lote diferentes.
- **ATENÇÃO:** Conjugado – H316/P332+P313/EUH208. Causa uma irritação suave da pele. Em caso de irritação cutânea: consulte um médico. Contém Kathon. Pode provocar uma reação alérgica.

Armazenamento

- Armazenar a 2-25°C até a data de vencimento.
- Todos os componentes devem estar à temperatura ambiente (18-25°C) antes de executar o teste.

Componentes do kit

Item	Reagentes	Quantidade
1	1 frasco de conjugado anti-filária: HRPO (Conservado com gentamicina e Kathon)	7,0 ml
2	Dispositivo SNAP	5, 15 ou 30
Reagentes contidos em cada dispositivo:		
	Solução de lavagem (Conservado com Kathon)	0,4 ml
	Solução de substrato	0,6 ml
Outros componentes: Pipetas de transferência, frascos de amostras e um suporte de reagentes		

Informações da amostra

- As amostras devem estar à temperatura ambiente (18-25°C) antes de iniciar o procedimento do teste.
- Soro, plasma ou sangue total anticoagulado (por exemplo, EDTA, heparina), fresco ou armazenado a 2-8°C por até uma semana, podem ser usados.
- Para um tempo mais longo de armazenamento, o soro ou plasma podem ser congelados (-20°C ou mais frio) e depois recentrifugados antes de usar.
- Amostras hemolisadas ou lipêmicas não afetarão os resultados do teste.

Procedimento de teste

1. Se armazenados em geladeira, deixe todos os componentes à temperatura ambiente (18-25°C) por 30 minutos para que equilibrem a temperatura. **Não aqueça.**
2. Ao utilizar a pipeta fornecida, coloque **3 gotas da amostra** em um novo tubo de amostra.
3. Segurando o frasco na vertical, adicione **4 gotas do conjugado** ao tubo de amostra.
4. Tampe o tubo de amostra e misture bem, invertendo-o de 3 a 5 vezes.
5. Coloque o dispositivo sobre uma superfície horizontal. Adicione todo o conteúdo do tubo da amostra à amostra, tendo o cuidado de não espirrar o conteúdo para fora do recipiente da amostra.

   A amostra fluirá através da janela de resultados, atingindo o círculo de ativação em 30 a 60 segundos. Algumas amostras podem permanecer no recipiente da amostra.

6. Quando a cor aparecer pela PRIMEIRA vez no círculo de ativação, empurre o ativador com firmeza até que esteja alinhado com o corpo do aparelho.

Observação: Algumas amostras podem não fluir para o círculo de ativação dentro de 60 segundos, portanto, o círculo pode não mudar de cor. Neste caso, pressione o ativador após a amostra fluir através da janela de resultado.

7. Leia o resultado do teste em **oito minutos**.

Interpretação dos resultados do teste

Resultado positivo

Qualquer quantidade de pontos de amostra com aparecimento de cor indica um resultado positivo e a intensidade da cor é proporcional à concentração de antígeno de dirofilária na amostra.

Resultado negativo

Somente surge cor no ponto de controle positivo.

Resultados inválidos

1. **Controle negativo (proteção contra falsos positivos)**—Se a cor do ponto de controle negativo for igual ou mais escura do que a cor nos pontos de amostra, o resultado é inválido e a amostra deve ser reanalisada.
2. **Sem aparecimento de cor**—Se o controle positivo não apresentar cor, repita o teste.
3. **Fundo**—Se a amostra fluir para além do círculo de ativação, isto pode resultar em cor de fundo. É normal haver alguma cor de fundo. No entanto, se o fundo colorido obscurecer o resultado do teste, repita o teste.

IDEXX SNAPshot Dx® Analyzer

Os resultados do teste também podem ser lidos usando SNAPshot Dx Analyzer. Uma descrição completa de como introduzir dados do paciente e ler os resultados do teste usando o SNAPshot Dx Analyzer pode ser encontrada no guia do operador do SNAPshot Dx Analyzer.

Sensibilidade e especificidade

Teste de comparação	Tamanho da Amostra Kit/Referência					Tipo de amostra	Limite de confiança de 95% de sensibilidade e especificidade relativas	Estatística Kappa
	+/+	-/+	+/-	-/-	Total			
PetChek® Dirofilariose	152	3	0	103	258	Soro/Plasma/ Sangue Total	Sens., 98% (95% CL 94%–100%) Espec., 100% (95% CL 96%–100%)	0,98
Os valores da sensibilidade da dirofilariose nesta tabela foram gerados a partir de uma população de carga de verminose mista. A sensibilidade para amostras de cães com cargas de verminose muito baixas (≤2 verminose, n=24) foi de 91,7%, sensibilidade ao testar amostras de cães com > 2 verminose foi de 99,2%.								

A sensibilidade e a especificidade são baseadas na interpretação visual dos resultados do SNAP.

CL = limite de confiança

Figura 3: Instruções do Fabricante do Teste Imunodiagnóstico ELISA semiquantitativo – Test Snap® Heartworm HTWM® - Idexx. Adaptado de Idexx.[364]

I.10. Instruções do Fabricante do Teste Imunodiagnóstico ELISA (Test SNAP® Feline Triple Test® – Idexx)

Kit para Detecção de Antígeno da Dirofilariose Felina, Antígeno de Leucemia Felina e Anticorpos do Vírus da Imunodeficiência Felina

Para uso exclusivo veterinário.

Versão Portuguesa

SNAP® Feline Triple®

Kit de diagnóstico in vitro para detecção do antígeno de Dirofilaria immitis, do antígeno do vírus da leucemia felina e de anticorpos contra o vírus da imunodeficiência felina em soro, plasma ou sangue total de felinos.

Precauções e advertências

- Todos os dejetos devem ser descontaminados corretamente antes de serem descartados.
- Não misture componentes de kits com números de lote diferentes.
- Não use dispositivos SNAP que já tenham sido ativados antes de adicionar a amostra.
- As filarioses em que há apenas parasitas machos geralmente produzem níveis de antígeno inferiores ao limiar de detecção deste teste antigênico.

Armazenagem

Os dispositivos e os reagentes de teste devem ser armazenados entre 2–8°C até a data de validade. Todos os componentes devem ser mantidos à temperatura ambiente (18–25°C) antes da realização do teste. **Não aquecer.**

Componentes do kit

Item	Reagentes	Quantidade
1	1 frasco de conjugado anti-filária, anti-FeLV e FIV:HRPO (Conservado com gentamicina e Kathon)	8,0 ml
2	Dispositivo SNAP	5, 15 ou 30
Reagentes contidos em cada dispositivo:		
	Solução de lavagem (Conservado com Kathon)	0,4 ml
	Solução de substrato	0,6 ml
Outros componentes: Pipetas de transferência, frascos de amostras e um suporte de reagentes		

Informação sobre a amostra

- As amostras devem ser armazenadas à temperatura ambiente (18–25°C) antes do início do teste.
- O teste pode ser realizado em amostras de soro, plasma ou sangue total tratado com anticoagulante (p. ex. em EDTA ou heparina), fresco ou armazenado a 2–8°C por até uma semana.
- Se for necessário armazenar amostras de soro por mais tempo, pode-se congelá-las (-20°C ou menos) e depois centrifugá-las novamente antes de usar.
- A presença de hemólise ou lipemia nas amostras não afetará os resultados.

Procedimento do teste

1. Antes de usar, espere 30 minutos até que a temperatura dos componentes se equilibre e atinja a temperatura ambiente (18–25°C). **Não aquecer.**
2. Use a pipeta fornecida e coloque 3 **gotas** da amostra em um tubo de amostra novo.
3. Com o frasco na posição vertical, adicione **4 gotas de conjugado** ao tubo com a amostra.
4. Tampe o tubo de amostra e inverta-o **3 a 5 vezes** para misturar bem.

5. Coloque o dispositivo em uma superfície horizontal, adicione todo o conteúdo do tubo da amostra na cavidade da amostra e misture bem, com cuidado para não derramar o conteúdo fora da cavidade da amostra.

   A amostra irá escorrer pela janela de resultados e atingirá o círculo de ativação em 30 a 60 segundos. Parte da amostra poderá permanecer na cavidade da amostra.

6. Quando a cor COMEÇAR A APARECER no círculo de ativação, empurre o ativador com firmeza até ele ficar no mesmo nível que o corpo do dispositivo.

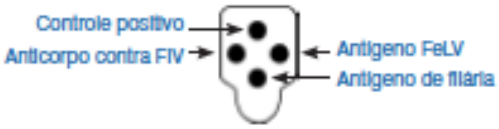
Observação: Algumas amostras podem não fluir para o círculo de ativação em 60 segundos. Se isto ocorrer, o círculo não mudará de cor. Neste caso, pressione o ativador depois que a amostra fluir pela janela de resultados.

7. Os resultados do teste devem ser lidos em 10 minutos a partir do momento da ativação.
   Observação: O controle positivo pode aparecer primeiro, mas os resultados só serão definitivos após 10 minutos.

Interpretar os resultados do teste

Resultado positivo

O surgimento de qualquer cor nos pontos de amostra indica que a amostra contém anticorpos contra FIV, o antígeno FeLV ou antígenos de filária.



Resultado negativo

Apenas o ponto de controle positivo muda de cor.

Resultado inválidos

- **Fundo**—Se a amostra fluir pelo círculo de ativação, uma cor de fundo poderá surgir. A presença de algum grau de coloração de fundo é normal, mas o teste terá que ser repetido se ela encobrir o resultado do teste.
- **Ausência de cor**—Se o controle positivo não mudar de cor, o teste terá que ser repetido.

Analizador IDEXX SNAPshot Dx*

Os resultados dos testes também podem ser lidos com o SNAPshot Dx. Existe uma descrição completa acerca do modo de introdução dos dados dos pacientes e de como ler os resultados com o SNAPshot Dx no guia do utilizador SNAPshot Dx.

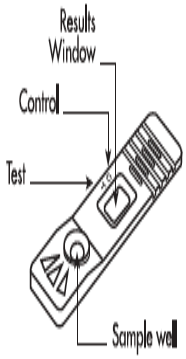
Figura 4: Instruções do Fabricante do Teste Imunodiagnóstico ELISA - Teste SNAP® Feline Triple Test® - Idexx . Adaptado de Idexx [364]

I.11: Instruções do Fabricante do Teste Imunodiagnóstico ELISA (Test Solo Step Feline Heartworm® – Heska)

Directions for Use

The test cassette is for use in detecting IgG antibodies against *D. im* in serum or plasma from cats.

Figure 1



Required Materials

1. A sample of feline serum or plasma
2. Test cassette (provided)
3. Pipette (provided)
4. Timer or clock

Procedure

1. Open the foil package and place the test cassette on a flat solid surface (Figure 1).
2. Using the pipette, draw up the patient sample into the stem port the pipette. Do not fill the bulb (Figure 2).
3. Holding the pipette vertically, dispense 3 drops of the sample int round sample well of the test cassette (Figure 3).
4. Allow the test cassette to sit undisturbed for 5 minutes (Figure 4)
5. Read the results in the rectangular Results Window 5 minutes af applying plasma or serum. A blue line (Procedural Control Line) **must** appear on all samples, and a red line (Test Line) may or may not appear (Figure 5).

Figure 2

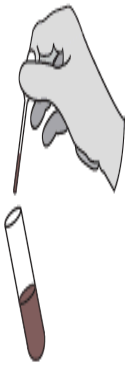


Figure 3

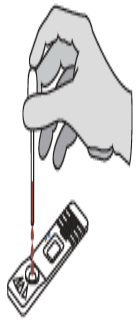


Figure 4

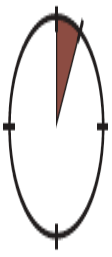
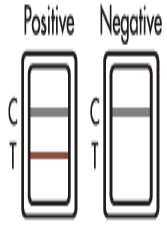


Figure 5



Interpretation of Test Results

Procedural Control Line (C): You **must** see a blue line within 5 minut of adding serum or plasma for the test to be valid. This blue proced control line indicates proper flow of the sample through the test cas **If the blue line does not develop, the test is invalid and should be repeated.** Discard the test cassette, and repeat the test with a new test cassette.

Test Line (T): Any visible red line within 5 minutes of adding serum or plasma indicates a positive result. Antibodies to *D. immitis* are present. This means one or more of the following:

- Adult heartworms are present in the heart and/or pulmonary arteries.
- The cat is infected with late L4 or adult worm(s).
- Heartworm infection has been cleared, but antibodies are still present.
- Ectopic heartworm infection may be present.

In the presence of suggestive clinical signs and other supportive diagnostic data (e.g., radiographic findings, echocardiographic findings, etc.), a positive result will help confirm cardiovascular heartworm disease.

No red line within 5 minutes of adding serum or plasma indicates a negative test result. There are no antibodies to *D. immitis* present. This means one of the following:

- The cat is not infected with *D. immitis*.
- The cat was infected less than 60 days prior to collection of the sample.

If a negative result is obtained and clinical signs are present, a retest within 2 – 3 months is recommended. Additional diagnostic tests should be employed to rule out other causes of the clinical signs.

Sample Collection and Storage

Plasma: Collect an anticoagulated blood sample using standard clinical laboratory procedures. Separate plasma by centrifugation. Plasma samples may be stored refrigerated (2° – 7° C) for up to 72 hours; for longer storage, freeze at or below -20° C in vials with air-tight seals.

Serum: Collect and prepare serum samples using standard clinical laboratory procedures. Serum samples may be stored refrigerated (2° – 7° C) for up to 72 hours; for longer storage, freeze at or below -20° C in vials with air-tight seals.

Precautions

1. Do not expose the test cassette to direct sunlight.
2. Do not use to test species other than cats.
3. After 10 minutes, a very faint red line may appear in the Results Window with samples from some cats which are negative for heartworm infection.
4. Do not use the test cassette more than once.
5. Use the test cassette immediately after opening the foil pouch.

Storage and Stability

1. Store at room temperature (15° – 30° C [59° – 86° F]).
2. See package for expiration date.

For technical assistance, call Heska at **1-800-GO HESKA (1-800-464-**

HESKA®

www.heska.com

Heska Corporation, 3760 Rocky Mountain Avenue, Loveland, CO 80538

U.S. Vet Lic. No. 213

Figura 5: Instruções do Fabricante do Teste Imunodiagnóstico ELISA - Test Solo Step Feline Heartworm® - Heska . Adaptado de Heska [414]

I.12. Questionário realizado aos proprietários dos cães examinados acerca da dirofilariose.

Tarefa - Proprietário

Código do Animal: TR __ _ _ **Data:_____**

Grupo etário:

< 20 anos: ☐ 40-49 anos: ☐

20-29 anos: ☐ 50-59 anos: ☐

30-39 anos: ☐ > 60 anos: ☐

Habilitações Literárias:

Sem escolaridade obrigatória: ☐

Escolaridade obrigatória: ☐

Ensino secundário: ☐

Ensino superior: ☐

Mestrado/Doutoramento: ☐

Tem conhecimento da doença: Sim ☐ Não ☐

Como teve conhecimento da doença:

Médico Veterinário ☐ Animal doente ☐ Amigo ☐

Internet: ☐ Loja de animais: ☐

Revistas de especialidade ☐

Folheto de publicidade desparasitante: ☐

Meio comunicação social: ☐

Outro: _____

Sabe que espécies pode afectar?

Cães ☐ Gatos ☐ Humanos ☐ Outros ☐

Tem conhecimento de como é transmitida?

Tem conhecimento acerca dos sinais que provoca no seu animal?

Tem conhecimento acerca da prevenção ou tratamento?

I.13. Distribuição gráfica da idade dos cães examinados no estudo

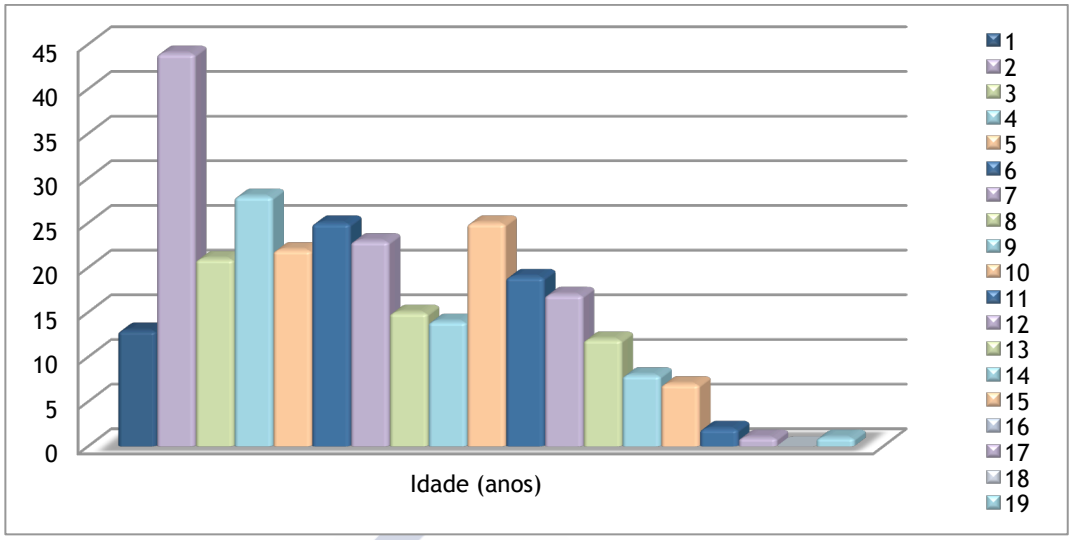


Gráfico 1: Distribuição gráfica da idade dos cães examinados (n=297).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

I.14 Representação gráfica dos fatores de risco de dirofilariose canina

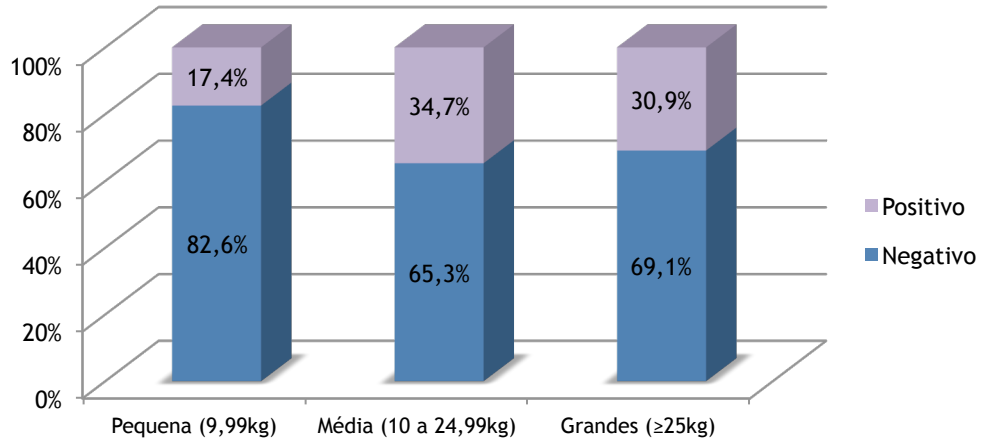


Gráfico 2: Estado da infeção por *D. immitis* de acordo com o tamanho do cão (n=236)

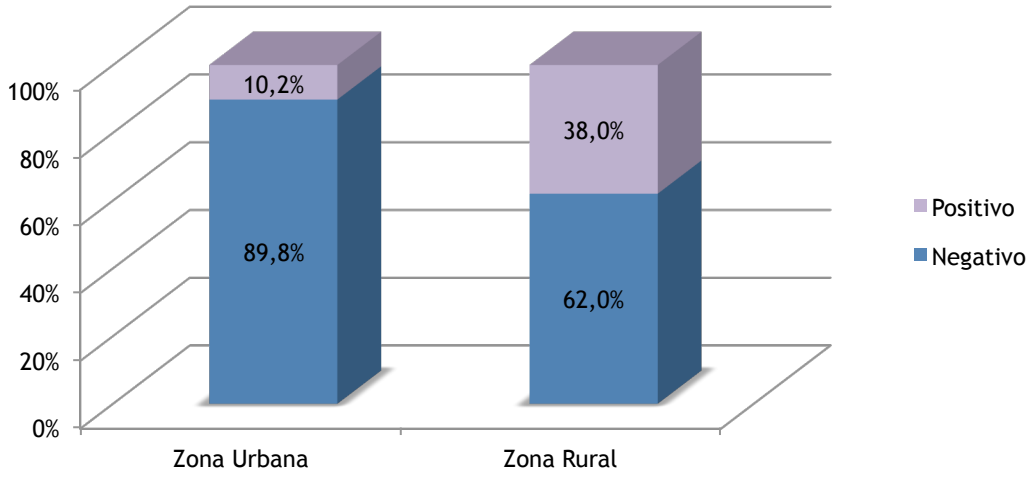


Gráfico 3: Estado da infeção por *D. immitis* de acordo com a zona de habitat (n=227)

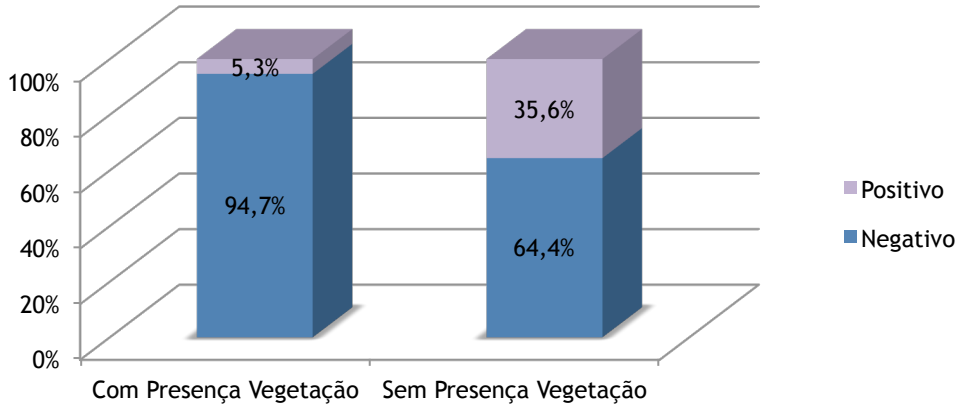


Gráfico 4: Estado da infeção por *D. immitis* de acordo com a presença de vegetação (n=137)

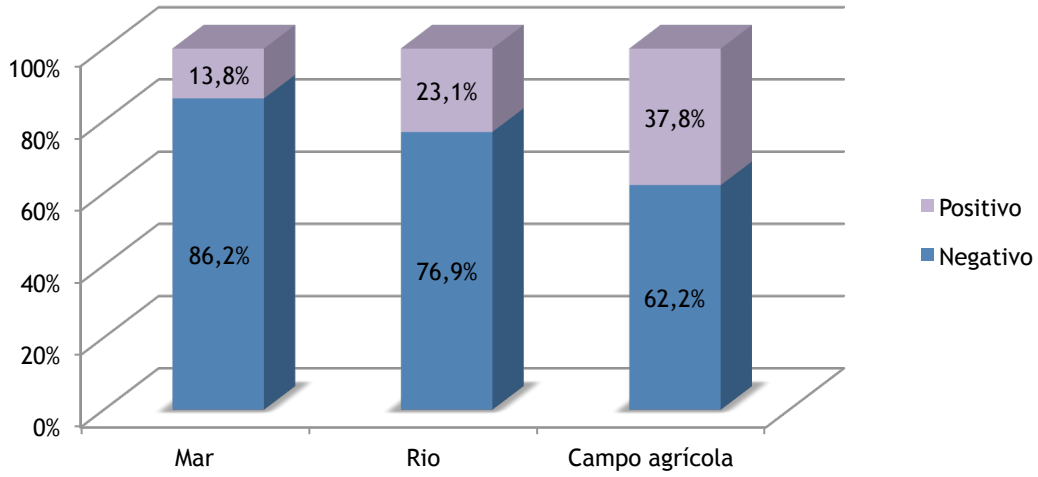


Gráfico 5: Estado da infeção por *D. immitis* de acordo com as características geográficas do habitat (n=129)

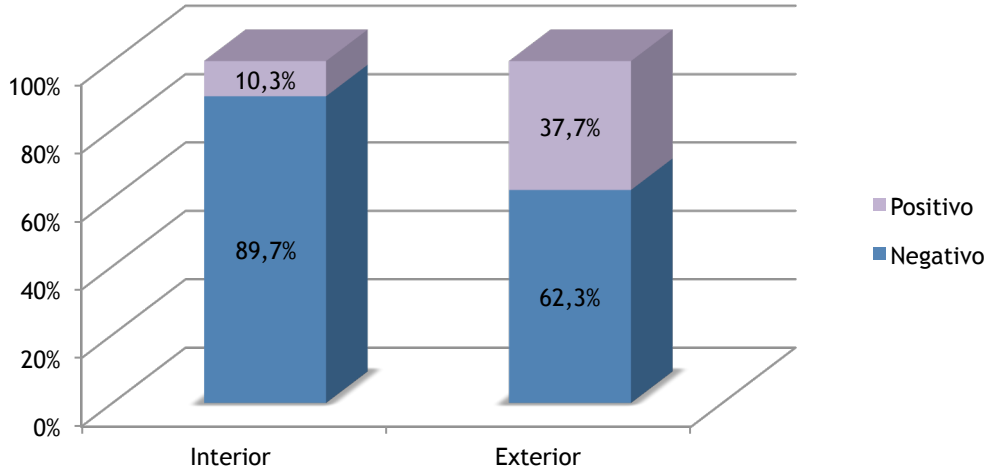


Gráfico 6: Estado da infeção por *D. immitis* de acordo com tipo de ambiente (n=298)

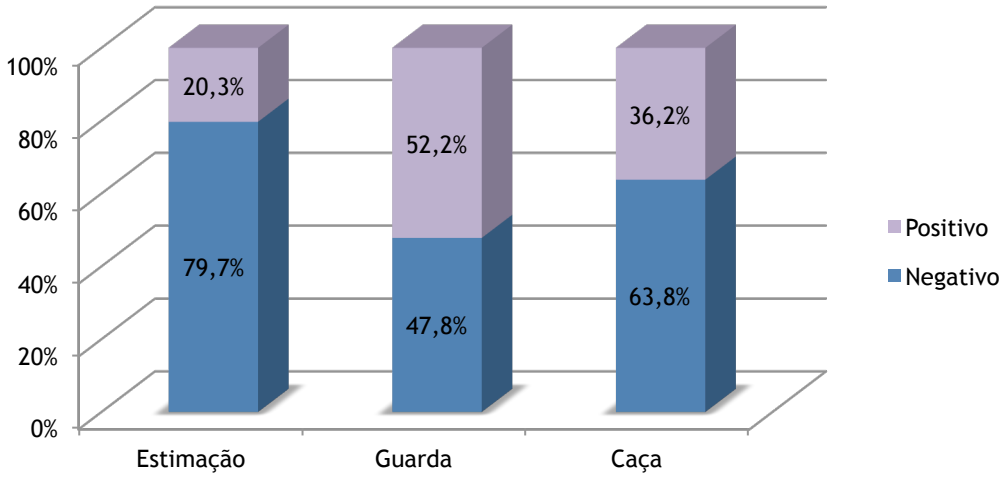


Gráfico 7: Estado da infeção por *D. immitis* de acordo com a utilização (n=228)

I.15. Alterações nas variáveis hematológicas nos cães parasitados

		N	%
GB	Normal	45	57,0%
	Aumentado	33	41,8%
	Diminuído	1	1,3%
Linfócitos%	Normal	56	70,9%
	Aumentado	19	24,1%
	Diminuído	4	5,1%
Monócito%	Normal	54	68,4%
	Aumentado	0	,0%
	Diminuído	25	31,6%
Granulócito %	Normal	59	74,7%
	Aumentado	19	24,1%
	Diminuído	1	1,3%
Linfócitos m/m3	Normal	55	69,6%
	Aumentado	20	25,3%
	Diminuído	4	5,1%
Monócito m/m3	Normal	56	70,9%
	Aumentado	1	1,3%
	Diminuído	22	27,8%
Granulócitos m/m3	Normal	58	73,4%
	Aumentado	19	24,1%
	Diminuído	2	2,5%
GV m/m3	Normal	49	62,0%
	Aumentado	24	30,4%
	Diminuído	6	7,6%
VCM fl	Normal	59	74,7%
	Aumentado	19	24,1%
	Diminuído	1	1,3%
Hematócrito %	Normal	40	50,6%
	Aumentado	35	44,3%
	Diminuído	4	5,1%
MCH pg	Normal	41	51,9%
	Aumentado	3	3,8%
	Diminuído	35	44,3%
MCCH g&dl	Normal	55	69,6%
	Aumentado	0	,0%
	Diminuído	24	30,4%

IDV	Normal	77	97,5%
	Aumentado	2	2,5%
	Diminuído	0	,0%
Hgb g/dl	Normal	58	73,4%
	Aumentado	18	22,8%
	Diminuído	3	3,8%
Plaquetas	Normal	43	55,1%
	Aumentado	0	,0%
	Diminuído	35	44,9%
VMP	Normal	78	98,7%
	Aumentado	1	1,3%
	Diminuído	0	,0%
IDP	Normal	46	75,4%
	Aumentado	14	23,0%
	Diminuído	1	1,6%

Tabela 1: Alterações nas variáveis hematológicas nos cães parasitados

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

I.16. Alterações nas variáveis bioquímicas nos cães parasitados

		N	%
ALT	Normal	52	86,7%
	Aumentado	8	13,3%
	Diminuído	0	,0%
FAS	Normal	58	89,2%
	Aumentado	6	9,2%
	Diminuído	1	1,5%
Creatinina	Normal	62	91,2%
	Aumentado	6	8,8%
	Diminuído	0	,0%
Albumina	Normal	57	85,1%
	Aumentado	0	,0%
	Diminuído	10	14,9%
Proteína Totais	Normal	41	56,2%
	Aumentado	31	42,5%
	Diminuído	1	1,4%
Globulinas	Normal	31	47,0%
	Aumentado	34	51,5%
	Diminuído	1	1,5%

Tabela 2: Alterações nas variáveis bioquímicas nos cães parasitados

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

I.17. Distribuição gráfica da idade dos gatos examinados no estudo

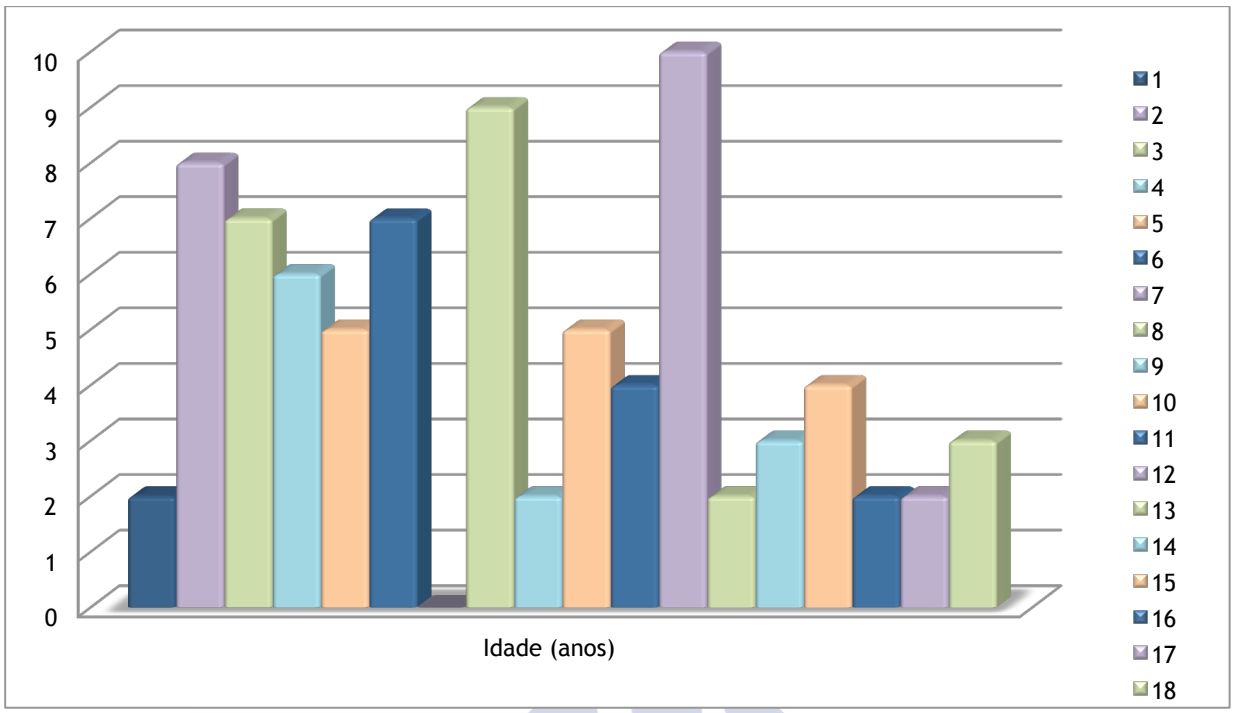


Gráfico 8: Distribuição gráfica da idade dos gatos examinados no estudo (n=81)

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

I.18. Resultados do questionário sobre a informação clínica prévia dos gatos examinados no estudo, de acordo com o estado de infeção de *D. immitis*

		Estado Dirofilária				p[1]
		Negativo		Positivo		
		N	%	N	%	
Doenças anteriores	Não	52	85,2%	9	14,8%	0,889
	Sim	13	86,7%	2	13,3%	
Medicações anteriores	Não	59	84,3%	11	15,7%	0,390
	Sim	4	100,0%	0	0,0%	
Desparasitação interna	Não	56	83,6%	11	16,4%	0,092
	Sim	15	100,0%	0	0,0%	
Desparasitação externa	Não	54	84,4%	10	15,6%	0,297
	Sim	16	94,1%	1	5,9%	
Vacinação	Não	61	84,7%	11	15,3%	0,207
	Sim	9	100,0%	0	0,0%	
Vacina da Leucose Felina	Não	61	85,9%	10	14,1%	0,862
	Sim	5	83,3%	1	16,7%	

Tabela 3: Resultados do questionário sobre a informação clínica prévia dos gatos examinados no estudo, de acordo com o estado de infeção de *D. immitis*[1]. Teste do Qui-Quadrado.

I.19. Resultados das alterações nas variáveis hematológicas e bioquímicas em gatos parasitados com *D. immitis*

		N	%
GB (m/m3)	Normal	3	27,3%
	Aumentado	8	72,7%
	Diminuído	0	0,0%
Linfócitos (%)	Normal	4	36,4%
	Aumentado	7	63,6%
	Diminuído	0	0,0%
Monócitos (%)	Normal	10	90,9%
	Aumentado	0	0,0%
	Diminuído	1	9,1%
Granulócitos (%)	Normal	9	81,8%
	Aumentado	1	9,1%
	Diminuído	1	9,1%
Linfócitos (m/m3)	Normal	4	36,4%
	Aumentado	7	63,6%
	Diminuído	0	0,0%
Monócitos (m/m3)	Normal	10	90,9%
	Aumentado	0	0,0%
	Diminuído	1	9,1%
Granulócitos (m/m3)	Normal	5	45,5%
	Aumentado	5	45,5%
	Diminuído	1	9%
GV (m/m3)	Normal	6	54,5%
	Aumentado	4	36,4%
	Diminuído	1	9,1%
VCM (fl)	Normal	11	100,0%
	Aumentado	0	0,0%
	Diminuído	0	0,0%
HT (%)	Normal	7	63,6%
	Aumentado	3	27,3%
	Diminuído	1	9,1%
MCH (pg)	Normal	0	0,0%
	Aumentado	0	0,0%
	Diminuído	11	100,0%
MCCH (g/dl)	Normal	5	45,5%
	Aumentado	0	0,0%
	Diminuído	6	54,5%
IDV	Normal	4	36,4%
	Aumentado	7	63,6%
	Diminuído	0	0,0%
Hgb (g/dl)	Normal	8	72,7%
	Aumentado	0	0,0%
	Diminuído	3	27,3%
Plaq (m/m3)	Normal	7	63,6%
	Aumentado	0	0,0%

	Diminuído	4	36,4%
VMP (fl)	Normal	0	0,0%
	Aumentado	10	90,9%
	Diminuído	1	9,1%
IDP	Normal	10	100,0%
	Aumentado	0	0,0%
	Diminuído	0	0,0%
GGT	Normal	11	91,7%
	Aumentado	1	8,3%
	Diminuído	0	0,0%
FAS	Normal	11	100,0%
	Aumentado	0	0,0%
	Diminuído	0	0,0%
CREAT	Normal	12	92,3%
	Aumentado	1	7,7%
	Diminuído	0	0,0%
ALB	Normal	9	75,0%
	Aumentado	1	8,3%
	Diminuído	2	16,7%
PT	Normal	9	75,0%
	Aumentado	2	16,7%
	Diminuído	1	8,3%
Glob	Normal	6	50,0%
	Aumentado	5	41,7%
	Diminuído	1	8,3%

Tabela 4: Resultados das alterações nas variáveis hematológicas e bioquímicas em gatos parasitados com *D. immitis*.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Anexo II

II.1. Artigos Científicos

Vieira, A.L., Vieira, M.J., Oliveira, J.M, Simões, A.R., Diez-Baños, P., Gestal, J. (2014). Prevalence of canine heartworm (Dirofilaria immitis) disease in dogs of central Portugal. *Parasite*. 21(5). doi:10.1051/parasite/2014003.

Parasite 2014, **21**, 5
Research Article

Prevalence of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs of central Portugal

Prévalence de la dirofilariose canine (*Dirofilaria immitis*) chez les chiens du centre du Portugal

Ana Luísa Vieira[3,4*], Maria João Vieira[3,4], João Manuel Oliveira[3,4], Ana Rita Simões[3], Pablo Diez-Baños[2] and Juan Gestal[1]

[1] Catedrático Jefe del Servicio de Medicina Preventiva y Salud Pública del Hospital Clínico Universitario, Facultad de Medicina y Odontología, Universidade de Santiago Compostela, España , Coordinador del Grupo de Santiago de Compostela del Centro de Investigación Biológica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), y del grupo de Epidemiología del Instituto de Investigación Sanitaria (IDIS) de Santiago de Compostela, 15782 Santiago Compostela, Spain [2] Catedrático de Universidad. Sanidad Animal. Grupo Investigación Sanidad Animal de Galicia (INVESAGA). Animal Pathology Department, Parasitology and Parasitic Disease. Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, España [3] Clinicão – Hospital Veterinário, 3080 Figueira da Foz, Portugal [4] EUVG – Escola Universitária Vasco da Gama, 3000 Coimbra, Portugal
[*] Corresponding author: vet.anavieira@gmail.com

Received: 23 July 2013 **Accepted:** 29 January 2014

Abstract
The aim of the present study was to determine the prevalence and risk factors concerning *Dirofilaria immitis* infection in dogs from Figueira da Foz, located in the central region of Portugal. In the period between November 2009 and January 2011, 304 blood samples were obtained from dogs over 1 year of age, with no previous history of heartworm prevention or diagnosis. Every blood sample was analyzed using varied laboratory techniques (direct microscopic evaluation of a fresh blood sample, the modified Knott technique, and the ELISA antigen detection test – IDEXX Snapp®). In the samples in which microfilaremia was detected, a histochemical technique using acid phosphatase staining was applied to identify the species of microfilariae. A total prevalence of 27.3% (83 out of 304) was found. We also found that 73.5% of all positive cases (61 out of 83) were microfilaremic, and 26.5% were occult infections (22 out of 83). By means of a histochemical technique *Dirofilaria immitis* was identified in

96.7% of microfilaremic samples. A multivariate model allowed us to identify the following risk factors for the presence of heartworm disease: age between 4 and 9 years, dogs living in a rural environment, large breed dogs, and living outdoors. This study shows for the first time the high prevalence of heartworm disease in a central area of Portugal and emphasizes the importance of systematic screening for this disease, as well as the need to prevent it in dogs in this area.

Résumé

Le but de cette étude était de déterminer la prévalence et les facteurs de risques de *Dirofilaria immitis* chez les chiens de Figueira da Foz, ville située dans la région centrale du Portugal. Entre Novembre 2009 et Janvier 2011, 304 échantillons de sang ont été prélevés chez les chiens de plus d'un an, sans antécédent de diagnostic ou prévention de *Dirofilaria immitis*. Chaque échantillon a été analysé en utilisant diverses techniques de laboratoire (évaluation directe au microscope d'un échantillon de sang frais, technique de Knott modifiée, test ELISA de détection des antigènes Idexx Snapp®). Pour les échantillons dans lesquels la présence de microfilaires a été détectée, une technique histochimique utilisant une coloration à la phosphatase acide a été utilisée pour identifier les espèces de microfilaires. Une prévalence totale de 27,3 % (83 sur 304) a été trouvée. Nous avons également constaté que 73,5 % de tous les cas positifs (61 sur 83) avaient des microfilaires, et que 26,5 % étaient des infections occultes (22 sur 83). Par une technique histochimique *Dirofilaria immitis* a été identifié dans 96,7 % des échantillons avec des microfilaires. Un modèle multivarié a identifié les risques suivants pour la présence de dirofilariose canine : âge entre 4 et 9 ans, vie en milieu rural, grande taille, vie à l'extérieur. Cette étude montre pour la première fois la forte prévalence de dirofilariose dans une zone centrale du Portugal et souligne l'importance du dépistage systématique de cette maladie ainsi que la nécessité de la prévenir chez les chiens de cette région.

Key words: *Dirofilaria immitis* / Prevalence / Dog / Knott / ELISA / Portugal
© A.L. Vieira et al., published by EDP Sciences, 2014

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Dirofilaria immitis (Leidy, 1856) [18] is a parasitic nematode infection responsible for canine and feline cardiopulmonary dirofilariasis. It is also the causal agent of human pulmonary dirofilariasis. It is a zoonotic parasitic disease mainly located in temperate, tropical, and subtropical areas of the world [27, 30]

Different species of culicid mosquitoes belonging to the genera *Culex, Aedes*, and *Anopheles*, among others, have been implicated in the transmission of this parasite, allowing for its intermediate stage to complete its life cycle [6, 30]. Weather is a critical factor because of climate requirements (high relative humidity, and higher than 15 °C average temperature) of the intermediate hosts [28].

Heartworm infection is a severe and life-threatening disease. The pathophysiological response to heartworm infection is mainly due to the presence of adult worms of *Dirofilaria immitis* in the pulmonary arteries and right ventricle of the heart [8, 17]. The worm numbers, host immune response, duration of infection, and host exercise levels determine the severity of the cardiopulmonary pathology [16, 28]. Furthermore, the symbiotic relationship with bacteria of the genus *Wolbachia* (Rickettsiaceae) stimulates an inflammatory response from the host's immune system, amplifying disease severity [29].

Clinical manifestations include cough, dyspnea, weight loss, poor exercise tolerance, weakness, hemoptysis, cyanosis, and congestive heart failure [7, 17].

Canine heartworm infection is preventable and chemoprophylaxis is a priority in heartworm endemic areas. One of the goals of prevention is to reduce the reservoir population and decrease the prevalence of infection among unprotected dogs. The macrocyclic lactones (ivermectin, milbemycin oxime, moxidectin, and selamectin) are the most commonly used chemoprophylaxis agents: they are safe, effective and are administered either in oral, topical, or parenteral formulations at monthly or six-month intervals [19, 21, 22]. These drugs are effective against *Dirofilaria immitis* third-stage larvae (L3) and L4, which have developed within the previous 30 days, and thus prevent disease caused by adult worms [4, 13]. Prevention should start before the mosquito season in spring and should be continued until late fall [14]. Before starting a prophylactic regime, all mature dogs should perform a diagnostic test at least 6 months after the last administration of one of the macrolide compounds [14, 22].

The treatment of heartworm infection is neither simple nor safe in itself. The American Heartworm Society recommends the melarsomine dihydrochloride three-injection protocol (2.5 mg/kg followed 1 month later by two similar treatments 24 h apart) instead of the two-injection protocol of 2.5 mg/kg 24 h apart, because the former is safer in terms of thromboembolism and shock, and has a higher efficacy [23, 46, 47]. Recent studies suggest that the administration of both ivermectin and doxycycline for several months prior to melarsomine dihydrochloride or possibly even without melarsomine, will eliminate adult heartworm with lower risk of severe thromboembolism than melarsomine alone and will block transmission of the parasite [23, 24].

The presence of *Dirofilaria immitis* in dogs supposes a risk for the human population. Epidemiological, molecular, and immunological studies as well as clinical practice have discovered an increasing number of countries in which clinical cases of human dirofilariasis are reported, while seroepidemiological studies suggest that humans frequently become infected with *Dirofilaria spp.* at an early age. This information has changed the picture of human dirofilariasis from a sporadic to an emerging disease [20, 41]. In Portugal, a case of human ocular dirofilariasis was reported [15], and two cases of *D. immitis* infection in humans were reported in Portugal as a consequence of surgical removal and histological examination of larval lung nodules [1].

In the human host, *Dirofilaria immitis* is the causative agent of pulmonary dirofilariasis, and in many cases produces benign pulmonary nodules usually identified incidentally by chest radiography in asymptomatic patients, which can initially be misidentified as malignant tumors [12, 30–32, 44]. *Dirofilaria immitis* worms were also found in cranial,

hepatic, intraocular and mesenteric adipose tissue, testicular arteries, and conjunctival regions [20, 41]. The clinical importance of human dirofilariasis was associated almost exclusively with iatrogenesis derived from surgical interventions to remove pulmonary nodules [20, 41].

The epidemiological status of dirofilariasis is currently undergoing rapid evolution. In spite of efforts made to prevent and control the infection in dogs, disease prevalence is rising in endemic areas as well as spreading into new areas reported as dirofilariasis-free until recently [40]. Factors such as global warming, changes in vectors' seasonal population dynamics, animal circulation between countries, worm burden, and the age and immune response of the host, may play a role in the current geographical spread of the disease [10, 30]. In Europe, the highest prevalence has been reported in Mediterranean countries such as Italy, France, Greece, and Spain [30].

In the present study we will analyze the current prevalence and the seroprevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs living in the central area of Portugal and explore some of the epidemiological conditions that may increase the infection.

Materials and methods

Study area, animals, and sample collection

The study was conducted in the county of Figueira da Foz, a central region of Portugal, in 18 contiguous parishes (379-km^2 area) located near the Atlantic coast and crossed by the Mondego river. The climate is temperate. Winter temperatures range between 7 °C and 14 °C, rarely reaching below 0 °C, while in summer the temperatures range between 15 °C and 25 °C, sometimes exceeding 35 °C during heat waves. The average annual temperature is around 15 °C, while the mean annual precipitation is about 600 mm. The climate and socioeconomic life in the region with farming activity (rice culture) provide suitable conditions for development of culicid mosquitoes, vectors of Dirofilaria.

This study was carried out from November 2009 to January 2011, and 304 dogs (140 males and 164 females) were sampled: 247 animals were privately owned dogs which had been taken to the veterinary clinic for a routine health examination and 57 animals came from an animal rescue shelter (Animal Protection Association of Figueira da Foz), throughout the whole year (Figure 1).

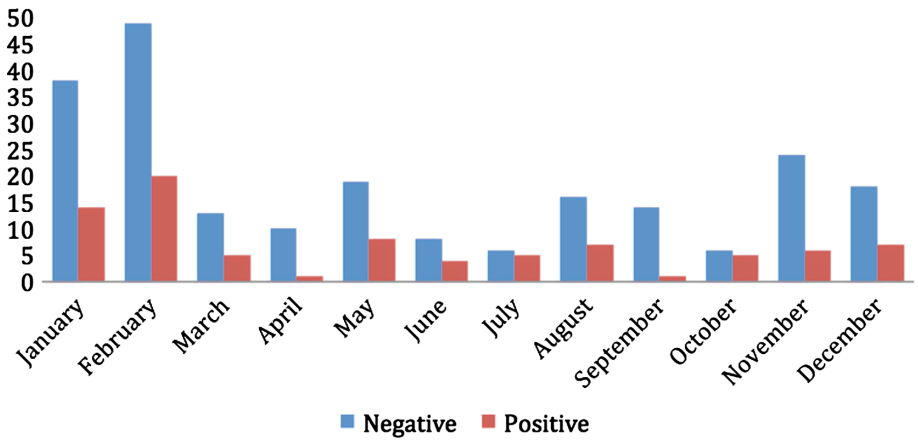


Figure 1. Distribution of heartworm results in investigated dogs according to months.

Animals were selected to fulfill the following criteria: (1) native animals that had never been moved outside the study area according to the owners or the shelter's representative, (2) animals more than 12 months old, (3) animals not submitted to chemoprophylaxis against heartworm, (4) animals with no past history or diagnosis of heartworm infection, and (5) owners who were willing to participate in this survey and authorized it.

The clinical signs and a detailed history (sex, age, weight, breed, hair length, utilization, indoor/outdoor status, and geographical origin) were obtained together with a complete physical examination looking for the presence of cardiopulmonary signs. This check-up included a complete cardiac and pulmonary auscultation, pulse evaluation, capillary refill time, jugular distension, and abdominal palpation.

A minimum of 5 mL of blood was collected from the jugular vein of all 304 dogs. Of this blood volume, at least 3 mL were collected in tubes with anticoagulant and at least 2 mL in tubes without anticoagulant and stored under refrigeration until analysis.

This study was approved by the Ethics Committee of the Clinicão – Veterinary Hospital and all of the dogs' owners signed an informed consent document.

Antigen detection

All samples of canine blood were tested for detection of *Dirofilaria immitis* circulating antigen using a canine antigen test kit (Canine Heartworm Antigen Test Kit, IDEXX Laboratories, Germany) with sensitivity of 84% (78–89), specificity of 97% (84–100), and accuracy of 86% (81–90) [2]. The procedure was carried out according to IDEXX's instructions. A sample was considered positive if it developed a more intense color than the negative control. Each test was considered valid if the positive control developed a distinct blue color and the negative control was transparent or developed a very faint color.

Microscopic examination

Blood samples were processed on the day of collection. First, fresh blood from each sample was examined under a microscope to determine the presence of microfilariae by the thick drop technique. A modified Knott test was also performed on all samples. Blood was hemolyzed with 9 mL of 2% formalin and centrifuged at 1500 rpm for 5 min. The supernatant was then decanted, and the sediment was stained with a drop of methylene blue 0.1% [9].

For species determination, microfilaremic-positive samples were analyzed using histochemical staining bases with different acid phosphatase activity using a commercial kit test (Leucognost SP©, Merck, Darmstadt, Germany) according to Peribánez et al. [36]. Microfilariae of *D. immitis* show two acid phosphatase activity spots localized around the anal and excretory pores, whereas *D. repens* shows only one acid phosphatase activity spot localized around the anal pore and microfilariae with enzyme activity throughout the body, shown to be *Dipetalonema reconditum* [36].

Survey

From the 304 dogs used in the present study, 46.1% were males and 53.9% were females; 41.8% were pure breed and 58.2% were mixed breed; 37.8% were small breed, 39.8% were medium breed and 22.4% were large breed; 52% were short-haired, 28% were medium-haired and 20% were long-haired.

According to their habitats, 35.9% of the dogs were kept indoors and 64.1% remained outdoors; 56.9% lived in a rural environment and 43.1% lived in an urban environment, 80.9% had an owner and 19.1% came from an animal shelter.

Concerning their age, 26.3% of the dogs were between 1 and 3 years old, 42.7% were between 4 and 9 years old, and 31% were over 10 years old. As for their use, 69.3% were kept as pets, 10.1% were watchdogs, and 20.6% were hunting dogs.

Statistical analysis

The data were analyzed using the SPSS© Base 18.0 software for *Windows* © [42]. The chi-square test was performed to compare proportions when the variables were categorical.

A multivariate analysis allowed us to identify the risk factors for the presence of heartworm disease in this population. This multivariate analysis included those independent variables that presented a statistical significance of less than 0.2 in the bivariate analysis. The independent variables with the highest level of statistical significance were successively eliminated from the original model, provided that the coefficients of the principal variables of exposure changed by no more than 10%.

In all cases, the significance level was established at $p < 0.05$.

Results and discussion

The information on the distribution and prevalence of *Dirofilaria immitis* in Portugal is incomplete. In the early 1990s, a study showed that canine heartworm infection was prevalent in several southern regions in Portugal, including Ribatejo (16.7%), Alentejo (16.5%), and Algarve (12%). The island of Madeira had the highest prevalence, with 30% of the dogs tested being positive for *Dirofilaria immitis* microfilaremia [1]. Prevalence may be underestimated because it was estimated solely as infection with heartworm microfilariae [7]. In another study from 2011, the overall canine heartworm prevalence in the north and central regions of Portugal was 2.1%, with the highest prevalence found in Aveiro (6.8%) and Coimbra (8.8%) [7]. In 2012, a study showed a prevalence of 3.6% in healthy Portuguese dogs and 8.9% in canine vector-borne disease (CBVD)-suspected Portuguese dogs. In this study the central region had a prevalence of 0.9% in healthy dogs and 7.4% in CBVD-suspected dogs. The region showing the highest prevalence was Madeira, with 40% in healthy dogs [7].

In the current study we demonstrate for the first time the existence of canine heartworm infection in Figueira da Foz (a central region of Portugal that belongs to Coimbra district) with 83 out of 304 dog samples analyzed testing positive in at least one diagnostic test, thus resulting in a prevalence of 27.3% ($CI_{95\%}$: 22.4%–32.7%). This

value is higher than the previously estimated prevalence for Coimbra district and Portugal. Only the island of Madeira showed a similarly high prevalence.

The number of dogs that tested positive for *D. immitis* in one or more diagnostic tests was variable according to the techniques considered (Table 1). The prevalence values of *Dirofilaria immitis* were 19.4% (59/304) by the direct smear test, 20.1% by the modified Knott technique (61/304), and 25.7% (78/304) by the Snapp® IDEXX test. The resulting sensitivities were therefore 71.7% for the direct smear test, 73.5% for the modified Knott technique and 94% for the Snapp® IDEXX test. Specificity was 100% for the three techniques employed.

	Direct smear test	Modified Knott test	Snapp® IDEXX test	Total
Positive	59	61	78	83
Negative	245	243	226	221
Total	304	304	304	304
Prevalence (%)	19.4	20.1	25.7	27.3

Table 1. Comparison of results of different diagnostic techniques for heartworm.

The different sensitivities among the techniques could be explained by the fact that microfilariae-detecting techniques are not able to detect occult infections (amicrofilaremic infections). These infections could arise due to several causes: low parasite burdens, prepatent infection by young adults, infections by aging adult females with impaired fertility, infections with male-only parasites, or immune response from the host against microfilariae. The resulting percentage of occult infections was 26.5%. This high percentage of occult infections is not uncommon and was previously reported by several studies [23, 25, 39].

Five of the positive (6%) samples tested negative when using the Snapp© IDEXX test but tested positive on the modified Knott test and were identified as belonging to *D. immitis* species by histochemical staining (acid phosphatase activity). Many studies have reported that commercial serological kits have low sensitivity when parasite burdens are low (one to five *Dirofilaria immitis* adult females), when the worms show low fertility, when the presence of microfilariae persists for 1 to 3 years after the death of adult females, prepatent infection or only male infection [23]. This could explain the result of five positive dogs (6%) that were microfilariae-positive and antigen-negative [35–37].

The samples of the 61 microfilaremic dogs underwent histochemical staining and 59 (96.7%) of them revealed acid phosphatase distribution matching with microfilariae of *D. immitis* (two distinct bright red bands of acid phosphatase activity on the excretory and anal pores specific to *D. immitis*). The acid phosphatase activity offers an easily observable and reliable method for differentiation of microfilariae [36, 49].

In regard to the diagnostic method, the McNemar statistical test allowed us to compare

the different diagnostic techniques. The direct smear test and the modified Knott technique showed the same ability to perform the diagnosis, with no statistical differences ($p = 1$) and a high level of agreement with the dogs' status of *Dirofilaria immitis* infection (Kappa = 0.781 and 0.801, respectively). The Snapp IDEXX® test demonstrated a much higher diagnostic capability, with a substantial level of agreement (Kappa = 0.958).

The following risk factors were therefore determined: dogs aged between 4 and 9 years old (37.8%), medium breed dogs (34.7%), dogs living in a rural environment (38%), dogs living outdoors (37.7%), watchdogs (52.2%), and hunting dogs (36.2%) ($p < .05$), whereas no significant differences were found related to ownership, pure versus mixed breed, sex or hair length.

A multivariate model identified the following risk factors for the presence of heartworm disease: age between 4 and 9 years (OR = 1.65; $CI_{95\%}$: 1.21–2.25; $p < .01$), dogs living in a rural environment (OR = 15.29, $CI_{95\%}$: 1.93–121.35; $p < .05$), large breed dogs (OR = 14.31; $CI_{95\%}$: 1.30–157.34; $p < .05$), and living outdoors (OR = 37.02; $CI_{95\%}$: 3.39–403.91; $p < .001$).

Estimation of canine heartworm prevalence by sex yielded inconsistent results. No significant differences by sex were reported in some studies [11, 43, 48]. On the other hand, some other authors [26, 28, 45, 49] have reported significantly higher prevalence in male dogs. In this study**,** there was no statistical difference between the sexes. For many authors, age is an important risk factor. The infection risk for dogs will probably remain stable throughout life and the probability of acquiring infection with *Dirofilaria immitis* is undoubtedly related to the increasing length of the period of exposure to the mosquitoes. Therefore, older dogs have higher prevalence of dirofilariasis than younger dogs [28, 49, 50]. We found the highest prevalence in animals between 4 and 9 years old (37.8%) and the lowest in animals under 3 years old (14.1%). In the present study, larger dogs showed higher prevalence than small dogs. In agreement with other studies, larger dogs seem to be more attractive for mosquitoes and spend more time outdoors [28, 48].

In Portugal there are 41 identified species of mosquitoes. The most abundant (92%) are *Anopheles atroparvus, Culex pipiens, Culex theileri*, and *Aedes (Ochlerotatus) caspius*, and they are broadly distributed among the 18 districts of Portugal [33]. Osório et al. demonstrated that the most common species of mosquitoes in the district of Coimbra were *Culex pipiens* (57%), *Culex theileri* (33.7%), and *Ochlerotatus caspius* (6.2%) [33]. In another study conducted in Portugal, Osório et al. found that both *Culex theileri and Ochlerotatus caspius species* fed on both hosts: *Canis familiaris* and *Homo sapiens* [34]. *Culex pipiens* is a natural and efficient vector of *Dirofilaria immitis* with a host-feeding pattern that includes humans, and is therefore of particular concern for animal and public health [3, 5, 34]. *Aedes caspius* was also described as a vector of *Dirofilaria immitis* [6]. In Portugal, the presence of larval forms of *Dirofilaria immitis* in mosquitoes of the species *Culex theileri* was found in Funchal [38] and in the area of Comporta, Alcácer do Sal [15, 37].

In this study, living in a rural environment and living outdoors are important risk factors and the activity of the dog is also a relevant health risk. Hunting dogs and watch dogs

show higher prevalence. This influence is presumably due to vector exposure rates as they have a greater chance of being bitten by mosquitoes [28, 48, 49, 50]. No significant difference was found in the infection prevalence between owned or stray dogs. This is probably due to the lack of prophylaxis and public knowledge about the disease [49].

No significant difference was found in the results throughout the year. Although the period of transmission is restricted to a period of the year because of the relationship of the life of the vector with the weather, the long parasite development in dogs (7–9 months) and the fact that many of the infected dogs are asymptomatic for months or years makes it difficult to establish a curve during the year for prevalence [23] (Figure 1). We found that 64% of the *Dirofilaria immitis*-positive dogs were asymptomatic, with the risk of being silent carriers, which reinforces the importance of screening all dogs that live in Figueira da Foz that have not started any prevention strategy for *Dirofilaria immitis* yet.

The most common physical examination findings in this study were cough (38%), low body condition index (38.2%), increased capillary repletion time (66.7%), cardiac (48.8%), and pulmonary (66.6%) auscultation abnormalities, cardiac murmur (48.7%), and abdominal distention (48.1%). All these findings showed a significantly higher prevalence ($p < 0.05$). These physical examination findings are compatible with the pathophysiology of dirofilariasis disease [20, 39, 47].

The present study provides evidence that dogs in Figueira da Foz, Portugal, are at risk of becoming infected with *Dirofilaria immitis*. Given the impact on animal and human health, it is advisable that this infection should be included in the differential diagnosis of canine cardiopulmonary disease in the central area of Portugal. The epidemiological knowledge of human dirofilariasis in Portugal is still scarce. In Portugal, a case of ocular dirofilariasis in a human was reported [15], as well as two cases of *D. immitis infection* in humans as a consequence of surgical removal and histological examination of larval lung nodules [1]. Therefore, more studies are needed to understand the current situation better.

Continuing veterinary education and developing awareness will possibly avoid the spread of this parasitic disease throughout the country; for instance, by improving diagnostic and preventive measures against the vectors. This is particularly true given the possible lack of symptoms in microfilaremic animals and long incubation periods during which the animals are able to infect mosquitoes. The finding of positive microfilaremic but asymptomatic animals highlights the potential risk that exists. The presence of asymptomatic and microfilaremic animals in the present work demonstrates this potential risk.

Finally, this study is expected to give veterinary and public health authorities an increased awareness about the data concerning *Dirofilaria immitis* in the central area of Portugal, a situation that can be extended to other regions of the country where the information is also missing, thus contributing to the establishment of future control programs.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the FCT (Foundation for Science and Technology, Ministry for Science and Technology and Higher Education) with a doctoral scholarship: SFRH/BD/64692/2009.

References

1. Araújo AM. 1996. Canine and human *Dirofilaria immitis* infections in Portugal. A review. Parassitologia, 38, 366. (In the text)

2. Atkins CE. 2003. Comparison of results of three commercial heartworm antigen test kits in dogs with low heartworm burdens. Journal of the American Veterinary Medicine Association, 222, 1221–1223. [CrossRef] (In the text)

3. Bargues M. 2009. Culicid vector characterization by means of molecular haplotyping, in Proceedings of Second European Dirofilaria Days, 16–18 September. Morchón R, Simón F, Montoya JA, Genchi C, Eds. Salamanca, Spain. p. 116–123. (In the text)

4. Bowman D. 2012. Heartworms, macrocyclic lactones and the specter of resistance to prevention in the United States. Parasites & Vectors, 5, 1–10. [CrossRef] [PubMed] (In the text)

5. Cancrini G, Gabrielle S. 2009. Global warming: effects on abundance and distribution of Dirofilaria natural vectors, in Proceedings of Second European Dirofilaria Days, 16–18 September. Morchón R, Simón F, Montoya JA, Genchi C, Eds. Salamanca, Spain. p. 98–106. (In the text)

6. Cancrini G, Kramer LH. 2001. Insect vectors of *Dirofilaria spp*, in Heartworm Infection in Humans and Animals. Simón F, Genchi C, Eds. Ediciones Universidad Salamanca: Salamanca, Spain. p. 63–76. (In the text)

7. Cardoso L, Mendão C, Madeira de Carvalho L. 2012. Prevalence of *Dirofilaria immitis, Erlichia canis, Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal – a national serological study. Parasites & Vectors, 5, 1–9. [CrossRef] [PubMed] (In the text)

8. Cringoli G, Rinaldi L, Veneziano V, Capelli G. 2001. A prevalence survey and risk analysis of filariosis in dogs from the Mt. Vesuvius area of Southern Italy. Veterinary Parasitology, 102, 243–252. [CrossRef] [PubMed] (In the text)

9. Datz C. 2003. Update on canine and feline heartworm tests. Compendium, 25, 30–41. (In the text)

10. Dimri U, Singh S, Sharma M, Behera S, Kumar D, Tiwari P. 2012. Oxidant/antioxidant balance, minerals status and apoptosis in peripheral blood of dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis*. Research Veterinary Science, 93, 296–299. [CrossRef] (In the text)

11. Duran-Struuck R, Jost C, Hernandez AH. 2005. *Dirofilaria immitis* prevalence in a canine population in Samana Peninsulta (Dominican Republic). Veterinary Parasitology, 133, 323–327. [CrossRef] [PubMed] (In the text)

12. Echeveni A, Long R, Check W, Burnett C. 1999. Pulmonary Dirofilariasis. Annals of Thoracic Surgery, 67, 201–202. [CrossRef] (In the text)

13. ESCCAP. 2012. Control of vector-borne disease in dogs and cats. ESCCAP Guidelines, 2nd ed., October 2012. http://www.esccap.org/ (accessed in February 2013) (In the text)

14. Genchi C, Guerrero J, McCall J, Venco L. 2007. Epidemiology and prevention of *Dirofilaria* infection in dogs and cat, in Proceedings of First European Dirofilaria Days, 22–25 February. Genchi C, Rinaldi L, Cringoli G, Eds. Zagreb, Croatia. p. 145–162. (In the text)

15. Gouveia de Almeida A. 2011. Os mosquitos (Diptera, Culicidae) e a sua importância médica em Portugal- desafios para o século XXI. Acta Medica Portuguesa, 24, 961–974. [PubMed] (In the text)

16. Hoch H, Strickland K. 2008. Canine and feline dirofilariasis: life cycle, pathophysiology, and diagnosis. Compendium Continuing Education Veterinary, 30, 133–140. (In the text)

17. Kramer LH. 2009. Pathogenesis of *Dirofilaria* spp. Infections, in Proceedings of Second European Dirofilaria Days, 16–18 September. Morchón R, Simón F, Montoya JA, Genchi C, Eds. Salamanca, Spain. p. 116–123. (In the text)

18. Leidy J. 1856. On filarial canis cordis. Proceeding of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 8, 2. (In the text)

19. Lok J, Knight D, Nolan T, Grubbs S, Cleale R, Kathleen H. 2005. Efficacy of an injectable sustained-release formulation of moxidectin in preventing experimental heartworm infection in mongrel dogs challenged 12 months after administration. Veterinary Parasitology, 128, 129–135. [CrossRef] [PubMed] (In the text)

20. McCall JW, Genchi C, Kramer LH, Guerrero J, Venco L. 2008. Heartworm disease in animals and humans. Advances in Parasitology, 66, 195–285. (In the text)

21. McCall J. 2005. The safety-net about macrocyclic lactone heartworm preventives: a review, an update and recommendations. Veterinary Parasitology, 133, 197–206. [CrossRef] [PubMed] (In the text)

22. McCall J. 2009. Update American Heartworm Society Canine guidelines, with emphasis on the role of doxycycline in adulticidal therapy, in Proceeding of Second European Dirofilaria Days, 16–18 September. Morchón R, Simón F, Montoya JA, Genchi C, Eds. Salamanca, Spain. p. 44–166. (In the text)

23. McCall J, Genchi C, Kramer L, Guerrero J, Dzimianski M, Supakorndej P, Mansour A, McCall S, Supakorndej N, Grandi G, Carson B. 2008. Heartworm and *Wolbachia*: therapeutic implication. Veterinary Parasitology, 158, 204–214. [CrossRef] [PubMed] (In the text)

24. McCall J, Genchi C, Kramer L, Guerrero J, Dzimianski M, Mansour A, McCall S, Grandi G, Carson B. 2012. Role of doxycycline treatment in preventing heartworm disease, killing adult heartworms and blocking heartworm transmission, in Proceeding of Third European Dirofilaria Days, 21–22 June. Genchi G, Kramer L, Genchi C, Eds. Parma, Italy. p. 25. (In the text)

25. Meriem-Hind B, Mohamed M. 2009. Prevalence of canine *Dirofilaria immitis* infection in the city of Algiers, Algeria. African Journal of Agricultural Research, 4, 1097–1100. (In the text)

26. Mircean V, Dumitrache MO, Gyorke A, Pantchev N, Jodies R, Mihalca AD, Cozma V. 2012. Seroprevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis* and tick-borne infections (*Anaplasma phagocytophilum, Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Ehrlichia canis*) in dogs from Romania. Vector Borne Zoonotic Disease, 12, 595–604 (abstract). [CrossRef] (In the text)

27. Montoya JA, Mellado I, Carretón E, Cabrera-Pedrero ED, Morchón R, Simón F. 2010. Canine dirofilariosis caused by *Dirofilaria immitis* is a risk factor for the human population on the Island of Gran Canaria, Canary Islands, Spain. Parasitology Research, 107, 1265–1269. [CrossRef] [PubMed] (In the text)

28. Montoya JA, Morales M, Ferrer O, Molina JM, Corbera JA. 1998. The prevalence of *Dirofilaria immitis* in Gran Canaria, Canary Islands, Spain (1994–1996). Veterinary Parasitology, 75, 221–226. [CrossRef] [PubMed] (In the text)

29. Morchón R, Simón F, González-Miguel J, Mellado I. 2009. Relationship *Dirofilaria*/hosts: cellular and molecular mechanisms of the heartworm disease vascular pathology, in Proceedings

of Second European Dirofilaria Days, 16–18 September. Morchón R, Simón F, Montoya JA, Genchi C, Eds. Salamanca, Spain. p. 116–123. (In the text)

30. Morchón R, Carretón E, González-Miguel J, Mellado-Hernández I. 2012. Heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) and their vectors in Europe – new distribution trends. Frontiers in Physiology, 3, 196. [PubMed] (In the text)

31. Muro A, Cordero M. 2001. Clinical aspects and diagnosis of human pulmonary dirofilariosis, in Heartworm Infection in Humans and Animals. Simón F, Genchi C, Eds. Ediciones Universidad Salamanca: Salamanca, Spain. p. 191–202.

32. Muro A, Genchi C, Cordero M, Símon F. 1999. Human Dirofilariasis in the European Union. Parasitology Today, 15, 386–389. [CrossRef] (In the text)

33. Osório H, Amaro F, Zé-Zé L, Pardal S, Mendes L, Ventim R, Ramos J, Nunes S, REVIVE workgroup, Alves M. 2010. Mosquito species distribution in mainland Portugal 2005–2008. European Mosquito Bulletin, 28, 187–193. (In the text)

34. Osório H, Zé-Zé L, Alves M. 2012. Host-feeding patterns of *Culex pipiens* and other potential mosquito vectors (Diptera: Culicidae) of West Nile Virus (Flavoridae) collect in Portugal. Journal of Medical Entomology, 49, 717–721. [CrossRef] [PubMed] (In the text)

35. Otranto D, Dantas-Torres F, Brianti E, Traversa D, Petric D, Genchi C, Capelli G. 2013. Vector-borne helminths of dogs and human in Europe. Parasite & Vectors, 6, 1–14. [CrossRef] (In the text)

36. Peribánez MA, Lucientes J, Arce S, Morales M, Castillo JA, Gracia MJ. 2001. Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Acanthocheilonema dranculoides* microfilariae by staining with a comercial kit, Leucognost – SP®. Veterinary Parasitology, 102, 173–175. [CrossRef] [PubMed] (In the text)

37. Ribeiro H, Ramos H, Pires C. 1983. Contribuição para o estudo de vetores das filaríases animais em Portugal. Jornal da Sociedade de Ciências Médicas de Lisboa, 147, 143–146. (In the text)

38. Santa-Ana M, Khadem M, Capela R. 2006. Natural infection of *Culex theileri* (Diptera: Culicidae) with *Dirofilaria immitis* (Nematoda: Filarioidea) on Madeira Island Portugal. Journal of Medical Entomology, 43, 104–106 . [CrossRef] [PubMed] (In the text)

39. Schrey C, Trautvetter G. 1998. Canine and Feline heartworm disease – diagnosis and therapy. Waltham Focus, 8, 23–30. (In the text)

40. Símon F, Morchón R, González-Miguel J, Marcos-Atxutegi C, Siles-Lucas M. 2009. What is new about animal and human dirofilariasis? Trends in Parasitology, 25, 404–409. [CrossRef] [PubMed] (In the text)

41. Símon F, Gonzalez-Miguel P, Kartashev V, Morchon R, Carretón E, Montoya-Alonso J. 2012. Human dirofilariosis: what is changing?, in Proceeding of Third European Dirofilaria Days, 21–22 June. Genchi G, Kramer L, Genchi C, Eds. Parma, Italy. p. 22–23. (In the text)

42. SPSS. 2009. PASW Statistics for Windows, Version 18.0. Chicago: SPSS Inc. (In the text)

43. Song KH, Lee SE, Hayasaki M, Shiramizu K, Kim DH, Cho KW. 2003. Seroprevalence of canine dirofilariosis in South Korea. Veterinary Parasitology, 114, 231–236. [CrossRef] [PubMed] (In the text)

44. Theis J, Gilson A, Simon G, Bradshaw B, Clark D. 2001. Case report: unusual location of *Dirofilaria immitis* in a 28-year old man necessitates orchiectomy. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 64, 317–322. (In the text)

45. Traversa D, Aste G, Milillo P, Capelli G, Pampurini F, Tunesi C, Santori D, Paoletti B, Boari A. 2010. Autochthonus foci of canine and feline infections by *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in central Italy. Veterinary Parasitology, 169, 128–132. [CrossRef] [PubMed] (In the text)

46. Venco L. 2007. Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs, in Proceeding of First European Dirofilaria Days, 22–25 February. Genchi C, Rinaldi L, Cringoli G, Eds. Zagreb, Croatia. p. 117–126. (In the text)

47. Venco L. 2009. New insight into heartworm disease management: from old legends to the present looking to the future, in Proceeding of Second European Dirofilaria Days, 16–18 September. Morchón R, Simón F, Montoya JA, Genchi C, Eds. Salamanca, Spain. p. 107–115. (In the text)

48. Yaman M, Guzel M, Koltas IS, Demirkakik M, Aktas H. 2009. Prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs, from Hatay province, Turkey. Journal of Helminthology, 83, 255–260. [CrossRef] [PubMed] (In the text)

49. Yildirim A, Ica A, Atalay O, Duzlu O, Inci A. 2007. Prevalence and epidemiological aspects of *Dirofilaria immitis* in dogs from Kayseri Province, Turkey. Research in Veterinary Science, 82, 358–363. [CrossRef] [PubMed] (In the text)

50. Yuasa Y, Hsu TH, Chou CC, Huang CC, Huang WC, Chang CC. 2012. The comparison of spatial variation and risk factors between mosquito-borne and tick-borne diseases: seroepidemiology of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma spp.* and *Dirofilaria immitis* in dogs. Comparative Imnunology, Microbiology and Infectious Disease, 35, 599–606. [CrossRef] (In the text)

Cite this article as: Vieira AL, Vieira MJ, Oliveira JM, Simões AR, Diez-Banõs P & Gestal J: Prevalence of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs of central Portugal. Parasite, 2014, **21**, 5.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Vieira, A.L., Vieira, M.J., Oliveira, J.M, Simões, A.R., Diez-Baños, P., Gestal, J. (2014). Seroprevalence of heartworm (*Dirofilaria immitis)* disease in canine and feline population central Portugal. *Acta Parasitológica Portuguesa*. 20 (1/2): 145.

Acta Parasitológica Portuguesa 2014, **20** *(1/2)* 145

CO-17

SEROPREVALENCE OF HEARTWORM (*Dirofilaria immitis*) DISEASE IN CANINE AND FELINE POPULATION CENTRAL PORTUGAL

Ana Luísa N.M.P. Vieira[3,4,5]*, Maria João N. M. P. Vieira[4,5], João Manuel P. Oliveira[3,4,6], Ana Rita M. Simões[3], Pablo Diez-Baños[2], Juan Gestal[1]

[1]Facultad de Medicina y Odontología, Universidade de Santiago Compostela. España.
[2]Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 – Lugo. España
[3]Clinicão – Hospital Veterinário OneVet Group, 3080- Figueira da Foz, Portugal
[4]EUVG –Escola Universitária Vasco da Gama, 3000- Coimbra, Portugal.
[5]CECAV - Centro de Ciência Animal e Veterinária, UTAD, Vila Real, Portugal
[6]Unidade I+D Cardiovascular do Porto/Departamento de Fisiologia e Cirurgia Cardiotorácica da FMUP, Porto, Portugal

Introdution: Heartworm infection is a parasitic disease caused by the nematode species *Dirofilaria immitis*[1,2]. The canine was the definitive host but feline could be infected too[3]. Because of the public health concerning, it's important the knowing of their prevalence and distribution in Portugal[3]. The aim of the present study was to determine the prevalence and risk factors concerning *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) infection in dogs and cats living in Figueira da Foz, located in the central region of Portugal.

Material and Methods: In the period between November 2009 and July 2012, 304 blood samples of dogs and 100 blood samples of cats were obtained from animals over 1 year of age, living in Figueira da Foz, with no previous history of heartworm prevention or diagnosis. The dog blood sample was analyzed using several laboratory techniques (direct microscopic evaluation of a fresh blood sample, microhematocrit technique, modified Knott technique, ELISA antigen detection test – Idexx Snap®). In those samples in wich microfilaremia was detected, a hystochemical technique using acid phosphatase staining was applied. The cat blood sample was analyzed using several laboratory techniques (direct microscopic evaluation of a fresh blood sample, modified Knott technique, ELISA antigen detection test – Idexx Snap® Feline Triple® Test, and antibody anti-*Dirofilaria immitis* detection test – Heska Solo Step FH®).

Results: A canine prevalence of 27,3% was found (83/304). We also found that 74,7% of all the positive cases (62 out of 83) were microfilaremic and 25,3% were occult infection (21 out of 83). Identification of the microfilariae as *Dirofilaria immitis*, in microfilaremic infection, was achieved by hystochemical exam using acid phosphatase; wich identified this species in 96,4% of samples. The following risk factors were determined: agebetween 4 and 9 years old, medium breed dogs, dogs living un rural environment, dogs living outdoors, watchdogs and hunt dogs. A feline prevalence of 16% was found (16/100). A total of 16 cats were positive in antibody anti-*Dirofilaria immitis* detection test and two of these cats were positive in antigen detection test. No microfilarias were identified in the direct blood sample and modified Knott technique. This study also pointed the fact that the cats not neutered had higher risk of infection.

Conclusion: The results of this study demonstrated, for the first time, the presence of high prevalence of canine and feline heartworm disease in Figueira da Foz, Central Portugal. This finding emphasizes the importance of systematic screening for this disease, as well as the need to prevent it in every dogs and cats living in this geographic area to minimize the risk for public health.

References:

1. McCall J, Genchi C, Kramer L, Guerrero J, Venco L. Heartworm disease in animals and humans. Advances in Parasitology. 2008; 66:193-285.
2. Manfredi M, Cerbo A, Genchi M. Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats. Proceedings of First European *Dirofilaria* Days. 2007 Fevereiro 22-25; Zagreb, Croatia.
3. Montoya-Alonso J, Carretón E. Dirofilariosis – Pautas de Manejo Clinico. Multimédicas Ediciones Veterinarias. 2012. Barcelona, Spain

This Work was suported by FCT (Fundation for Science and Technology, Ministry for Science and Technology and Higher Education) scope of a doctoral scholarship SFRH/BD/64692/2009

II.2 . Comunicações Internacionais

<u>Vieira, A.L.</u>, Vieira, M.J., Oliveira, J.M, Simões, A.R., Diez-Baños, P., Gestal, J. (2014). Seroprevalence of feline heartworm (*Dirofilaria immitis)* disease in cats of central Portugal. *Fourth European Dirofilaria and Angiostrongylus Days (FEDAD) –ESDA*. Budapeste. Hungria. (Comunicação oral).

FRIDAY, 4 JULY, 2014 · 12:00-12:15

SEROPREVALENCE OF FELINE HEARTWORM (DIROFILARIA IMMITIS) DISEASE IN CATS OF CENTRAL PORTUGAL

<u>Ana Luisa Vieira</u>[3,4,5], Maria João Vieira[4,5], João Manuel Oliveira[3,4,5], Ana Rita Simões[3], Pablo Diez- Baños[2], Juan Gestal[1]

[1]- Catedrático Jefe del Servicio de Medicina Preventiva y Salud Pública del Hospital Clínico Universitario. Facultad de Medicina y Odontología, Universidade de Santiago Compostela. España. Coordinador del Grupo de Santiago de Compostela del Centro de Investigación Biológica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), y del grupo de Epidemiología del Instituto de Investigación Sanitaria (IDIS) de Santiago de Compostela, Espanã.

[2]- Animal Pathology Department. Galician Animal Health Group (Invesaga). Veterinary Faculty of Santiago de Compostela University. Lugo. Spain

[3]- Clinicão – Hospital Veterinário, Figueira da Foz, Portugal

[4]- EUVG –Escola Universitária Vasco da Gama, Coimbra, Portugal.

[5]- CECAV - Centro de Ciência Animal e Veterinária, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

Introduction Heartworm infection (Dirofilaria immitis) is now recognized as a potential cause of severe disease in the cat and can be clinical and diagnostic challenge to practicing veterinarians. It is generally believed that in areas where canine heartworm disease is endemic, cats are also at risk of infection, but a much lower rate. Vieira et al (2014) showed a 27.3% of prevalence of Dirofilaria sp. in dogs in the center of Portugal, so it's expected that cats to be at risk. **Objective** The aim of the present study was to determine the prevalence and risk factors concerning D. immitis (Leidy, 1856) infection in cats living in Figueira da Foz, located in the central region of Portugal.

Methods In the period between March 2011 and July 2012, 100 blood samples were obtained from cats over 1 year of age, living in Figueira da Foz, with no previous history of heartworm prevention or diagnosis. Every blood sample was analyzed using several laboratory techniques (direct microscopic evaluation of a fresh blood sample, modified Knott technique, ELISA antigen detection test – Idexx Snap® Feline Triple® Test, and antibody detection test – Heska Solo Step FH®). A thoracic radiography was taken if one of the serological blood exam tested positive. An echocardiography was performed whenever possible in seropositive cats.

Results A total prevalence of 16% ($CI_{95\%}$: 9.4-24.7%) was found. A total of 16 cats were positive in antibody detection test and two of these cats were positive in antigen detection test. No microfilariae were identified in the direct blood sample and modified Knott technique. Using the Brawner et al (2000), Radiography Heartworm Score Criteria, 37.5% didn't had radiographic change consistent with Feline Heartworm Disease (FHD) (score 0), 25% had radiographic change consistent but not specific for FHD (score 0,5), 31.25% had radiographic change mildly indicative of FHD (score 1) and 6.25% had radiographic change moderately indicative of FHD (score 2). The echocardiography was performed in 8 cats and the parasite was identified in 4 cats.

This study also pointed the fact that the cats not neutered had higher risk of infection.

Discussion/Conclusion The results of this study demonstrated, for the first time, the presence of heartworm disease in cats in the center of Portugal. This finding emphasizes the importance of systematic screening for this disease, as well as the need to prevent it in every cats living in this geographic area.

This Work was supported by FCT (Fundation for Science and Technology, Ministry for Science and Technology and Higher Education) scope of a doctoral scholarship SFRH/BD/64692/2009.

60

Vieira, A.L., Vieira, M.J., Oliveira, J.M, Simões, A.R., , Otero, J. G. (2012). Seroprevalency of heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) in the canine population of Figueira da Foz, Portugal. *Third European Dirofilaria Days – EDIS*. Parma, Itália. ISBN-13:978-88-903582-6-5. (Comunicação oral).

EDiS - European Dirofilaria Society

Third European *Dirofilaria* Days
Parma, June 21-22, 2012

SEROPREVALENCY OF HEARTWORM DISEASE (*DIROFILARIA IMMITIS*) IN THE CANINE POPULATION OF FIGUEIRA DA FOZ, PORTUGAL

Nobre de Matos Pereira Vieira A.L.[2,3], Vieira M.J.[2,3], Oliveira J.[2,3], Simões A.R.[2], Otero J.G.[1]

[1]Faculty of Medicine and Odontology, Santiago de Compostela University, Spain;[2]Clinicão Veterinary Hospital, Figueira da Foz, Portugal; [3]EUVG – Vasco da Gama University School of Veterinary Medicine, Coimbra, Portugal.

Canine heartworm infection is a parasitary disease caused by the nematode species *Dirofilaria immitis*[1,2]. Its presence has been described in Portugal in 1991, but no other studies were published concerning its actual prevalence and distribution[1,3].

The main goal of the present study was to determine the prevalence and risk factors concerning heartworm disease in dogs from Figueira da Foz, located in central Portugal. In the period between November 2009 and January 2011, 304 blood samples were obtained from dogs over 1 year of age, living in Figueira da Foz, with no previous history of heartworm prevention or diagnosis. A complete record was kept for each dog, including identification (age, sex, breed), clinical history and demographic data. Every blood sample was analyzed using varied laboratory techniques (direct microscopic evaluation of a fresh blood sample, microhematocrit technique, modified Knott technique, ELISA antigen detection test – Idexx Snapp®). In those samples in which microfilaremia was detected, a hystochemical technique using acid phosphatase staining was applied.

A total prevalence of 27,3% ($CI_{95\%}$ 22,4-32,7) was found. We also found that 74,7% of all the positive cases (62 out of 83) were microfilaremic, and 25,3% were occult infections (21 out of 83). Identification of the microfilariae as *Dirofilaria immitis*, in microfilaremic infection, was achieved by hystochemical exam using acid phosphatase, which identified this species in 96,4% of the samples.
The following risk factors were determined: age between 4 and 9 years of age (37,8%) medium breed dogs (34,7%), dogs living in rural environment (38%), dogs living outdoors (37,7%), watchdogs (52,2%), hunt dogs (36,2%) ($p<.05$).

The logistic regression (STEPWISE method) allowed to identify, in multivariate model, the following risk factor for the presence of heartworm disease: age (OR=1.12; $CI_{95\%}$: 1,02-1,24; $p < .05$), dogs living in rural environment (OR = 4.81 $CI_{95\%}$: 2.02 – 11.46; $p < .001$),Medium breed dogs (OR = 2.44; $CI_{95\%}$: 1.03 – 5.81; $p < .05$) or large breed dogs) (OR = 3.11; $CI_{95\%}$: 1.16 – 8.36; $p < .05$) and living outdoors (OR = 10.15; $CI_{95\%}$: 3.89 – 26.51; $p < .001$).

Concerning clinical signs, it's of particular importance that 50% of the dogs were asymptomatic. The most common physical examination findings were low body condition index (38,2%), cardiac auscultation abnormalities (48,8%), cardiac murmur (48,7%), abdominal distention/ascites (48,1%). All of these findings showed a significantly higher prevalence ($p<0,05$).

The results of this study show, for the first time, the high prevalence of heartworm disease in the city of Figueira da Foz, Portugal. This finding emphasizes the importance of systematic screening for this disease, as well as the need to prevent it in every dog living in this geographic area.

This Work was suported by FCT (Fundation for Science and Technology, Ministry for Science and Technology and Higher Education) scope of a doctoral scholarship SFRH/BD/64692/2009

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR

UNIÃO EUROPEIA
Fundo Social Europeu
POPH POTENCIAL HUMANO

TEDD 2012
ISBN-13: 978-88-903582-6-5
Edited by Grandi G., Kramer L., Genchi C.

II.3. Comunicações Nacionais

<u>Vieira, A.L.</u>, Vieira, M.J., Oliveira, J.M, Simões, A.R., Diez-Baños, P., Gestal, J. (2014). Seroprevalência de Dirofilariose (*Dirofilaria immitis)* na população canina e felina da região centro de Portugal. *XVII Congresso Português de Parasitologia*. Coimbra, Portugal. (Comunicação oral)

144 *Acta Parasitológica Portuguesa 2014,* **20** *(1/2)*

CO-17

SEROPREVALÊNCIA DE DIROFILARIOSE (*Dirofilaria immitis*) NA POPULAÇÃO CANINA E FELINA DA REGIÃO CENTRO DE PORTUGAL

Ana Luísa N.M.P. Vieira[3,4,5]*, Maria João N. M. P. Vieira[4,5], João Manuel P. Oliveira[3,4,6], Ana Rita M. Simões[3], Pablo Diez-Baños[2], Juan Gestal[1]

[1]Facultad de Medicina y Odontología, Universidade de Santiago Compostela. España.
[2]Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 – Lugo. España
[3]Clinicão – Hospital Veterinário OneVet Group, 3080- Figueira da Foz, Portugal
[4]EUVG –Escola Universitária Vasco da Gama, 3000- Coimbra, Portugal.
[5]CECAV - Centro de Ciência Animal e Veterinária, UTAD, Vila Real, Portugal
[6]Unidade I+D Cardiovascular do Porto/Departamento de Fisiologia e Cirurgia Cardiotorácica da FMUP, Porto, Portugal

Introdução: A Dirofilariose é uma doença parasitária causada por um nemátode da espécie *Dirofilaria immitis* [1,2]. Os canídeos são os principais hospedeiros definitivos mas os felinos também podem ser infectados[3]. Devido ao risco para a saúde pública é de extrema importância ter conhecimento acerca da prevalência e distribuição da doença em Portugal[3]. O objectivo do presente estudo foi determinar a prevalência e factores de risco da infecção de *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) em cães e gatos do concelho da Figueira da Foz, região Centro de Portugal.

Material e Métodos: No período de Novembro de 2009 a Julho de 2012, foram recolhidas amostras de sangue de 304 cães e 100 gatos, obtidas de animais com mais de 1 ano de idade, que habitavam na Figueira da Foz, e sem história prévia de prevenção ou diagnóstico de dirofilariose. As amostras de sangue caninas foram analisadas mediante diferente técnicas laboratoriais (exame microscópio directo de sangue fresco, técnica de microhematócrito, técnica de Knott modificada, teste de pesquisa de antigénio *Dirofilaria immitis* ELISA Idexx Snap®). Nas amostras em que foram detectadas microfilárias, foi realizada a técnica de coloração histoquímica por fosfatase ácida. As amostras de sangue felinas foram analisadas mediante diferentes técnicas laboratoriais (exame microscópio directo de sangue fresco, técnica de Knott modificada, teste de pesquisa de antigénio *Dirofilaria immitis* – ELISA Idexx Snap® Feline Triple® Test e teste de pesquisa de anticorpos anti-*Dirofilaria immitis* – Heska Solo Step FH®).

Resultados: Constatou-se uma prevalência de *Dirofilaria immitis* em 27.3% dos cães testados (83/304), sendo 74,7% (62/83) das infecções microfilarémicas e 25,3% (21/83) infecções ocultas. A identificação das microfilárias como pertencentes à especie *Dirofilaria immitis*, nas infecções microfilarémicas, foi realizada através da técnica de coloração histoquímica por fosfatase ácida, tendo sido identificada em 96,4% das amostras. Foram determinados os seguintes factores de risco: cães entre os 4 e 9 anos, cães de raça média, cães que vivam em zonas rurais, cães que habitem no exterior, cães de guarda, e cães de caça. Constatou-se também uma prevalência de *Dirofilaria immitis* em 16% dos gatos testados (16/100). Os 16 gatos obtiveram um resultado positivo no teste de pesquisa de anticorpos anti - *Dirofilaria immitis* e dois deste gatos obtiveram um resultado positivo no teste de pesquisa de antigénio. Não foram identificadas microfilárias pelo exame microscópio directo de sangue fresco e pela técnica de Knott modificada. O estudo também determinou que os gatos não esterilizados tinham maior risco de infecção.

Conclusão: Os resultados deste estudo, demonstraram pela primeira vez, a prevalência elevada de dirofilariose canina e felina, na Figueira da Foz, Região Centro de Portugal, Estes resultados reinforçam a importância de um rastreio sistemático da doença, assim como a necessidade de prevenção em todos os cães e gatos que vivam nesta área geográfica para minimizar o risco para a saúde pública.

Referências Bibliográficas:

1. McCall J, Genchi C, Kramer L, Guerrero J, Venco L. Heartworm disease in animals and humans. Advances in Parasitology. 2008; 66:193-285.
2. Manfredi M, Cerbo A., Genchi M. Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats. Proceedings of First European *Dirofilaria* Days. 2007 Fevereiro 22-25; Zagreb, Croatia.
3. Montoya-Alonso J, Carretón E. Dirofilariosis – Pautas de Manejo Clinico. Multimédicas Ediciones Veterinarias. 2012. Barcelona, Spain

This Work was suported by FCT (Fundation for Science and Technology, Ministry for Science and Technology and Higher Education) scope of a doctoral scholarship SFRH/BD/64692/2009

Vieira, A.L., Vieira, M.J., Oliveira, J.M, Simões, A.R., Gestal, J. (2012). Seroprevalência de dirofilariose (*Dirofilaria immitis*) na população canina do concelho da Figueira da Foz, Portugal. *VIII Congresso Hospital Veterinário Montenegro*. Santa Maria da Feira, Portugal. (Comunicação oral).

VIII CONGRESSO HOSPITAL VETERINÁRIO MONTENEGRO
11 E 12 DE FEVEREIRO 2012 – EUROPARQUE

SEROPREVALÊNCIA DE DIROFILARIOSE (DIROFILARIA IMMITIS) NA POPULAÇÃO CANINA NO CONCELHO DA FIGUEIRA DA FOZ, PORTUGAL

Vieira, A.L., Vieira, M.J., Oliveira, J.M, Simões, A.R., Gestal, J.

A Dirofilariose é uma doença parasitária causada por um nemátode da espécie Dirofilaria immitis. A Dirofilaria immitis é transmitida por vectores (mosquitos) dos géneros: Culex, Aedes, Anopheles, Mansonia. Os canídeos são os principais hospedeiros, mas, também estão descritos como hospedeiros definitivos: felídeos, mustelídeos e primatas (incluindo humanos).[1] As dirofilárias adultas localizam-se nas artérias pulmonares, podendo também afectar o coração. As microfilárias circulam no sangue periférico.[2]

O objectivo do presente estudo foi determinar a prevalência e factores de risco da infecção de Dirofilaria immitis em cães do concelho da Figueira da Foz, Portugal. Durante o período compreendido entre Novembro de 2009 e Janeiro de 2011, foram recolhidas 304 amostras de sangue em cães com mais de 1 ano de idade, sem história prévia de prevenção ou diagnóstico de dirofilariose e que habitavam no concelho da Figueira da Foz (Portugal).

As amostras de sangue foram analisadas mediante diferentes técnicas laboratoriais (exame microscópico directo de sangue fresco, técnica de microhematócrito, técnica de Knott modificada, teste de pesquisa de antigénio ELISA Snapp® Idexx – realizados em todas as amostras e técnica de coloração histoquímica por fosfatase ácida – realizado nas amostras com microfilarémia).

Constatou-se uma prevalência de Dirofilaria immitis de 27,3% (83/304) sendo 73,5% (61/83) das infecções microfilarémicas e 26,5% (22/304) infecções ocultas. Foram determiandos os seguintas factores de risco: cães entre os 4 e 9 anos de idade, cães de raça média, cães que vivam em zonas rurais, cães que habitem no exterior, cães de guarda e cães com condição corporal baixa ($P<0,05$).

Os resultados deste estudo sugerem que a dirofilariose é endémica no concelho da Figueira da Foz (Portugal), sendo por isso aconselhável fazer a prevenção a todos os cães que vivam neste concelho.

Bibliografia:

1 – Manfredi M, Cerbo A., Genchi M. Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats. Proceedings of First European Dirofilaria Days. 2007 Fevereiro 22-25; Zagreb, Croatia.

2 – McCall J., Genchi C., Krames Laura, Guerrero J., Venco L. Heartworm disease in animals and humans. Advances in Parasitology. 2008; 66:193-285.

II.4. Comunicação em Poster

Vieira, A.L., Pinto, I., Oliveira, J.M, Simões, A.R., Carrilho, J., Pereira, C., Olivério, P, Vieira, M.J.(2012). Extracção de *Dirofilaria immitis* intracardíaca por venotomia da jugular. *VIII Congresso Hospital Veterinário Montenegro*. Santa Maria da Feira, Portugal. (Poster).

Extracção de *Dirofilaria immitis* Intracardíaca por Venotomia da Jugular

euvg

Vieira A[1,2], Pinto I[1], Oliveira J[1,2], Simões R[1], Carrilho J[1], Pereira C[3], Olivério P[2] e Vieira MJ[1,2]

1 – Clinicão – Hospital Veterinário – Figueira da Foz; 2 – Escola Universitária Vasco da Gama, 3 – VetCoimbra - Coimbra

Introdução

A Dirofilariose Canina é uma doença parasitária cardiopulmonar causada pelo nemátode *Dirofilaria immitis* e transmitido por várias espécies de mosquitos. A sua prevalência varia consoante a zona do país. A variedade de apresentação clínica, que vai desde o animal assintomático, à presença de intolerância ao exercício, perda de peso, dispneia, tosse, hemoptise, sinais de insuficiência cardíaca direita e síndrome da veia cava tornam esta patologia uma causa frequente de motivo de consulta.

O tratamento médico está indicado para os casos assintomáticos ou com sintomatologia moderada, e o tratamento cirúrgico está indicado para os casos severos, nomeadamente na síndrome da veia cava. Nestes casos, a venotomia jugular direita, a toracotomia com atriotomia direita e a toracotomia esquerda com arteriotomia pulmonar são as possíveis abordagens.

Caso Clínico

Paciente: Cão, Macho, Raça Indeterminada, 12 anos de idade e 8,250Kg

História Clínica: Prostração, anorexia, perda de peso, intolerância ao exercício, síncope e tosse (com agravamento nas últimas 48 horas)

Exame Físico: Condição corporal baixa; desdobramento de S1 à auscultação (mais audível à direita)

Fig. 1– Radiografia torácica (projecção ventrodorsal)

Fig. 2 – Radiografia torácica (projecção lateral).

Exames Complementares

Hemograma: Plaquetas – 111 x 10^3/µl (n: 200-500 x 10^3/µl)

Análises Bioquímicas: ALT – 200 U/L (n: 10-109 U/L)

Teste de Imunofluorescência – Leishmania: Negativo

Teste ELISA Snapp 4 Dx® de Dirofilariose: Positivo (Fig. 3)

Teste da gota de sangue fresca e Teste Knott modificado: Ausência de microfilárias

Radiografia Torácica: Cardiomegália direita, dilatação do tronco pulmonar e artérias pulmonares (Figura 1 e 2)

Ecocardiografia: Estrutura hiperecogénica ao nível do coração direito compatível com um aglomerado de *Dirofilaria immitis* adultas. Esta estrutura encontrava-se móvel, associado ao movimento dos folhetos tricúspides. Na sua periferia identificaram-se diversas estruturas compatíveis com adultos de Dirofilária (estruturas lineares com dupla linha ecogénica) (Fig. 4). Confirmou-se igualmente a dilatação do tronco pulmonar e das câmaras cardíacas direitas, assim como hipertrofia da parede ventricular direita e do septo interventricular.

Electrocardiograma: Sem alterações

Urianálise: Densidade urinária normal; hemoglobinúria e proteinúria (++)

Fig. 3 – Teste ELISA Snapp 4Dx®

Fig. 4 - Imagem ecocardiográfica pré cirúrgica

Fig. 5 - Imagem ecocardiográfica após a cirurgia.

Tratamento

Dada a severidade da infecção, o quadro clínico e a grande quantidade de dirofilárias presentes no átrio direito, optou-se pelo tratamento cirúrgico:

Venotomia da jugular direita

Terapêutica pré cirúrgica:
Heparina (100UI/Kg, SC, SID) e Metilprednisolona (1mg/Kg, IV, BID).

Anestesia:

Pré-Medicação: Tramadol (5mg/Kg IV) e diazepam (0,2 mg/Kg IV)

Indução: Propofol IV (máximo 4 mg/Kg)

Manutenção: Isoflurano

Procedimento Cirúrgico com Monitorização Ecográfica e Electrocardiográfica

Assépsia da região cervical direita

Incisão da pele na zona lateral do pescoço, sobre a veia jugular

Dissecção do tecido subcutâneo e isolamento da veia jugular direita (Figura 6)

Após colocação de duas pinças atraumáticas realizou-se a incisão da jugular (Figura 7)

Introduziu-se uma pinça crocodilo (24 cm) até ao átrio direito de modo a remover as *Dirofilaria immitis* (Figura 8 e 9)

No final do procedimento, laqueou-se a veia jugular com duas ligaduras simples e uma de transfixação. Encerramento do tecido subcutâneo e da pele de forma rotineira

Resultados e Conclusão

Retiraram-se no total cinco parasitas adultos e houve uma marcada diminuição do volume de parasitas no átrio direito (Figura 5). A recuperação pós-cirúrgica ocorreu sem incidentes e em resultado da melhoria clínica, o animal teve alta ao fim de três dias com Prednisolona (0,5mg/kg BID), Ácido acetilsalicílico (0,5mg/kg BID), Sucralfato (1g/kg BID) e Doxiciclina (10mg/kg SID). Ao fim de três dias desenvolveu um quadro de insuficiência respiratória aguda acompanhada de cianose, que não respondeu às medidas terapêuticas de urgência acabando por entrar em paragem cardiorespiratória passado uma hora. Esta técnica está associada a um aumento da sobrevivência em animais com infecções severas, sendo o alívio sintomático inicial frequente. No entanto, é necessário o tratamento adulticida pós cirúrgico para eliminação das dirofilárias remanescentes. O risco de tromboembolismo pulmonar secundário à presença de dirofilárias permanece até ao fim do tratamento e poderá ter determinado o desfecho deste caso.

Bibliografia

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA