



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
INSTITUTO DA SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL**

INGRID MAELY PATRICIO PEGADO

PRISCILA AMORIM ARAUJO ANDRADE

**INCIDÊNCIA DE *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) POR MEIO DOS MÉTODOS DE
KNOTT MODIFICADO, GOTA ESPESSA E IMUNOCROMATOGRÁFIA EM CÃES
ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO PROF. MÁRIO DIAS TEIXEIRA
(HOVET-UFRA).**

**BELÉM-PA
2019**

**INGRID MAELY PATRICIO PEGADO
PRISCILA AMORIM ARAUJO ANDRADE**

**INCIDÊNCIA DE *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) POR MEIO DOS MÉTODOS DE
KNOTT MODIFICADO, GOTA ESPESSA E IMUNOCROMATOGRÁFIA EM CÃES
ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO PROF. MÁRIO DIAS TEIXEIRA
(HOVET-UFRA).**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Medicina Veterinária e ao Instituto de Saúde e Produção Animal (ISPA) da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) como requisito para obtenção dos títulos de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof^a. Titular Nazaré Fonseca de Souza

**BELÉM - PA
2019**

Pegado, Ingrid Maely Patricio

Incidência de *Dirofilaria immitis* (LEIDY,1856) por meio dos Métodos de Knott Modificado, Gota Espessa e Imunocromatografia em cães atendidos no Hospital Veterinário Prof. Mário Dias Teixeira (HOVET-UFRA) / Ingrid Maely Patricio Pegado, Priscila Amorim Araújo Andrade. - Belém, 2019.

42 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) –
Universidade Federal Rural da Amazônia, 2019.
Orientadora: Dra. Nazaré Fonseca de Souza

1. Dirofilariose canina 2. *Dirofilaria immitis* 3. Parasitológico 4.
Imunocromatográfico I. Título. II. Andrade, Priscila Amorim Araújo. III. Souza,
Nazaré Fonseca de

CDD – 636.08969652

**INGRID MAELY PATRICIO PEGADO
PRISCILA AMORIM ARAUJO ANDRADE**

**INCIDÊNCIA DE *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) POR MEIO DOS MÉTODOS DE
KNOTT MODIFICADO, GOTA ESPESSE E IMUNOCROMATOLOGRAFIA EM CÃES
ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO PROF. MÁRIO DIAS TEIXEIRA
(HOVET-UFRA)**

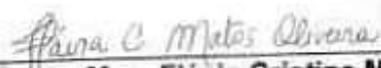
Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Medicina Veterinária e ao Instituto de Saúde e Produção Animal (ISPA) da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) como requisito para obtenção dos títulos de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof^o. Titular Nazaré Fonseca de Souza

Data da Aprovação



Prof^o. Titular Nazaré Fonseca de Souza
Orientador/Presidente da Banca Examinadora
Instituto da Saúde e Produção Animal
Universidade Federal Rural da Amazônia



Msc. Flávia Cristina Matos Oliveira
Membro Titular da Banca Examinadora
Biomédica Mestre em Biologia de Agente Infecciosos e Parasitários
Universidade Federal Rural da Amazônia



Msc. Eliane de Nazaré Lima e Andrade
Membro Titular da Banca Examinadora
Médica Veterinária Mestre em Saúde e Produção Animal
Universidade Federal Rural da Amazônia

**BELÉM - PA
2019**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por ter me concedido o dom da vida e permitido que eu chegasse até aqui.

Ao meu pai e minha mãe, Aldo e Lara, que nunca mediram esforços em toda minha caminhada profissional e pessoal, para que eu pudesse me tornar a pessoa que sou hoje, amo vocês mais que tudo nessa vida. Tudo é por vocês e para vocês.

Ao meu irmão, Lucas, que sempre esteve ao meu lado e sempre me apoiou nos momentos bons e mais ainda nos ruins. Obrigada mano. Você foi fundamental. Obrigada por ter me dado um sobrinho tão lindo e inteligente como o Vicente. Amo vocês.

À pessoa que não é irmã de sangue, mas que a vida me presenteou como se fosse, em quem sei que posso contar, obrigado Maria, por tudo que fez por mim em todos esses anos. Sem tua ajuda não sei se conseguiria chegar até aqui.

À minha falecida Bisavó, Maria Raimunda, que lutou por toda família e ajudou a criar todas as netas. À minha avó Iracema, que me ajudou muito em toda minha vida, não medindo esforços. Às minhas tias, Raquel, Claudia e Patrícia, não tenho palavras o suficiente para descrever o quanto sou agradecida a vocês, por sempre estarem ali quando mais precisei. Muito obrigada a todas. Amo muito vocês.

Ao meu querido namorado e melhor amigo, Bruno, obrigado por todo carinho, paciência e aprendizado durante esses anos. Sou muito grata por tudo que fizeste por mim até aqui.

Aos meus amigos da vida, que me ajudaram, apoiaram e incentivaram durante todos esses anos de amizade, desde a sexta série, Marcelo, Kamilla, Andrew, Beatriz, Bruno e Sereja. Vocês não imaginam o quanto foram importantes nessa caminhada, muito obrigado por todos os momentos vividos até aqui.

Aos meus amigos, que a Ufra me presenteou, Mailsa, Jessica Sábio, Nayane, Sayuri, Átila, Camila, Kelly, Keila, Cássia, Ronaldo, Jessica Andrade. Obrigado por toda a ajuda em trabalhos, estudos e provas.

A minha dupla de TCC, Priscila, obrigada por todo apoio, incentivo, ajuda, paciência e conselhos. Não sabes o quão importante você foi nessa fase final da graduação. Fico muito agradecida, de coração. Tenho certeza que nossa amizade vai muito além.

À toda equipe do Laboratório de análises clínicas e residentes do HOVET-UFRA, em especial, aos residentes Átila, Jean, Victor, Raphael. Por terem ajudado

nesta pesquisa. À equipe de Infectologia, Jaqueline, Keila, Thamillys, Camila, Barbara, por todo auxílio e ensinamentos durante esses meses de pesquisa. Muito obrigada.

A minha orientadora, Professora Doutora Nazaré Fonseca de Souza, obrigado por toda confiança, paciência e conhecimento compartilhado durante a pesquisa.

Ingrid Pegado

Agradeço primeiramente a Deus que me deu saúde e forças para superar todos os momentos difíceis a que eu me deparei ao longo da minha graduação.

A minha tão amada Mãe que, com muito carinho, dedicação e eterno apoio, não mediu esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

As minhas irmãs Patrícia e Thais e meu irmão Ivan que me ajudaram sempre que precisei me incentivando e me dando forças para continuar e nunca desistir.

Agradeço imensamente ao meu esposo Anderlon que sempre me apoiou e nunca me desamparou mesmo nos momentos difíceis. Serei muito grata a você por nunca desistir de mim. Obrigada por tudo.

Dedico essa minha conquista ao meu filho Adrian, que me fez ver que lutar, conquistar e vencer sempre é possível.

Agradeço aos Residentes do HOVET, em especial ao Átila, Jean, Victor Mileo, Raphael Conde, Natacha, Jacqueline, Thamillys, Keila, Camila, Bárbara por todo apoio, ajuda, carinho e amizade.

A toda equipe do Laboratório de Análises Clínicas do Hovet que direta ou indiretamente nos ajudaram nessa pesquisa.

As minhas amigas de graduação Louise, Thais, Cryslène, Isabela, Mayara por toda força e incentivo, por sempre estarem presentes nos momentos bons e, principalmente, por permanecerem nos momentos difíceis. Serei eternamente grata.

A minha maior surpresa e melhor dupla de TCC que poderia ter: Maely por toda paciência, compreensão e amizade nessa caminhada. Você foi uma pessoa que me conquistou e tenho certeza que nossa amizade vai muito além. Obrigada por fazer parte da minha vida, por ficarmos horas debatendo sobre o trabalho, mas também por uma dar força pra outra nos momentos difíceis da vida.

À minha orientadora e professora Nazaré Fonseca de Souza, pelo apoio e dedicação.

A todos os Professores que de alguma forma, durante todo o curso se disponibilizaram para me ajudar em todos os aspectos.

E por fim, agradeço aos meus queridos animais, os maiores incentivos na escolha desta bela profissão, em especial aos animais que acompanhei durante essa pesquisa, vocês foram fundamentais.

Priscila Andrade

RESUMO

A *Dirofilaria immitis* é o agente etiológico da dirofilariose, uma doença potencialmente fatal, transmitida por mosquitos, que acomete diversas espécies de mamíferos, incluindo cães, felinos e o homem. Sendo o cão o hospedeiro definitivo. É considerada uma doença zoonótica e tem um papel importante na saúde pública. O objetivo desse trabalho foi determinar a incidência de *Dirofilaria immitis* em cães atendidos no Hospital Veterinário Mario Dias Teixeira (HOVET), por meio da submissão de amostra de sangue total e soro sanguíneo à técnica parasitológica da gota espessa, knott modificado e imunocromatográfico (Alere Dirofilariose Ag Test Kit). Foram analisadas 50 amostras, onde se obteve uma incidência total de 12% de positividade, evidenciando, portanto, a ocorrência de uma área endêmica.

PALAVRAS-CHAVE: *Dirofilaria Immitis*, parasitológico, imunocromatográfico, cães, Hovet.

ABSTRACT

Canine Heartworm Disease is a potentially fatal disease that has the parasitic nematode *Dirofilaria immitis* as the etiological agent, It is transmitted by mosquitoes, which affects several species of mammals, including dogs, cats and humans. The dog is the definitive host. It is considered a zoonotic disease and has an important role in public health. The objective of this study was to determine the incidence of *Dirofilaria immitis* in dogs attended at the Veterinary Hospital Mario Dias Teixeira (HOVET), by means of the submission of whole blood and serum samples to the parasitological techniques of thickened, Knott modified and immunochromatographic (Alere Dirofilariose Ag Test Kit). Fifty samples were analyzed, in which total incidence of 12% of positivity was obtained, evidencing the occurrence of an endemic area.

KEY WORDS: *Dirofilaria immitis*, parasitological, immunochromatographic, dogs, Hovet.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

IMAGENS:

Figura 1.	Ciclo Biológico da <i>Dirofilária Immitis</i>	15
Figura 2.	Alere Dirofilariose Ag Teste Kit®.....	33
Figura 3.	Microfilária em gota espessa, aumento de 10x.....	34
Figura 4.	Microfilária em Knott modificado, aumento de 40x.....	35

TABELAS:

Tabela 1.	Incidência de cães positivos para a <i>Dirofilaria imittis</i> , atendidos no Hospital Veterinário Mario Dias Teixeira (HOVET-UFRA), região Metropolitana de Belém-PA.....	29
Tabela 2.	Incidência de cães positivos para a <i>Dirofilaria imittis</i> , atendidos no Hospital Veterinário Mario Dias Teixeira (HOVET-UFRA), região Metropolitana de Belém- PA, de acordo com o sexo.....	30
Tabela 3.	Incidência de cães positivos para a <i>Dirofilaria imittis</i> , atendidos no Hospital Veterinário Mario Dias Teixeira (HOVET-UFRA), região Metropolitana de Belém- PA, de acordo com a faixa etária.....	31
Tabela 4.	Eficiência dos testes parasitológicos e sorológico na detecção da <i>Dirofilaria imittis</i> , em cães atendidos no Hospital Veterinário Mario Dias Teixeira (HOVET-UFRA), região Metropolitana de Belém-PA..	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Histórico da Dirofilariose	14
2.2 Características morfológicas	15
2.3 Ciclo evolutivo do parasita	16
2.4 Epidemiologia	18
2.5 Sinais clínicos	20
2.6 Patogenia	22
2.7 Diagnóstico	23
2.8 Exames complementares	24
2.9 Tratamento	25
3. OBJETIVOS	27
3.1 Geral	27
3.2 Específicos	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Materiais	28
4.1 Métodos	28
4.1.1 Método da Gota Espessa	28
4.1.2 Técnica de Knott Modificada	29
4.1.3 Teste Imunocromatográfico ou sorológico (Alere Dirofilariose Ag Teste Kit®)	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÃO	37
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. INTRODUÇÃO

A dirofilariose é uma doença cardiopulmonar que ocorre principalmente no ventrículo direito, na artéria pulmonar e na veia cava, podendo afetar, também, outros órgãos como os rins e o fígado (MSD Animal Health [Brochura], 2013).

Conhecida como a “doença do verme do coração” (heartworm disease), é considerada uma antropozoonose emergente de cães, de caráter crônico, causada por nematódeos do gênero *Dirofilaria*, onde *Dirofilaria immitis* é a espécie mais amplamente conhecida, sendo transmitida por mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* (ACHA & SZYFRES, 2003; PAMPIGLIONE *et al.*, 2001).

As dirofilárias são nematódeos pertencentes à ordem Spirurida, superfamília Filarioidea, família Filariidae, subfamília Dirofilarinae, gênero *Dirofilaria*. O gênero *Dirofilaria* apresenta dois subgêneros, *Dirofilaria* (*D. immitis*) e *Nochtiella* (*Dirofilaria tenuis*, *Dirofilaria repens* e *Dirofilaria ursi*), ambos infectam o ser humano (ACHA & SZYFRES, 2003).

D. immitis é um parasita do sistema circulatório (coração e grandes vasos), linfático, tecido subcutâneo, cavidade peritoneal ou mesentério de cães, canídeos silvestres e, menos frequentemente, gatos, necessitando de um hospedeiro invertebrado (ACHA & SZYFRES, 2003). O reservatório principal de *D. immitis* e *D. repens* é o cão doméstico ou canídeos silvestres e o de *D. tenuis* é o guaxinim (KNAUER, 1998; ACHA & SZYFRES, 2003; SIMÓN *et al.*, 2007).

Em 1911, Raillet e Henry, dois parasitologistas franceses descreveram o gênero *Dirofilaria* e, assim, a atual classificação taxonômica, *D. immitis* (Leidy, 1856) Raillet & Henry, 1911 (KNAUER, 1998). Em 1979, devido à importância desta parasitose, não apenas pelos danos que causa aos animais infectados, mas também à população humana, e pela íntima relação dos animais domésticos com o ser humano, a enfermidade passou a ser considerada zoonose pela Organização Mundial da Saúde (ACHA & SZYFRES, 2003; BARBOSA & ALVES, 2006).

No Brasil, há poucos relatos de dirofilariose felina e, embora a infecção humana seja internacionalmente reconhecida como mais rara que a felina, há mais registros de infecções humanas (BRANCO *et al.*, 2009). A sua introdução no país está provavelmente associada à importação de cães domésticos infectados, apresentando alta adaptabilidade ao clima e à presença de vetores (CHAME *et al.*, 2007).

A gravidade da doença é determinada pelo número de vermes adultos e pela interação hospedeiro-parasita. Cães que desenvolvem potente resposta imunológica contra os parasitas tendem a apresentar patologia pulmonar mais grave (CALVERT e RAWLINGS, 2002).

No coração do animal afetado as filarias chegam a atingir 30 cm, causando problemas de saúde que começam a manifestarem-se então pela corrente sanguínea seis a sete meses após o início da infestação, podendo, no entanto, passar despercebidos até que a doença esteja numa fase muito avançada (BOCARDÓ *et al.*, 2009).

A presença do mosquito transmissor e de animais reservatórios da infecção são fatores indispensáveis para garantir a manutenção e a transmissão da doença em um dado território. Desta maneira, a introdução de novas espécies de vetores e sua adaptação em novos ambientes, assim como a maior movimentação de cães entre diferentes países, garantiu ampla distribuição desta doença em diferentes áreas do globo (MORCHÓN *et al.*, 2012).

A *D. immitis* é atualmente considerada uma das espécies filarídeas de maior importância na Europa e nos Estados Unidos, por causar doença grave em animais e devido ao seu potencial zoonótico (BOWMAN *et al.*, 2009; OTRANTO *et al.*, 2009). No estado do Colorado, a Infecção por dirofilariose é relativamente comum em cães de abrigos e em cães resgatados de tornados e furacões em áreas endêmicas. Testar cães com infecções inferiores a seis meses de idade normalmente resultam em testes negativos apesar da presença de vermes imaturos. Em estudos realizados no período 2005-2018, é estimada uma prevalência entre 14,6% e 48,8% nos cães, com base em testes positivos para *D. immitis* (DRAKE, 2019).

Desde seu reconhecimento como zoonose pela Organização Mundial da Saúde em 1979, a ocorrência desta enfermidade aumentou consideravelmente em todo o mundo, devido principalmente a fatores como mudanças climáticas e maior trânsito de animais entre diferentes países (SILVA & LANGONI, 2009; GENCHI *et al.*, 2005).

A *Dirofilaria immitis* é um parasita comum em cães, mas também já houve relatos desta em humanos. O diagnóstico diferencial e a avaliação epidemiológica dessas zoonoses são importantes para o desenvolvimento de políticas públicas de saúde eficientes e estratégias de controle (DE ARGÔLO *et al.*, 2018).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico da Dirofilariose

A *Dirofilaria immitis* originou-se na Ásia e sua presença no coração de cães é reconhecida há mais de 300 anos. Na Europa, este parasita surgiu primeiramente em países da costa do Mediterrâneo, e foi posteriormente introduzido nas Américas por imigrantes Europeus (BOWMAN & ATKINS, 2009). Os vermes do coração foram relatados em cães na Itália em 1626 e em gatos no Brasil em 1921. Foram encontrados também em gatos nos Estados Unidos e nas Filipinas em 1922 (NELSON, 2008).

A primeira descrição publicada da doença em cães foi nos Estados Unidos, pelo físico Osborne, em 1847, no periódico *The Western Journal of Medicine and Surgery*. Já os primeiros relatos em gatos foram realizados por Travassos, em 1921, no periódico *Brasil Medical* e por Riley, em 1922, no *Journal of Parasitology* (AHS, 2007).

Em 1850, Joseph Leidy classificou o agente etiológico dessa enfermidade como *filaria immitis* (KNAUER, 1998). No Brasil, os primeiros casos de *D. immitis* em humanos foram relatados em 1878, por Silva-Araújo, na Bahia (BARBOSA & ALVES, 2006), e em 1887, por Magalhães, em um menino no Rio de Janeiro, que apresentava um parasita macho e uma fêmea no ventrículo direito (MAGALHÃES, 1887).

Em 1911, Railliet e Henry, dois parasitologistas franceses descreveram o gênero *Dirofilaria* e, assim, a atual classificação taxonômica, *D. immitis* (LEIDY, 1856) Railliet & Henry, 1911 (KNAUER, 1998). Acreditava-se que a transmissão ocorria pela ingestão de água contaminada, o que foi refutado por Bancroft, em 1901, que demonstrou que a transmissão da doença se dava através de mosquitos (KNAUER, 1998).

Relata-se a existência de nove espécies de filarídeos descritos em cães, contudo no Brasil foram assinaladas apenas quatro: *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens*, *Dipetalonema reconditum* e *Dipetalonema grassii*, sendo o principal agente da dirofilariose canina a *D. immitis* (FERNANDES *et al.*, 1999).

2.2 Características morfológicas

Os parasitas adultos são longos, de coloração esbranquiçada com acentuado dimorfismo sexual (LEITE, 2005). Ao microscópio é possível observar cutícula lisa, multilaminar e com espessura de 5,0 a 25,0 μm , com projeções internas espessas, diametralmente opostas, acompanhada de musculatura proeminente (CIRIO, 2005).

Os parasitas machos adultos possuem de 12,0 a 20,0 cm de comprimento e 0,7 a 0,9 mm de diâmetro, e possuem extremidade posterior em espiral; já as fêmeas adultas medem de 25,0 a 31,0 cm de comprimento e 1,0 a 1,3 mm de diâmetro e possuem a extremidade posterior arredondada. As fêmeas são ovovivíparas e liberam microfilárias na corrente sanguínea. As microfilárias, larvas de primeiro estágio (L1) medem de 295,0 a 325,0 μm de comprimento e 7,3 μm de diâmetro, e possuem a extremidade anterior ovalada e a posterior reta (DATZ, 2003; MANFREDI *et al.*, 2007; SILVA & LANGONI, 2009).

As microfilárias possuem a capacidade de responder a mudanças fisiológicas em seus hospedeiros, podendo estar ou não presentes na circulação sanguínea em diferentes períodos do dia, além de possuírem estruturas que permitem a sua passagem através dos finos capilares sanguíneos e através dos aparelhos bucais estreitos e parede intestinal de seus hospedeiros intermediários. As microfilárias sobrevivem na circulação sanguínea por até dois anos, sendo identificadas em aproximadamente 60% dos cães portadores de dirofilariose. Os parasitas adultos de *D. immitis* se alimentam de plasma e podem sobreviver em seus hospedeiros durante meses a anos (LEITE, 2005; MANFREDI *et al.*, 2007).

Nos machos os órgãos reprodutores são constituídos por um único testículo contínuo e um canal deferente que termina num ducto ejaculador na cloaca (Urquhart *et al.*, 1996). Na cauda são visíveis espículas desiguais em tamanho e forma, sendo à direita menor, que são introduzidas no orifício genital da fêmea durante a cópula. Apesar da existência de espículas esta espécie é desprovida de gubernáculo (URQUHART *et al.*, 1996; CAMPILLO *et al.*, 1999).

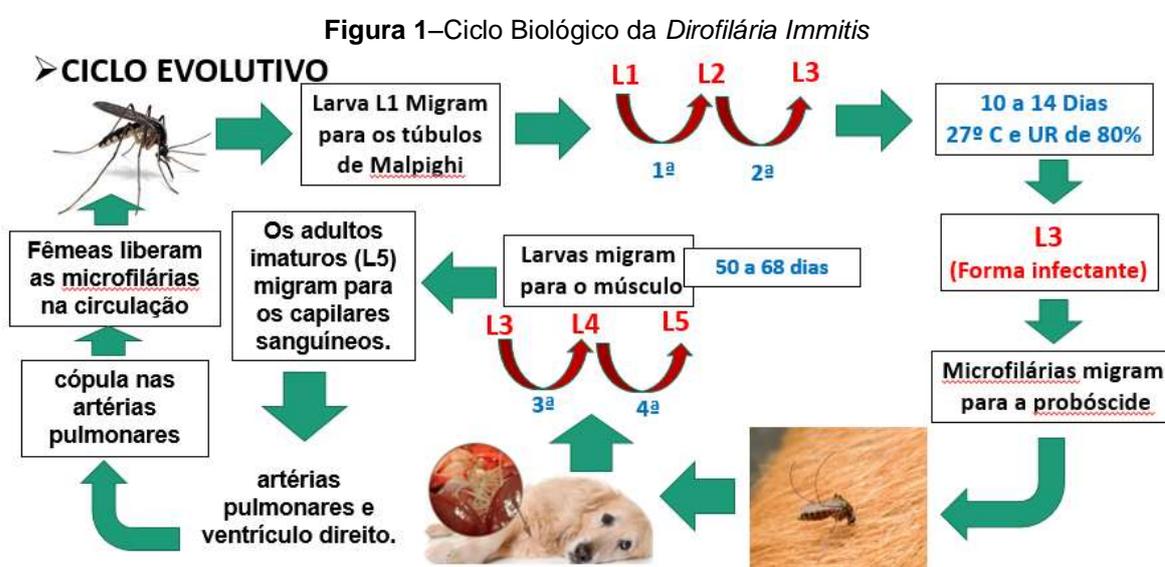
A fêmea apresenta como órgãos reprodutores o ovário, oviduto e útero que se abrem na vulva (URQUHART *et al.*, 1996). A vulva encontra-se junto ao esôfago e a cauda é arredondada sem terminar em espiral (CAMPILLO *et al.*, 1999).

2.3 Ciclo evolutivo do parasita

As microfilárias necessitam de um artrópode hematófago (mosquito) para o desenvolvimento do seu ciclo vital. Os parasitas adultos, machos e fêmeas, vivem nos tecidos ou cavidades orgânicas dos hospedeiros definitivos. (SIMÓN *et al.*, 2007; UCD, 2007; DILLON, 2007).

Durante o seu ciclo de vida o nematódeo *D. immitis* realiza quatro mudas, sendo que as duas primeiras ocorrem no mosquito e as duas últimas no hospedeiro definitivo. As fêmeas adultas, presentes no coração e vasos sanguíneos adjacentes no hospedeiro definitivo, liberam microfilárias diretamente na circulação sanguínea. Estas são ingeridas pelos hospedeiros intermediários – mosquitos-fêmeas hematófagos do gênero *Culex*, *Aedes*, *Psorophora*, *Mansonia* ou *Anopheles* – no momento da alimentação (URQUAHART, 1996; CIRIO, 2005; MANFREDI *et al.*, 2007).

No mosquito, as microfilárias (L1) migram para os túbulos de Malpighi, onde realizam duas mudas, transformando-se nos estágios larvais L2 e L3. O tempo necessário para que as microfilárias se tornem infectantes está diretamente relacionado com a temperatura. A uma temperatura de 27°C e umidade relativa de 80% as microfilárias se tornam infectantes em aproximadamente 10 a 14 dias (AMERICAN HEARTWORM SOCIETY, 2012).



Fonte: Autor

No estágio larval L3, sua forma infectante, as microfilárias migram dos túbulos de Malpighi para os espaços intersticiais da cabeça ou para a probóscide, para serem inoculadas em um novo hospedeiro no momento do repasto sanguíneo. A pele lesada por ocasião da picada do mosquito permite o contato da hemolinfa contendo as microfilárias, que penetram no tecido subcutâneo ou subseroso do hospedeiro definitivo (CIRIO, 2005; MANFREDI *et al.*, 2007). De 10 a 12 microfilárias podem ser transmitidas pela picada por um só mosquito (DILLON, 2007).

As larvas migram para os músculos, onde realizam a terceira e quarta muda (L4-L5), período que dura cerca de 50 a 68 dias. Os adultos imaturos (L5) migram do tecido muscular para os capilares sanguíneos, chegando às artérias pulmonares e ventrículo direito, onde irão atingir a maturidade sexual e crescer até o tamanho máximo de 20,0 a 35,0 cm (HOCK & STRICKLAND, 2008).

O período pré-patente mínimo é de seis meses em cães. A maturação final dos vermes adultos e a cópula ocorrem nas artérias pulmonares. Após a cópula as fêmeas liberam as microfilárias na circulação, completando o ciclo (MANFREDI *et al.*, 2007). Sob condições ideais de temperatura e umidade, o ciclo leva de 184 a 210 dias para se completar.

Os principais fatores que influenciam o ciclo de crescimento de formas larvais de filárias no vetor são a espécie do vetor e a temperatura do ambiente. Outro fator importante é a quantidade de microfilárias circulantes. Um elevado número de microfilárias que um vetor ingurgita pode levá-lo a morte e um baixo número pode não ser o suficiente para vencer todas as barreiras físicas e imunológicas dos mosquitos (CANCRINI; GABRIELLI, 2007).

A barreira física é o cibário que possui dentes que podem romper a membrana das microfilárias e a imunológica principal é a matriz peritrófica. Dentre os fatores que mais influenciam a transmissão, a exposição ao vetor, densidade populacional, fecundidade e espécie do vetor são os mais importantes. O fato do desenvolvimento biológico do vetor e do parasito depender de condições ambientais faz com que a distribuição mundial de filariose canina esteja diretamente relacionada ao clima (CANCRINI; GABRIELLI, 2007).

Os adultos podem viver por vários anos no cão e a microfilária pode sobreviver, no máximo, por dois anos e meio (ACHA & SZYFRES, 2003; CIRIO, 2005).

2.4 Epidemiologia

A distribuição geográfica da enfermidade é mundial, com casos registrados na África, Ásia, Austrália, Europa, e nas Américas do Sul e do Norte (MUNICHOR *et al.*, 2001; AKST *et al.*, 2004). A população canina que apresenta maior risco é aquela que está submetida à maior exposição aos artrópodes vetores, tais como os cães não controlados sanitariamente em zonas rurais, os que não possuem abrigo permanente, os de caça, pastoreio, competição ao ar livre e os que são transportados para locais em que a infecção é endêmica (TZIPORY *et al.*, 2010).

Animais do sexo masculino apresentam maior probabilidade de infecção do que as fêmeas. E que a idade é também um importante fator de risco, determinado pelo tempo de exposição em áreas em que a doença é endêmica. Assim sendo, cães idosos têm uma maior prevalência de infecção por *Dirofilaria* do que cães mais novos. (MONTOYA *et al.* 1998).

As regiões costeiras tropicais e subtropicais de todo o mundo apresentam alta prevalência de dirofilariose canina, pela abundância de vetores susceptíveis competentes (ALMEIDA *et al.*, 2001). Nas áreas endêmicas, a prevalência de infecções por *D. immitis* varia de 40% a 70% nos cães e de 1% a 4% nos gatos (ACHA & SZYFRES, 2003).

D. immitis já foi encontrada no sul e leste da Europa. Sua ocorrência foi registrada na Itália, Espanha, Portugal, França, Grécia, Turquia, Hungria, República Tcheca, Eslováquia, Eslovênia, Bulgária, Romênia, Polônia e Croácia, com prevalências variando de 2% a 80%. Casos foram registrados na Alemanha, Áustria, Rússia e Holanda (CARDOSO; MENDAO; DE CARVALHO 2012; GENCHI *et al.*, 2005; GENCHI; VENCO; GENCHI, 2007; MORCHÓN *et al.*, 2012).

Na Ásia *D. immitis* já foi encontrada no Irã, Japão, Coreia do Sul e Taiwan, com prevalências entre 11,3% e 57% de cães parasitados (JAFARI; GAUR; KHAKSAR, 1996; LEE *et al.*, 1996; TANAKA; WATANABE; OGAWA, 1985; WU; FAN, 2003). Sendo comumente encontrada na costa leste da África, desde a África do Sul até a República do Sudão (SCHWAN; DURAND, 2002). Na Austrália, *D. immitis* já foi encontrada na região costeira nordeste e em alguns estados do Leste. Na cidade de Sidney foi encontrada com a prevalência de 11,4% (BIGGOOD; COLLINS, 1996).

Nos Estados Unidos, o agente da dirofilariose já foi encontrado em todos os 50 estados. Sendo que um estudo estima que existam 1,2% de cães parasitados naquele país (BROWN *et al.*, 2012). A prevalência de infecções por dirofilariose em cães vem aumentando no Colorado e pode ser subestimada. Além dos testes de cães positivos para o antígeno dirofilariose, alguns cães infectados serão perdidos se apenas o teste de antígeno for realizado, já que podem ter infecções por dirofilariose imatura, onde o antígeno ainda não será detectado, e esses cães podem apresentar microfilarêmia positiva, com antígeno ainda negativo (AMERICAN HEARTWORM SOCIETY, 2014; LITTLE *et al.*, 2014). A prevalência da Dirofilariose no Colorado aumentou 67,5% entre 2013 e 2017 (DRAKE, 2019).

Na América Central e no Caribe *D. immitis* já foi encontrada em Porto Rico, Cuba, Curaçao, Bahamas, República Dominicana e México com prevalências entre 3,1% a 67% (GUERRERO, 1992; KOZEK, 1995). Na Argentina a prevalência varia entre 1% a 71% (VEZZANI; EIRAS; WISNIVESKY, 2006). Na Venezuela foram encontrados 2,3% de cães parasitados por *D. immitis* e no Peru 4,3% (GONZALES, 2002).

No Brasil, a dirofilariose canina é considerada uma endemia com maior prevalência de cães microfilarêmicos. Até 2005, a prevalência nacional em cães revelou uma média de 10,2% animais microfilarêmicos, enquanto 9,1% apresentaram antígenos circulantes. Nas regiões Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul, as prevalências médias de microfíliarias circulantes foram 10,6%, 17,2%, 5,8% e 12,0%, respectivamente, demonstrando a localização mais litorânea da infecção. Já as médias de levantamentos sorológicos foram de 13,9%, 13,5%, 6,9% e 2,0%, respectivamente (BARBOSA & ALVES 2006).

A incidência da dirofilariose é mais frequente em cidades litorâneas e de clima quente, pela abundância de vetores susceptíveis competentes, porém muitos casos têm sido diagnosticados em regiões interioranas e longe da costa (FERREIRA *et al.*, 1999; FERNANDES *et al.*, 2000), (ALMEIDA *et al.*, 2001).

A dirofilariose canina está presente em vários estados de todas as regiões do Brasil. As maiores prevalências descritas no país estão em áreas banhadas por rios e mares, providas ou próximas de lagos (GARCEZ *et al.*, 2006). Na última década houve um aumento do número de registros em países onde antes era considerada área livre de dirofilariose. Este aumento é creditado ao aquecimento global e maior

tráfego de animais parasitados a estas novas áreas (BROWN *et al.*, 2012; MORCHÓN *et al.*, 2012).

2.5 Sinais clínicos

Algumas alterações observadas nos hospedeiros definitivos são provocadas por moléculas derivadas das filárias, que levam a inflamação, proliferação endotelial e conseqüentemente a hipertensão pulmonar, tromboembolismo, lesões cardíacas e renais. A circulação de imunocomplexos formados pelos antígenos de *Wolbachia* e de L1 também causam lesões endoteliais (KRAMER *et al.*, 2008).

Os principais sinais clínicos de *Dirofilariose* agudas são: colapso, dispneia, convulsões, diarreia, vômitos, cegueira, taquicardia, síncope e morte súbita. Na *Dirofilariose* crônica, é frequente ocorrer tosse, vômitos, dispneia, letargia, anorexia e perda de peso. Ainda assim, o diagnóstico pode ser difícil por muitas vezes ser assintomática (NAYAR & CONNELLY, 2013).

A doença no animal é de difícil diagnóstico clínico, pois pode ser assintomática ou apresentar sintomas comuns a muitas patologias, como tosse e dispnéia (considerados os mais comuns à *dirofilariose*), redução da capacidade de exercícios e, em alguns casos mais graves, o animal pode apresentar caquexia (ETTINGER & FELDMAN, 1997; BIRCHARD & SHERDING, 1998).

As manifestações clínicas mais observadas foram a prostração (76,7%), a tosse (43,3%), a anorexia (30%) e a intolerância ao exercício (30%). Anemia normocítica e normocrômica e leucocitose com neutrofilia, monocitose, eosinofilia e basofilia foram alterações hematológicas observadas nos animais assintomáticos infectados e nos animais com *dirofilariose* (ROCHA, 2010).

Arango *et al.* (2006), relata como sinais e sintomas, mucosas pálidas, ausculta cardíacas anormais, sons estridentes em ambos os campos pulmonares, edema no terço inferior do membro anterior esquerdo e desidratação.

Segundo Moreira (2008), os animais que desenvolvem doença cardiopulmonar podem não manifestar nenhum sinal clínico ou esses sinais podem apresentar-se na forma de dispneia, intolerância ao exercício físico que se agrava devido à resistência ao fluxo sanguíneo nos alvéolos, hemoptise e síncope. A síndrome da veia cava é um sinal clínico manifestado pelos doentes graves, devido

à grande concentração de vermes adultos no átrio direito do coração, válvula tricúspide e veia cava caudal. Hemólise, anemia e bilirrubinúria são lesões provocadas por comprometimento hepático primário.

A carga de vermes adultos, a interação hospedeiro-parasita e a duração da infecção refletem os sinais clínicos, ou seja, os sinais da dirofilariose canina podem variar muito e refletem na gravidade das lesões causadas pelos parasitas. A grande maioria dos animais portadores de dirofilárias apresenta poucos ou nenhum sinal clínico (CALVERT, 1998; MENEZES, 1998).

Na dirofilariose, ocorrem tanto a resposta imune inata como a adquirida, sendo que o desenvolvimento da resposta adquirida depende do hospedeiro ou carga parasitária (AHS, 2007). As manifestações clínicas dependem do tipo de resposta imune estimulada pelo parasita. As populações de eosinófilos e neutrófilos aumentam quando o sistema imune de camundongos é estimulado por antígenos da L3 ou pelo parasita adulto. Os neutrófilos se acumulam nos rins e nas paredes das artérias pulmonares durante a infecção canina. Há a formação de reação granulomatosa, iniciada quando da presença do parasita nos ramos arteriais pulmonares (THEIS, 2005).

Algumas moléculas secretadas pelo agente parecem estimular a produção de interleucinas do tipo 10 (IL-10) contribuindo para a sobrevivência do parasita, beneficiando o hospedeiro pela inibição da patologia imunomediada. A morte do parasita resulta em uma reação inflamatória exacerbada com formação de granuloma que pode obstruir as artérias pulmonares (TEZUKA *et al.*, 2003).

D. immitis se desenvolve na artéria pulmonar do cão e, secundariamente, no ventrículo direito. Quase sempre forma um enovelado que compreende inúmeros parasitas. Em infecções mais intensas e duradouras, as filárias vivas ou mortas causam estenose dos vasos pulmonares e dificultam o fluxo sanguíneo. Isso provoca, com o tempo, falha do ventrículo direito. Os sinais clínicos no cão podem estar ausentes ou se manifestarem por tosse, intolerância a exercícios, dispneia, ruídos cardíacos e pulmonares, hepatomegalia, síncope, tosse crônica e/ou perda de vitalidade. Nas formas graves, manifestações de insuficiência cardíaca direita, como ascite, congestão aguda do fígado e rins, hemoglobinúria e morte em 24 a 72 horas podem ocorrer (ACHA & SZYFRES, 2003).

A severidade é influenciada pelo número de parasitas, mas também exacerbada pelo estresse de alto fluxo sanguíneo relacionado a exercício. A

descrição clássica de síndrome pulmonar é induzida somente em cães com um padrão de exercício que force uma hipertrofia ventricular direita originária de uma saída cardíaca aumentada e resistência pulmonar (DILLON, 2007).

2.6 Patogenia

A dirofilariose é uma doença que apresenta duas fases ditas decisivas. Por um lado, a chegada e alojamento das L5 de *D. immitis* nas artérias pulmonares, principalmente nas artérias dos lobos pulmonares caudais, por outro, a morte dos nematoides adultos (ALMEIDA, 2010).

Os primeiros sinais clínicos de infecção por *D. immitis* estão relacionados com a primeira fase da doença, surgindo, portanto, 3 a 6 meses após a infecção. A ação traumática das L5, nas artérias pulmonares, bem como a liberação de fatores tóxicos e o desencadeamento de mecanismos imunitários originam alterações na vasculatura pulmonar. É após um período de aproximadamente 9 meses que, em resposta à hipertensão pulmonar, o ventrículo direito surge com uma hipertrofia excêntrica. Isto pode levar a insuficiência cardíaca congestiva acompanhada de ascite e edema (GOMES, 2009).

As alterações patológicas associadas à dirofilariose são resultado de lesões vasculares causadas pela presença de parasitas no sistema circulatório do animal. Os primeiros danos secundários à infecção ocorrem na artéria pulmonar e pulmões. A gravidade das alterações varia conforme a carga parasitária, a duração da infecção e como o sistema imune do hospedeiro reage à presença dos parasitas. A quantidade de exercício também é um fator agravante da doença, por aumentarem o risco da ocorrência de complicações tromboembolíticas (HOCK & STRICKLAND, 2008; BOWMAN & ATKINS, 2009).

Animais com alta carga parasitária podem desenvolver síndrome da veia cava, considerada a manifestação mais grave da dirofilariose. Usualmente é observada em cães jovens com mais de 100 parasitas adultos e caracteriza-se pela migração retrógrada de parasitas das artérias pulmonares, o que obstrui parcialmente o fluxo sanguíneo para o coração direito. A presença de parasitas no coração causa regurgitação de tricúspide e diminuição do retorno venoso. (CIRIO, 2005)

As dirofilárias causam danos ao parênquima pulmonar, sendo a pneumonite eosinofílica a lesão parenquimal mais comum em casos de dirofilariose. É causada pela destruição de microfilárias pelo sistema imune do hospedeiro, seguida por reação inflamatória local. A formação de granulomas pulmonares pela morte e aprisionamento de parasitas no parênquima pulmonar é menos comum em animais (HOCK & STRICKLAND, 2008).

Quando há morte de parasitas, naturalmente ou secundário ao tratamento adulticida, surgem danos vasculares mais graves, incluindo trombose, inflamação de vilosidades rugosas e inflamação granulomatosa. Os vasos afetados se tornam espessos, dilatados, tortuosos e não complacentes, o que os torna funcionalmente incompetentes. As dirofilárias causam a liberação endotelial de substâncias vasoativas que induzem vasoconstrição, a qual é agravada pela hipóxia secundária ao tromboembolismo, à inflamação pulmonar eosinofílica ou à consolidação pulmonar. As consequências desta vasoconstrição prolongada são a hipertensão pulmonar e diminuição do débito cardíaco (BOWMAN & ATKINS, 2009).

2.7 Diagnóstico

O diagnóstico baseia-se inicialmente na observação de sinais clínicos sugestivos de dirofilariose como tosse, dispnéia, intolerância a exercícios e fraqueza, associados ao histórico e a exames complementares. Na anamnese é importante obter informações sobre possíveis viagens a áreas endêmicas, assim como sobre a administração ou não de medicamentos profiláticos para animais que residem em áreas endêmicas. A realização de exames complementares também é importante, pois pode auxiliar no diagnóstico, fornece informações sobre o estado geral de saúde do paciente e gravidade da doença, e direcionar o clínico na escolha do tratamento adequado (CASTRIC, 2002; VENCO, 2007).

Existem diversos métodos de diagnóstico para dirofilariose canina, os mais utilizados são a gota espessa e o método do Knott, ambos por serem rápidos e baratos. Estes são utilizados para identificar as espécies de filarias e fazer a contagem do número de microfilárias circulantes. Apesar de serem muito utilizados, podem ocorrer falsos resultados negativos. Em alguns casos, a população de vermes adultos pode ser formada apenas por vermes do mesmo sexo e, de acordo

com a fase biológica do parasita, pode não ocorrer a produção das microfilárias, causando resultado falso negativo no diagnóstico parasitológico. Desta forma é necessário um outro tipo de diagnóstico que seja capaz de detectar vermes adultos. Existem diversos kits comerciais de diagnóstico específicos para *D. immitis* que detectam antígenos produzidos apenas por vermes adultos (OGAWA, 2013).

O teste de Knott modificado é o teste de eleição para observar a morfologia, mensurar dimensões corporais do parasita, e para diferenciar a *D. immitis* de outras espécies de microfilárias. (SCHREY & TRAUTVETTER, 1998). Este teste utiliza maior quantidade de sangue como amostra (1 ml) e caracteriza-se por causar a lise de hemácias, fixando as microfilárias presentes (GENCHI *et al.*, 2007b).

A identificação de antígenos e a visualização das microfilárias só são possíveis após cinco e seis meses pós-infecção, respectivamente. Atualmente não existem testes que possibilitem o diagnóstico antes deste período (AMERICAN HEARTWORM SOCIETY, 2012).

2.8 Exames complementares

Radiografias torácicas e eco cardiograma são utilizados para identificar alterações condizentes com dirofilariose, assim como determinar a gravidade e progressão da doença e avaliar alterações cardiopulmonares parenquimatosas (HOCK & STRICKLAND, 2008).

Sinais radiográficos variam conforme a espécie, além de serem transitórios e nem sempre indicarem a ocorrência de infecção ativa. Além disso, a severidade das alterações vasculares pulmonares não possui relação direta com a carga parasitária (LITSTER *et al.*, 2005; VENCO, 2007; HOCK & STRICKLAND, 2008).

A eco cardiografia é um método complementar de diagnóstico que pode permitir afirmar definitivamente que o animal está infetado com *D. immitis*. (AHS - Current canine guidelines, 2012).

O eco cardiograma é indicado para evidenciar a presença de dilatação ventricular direita e disfunção cardíaca direita e, por vezes, permite a identificação do parasita na artéria pulmonar e/ou no coração direito. É utilizado para estimar a carga parasitária, a presença de regurgitação de tricúspide e a gravidade da

hipertensão pulmonar, além de possibilitar rápido diagnóstico de ocorrência de síndrome da veia cava (HOCK & STRICKLAND, 2008; WARE, 2010).

Atualmente, é possível e preferível a realização de testes sorológicos como ELISA e imunocromatografia para detecção de infecções por *D. immitis*, estando disponíveis na forma de testes rápidos para uso rotineiro em clínicas veterinárias (Ettinger e Feldman, 2004; AHS - Current canine guidelines, 2012). Estes métodos, para além de terem uma sensibilidade maior que os testes para detecção de microfilárias, permitem identificar infecções em que estão presentes parasitas adultos, mas não existem microfilárias em circulação. A sua especificidade é próxima de 100% em infecções que sejam constituídas por pelo menos um nematoide fêmea maduro uma vez que os antígenos detectados são provenientes dos úteros das fêmeas (AHS, 2012).

O eletrocardiograma permite detectar arritmias e distúrbios de ritmo, comuns em casos de dilatação cardíaca (HOCK & STRICKLAND, 2008).

Além disso é muito importante fazer um exame laboratorial, ou seja, uma constatação e identificação de microfilárias através de exame de sangue microscópico (FORTES, 1998).

2.9 Tratamento

Os cães infectados sem sinais clínicos ou com sinais leves apresentam melhor resposta ao tratamento. Pacientes com doença mais severa apresentam maiores possibilidades de complicações e morte. A presença de doença severa associada a outras doenças graves pode impedir o tratamento (AHS 2007; NISSEN & WALKER, 2007).

Os objetivos do tratamento são melhorar a condição clínica do paciente, eliminar a *D.immitis* (estágios larvais e adultos) e minimizar o surgimento de complicações (SCHREY & TRAUTVETTER, 1998; SHEARER, 2011; AMERICAN HEARTWORM SOCIETY, 2012).

O tratamento baseia-se na associação entre diferentes fármacos para combater os parasitas em diferentes estágios de infecção. A combinação entre adulticidas e larvicidas, utilizados para tratamento profilático de longo prazo, é recomendada pela *American Heartworm Society* (2012).

Animais que apresentem sinais importantes de dirofilariose devem ser estabilizados antes do início da administração de adulticidas. A quimioprofilaxia com lactonas macrocíclicas deve ser iniciada logo após o diagnóstico da doença, para prevenir a transmissão da doença para outros animais, eliminar as microfilárias e destruir vermes imaturos com menos de 4 meses de desenvolvimento, os quais são resistentes ao tratamento com o adulticida (HOCK & STRICKLAND, 2008).

A ivermectina, na dose de 6 mg/kg, é o fármaco mais utilizado no tratamento e na profilaxia. Melhorias no saneamento básico e nas condições do abrigo dos cães também influenciam na profilaxia. O tratamento exige cuidados, porque, após a ingestão da droga, pode ocorrer morte em massa dos vermes adultos, causando congestão pulmonar e até a morte dos cães. Por isso, recomenda-se administração de medicamento em pequenas quantidades por um período prolongado (OGAWA, 2013).

A melarsomina é considerada relativamente segura, apesar da sua baixa margem de segurança. Uma única dose de 7,5mg/kg (o triplo da dose recomendada), pode resultar em inflamação pulmonar, edema e morte (HOCK & STRICKLAND, 2008; MERIAL, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Determinar a Incidência de *Dirofilaria immitis* em cães atendidos no Hospital Veterinário Mario Dias Teixeira (HOVET), na Universidade Federal Rural da Amazônia, localizada no município de Belém, Estado do Pará, no período de abril a maio de 2019.

3.2 Específicos

Avaliar a presença de Microfilárias no sangue de cães por meio das técnicas da gota espessa e de Knott Modificada;

Realizar o teste sorológico para detectar a presença de anticorpos que agem contra as microfilárias;

Estimar a ocorrência de *Dirofilaria immitis* em cães utilizando três métodos de diagnóstico (gota espessa, Knott modificado e imunocromatografia);

Verificar a presença de *D. immitis* de acordo com a faixa etária, sexo e raça em cães.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Foram coletadas 50 amostras de sangue de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*), escolhidos aleatoriamente, no período de abril a maio de 2019, com idade acima de seis meses, independente de raça e sexo, durante a realização das consultas e procedimentos no Hospital veterinário Mario Dias Teixeira (HOVET) localizado na Universidade Federal Rural da Amazônia, no município de Belém, Estado Pará. Esta pesquisa está em processamento pelo Comitê de Ética da UFRA com protocolo nº 062/2017 (CEUA); 23084.022862/2017-62 (UFRA).

As amostras de sangue foram coletadas por venopunção da jugular e da veia cefálica, de forma asséptica, com conteúdo em torno de 4-5 ml de sangue total, para armazenamento em tubo estéril, sendo colocados de 2-3 ml em tubo contendo anticoagulante EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético) e 2 ml de Sangue em tubo estéril sem anticoagulante EDTA.

Após as coletas, as amostras eram armazenadas no Laboratório de análises Clínicas (LAC), onde eram analisadas e processadas em até 3 horas. As amostras contendo anticoagulante foram utilizadas para realização das técnicas de Gota Espessa primeiramente e logo após Knott Modificado. Já as amostras sem anticoagulante foram centrifugadas á 2500 rpm por 5 minutos, o soro foi retirado e armazenado no freezer para conservação e posterior análise sorológica.

4.1 Métodos

4.1.1 Método da Gota Espessa

Para a realização do método da gota espessa foi utilizada uma gota de sangue com EDTA (aproximadamente 0,05 ml) sobre a lâmina e logo após colocada a lamínula. Estas lâminas foram lidas em microscópio óptico sob objetiva de 10x e 40x, para detecção de microfilárias.

4.1.2 Técnica de Knott Modificada

À um tubo Falcon, foi adicionado 9 ml de água destilada e 1 ml de sangue com EDTA. Logo após o tubo foi homogeneizado suavemente em torno de 5 vezes e mantido em temperatura ambiente de 2 a 3 minutos. Após esse período centrifugou-se por 5 minutos a 3000 rpm. e desprezou-se o sobrenadante. O sedimento foi depositado em uma lâmina com o auxílio de uma pipeta e coberto com uma lamínula. As lâminas foram examinadas em microscópio óptico, utilizando-se objetivas de 10x e 40x para a procura e identificação específica do gênero das microfilárias.

4.1.3 Teste Imunocromatográfico ou sorológico (Alere Dirofilariose Ag Teste Kit®)

O dispositivo de teste foi removido da embalagem de alumínio e colocado em uma superfície plana, seca e limpa. Foram adicionadas, com a pipeta, duas gotas de soro na cavidade de amostra. Observou-se uma coloração rosa se movendo através da janela de resultado no centro do dispositivo de teste, onde os resultados foram interpretados de 10 a 15 minutos após o início da realização da técnica.

Alere Dirofilariose Ag Teste Kit® é um imunoensaio cromatográfico para a detecção qualitativa do antígeno da *Dirofilária immitis* no soro, plasma ou sangue canino.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, foram analisadas amostras de 50 animais, sendo todos, cães, acima de 6 meses, onde foi possível observar incidência de 12 % (n=6/50) de animais que apresentavam dirofilariose (Tabela1).

Tabela 1 – Incidência de cães positivos para a *Dirofilaria immitis*, atendidos no Hospital Veterinário Mario Dias Teixeira (HOVET-UFRA), região Metropolitana de Belém- PA

Geral		
Examinados (n)	Positivos (n)	%
50	6	12,00

Fonte: Autor

A partir desse Resultado é possível identificar altos índices de Infecção, o que nos leva a pensar na razão por trás desse percentual, que pode ser explicado segundo Silva & langoni (2009) pelas condições favoráveis à presença de mosquitos infectados, entre elas, índice pluviométrico, condições precárias de saneamento básico, desmatamento, alta concentração de populações de mosquitos e o aumento desordenado da população de cães, gatos e outros animais errantes, que constituem fatores importantes para a disseminação da doença neste Estado.

Outros fatores ambientais que podem influenciar no aumento da incidência da dirofilariose, segundo Morchón *et al.* (2012), são aqueles como a alta temperatura e a umidade, os quais vão propiciar o desenvolvimento e maior atividade do vetor. Regiões mais úmidas e com maior área verde contribuem para a formação de criadouros de mosquitos. Em revisão realizada por Barbosa e Alvez (2006), a prevalência nacional variou de 9,1% a 10,2%, demonstrando grande endêmicidade no Brasil e, em áreas onde as condições são favoráveis à presença de mosquitos infectados durante todo o ano, o risco de transmissão da doença aumenta consideravelmente.

No Estado do Pará, de acordo Souza *et al.*(1997) foram encontrados 10,7% de cães parasitados com *D. immitis* em Belém, observamos assim, que houve um aumento nos índices de infecção , já que no presente estudo a prevalência foi de 12%, o que pode ser justificado, segundo American Heartworm Society (2012), pela atuação do homem no meio ambiente e mudanças climáticas como o aquecimento

global, que favorecem a multiplicação do mosquito, expandem seu território de atuação e prolongam a estação de risco de ocorrência da doença.

Outros fatores relatados por American Heartworm Society (2012) são, o crescimento do setor imobiliário e a urbanização de novos territórios, que alteram a drenagem de terras não cultivadas e fornecem novas fontes de água, propiciando um ambiente favorável ao desenvolvimento de vetores e do parasita. A urbanização e a construção de grandes edifícios levam a formação de ilhas de calor, as quais retêm o calor emitido durante o dia e o irradiam durante a noite. Sendo assim, a urbanização leva a criação de microambientes que possibilitam a maturação de larvas de *D. immitis* durante os meses de inverno, prolongando a estação de risco de transmissão da doença.

Segundo Ogawa (2013) o Brasil, principalmente a região amazônica, possui todas as características necessárias para a transmissão de filariose canina. Além de que o clima favorece o desenvolvimento biológico dos vetores, o desmatamento e a falta de saneamento básico também contribuem para a manutenção de uma elevada população de vetores no meio urbano. A migração de hospedeiros parasitados para áreas antes livres de filariose canina é um dos principais modos de disseminação destas parasitoses.

Quando divididos por sexo, as amostras positivas são equilibradas, sendo 3 machos e 3 fêmeas, como podemos observar na tabela 2.

Tabela 2 – Incidência de cães positivos para a *Dirofilaria imittis*, atendidos no Hospital Veterinário Mario Dias Teixeira (HOVET-UFRA), região Metropolitana de Belém- PA, de acordo com o sexo

Sexo	Examinados (n)	Positivos (n)	%
Macho	32	3	9,38
Fêmea	18	3	16,67
Total	50	6	12,00

Fonte: Autor

De acordo com esses resultados podemos observar um percentual maior de fêmeas positivas (16,67%) em relação aos machos (9,38%), o que contraria os relatos de outros autores como Martin e Collins (1985), que afirmam que não há influência, quanto ao sexo, no parasitismo por filarídios. Montoya *et al.* (1998),

demonstra que animais machos apresentam maior probabilidade de infecção do que as fêmeas, o que vai de acordo com Almeida et al. (2001) que relatam que as fêmeas são mais resistentes à infecção devido à presença de estrógenos, pois inibe o desenvolvimento dos filarídeos devido à capacidade que esse hormônio tem em ativar o sistema imunológico.

Segundo Ogawa (2013) a idade é um fator importante a ser analisado devido ao fato da dirofilariose ser uma parasitose acumulativa, ou seja, quanto mais tempo de vida têm o hospedeiro mais tempo este ficou exposto a picadas e por consequência maior a chance de ser infectado e de desenvolver maior número de formas adultas.

A idade dos cães amostrados está descrita na tabela 3, onde analisamos que cães com idade acima de 9 anos apresentam maior porcentagem de positividade (18,75 %), em relação aos cães com idade entre 0,5 a 3 anos (7,69%) e a partir de 3 a 9 anos (9,52%).

Tabela 3 – Incidência de cães positivos para a *Dirofilaria imittis*, atendidos no Hospital Veterinário Mario Dias Teixeira (HOVET-UFRA), região Metropolitana de Belém- PA, de acordo com a faixa etária

Faixa etária			
Idade (anos)	Examinados (n)	Positivos (n)	%
0,5 a 3	13	1	7,69
Acima de 3 a 9	21	2	9,52
Acima de 9 a 15 anos	16	3	18,75
Total	50	6	12,00

Fonte: Autor

Estes achados são semelhantes aos encontrados por Montoya *et al.* (1998), que relata a idade como um importante fator de risco, determinado pelo tempo de exposição em áreas em que a doença é endêmica. Assim sendo, cães idosos têm uma maior prevalência de infecção por *Dirofilaria* do que cães mais novos.

De acordo com Yildirim *et al.* (2007), o risco de infecção aumenta com a idade. Segundo Selby *et al.* (1980) e Almeida *et al.* (2001) a idade do cão é um fator de risco importante determinado pelo tempo de exposição na área endêmica. Da

mesma forma, Garcez *et al.* (2006), enfatiza que a prevalência de animais com microfilárias de *D. immitis* aumenta progressivamente com a faixa etária.

Das 6 amostras positivas dentre as 50, 3 foram de cães sem raça definida e 3 de cães com raça definida. Esse resultado vai de acordo com o estudo realizado por Yildirim *et al.*, 2007; Vezzani *et al.*, 2011, onde não foi observada diferença significativa entre cães de raça ou sem raça definida e entre cães de pequeno e de grande porte. Contrariamente, Vezanni e colaboradores (2011) encontraram valores de prevalência significativamente maiores em cães de pêlo curto, além de demonstrarem que a prevalência aumenta significativamente em animais de grande porte. Os autores acreditam que isso pode ser justificado pelo fato desses animais serem utilizados como cães de guarda e em virtude do pêlo curto facilitar a aproximação e picada do mosquito.

Na realização da presente pesquisa, foram utilizados três métodos diagnósticos, dois parasitológicos, Gota espessa e Knott Modificado, e o sorológico, Alere Dirofilariose Ag Teste Kit®, como apresentado na tabela 4. O que vai de acordo com a recomendação da American Heartworm Society (2012), que prevê a utilização de dois ou mais métodos para diagnóstico.

Tabela 4 – Eficiência dos testes parasitológicos e sorológico na detecção da *Dirofilaria imittis*, em cães atendidos no Hospital Veterinário Mario Dias Teixeira (HOVET-UFRA), região Metropolitana de Belém-PA

Testes	Positivos	
	n	%
Gota espessa	0	0,00
Knott modificado	0	0,00
Alere®	1	16,67
Gota espessa + Knott modificado	1	16,67
Gota espessa + Alere®	0	0,00
Knott modificado + Alere®	0	0,00
Gota espessa + Knott modificado + Alere®	4	66,67
Total	6	100,00

Fonte: Autor

Sendo feito um comparativo sobre a eficiência dos testes na detecção da *Dirofilaria imittis*. Das 6 amostras positivas no teste, 4 delas reagiram aos três testes (Gota Espessa, Knott Modificado e Alere®), totalizando 66% dos positivos. Uma

amostra reagiu a dois testes (16%) (Gota Espessa e Knott Modificado) e uma reagiu somente a um teste (16%) (Alere®).

No teste imunocromatográfico, Sorológico ou de detecção de antígeno, das 6 amostras positivas, 5 reagiram ao Alere Dirofilariose Ag Teste Kit®, o que é justificado pelas últimas diretrizes publicadas pela American Heartworm Society (2012) para o diagnóstico, prevenção e tratamento da dirofilariose canina, o teste de detecção de antígenos é mais sensível e deve ser o teste de primeira escolha para o diagnóstico da doença em cães.

Assim como o relatado por Hock & Strickland (2008), que considera o teste de identificação de antígenos como o mais sensível para o diagnóstico de dirofilariose em cães. Obtendo especificidade próxima a 100%, e os testes atualmente disponíveis são capazes de diagnosticar a doença inclusive em animais amicrofilarêmicos (infecções ocultas), podendo inclusive, essa ser a resposta para a amostra negativa nos testes parasitológicos e positiva somente no Alere Dirofilariose Ag Teste Kit®. Animais que apresentam este tipo de infecção (oculta), devem possuir ao menos uma fêmea madura em seu organismo, uma vez que o teste detecta proteínas secretadas apenas por fêmeas adultas de *D. immitis* na circulação sanguínea do hospedeiro definitivo. O que, também, pode justificar a única amostra negativa para o Teste Alere® no presente estudo, assim como apresentado por Silva & Langoni (2009), onde falsos negativos podem ocorrer em casos de baixa carga parasitária e/ou baixa concentração de antígenos circulantes, supressão da presença de antígenos circulantes devido a tratamento profilático com lactonas macrocíclicas, morte de parasitas, e ausência ou baixa quantidade de fêmeas maduras. Animais infectados apenas com parasitas machos também resultarão sempre negativos.

Na imagem 2, podemos observar o Teste Imunocromatográfico ou sorológico Alere Dirofilariose Ag Teste Kit®, onde o Número 1 identifica o resultado negativo e o número 2 o resultado positivo.

Figura 2 - Alere Dirofilariose Ag Teste Kit®



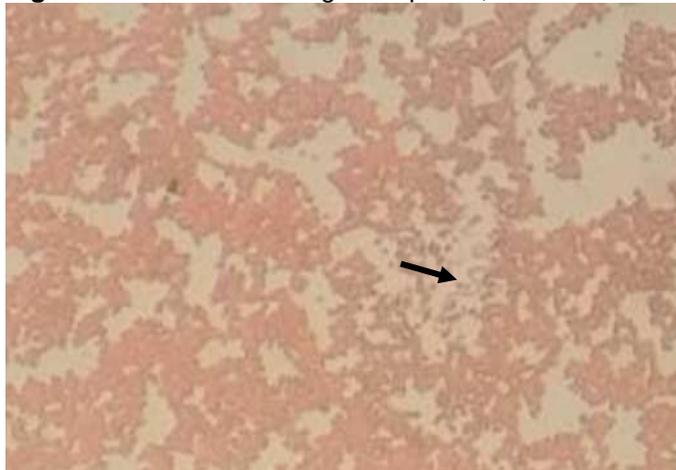
Fonte: Arquivo pessoal

Segundo Milonakis *et al*, (2004), a gota espessa apresenta sensibilidade de 100% apenas em microfílemias acima de 400 microfílaras por mL. Já Courtney e Zeng (2011), relatam que amostras com microfílemia acima de 50 microfílaras por mL, a gota espessa resulta em sensibilidade de 100%.

O objetivo, de acordo com Leite (2005) é visualizar o parasita em esfregaço de sangue a fresco e identificar o movimento realizado pela microfílaria na camada de células sanguíneas. As microfílaras de *D. immitis* possuem movimento serpentiforme e estacionário. Falsos negativos podem ocorrer em infecções ocultas ou em animais com baixa microfílemia. Em um estudo realizado por Courtney e Zeng (2011) esta técnica demonstrou que a sensibilidade deste teste geralmente aumenta conforme o valor de microfílemia.

Na imagem 3, podemos observar, na ponta da seta, uma microfílaria com movimento serpentiforme, pelo método da gota espessa.

Figura 3 – Microfílaria em gota espessa, aumento de 10x



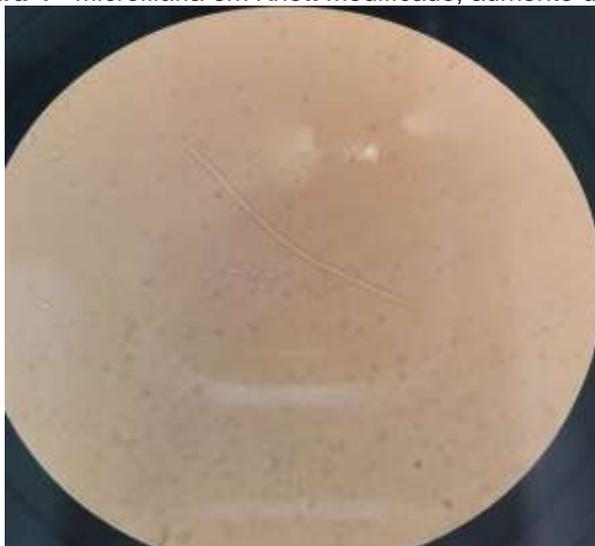
Fonte: Arquivo pessoal

Para, Schrey & Trautvetter (1998) o teste de Knott modificado é o teste de eleição para observar a morfologia, mensurar dimensões corporais do parasita, e

para diferenciar a *D. immitis* de outras espécies de microfilárias não-patogênicas como *Acanthocheilonema* (anteriormente *Dipetalonema*) *reconditum*. Em um estudo realizado por Courtney e Zeng (2011) esta técnica detectou microfilárias em 52,3% de animais com infecção por *D. immitis* confirmada através de necropsia.

Na imagem 4, podemos visualizar a microfilária pela técnica do Knott modificado.

Figura 4 - Microfilária em Knott Modificado, aumento de 40x



Fonte: Arquivo pessoal

6. CONCLUSÃO

A incidência de *D. immitis* em cães, avaliados aleatoriamente no Hospital Mario Dias Teixeira (HOVET-UFRA) no período de abril a maio de 2019, identificou e caracterizou o local como uma área endêmica para a doença. Por meio dos resultados, foi possível observar uma maior prevalência em cães com idade superior a 9 anos. Quanto ao sexo, as fêmeas apresentaram um maior índice de positividade em relação aos machos. No que diz respeito às raças, não foi encontrado nenhum indicativo de predileção da *Dirofilaria immitis* por animais com ou sem raça definida.

Esse alto índice de infecção se deve ao fato da nossa região possuir todas as características necessárias para ocorrência da transmissão de filarioses caninas, devido ao clima, desmatamento acelerado e falta de saneamento básico. Com isso, a realização de estudos epidemiológicos é de extrema importância para permitir a identificação de áreas endêmicas para a doença e instituição de tratamento profilático conforme necessário.

Todos os testes parasitológicos e sorológicos foram satisfatórios para a pesquisa da *D. immitis*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Filariasis zoonóticas. In: **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3.ed. Washington: OPS, 2003, v.3. p.284-291.
- AHID, S. M. M.; SARAIVA, L. Q. Ocorrência da filariose canina no Município de São Luís MA. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2, p.70, 1993.
- AHS. **What is heartworm?**. Disponível na Internet: <http://www.heartwormsociety.org/>. Acesso em: 30 maio 2019.
- AKST, L.M.; DIPASQUALE, B.; BERHO, M.; GREENE, D.; ROBERTS, J. Dirofilarial infection presenting as a facial mass: case report of an emerging zoonosis. **American Journal of Otolaryngology**, v.25, p.134-137, 2004.
- ALMEIDA, C. **Prevalência de dirofilariose felina na região do Sado**. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.
- ALMEIDA, M. A. O.; BARROS, M.T.G.; SANTOS, E.P.; AYRES, M.C.C.; GUIMARÃES, J.E.; Parasitismo de cães por microfírias de *Dirofilaria immitis*: influência da raça, sexo e idade. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 2, p.59-64, 2001.
- AMERICAN HEARTWORM SOCIETY. **AHSDIGITAL: Current Canine Guidelines for the Diagnosis, Prevention and Management of Heartworm Disease (*Dirofilaria immitis*) Infection in Dogs**. Jan. 2012. Disponível em: <http://www.heartwormsociety.org/>. Acesso em: 1 junho 2019
- AMERICAN HEARTWORM SOCIETY. **AHSDIGITAL: Current canine guidelines**. Dez. 2012. Disponível em: <http://www.heartwormsociety.org/veterinary-resources/canineguidelines>. Acesso em: 30 maio 2019
- AMERICAN HEARTWORM SOCIETY. **Prevention, diagnosis and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs**, 2014. <https://www.heartwormsociety.org/veterinary-resources/american-heartworm-societyguidelines>. Acesso: 11 Junho 2019
- BARBOSA, C.L.; ALVES, L.C. Dirofilariose canina: situação atual no Brasil. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 1, p.57-62, 2006.
- BIDGOOD, A.; COLLINS, G. H. The prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs in Sydney. **Australian Veterinary Journal**, v. 73, p.103-104, 1996.
- BOCARD, M.; HAMZÉ, A. L.; PACHECO, A. M. Dirofilariose na medicina veterinária. In: **Anais do XII simpósio de ciências aplicadas da FAEF**. Garça, v. 1, p.321 – 325, 2009.
- BOWMAN, D.; LITTLE, S.E.; LORENTZEN, L.; SHIELDS, J.; SULLIVAN, M.P.; CARLIN, E.P. 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**, v. 160, n. 1-2, p.138-148, 2009.

BOWMAN, D.D.; ATKINS, C.E. Heartworm biology, treatment, and control. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.**, v. 39: p.1127-1158, 2009.

BRANCO, A. S.; ALMEIDA, F. M.; FARIA, M. C. F.; DANTAS, L. M. S.; LABARTHE, N. V. *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1956) no entorno de um caso felino: um estudo sobre sua transmissão. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, Jaboticabal, v.18, n. 1, p.14-18, 2009.

BROWN, H.E.; HARRINGTON, L.C.; KAUFMAN, P.E.; MCKAY, T.; BOWMAN, D.D.; NELSON, C.T.; WANG, D.; LUND, R. Key factors influencing canine heartworm, *Dirofilaria immitis*, in the United States. **Parasite Vectors**, v. 5, p.255, 2012.

CALVERT, C. A.; RAWLINGS, C. A. *Dirofilariose Canina* in: GOODWIIN, J. K.; TILLER, L. P. **Manual de cardiologia para cães e gatos**. Rio de Janeiro: Guanabara, ed. 3, p.203 – 220, 2002.

CAMPILLO, M.; VAZQUEZ, F.; FERNANDEZ, A.; ACEDO, M.; RODRIGUEZ, S.; LOPEZ-COZAR, I.; BAÑOS, P.D.; ROMERO, H.Q.; VARELA, H.C. **Parasitologia Veterinária**. 1.ed. Aravaca: McGraw-Hill-Interamericana de Espanha, 1999, p.113 - 114, 679 – 689.

CANCRINI, G.; GABRIELLI, S. Vectors of *Dirofilaria* nematodes: biology, behaviour and host/parasite relationships. **Mappe Parassitologiche**. P.47-58, 2007.

CARDOSO, L.; MENDAO, C.; DE CARVALHO, L. M. 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. **Parasite Vectors**, v. 5, p.62, 2012.

CASTRIC, C. A. F. **Mise au point sur le diagnostic et le traitement de la dirofilariose cardiopulmonaire et de l'angiostrongylose canines**. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – École Nationale Vétérinaire D'Alfort, Paris, 2002.

CHAME, M.; SANTOS, A. L. B.; BRANDAO, M. L. As migrações humanas e animais e a introdução de parasitas exóticos invasores que afetam a saúde humana no Brasil. **Fundamentos**, v. 7, p.47-62, 2007.

CIRIO, S. M. **Epidemiologia e clínica de cães portadores de dirofilariose em espaços urbanos do município do litoral do Paraná e aspectos da histologia de *Culex quinquefasciatus* say, 1823 (Diptera, Culicidae)**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

COURTNEY, C.H.; ZENG, Q.Y. Relationship between microfilaria count and sensitivity of the direct smear for diagnosis of canine dirofilariosis. **Veterinary Parasitology**, v. 94, n. 3, p.199-204, 2011.

DATZ, C. Update on Canine and Feline Heartworm Tests. **Compendium**, v. 25, n. 1, p.30-41, 2003.

DE ARGÔLO EGG, REIS T, FONTES DAT, GONÇALVES EC, GIESE EG, MELO FTDV, et al. (2018) **Canine filariasis in the Amazon: Species diversity and epidemiology of these emergent and neglected zoonoses**. PLoS ONE 13(7): e0200419. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200419>. Acesso: 11 de junho 2019

DRAKE J, PARRISH RS. (2019) **Dog importation and changes in heartworm prevalence in Colorado 2013-2017**. Parasit Vectors. 12(1):207. 6 de Maio, 2019; doi: 10.1186/s13071-019-3473-0. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31060572> . Acesso: 11 de Junho 2019

FERNANDES, C. G. N.; MOURA S. T.; DIAS A. R.; VIEIRA FILHO W. S. Ocorrência de dirofilariose canina na região da Grande Cuiabá, Estado de Mato Grosso - Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n.5, p.258-261, 1999.

FERNANDES, C. G. N.; RODRIGUES, R. MOURA.; R, OLIVEIRA. S. T.; REGINA, M. F. Aspectos epidemiológicos da dirofilariose canina no perímetro urbano de Cuiabá, Mato Grosso: emprego do “Immunoblot” e do teste de Knott modificado. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n.6, p.1-10, 2000.

FERRÃO, J. R. S. S. **Prevalência da dirofilariose canina em sete concelhos da região do Algarve**. Dissertação (Mestrado Integrado em medicina Veterinária) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2018.

FERREIRA, A. F.; BARBOSA, F. C.; MASTRANTONIO, E. C. Ocorrência da dirofilariose canina na cidade de Uberlândia, MG, Brasil. **Veterinária notícias, Uberlândia**, v. 5, n. 1, p.57-61, 1999.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. Editora: ícone. Ed.3º, p.404-415, 1997.

GARCEZ, L M.; SOUZA, N.F.; MOTA, E. F.; DICKSON, L. A. J.; ABREU, W. U.; CAVALCANTI, V. F. N.; GOMES, P. A. F. Focos de dirofilariose canina na Ilha do Marajó: um fator de risco para a saúde humana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p.333-336, 2006.

GENCHI, C.; RINALDI, L.; CASCONI, C.; MORTARINO, M.; CRINGOLI, G. Is heartworm disease really spreading in Europe? **Veterinary Parasitology** v. 133, p.137-148, 2005.

GENCHI, C.; RINALDI, L.; CRINGOLI, G. *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections. **MappeParassitologiche**, 2007. p139-144, 2007.

GENCHI, C.; VENCO, L.; GENCHI, M. Guideline for the laboratory diagnosis of canine and feline *Dirofilaria* infections. In: GENCHI, C.; RINALDI, L.; CRINGOLI, G. ***Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections**. Mappe Parassitologiche, 2007. p.139-144.

GOMES, B. **Doenças parasitárias do cão transmitidas por insectos culicídeos e psicodídeos no funchal e em barcelona**. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.

GONZALES, J. A. **Seroprevalencia de la dirofilariosis y ehrlichiosis canina en los distritos de Chorrillos, La Molina y San Juan de Miraflores. 2002.** Tese (Doutorado) - Universidade Nacional Mayor de San Marcos, Lima, 2002.

GUERRERO, J.; DUCOS, H. J.; GENCHI, C.; ROJO, F.; GOMEZ-BAUTISTA, M.; VARELA, M. C. Update on the distribution of *Dirofilaria immitis* in dogs from Southern Europe and Latin America. *In: Heartworm Symposium*. Batavia, 1992, p. 31-37.

HOCH, H.; STRICKLAND, K. Canine and feline dirofilariosis: life cycle, pathophysiology, and diagnosis. **Compend Contin Educ Vet.**, v. 30, p.133-40, 2008.

HOCK, H.; STRICKLAND, K. Canine and Feline Dirofilariosis: Prophylaxis, Treatment, and Complications of Treatment. **Compendium**, v. 30, n. 3, p.133-141, 2008.

JAFARI, S.; GAUR, S. N. S.; KHAKSAR, Z. Prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs of Fars province of Iran. **Journal of Applied Animal Research**, v. 9, p.27-31, 1996.

KIM, M.K. The first human case of hepatic dirofilariosis. **Journal of Korean Medical Science**, v. 5, p.686-690. 2002.

KNAUER, K.W. Human dirofilariosis. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.13, p.96-98, 1998.

KOZEK, W. J. Prevalence of canine filariae in Puerto Rico and the Caribbean. *In: Simpósio Heartworm*, Batavia, p.55- 64, 1995.

LABARTHE, N.; ALMOSNY, N.; GUERRERO, J.; DUQUE-ARAÚJO, A. M. Description of the occurrence of canine dirofilariosis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, p.47-51, 1997.

LARSSON, M. H. M.; IWASAKI, M.; FERNANDES FILHO, A.; DERRICO, A. A.; OGASSAWARA, S.; DUTRA, L. F. Contribuição do diagnóstico clínico da dirofilariose canina. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 24, p.47-59, 1987.

LEE, J. C.; LEE, C. Y.; SHIN, S. S.; LEE, C. G. A survey of canine heartworm infections among German shepherds in South Korea. **Korean J. Parasitol.**, v. 34, p.225-231, 1996.

LEITE, L. C. **Mosquitos (Diptera, Culicidae) vetores potenciais de *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) em Guaratuba, Paraná.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

LITSTER, A.; ATKINS, C.; ATWELL, R.; BUCHANAN, J. 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**, v. 7, n. 1, p33-40, 2005.

LITTLE SE, MUNZING C, HEISE SR, ALLEN KE, STARKEY LA, JOHNSON EM, MEINKOTH J, REICHARD MV. **Pre-treatment with heat facilitates detection of antigen of *Dirofilaria immitis* in canine samples.** *Vet Parasitol.* 2014;203:250–2.

MAGALHÃES, P.S. Descrição de uma espécie de filarias encontradas no coração humano. **Revista de Cursos Práticos e Teóricos da Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro**, v.3, p129-215, 1887.

MANFREDI, M. T.; DI CERBO, A.; GENCHI, M. Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats. In: ***Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections**. Mappa Parassitologica 8, p.41-45, 2007.

MARTIN T. E. & COLLINS G. H.; **Prevalence of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* in greyhounds**. Australian veterinary journal. 62 (5): 159-163, 1985.

MONTOYA J. A.; MORALES M., FERRER O.; MOLINA J. M.; CORBERA J. A. The prevalence of *Dirofilaria immitis* in Gran Canaria, Canary Islands, Spain (1994–1996). **Veterinary Parasitology**, v. 75, p.221-226, 1998.

MORCHÓN, R.; CARRETÓN, E.; GONZALES-MIGUEL, J.; MELLADOHERNANDÉZ, I. Heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) and their vectors in Europe – New distribution trend. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p.1-11, 2012.

MUNICHOR, M.; GOLD, D.; LENGY, J.; LINN, R.; MERZBACH, D. An unusual case of *Dirofilaria conjunctivae* infection suspected to be malignancy of the spermatic cord. **Israel Medical Association Journal**, v.3, n.11, p.860-861, 2001.

MYLONAKIS, M.E.; PAPADOPOULOS, E.; KOUTINAS, A.F.; PAITAKI, C.; LEONTIDES, L. Comparative methodology for the detection and differentiation of circulating microfilariae of *Dirofilaria immitis* in the dog. **Journal of Helminthology**, v. 78, p.137–140. 2004.

NELSON, C. T. *Dirofilaria immitis* in Cats: Anatomy of a Disease. **Compend Contin Educ Vet.**, v. 30, p.382-389, 2008.

NELSON, R. W.; COUTO, C. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 2º ed, 1998, p. 127 - 139.

NISSEN, M.D.; WALKER, J.C. *Dirofilaria immitis*. **Medicine Journal**, v.4, n.2, 2003.

OGAWA, G. M. **Prevalência de *Dirofilaria immitis* (Leyd,1856) em cães e sua ocorrência em mosquitos (Diptera, Culicidae) na cidade de Porto Velho, Rondônia, Brasil**. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

OTRANTO, D.; CAPELLI, G.; GENCHI C. Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniosis vs. *Dirofilaria immitis*. **Parasit Vectors**, v. 26, p.2, 2009.

PAMPIGLIONE, S.; RIVASI, F.; ANGELI, G.; BOLDORINI, R.; INCENSATI, RM.; PASTORMERLO, M.; PAVESI, M.; RAMPONI, A. *Dirofilaria immitis* due to *Dirofilaria repens* in Italy, an emergent zoonosis: report of 60 new cases. **Histopathology**, v.38, p.344-354, 2001

SCHREY, C. F., TRAUTVETTER, E. Canine and Feline Heartworm Disease – Diagnosis and Therapy. **Waltham Focus**, v. 8, n. 2, p.23-30, 1998.

SCHREY, C.; TRAUTVETTER, E. Diagnosis and Therapy. **Waltham Focus**, v. 8, n. 2, p.23-30, 1998.

SCHWAN, E. V.; DURAND, D. T. Canine filariosis caused by *Dirofilaria immitis* in Mozambique: a small survey on the identification of microfilarie. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 73, p124-126, 2002.

SELBY, L.A.; CORWIN, R.M.; HAYES Jr, H.M. Risk factors associated with canine heartworm infection. **Journal of American Veterinarian Medical Association**. Schaumburg, v. 176, n. 1, p. 33-35, Jan. 1980.

SILVA, R.C.; LANGONI, H. *Dirofilariose*: zoonose emergente negligenciada. **Ciência Rural**. v. 39, n. 5, p.1614-162. 2009.

SIMÓN, F.; KRAMER, LH.; ROMÁN, A.; BLASINI, W.; MORCHÓN, R.; MARCOS-ATXUTEGI, C.; GRANDI, G.; GENCHI, C. Immunopathology of *Dirofilaria immitis* infection. **Veterinary Research Communication**, v.31, p.161-171, 2007.

SLOCOMBE, J. O. D. Reflections on heartworm surveys in Canada over 15 years. *In: Heartworm Symposium*. Batávia, p. 21-30, 1992.

SOUZA, N. F.; BENIGNO, R. N. M.; FIGUEIREDO, M.; SALIM, S. K.; SILVA, D.; GONÇALVES, R.; PEIXOTO, P. C.; SERRA-FREIRE, N. M. Prevalência de *Dirofilaria immitis* em cães no município de Belém, PA, com base na microfilaremia. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, p. 83-86, 1997.

TANAKA, H.; WATANABE, M.; OGAWA, Y. Parasites of stray dogs and cats in the Kanto region, Honshu, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 771, p.657-661, 1985.

TZIPORY, N. P.; CRAWFORD C.; LEVY J. K.; Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* in pet dogs, racing greyhounds, and shelter dogs in Florida. **Veterinary Parasitology**, v. 171, p.136-139, 2010.

URQUHART, G.M. **Parasitologia Veterinária**. 2 ed. Ed. Guanabara, São Paulo, 1996. p. 77-79.

VENCO, L. Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs. *In: GENCHI, C.;*

VEZZANI, D.; EIRAS, D. F.; WISNIVESKY, C. **Dirofilariasis in Argentina: historical review and first report of *Dirofilaria immitis* in a natural mosquito population**. *Vet. Parasitol.* , v. 136, p. 259-273, 2006.

WARE, W. A. Heartworm Disease. *In: NELSON, R. W., COUTO, C. G. Small Animal Internal Medicine*. Estados Unidos: Editora Elsevier, 2009. p. 169-183.

WU, C. C.; FAN, P. C. Prevalence of canine dirofilariasis in Taiwan. **Journal of Helminthology**, v. 77, p.83-88, 2003.

YILDIRIM, A.; ICA, A.; ATALAY, O.; DUZLU, O.; INCI, A. Prevalence and Epidemiological aspects of *Dirofilaria immitis* in dogs from Kayseri Province, Turkey. **Research in Veterinary Science**, v. 82, n. 3, p. 358-363, 2007.