



**UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DO  
MARANHÃO**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**SUELLEN DE ARAÚJO BARBOSA**

**DETECÇÃO E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE FILARÍDEOS EM CÃES NA  
REGIÃO METROPOLITANA DE SÃO LUÍS-MA**

**SÃO LUÍS  
2021**

**SUELLEN DE ARAÚJO BARBOSA**

**DETECÇÃO E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE FILARÍDIOS EM CÃES NA  
REGIÃO METROPOLITANA DE SÃO LUÍS-MA**

Dissertação apresentada à Banca do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador (a): Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Andréa Pereira da Costa

SÃO LUÍS  
2021

Barbosa, Suellen de Araújo.

Detecção e aspectos epidemiológicos de filarídeos em cães na região metropolitana de São Luís - MA / Suellen de Araújo Barbosa. – São Luís, 2021.

67 f

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2021.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Pereira da Costa.

1.Cão. 2.Parasita. 3.Filarioses. I.Título.

CDU: 636.7:616.995.132(812.1)

**Elaborado por Giselle Frazão Tavares - CRB 13/665**

**SUELLEN DE ARAÚJO BARBOSA**

**DETECÇÃO E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE FILARÍDIOS EM CÃES NA  
REGIÃO METROPOLITANA DE SÃO LUÍS-MA**

Dissertação apresentada à Banca do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Andrea Pereira da Costa  
Orientadora PPGCA - UEMA

---

Prof. Dr. Herbert Sousa Soares  
1º Membro - UNISA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Rita de Maria Seabra Nogueira  
2º Membro PPGCA - UEMA

Dedico esta dissertação a minha mãe, Eliy Pereira de Araújo. Ninguém um dia recebeu mais amor, dedicação e apoio incondicional do que eu tive de você.

## AGRADECIMENTOS

Ao concluir mais uma etapa deste sonho, recordo-me de muitas pessoas a quem devo ressaltar meus sentimentos de gratidão, pois, esta conquista concretiza-se com a ajuda de cada uma delas, que de algum modo, fizeram parte da minha vida. Posso dizer que vocês deram um sentido especial aos meus dias e esperança para que eu chegasse até o fim desta etapa.

Em primeiro lugar agradeço a Deus, fonte de vida e libertação, que me envolve diariamente no seu amor e me faz acreditar que viemos a este mundo com algumas missões. Estas missões são também chamadas de vocações, crença essa que me mantém em pé todos os dias da minha vida.

A todos da minha família, que me incentivaram a seguir em busca da realização dos meus sonhos. Em especial a minha mãe, a quem dedico esta dissertação, pelo apoio e amor incondicional dedicado a mim. “In memoriam” ao meu pai, que por “interferências indébitas” da vida não está neste momento fisicamente, embora tenho certeza que está olhando por mim onde quer que esteja.

Agradeço aos tios-padrinhos Enilde e Bento, pela dedicação, por contribuírem com meu crescimento pessoal, intelectual, por me darem a oportunidade de estudar em boas escolas e torcerem pelo meu sucesso.

Ao tio Carlos e tia Rozangela (Tia Rosa), por estarem sempre presentes na partilha de minhas conquistas, frustrações, pela força e ajuda em todos os momentos que precisei.

A todos meus tios e primos que de algumas formas me incentivaram, seja por uma palavra, mensagem ou gesto de carinho e apoio.

Aos meus avós maternos (Albertino e Julia) pelo amor e por me ensinarem a encontrar a felicidade nas coisas simples da vida.

As minhas avós Lindalva e Dalva, por todo amor e conselhos. “In memoriam” ao meu avô Antônio, aproveito também para agradecer-lo, esteja onde estiver, seu jeito e ensinamentos serão guardados.

Ao meu namorado Erivaldo Alves, por toda paciência, compreensão, incentivo e amor, e por me ajudar muitas vezes a achar soluções quando elas pareciam não ter.

A minha cadelinha Lilica, por ser minha fiel companheira durante 12 anos, por ser algumas vezes minha cobaia, pelo seu amor sincero e pelas coisas que aprendi com ela e que ainda levo como lição dia após dia.

A todos os meus amigos, colegas do programa de pós-graduação, conhecidos e anônimos, onde quer que estejam meu muito obrigado. As amizades que fiz com a convivência durante

os anos de curso, seja pelos corredores, grupos de estudos, agradeço pelo carinho e por compartilhar as experiências da vida acadêmica.

As colegas Jéssica, Brenda, Maria Beatriz, pela ajuda imprescindível nas coletas e nos preenchimentos dos questionários. Dias cansativos, mas gratificantes.

A colega Daniele pelo grande apoio e auxílio durante a realização das técnicas moleculares para obtenção dos resultados e conclusão da pesquisa.

A minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Andréa Pereira da Costa por todo ensinamento, paciência e incentivo que foram fundamentais para realizar e prosseguir este estudo.

Ao Prof. Dr. Francisco Borges Costa pela ajuda nas coletas e por ser sempre prestativo.

A Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Rita de Maria Seabra Nogueira por todos os ensinamentos passados, pelas correções, incentivo e colaboração nos trabalhos de pesquisa.

Ao laboratório de Biologia Molecular e Parasitologia do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, pela disponibilização dos equipamentos.

A todos os professores do curso de Mestrado em Ciência Animal que contribuíram direta ou indiretamente neste trabalho.

A Francisca Silva Araújo, que sempre esteve disposta em vários momentos que recorri a sua ajuda.

Gostaria também de agradecer a banca examinadora que dividiu comigo este momento e por ceder parte do seu tempo para contribuir com o nosso trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão- FAPEMA, pela bolsa concedida.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio ao longo da pesquisa

Enfim, a todos aqueles que me ajudaram e por um lapso de memória deixei de citar, muito obrigada!

## RESUMO

As filaríoses caninas são enfermidades causadas por parasitas nematóides filariais que pertencem a ordem Spirurida. Dentre os envolvidos, *Acanthocheilonema reconditum* e *Dirofilaria immitis* são os filarídeos caninos mais prevalentes no Brasil. *A. reconditum* é um parasita que habita os tecidos subcutâneos, perirrenal e cavidade peritoneal de canídeos e que são transmitidos através de picadas de pulgas. Baseado no escasso número de publicações sobre o assunto e devido ao pouco destaque dado pelos médicos veterinários do país, a infecção por esse filarídeo ainda é subestimada. *D. immitis*, agente etiológico da dirofilariose, é um parasita que causa infecção grave e potencialmente letal aos cães. É transmitido aos hospedeiros por culicídeos, com destaque para os gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex*. Devido ao seu potencial zoonótico, a dirofilariose vem despertando interesse em saúde pública. O objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento da ocorrência de filarídeos em cães residentes na cidade de São Luís, estado do Maranhão. O estudo foi desenvolvido a partir de amostras sanguíneas de cães atendidos Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Maranhão, em clínicas veterinárias particulares e em domicílio. Os fatores de risco associados à transmissão do parasita, também foram avaliados com base em questionário epidemiológico. Amostras sanguíneas de 103 cães foram submetidas à pesquisa de microfíliarias por meio da técnica da Gota espessa, Método de Knott modificado e detecção de antígenos de *D. immitis*, por imunocromatografia de fluxo lateral. As amostras também foram submetidas a detecção molecular pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e sequenciamento para diferenciação e confirmação da espécie. Oito amostras (6,9%) foram positivas quanto a presença de filarídeos, das quais seis amostras (5,8%) foram detectadas pela técnica da Gota espessa, seis (5,8%) pelo Método de Knott modificado, sete (6,7%) pelo teste imunocromatográfico (Alere Dirofilariose Ag Test Kit) e sete (6,7%) pela Reação em cadeia da polimerase (PCR). Após análise dos dados, seis amostras apresentaram identidade com *D. immitis* e uma amostra foi positiva para a espécie *A. reconditum*, o que confirmou pela primeira vez a circulação deste parasita na cidade de São Luís- MA. Os resultados demonstraram também que as características ligadas aos cães e condições ambientais associadas aos vetores, bem como a falta de conhecimento da população, representam os principais fatores de risco para a disseminação de filaríoses caninas.

Palavras-chave: Cão, Parasita, Filaríoses.



## ABSTRACT

Canine filariasis are diseases caused by filarial nematode parasites that belong to the order Spirurida. Among those involved, *Acanthocheilonema reconditum* and *Dirofilaria immitis* are the most prevalent canine filarids in Brazil. *A. reconditum* is a parasite that inhabits the subcutaneous, perirenal and peritoneal cavity tissues of dogs and is transmitted through flea bites. Based on the scarce number of publications on the subject and due to the little attention given by veterinarians in the country, an infection by this filarid is still underestimated. *D. immitis*, the etiologic agent of heartworm disease, is a parasite that causes severe and potentially lethal infection in dogs. It is transmitted to hosts by Culicidae, with emphasis on the genera *Aedes*, *Anopheles* and *Culex*. Intended for its zoonotic potential, a heartworm disease has been arousing interest in public health. The objective of this work was to carry out a survey of the occurrence of filarids in dogs residing in the city of São Luís, state of Maranhão. The study was developed from the blood of dogs treated at the Veterinary Hospital of the State University of Maranhão, in veterinary clinics and at home. Risk factors associated with the transmission of the parasite were also collected based on an epidemiological questionnaire. Blood samples from 103 dogs were submitted to microfilariae investigation using the Thick Drop technique, modified Knott method and detection of *D. immitis* antigens by lateral flow immunochromatography. The exposed ones were also subjected to molecular detection by the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique and sequencing for differentiation and confirmation of the species. Eight (6.9%) were positive for the presence of filarids, of which six (5,8 %) were detected by the thick drop technique, six (5,8 %) by the modified Knott method, seven (6,7 %) by immunochromatographic test (Kit Alere Dirofilariasis Ag Test) and seven (6,7 %) by Polymerase Chain Reaction (PCR). Data analysis collected the new identity with *D. immitis* and a sample was positive for a species *A. reconditum*, which confirmed for the first time the circulation of this parasite in the city of São Luís-MA. The results also showed that the characteristics linked to dogs and environmental conditions associated with the vectors, as well as the lack of knowledge of the population, represent the main risk factors for the spread of canine filariasis.

Keywords: Dog, Parasite, Filariasis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1-** Mapa mundial da prevalência de *Dirofilaria immitis* em cães por continente. 29
- Figura 2-** Mapa de localização da região metropolitana de São Luís. 37
- Figura 3 -** Teste imunocromatográfico Alere Dirofilariose Ag Test Kit. A presença de duas linhas coloridas (C e T) na janela indica resultado positivo. A presença somente da linha C na janela, indica resultado negativo. 39
- Figura 4-** Microfilárias recuperadas de cães da região Metropolitana de São Luís. A: Microfilária de *Dirofilaria immitis* detectada por Teste de Knott. B: Microfilária de *Acanthocheilonema reconditum* detectada por Teste de Knott. 43
- Figura 5-** Eletroforese em gel de agarose 1,5% representando os produtos de amplificação via PCR da região 12S do gene rDNA de filarídeos extraídos de amostras de sangue canino. M: Marcador de peso molecular Loading Buffer (6x); Amostras positivas (canaletas 2 e 11); Amostras negativas (canaletas 1 / 3-10/ 12-15); Controle negativo: 16. 44
- Figura 6 -** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos amplificados por PCR da região 12S do gene rDNA de filarídeos extraídos de amostras de sangue canino. M: Marcador de peso molecular Loading Buffer (6x); Amostras positivas (canaletas 1-5); Controle negativo: 6. 44
- Figura 7:** Granulomas na face lateral da língua de cão infectado com *Acanthocheilonema reconditum*. 47
- Figura 8:** Imagem de exame citológico de nódulos linguais com presenças de microfilárias. Imagem de exame histopatológico apresentando áreas de necrose e degeneração hidrópica de epitélio (glossite crônica). 48

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Ocorrência de cães positivos para filarídeos, atendidos no Hospital Veterinário Universitário “Edilberto Uchoa Lopes”, em clínicas veterinárias e em domicílio, na cidade de São Luís- MA. 43
- Tabela 2** – Análise univariada (teste Qui-quadrado) das associações entre variáveis independentes e presença ou ausência de animais positivos para filarídeos, independente do teste em cães residentes no município de São Luís, Maranhão. 51

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACES

PCR	Reao em cadeia da polimerase
MEV	Micrografia eletrônica de varredura
L1	Larvas de <i>Dirofilaria immitis</i> no primeiro estdio de desenvolvimento
L2	Larvas de <i>Dirofilaria immitis</i> no segundo estdio de desenvolvimento
L3	Larvas de <i>Dirofilaria immitis</i> no terceiro estdio de desenvolvimento
L4	Larvas de <i>Dirofilaria immitis</i> no quarto estdio de desenvolvimento
AHS	American Heartworm Society
EDTA	cido etileno-diamino-tetracético
DNA	cido desoxirribonucleico
CEEA	Comitê de tica e Experimentação Animal
H2O	gua
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
mL	Mililitros
mm	Milímetros

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	14
2 OBJETIVOS .....	16
2.1 Geral .....	16
2.2 Específicos .....	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO .....	17
3.1 Filarioses caninas.....	17
3.2 <i>A. reconditum</i> .....	17
3.2.1 Morfologia.....	18
3.2.2 Ciclo biológico de <i>A. reconditum</i> .....	18
3.2.3 Patogenia e sinais clínicos.....	19
3.2.4 Epidemiologia .....	19
3.3 <i>D. immitis</i> .....	20
3.3.1 Etiologia e morfologia .....	21
3.3.2 Ciclo biológico de <i>D.immitis</i> .....	23
3.3.3 Fisiopatogenia .....	23
3.3.4 Sinais clínicos.....	25
3.3.5 <i>D. immitis</i> em hospedeiros domésticos, silvestres e humanos .....	26
3.3.6 Epidemiologia da Dirofilariose .....	28
3.3.7 Diagnóstico.....	30
3.3.7.1 Pesquisa de microfilárias .....	30
3.3.7.2 Pesquisa de antígenos .....	32
3.3.7.3 Detecção Molecular pela Reação em cadeia da polimerase – PCR.....	33
3.3.7.4 Diagnóstico por imagem.....	33
3.3.8 Tratamento .....	34
3.3.9 Profilaxia .....	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 Comitê de Ética .....	37
4.2 Área de estudo .....	37
4.3 Obtenção das amostras.....	38
4.4 Questionário .....	38
4.5 Análises laboratoriais.....	38
4.5.1 Técnica da gota espessa .....	38

4.5.2 Teste de Knott modificado .....	39
4.5.3 Teste imunocromatográfico.....	39
4.5.4 Extração de DNA genômico .....	40
4.5.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	40
4.5.6 Sequenciamento de nucleotídeos.....	41
4.5.7 Análise estatística.....	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1 Detecção e caracterização molecular das amostras de filarídeos .....	42
5.2 Características dos cães .....	45
5.3 Sinais clínicos dos animais investigados .....	46
5.4 Fatores ambientais .....	48
5.5 Conhecimento sobre dirofilariose e o uso de práticas profiláticas .....	50
6 CONCLUSÃO .....	53
REFERÊNCIAS.....	54

## 1 INTRODUÇÃO

As filaríoses caninas são enfermidades causadas por parasitas nematóides filariais pertencentes à ordem Spirurida (LAIDOUDI et al., 2020). Dentre os nematódeos filarídeos que parasitam os cães, há espécies consideradas pouco patogênicas, enquanto outras podem causar óbito, além de representarem um potencial zoonótico (KANNENBERG et al., 2019). Esses parasitas têm como características possuir tropismo por tecidos específicos de seus hospedeiros e pela dependência de um hospedeiro invertebrado hematófago para completar seu ciclo vital (RANI et al., 2010a). Em diversas regiões do mundo, assim como no Brasil, *Dirofilaria immitis* e *Acanthocheilonema reconditum* são os filarídeos que apresentam maior prevalência (RAMOS et al., 2016; LABARTHE et al., 2014), sendo a *D. immitis* a mais conhecida em decorrência de seu caráter epidemiológico e patogênico (GOMES, et al., 2012). Estes parasitas ocorrem simultaneamente em diversas regiões geográficas e liberam microfílarias na circulação sanguínea de seus hospedeiros naturais (ATKINS, 2010).

*A. reconditum*, antigamente denominado *Dipetalonema reconditum* é um parasita que habita os tecidos subcutâneos, região perirrenal e cavidade peritoneal de canídeos (TAYLOR, et al., 2007) e são transmitidos através de picadas de pulgas, piolhos e carrapatos (*Ctenocephalides canis*, *Ctenocephalides felis*, *Pulex irritans*, *Trichodectes canis*, *Heterodoxus spiniger* e *Rhipicephalus sanguineus*) (CRINGOLI et al., 2001; TAYLOR et al., 2007; TORRES et al., 2007; BRIANTI et al., 2012), causando a Acanthocheilonemose, uma enfermidade, que embora não traga consequências patológicas graves para os seus hospedeiros, causa uma infecção transitória, ulcerações cutâneas e abscessos subcutâneos. Apesar de ser clinicamente menos importante em cães (FERASIN; VENCO, 2016), a identificação desses parasitas é de grande relevância, por favorecer a conduta no tratamento e um prognóstico mais assertivo (KANNENBERG et al., 2019).

*D. immitis* é o agente etiológico da dirofilariose, enfermidade que causa danos frequentes à saúde dos cães, principalmente em zonas costeiras nas regiões tropicais e subtropicais (VIEIRA, 2019). Popularmente conhecida como “doença do verme do coração” (PIMENTEL et al., 2013), a dirofilariose canina é uma infecção grave e potencialmente letal transmitida por gêneros de mosquitos culicídeos (*Culex*, *Aedes*, *Anopheles* e *Ochlerotatus*) (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2013a).

*D. immitis* também pode infectar os felinos e outras espécies selvagens, entretanto, essas infecções raramente se tornam patententes. Devido seu potencial zoonótico, o parasita vem despertando crescente preocupação em saúde pública (SILVA et al., 2019) uma vez que a

prevalência da infecção por *D. immitis* está associada a ocorrência da dirofilariose pulmonar humana (GARCEZ et al., 2006), sobretudo, pelas evidências de aumento de casos de dirofilariose canina no Brasil ao longo dos últimos anos (LABARTHE et al., 2014).

O Maranhão, principalmente a capital São Luís, possui características essenciais para a transmissão de filarioses caninas. Além de o clima favorecer o desenvolvimento biológico dos vetores, o desmatamento e a falta de saneamento básico aliados ao aumento desordenado da população de cães e gatos errantes, possibilitam a manutenção e disseminação de microfilárias entre os animais e o ser humano.

A ocorrência de filarídeos ainda é um tema pouco estudado no Maranhão, entretanto é essencial o diagnóstico diferencial considerando que a identificação específica faz-se necessária para estabelecer o tratamento adequado. Aliado a esse fato, a dirofilariose é a cardiopatia parasitária mais relevante em cães, assim, objetivou-se no presente estudo pesquisar a ocorrência de filarídeos na população de cães residentes na região metropolitana de São Luís, contribuindo para o entendimento dos aspectos epidemiológicos, e alertando sobre os eventuais fatores de riscos associados a essas parasitoses.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Investigar a ocorrência de filarídios em cães domiciliados residentes no município de São Luís - Estado do Maranhão, Brasil.

### **2.2 Específicos**

- Determinar a ocorrência de filarídeos por meio da pesquisa de microfilárias e da detecção de antígenos circulantes em cães domiciliados na região Metropolitana de São Luís- MA;
- Caracterizar através de técnicas moleculares os filarídeos identificados nos cães domiciliados;
- Avaliar os fatores de risco associados à filarioses em cães domiciliados na região Metropolitana de São Luís- MA;

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Filarioses caninas

As filarioses são causadas por diversos nematóides da família Onchocercidae, que frequentemente podem ser transmitidas por artrópodes e parasitam várias espécies de vertebrados como hospedeiros definitivos (ANDERSON, 2000).

As espécies mais relatadas em cães são *D. immitis*, *Dirofilaria repens* e *A. reconditum*, contudo há também relatos na literatura sobre infecções por *Acanthocheilonema dracunculoides*, *Cercopithifilaria grassii* (SCARAMOZZINO et al., 2005) e *Cercopithifilaria bainaie* (SOARES et al., 2020).

As filarioses caninas são relatadas em diversos locais do mundo, principalmente em regiões tropicais, devido à maior quantidade e diversidade de vetores (SIMÓN et al., 2012), e no caso da *D. immitis* e *A. reconditum*, podem apresentar distribuição geográfica semelhante (GOMES et al., 2012). Em relação aos casos de transmissão em humanos desses parasitas, a infecção ocorre com maior frequência em áreas com alta prevalência de hospedeiros caninos infectados (MEGAT ABD RANI et al., 2010).

#### 3.2 *A. reconditum*

*A. reconditum* (anteriormente *Dipetalonema reconditum*) foi relatado pela primeira vez por Grassi em 1889. No ano seguinte, Grassi e Calandruccio relataram as diferenças morfológicas entre *A. reconditum* e *D. immitis*, descrevendo as particularidades de uma fêmea imatura do helminto; estes mesmos autores também comprovaram que o parasita também é capaz de se desenvolver em pulgas (PACÍFICO et al., 2021).

Dados adicionais foram revelados por Noë em 1907, que descreveu outras características morfológicas, ao analisar espécimes adultos (machos e fêmeas) de *A. reconditum*. A característica morfológica adicional de microfíliarias de *A. reconditum* foi subsequentemente relatada por Newton e Wright em 1956. E estudos posteriores como os realizados por Bain e Beaucournu em 1974 e Korkejian e Edeson em 1978, elucidaram o ciclo de vida e complementaram a descrição do parasita (PACÍFICO et al., 2021).

### 3.2.1 Morfologia

Frequentemente, as microfilárias de *A. reconditum* são mais curtas do que as de *D. immitis* (MCCALL et al., 2008; BRIANTI et al., 2012; MAGNIS et al., 2013) e possuem 260 a 283  $\mu\text{m}$  de comprimento e 5 $\mu\text{m}$  de largura, já as de *D. immitis* apresentam de 290 a 330  $\mu\text{m}$  de comprimento e 5,0 a 7,0  $\mu\text{m}$  de largura (LÓPEZ et al., 2012). Além disso, elas caracterizam-se por apresentarem extremidade cefálica obtusa, com gancho cefálico proeminente, cauda em forma de botão e curvada (MCCALL et al., 2008).

Quanto aos adultos, os machos de *A. reconditum* medem em média cerca de 1,5 cm de comprimento e as fêmeas chegam a aproximadamente 2,5cm (TAYLOR et al., 2007). Nos machos encontram-se espículas desiguais em comprimento, com a espícula esquerda medindo 220 a 300  $\mu\text{m}$  (média de 248  $\mu\text{m}$  de comprimento), já a espícula direita de 92 a 104  $\mu\text{m}$  de comprimento e ausência de gubernáculo. Enquanto as fêmeas apresentam uma vulva logo atrás da junção da porção anterior e posterior do esôfago, localizada entre 680 a 930  $\mu\text{m}$  da extremidade anterior (LEVINE, 1968; NAPOLI et al., 2014).

### 3.2.2 Ciclo biológico de *A. reconditum*

Embora possua ampla distribuição geográfica e relato sobre sua descoberta em olho humano (HUYNH et al., 2001) ainda existem poucas informações disponíveis sobre o ciclo biológico do *A. reconditum*.

Para a transmissão do parasita é necessário a proximidade entre os cães infectados e não infectados (BRIANTI et al., 2012). O ciclo inicia-se quando as fêmeas adultas do helminto liberam microfilárias diretamente na corrente sanguínea, que são ingeridas por hospedeiros intermediários (BOWMAN, 2010). Dentre eles incluem pulgas (*Ctenocephalides canis*, *Ctenocephalides felis*, *Pulex irritans*, *Pulex simulans*, *Echidnophaga gallinae*), piolhos (*Heterodoxus spiniger*, *Linognathus setosus*) e carrapatos (*Rhipicephalus sanguineus*) (CRINGOLI et al., 2001; BRIANTI et al., 2012; NAPOLI et al., 2014). A duração do estágio das microfilárias L1 até chegar ao estágio infectante (L3) é de aproximadamente 7 a 14 dias (BOWMAN, 2010).

A transmissão do helminto acontece no momento que o vetor realiza o repasto sanguíneo, inoculando as larvas infectantes (L3) no hospedeiro definitivo (TAYLOR et al., 2007), que se desenvolve em verme adulto no período de 2 a 3 meses (BOWMAN, 2010).

A partir de estudo em cães experimentalmente infectados, evidências indicam que as microfilárias de *A. reconditum* podem ser encontradas no sangue periférico após um período pré-patente de 67 a 101 dias (LINDEMANN; MCCALL, 1984; BRIANTI et al., 2012). No hospedeiro definitivo canino, enquanto as microfilárias são encontradas predominantemente no sangue, os adultos deste nematóide habitam o tecido subcutâneo (HUYNH et al. 2001), onde estão localizados aproximadamente 90% destes filarídeos, enquanto outra pequena quantidade está situada na cavidade peritoneal (BOWMAN, 2010).

### 3.2.3 Patogenia e Sinais Clínicos

Segundo Otranto et al. (2013) *A. reconditum* é comumente conhecido como um parasita apatogênico, pois na maioria dos estudos não ocorre descrição e confirmação de doença clínica associada à infecção. Ou também é considerado com menor patogenicidade (RANI et al., 2010), visto que geralmente não é capaz de provocar sérias consequências para os seus hospedeiros (TAYLOR et al., 2007). Dentre as alterações patológicas causadas pelo parasita, já foi descrito por Lindemann et al. (1983) linfadenite mesentérica purulenta como resposta aguda em um cão infectado de forma experimental. Além disso, Pereira et al. (2004) também identificaram duas migrações erráticas em um cão apresentando parasitas adultos no coração (ventrículo esquerdo), associados a achados de broncopneumonia, com microfilárias nos alvéolos e outro cão com a presença de vermes adultos no ligamento do ovário, detectado através de procedimento de ovariectomia. Outras alterações clínicas esporádicas também relatadas devido a infecção por *A. reconditum*, incluíram nódulos inflamatórios supurativos subcutâneos em um canino com infecção natural (ENGELMANN et al., 2019).

Durante estudo realizado por Pacífico et al. (2021), em 71 cães microfilarêmicos com infecção única por *A. reconditum*, alguns sinais clínicos foram descritos, como: febre, desidratação, membranas mucosas congestionadas, perda de peso e intolerância ao exercício. Nos resultados do hemograma completo ainda revelaram alterações como anemia hipocrômica normocítica, trombocitopenia, trombocitose, leucocitose, linfocitose, linfopenia, neutropenia, basofilia, monocitose e eosinofilia. Alguns desses cães também apresentaram agregação plaquetária no exame microscópico de esfregaço sanguíneo.

### 3.2.4 Epidemiologia

*A. reconditum* é um helminto filarial distribuído mundialmente, mais prevalente em

cães, com relatos em várias regiões como na Ásia, África, América, Oceania e Europa, localizada principalmente na área do Mediterrâneo (OTRANTO et al., 2013). Segundo Ionică et al. (2014), a espécie *A. reconditum* em comparação *Dirofilaria* spp., parece estar mais adaptada a regiões secas e climas mais frios, embora seu desenvolvimento no vetor em relação à temperatura ou outros fatores climáticos ainda não foram avaliados. Este nematóide tem sido frequentemente relatado em cães e outros canídeos selvagens nas Américas. Porém, a maioria das informações disponíveis na literatura internacional refere-se a estudos conduzidos nos Estados Unidos (PATTON; FAULKER, 1992; THEIS et al., 2001) e em menor número nos países da América do Sul, como o Brasil (RAMOS et al., 2016; MORAES et al., 2017), Chile (LÓPEZ et al., 2012) e Costa Rica (ROJAS et al., 2015; SPRINGER et al., 2019).

Em revisão recente, Tahir et al. (2019) descreveram infecções por *Acanthocheilonema* (*A. reconditum* e *A. dracunculoides*), relatando a presença em cães e raposas na bacia do Mediterrâneo, incluindo o Oriente Médio e norte da África. Além dos cães domésticos, de acordo com estudos de Magnis et al. (2013), *A. reconditum* também já foi detectado em quatis, e, ocasionalmente, está associado a doenças em humanos.

Nos países da Europa, como Bélgica, Suíça e Holanda, apesar da detecção da presença de outras espécies de filarídeos, *A. reconditum* nunca foi relatado (OVERGAAUW; VAN DIJK, 2009; DE BOSSCHERE; KINDERMANS, 2019). No Brasil, a prevalência da infecção em cães domésticos ainda é subestimada, com poucos estudos demonstrando prevalências que variam de 0,6% a 22,6%, com maiores descrições da infecção em estudo realizado na região litorânea no Estado do Paraná (REIFUR et al., 2004).

### 3.3 *D. immitis*

*D. immitis* é uma espécie de nematódeo oriunda do continente Asiático, cujas evidências demonstraram a sua ocorrência em países banhados pelo mar Mediterrâneo e nas Américas, onde foi introduzida através de cães trazidos pela chegada dos primeiros imigrantes. Embora nas Américas existissem poucos exemplares de *Canis familiaris* na época da colonização, haviam outros canídeos selvagens que atuavam como hospedeiros definitivos e reservatórios para o parasita, como os lobos, coiotes e raposas, fazendo surgir condições para o estabelecimento de novos ciclos de transmissão (BOWMAN; ATKINS, 2009).

Em 1586, Chez Jean Wolfé realizou o esboço de um verme o qual denominou de “monstro”, ao encontrar um parasita no coração de um cavalo, que anos mais tarde, foi

caracterizado como *D. immitis* (POOLEY, 2014), no entanto, a primeira publicação sobre a descrição da espécie, foi realizada em 1847 pelo físico Osborne, ao confirmar a presença do parasita em um cão nos Estados Unidos (BOWMAN et al., 2009).

Em 1856, Joseph Leidy, no Estado do Alabama, também relatou a presença uma grande quantidade de vermes brancos detectados no coração e em grandes vasos sanguíneos de um cão (BOWMAN; ATKINS, 2009). O parasitologista foi o primeiro a classificar o agente etiológico como *Filaria* e mais tarde em 1911, Railliet e Henry renomeou o gênero como *Dirofilaria* e a espécie *D. immitis* (KNAUER, 1998).

No Brasil, em 1879, os primeiros casos de *D. immitis* em humanos foram descritos na Bahia, por Silva-Araújo (BARBOSA; ALVES, 2006) e no Rio de Janeiro, em 1887, por Magalhães, ao relatar dois vermes adultos de ambos os sexos no ventrículo esquerdo de um menino (KNAUER, 1998). Além de canídeos e humanos, o parasita também foi relatado pela primeira vez em gatos, no Brasil, em 1921, por Travassos (NELSON, 2008).

Devido à relevância do agente etiológico, tanto pelos agravos causados aos animais infectados, quanto à saúde da população humana, associado ao processo de interação entre animais domésticos e o ser humano, em 1979 a dirofilariose passou a ser reconhecida como zoonose pela Organização Mundial da Saúde (BARBOSA; ALVES, 2006; LIRA et al., 2012).

### 3.3.1 Etiologia e Morfologia

*D. immitis* (Leidy, 1856) representa o principal agente etiológico da dirofilariose em caninos. A enfermidade representa grande preocupação para a Medicina Veterinária e para a Saúde Pública devido aos agravos provocados nos animais domésticos, principalmente cães e gatos, e também por acometer os seres humanos (VIEIRA et al., 2014).

Segundo a classificação sistemática definida por Anderson (2000), este helminto pertence ao filo Nematoda, classe Secernentea, ordem Spirurida, superfamília Filarioidea, família Onchocercidae e subfamília Dirofilarinae.

A transmissão deste filarídeo ocorre por meio do repasto sanguíneo realizado por culicídeos. São descritas mais de 70 espécies da família Culicidae como potenciais vetores, entretanto, apenas 12 espécies têm sua capacidade vetorial comprovada (MORCHÓN et al., 2012), as quais dentre elas estão os gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* (SALGUEIRO, 2016). Como característica geral, o parasita possui o corpo alongado, filiforme, com extremidade cefálica levemente delgada e arredondada. Apresenta abertura oral terminal, circular, sem

lábios, rodeadas por 4 pares de pequenas papilas cefálicas e 2 anfídeos laterais. Os anfídeos possuem abertura basal em direção à região posterior do corpo e o esôfago segmentado em regiões musculares e glandulares, entretanto, sem delimitação evidente entre essas regiões. O nematódeo exibe pequenos deirídeos laterais localizados entre o anel nervoso e a junção esôfago intestinal, situados no centro da depressão cuticular, próximo à linha lateral. Os deirídeos caracterizam-se por uma forma filamentosa, base mais larga que o ápice, concavidade longitudinal e ápice trifurcado. A superfície corporal possui fina estriação transversal, com estriações cuticulares aleatórias na extremidade cefálica e na extremidade posterior das fêmeas (FURTADO et al., 2010).

Nos machos a apresentam as seguintes dimensões: 137,6 mm (119,4-162,3) de comprimento e 0,41 mm (0,3-0,5) de largura. Esôfago com 1,21 mm (1,08-1,46) de comprimento e 0,11 mm (0,09-0,13) de largura. Anel nervoso na extremidade anterior, localizado no primeiro terço do esôfago, apresentando 0,40 mm (0,35-0,47). Deirídeos voltados para a extremidade anterior com 0,57 mm (0,29-0,77), com área rugosa ventral extremidade posterior em espiral e cristas cuticulares paralelas de comprimento variado. Possuem papilas pré-cloacais pareadas e não pareadas em quantidades variadas (1 a 6), um pequeno par de papilas ad-cloacais situadas lateralmente à abertura cloacal e cinco pares de papilas pós-cloacais. Também exibem um par de fasmídeos localizados ventralmente entre os 2 últimos pares de papilas pós-cloacais, além de uma espícula grande 0,34 (0,31-0,39) presente no canal e formado por uma pequena espícula 0,17 mm (0,15- 0,19), ausência de gubernáculo e cauda com 0,10 mm (0,09- 0,11) (FURTADO et al., 2010).

Nas fêmeas medem 218,3 mm (177,0-272,0) de comprimento e 0,49 mm (0,40- 0,61) de largura. Possuem esôfago, anel nervoso e deirídios voltados para a extremidade anterior. Vulva localizada próxima à extremidade anterior e delimitada por lábios finos, sem papilas, da junção esôfago intestinal, ânus em direção à extremidade posterior, um par de fasmídeos látero-ventrais com aberturas circulares. Ovários didelfos (múltiplo) e opistodelfos (na porção posterior à vulva) (FURTADO et al., 2010).

Em relação as microfilárias, podem ser caracterizadas por extremidade cefálica fusiforme e extremidade caudal reta (ALHO et al., 2014). Estas formas jovens se diferenciam das adultas principalmente por possuírem menor tamanho e pela inexistência de gônadas e órgãos copuladores (REY, 2001).

### 3.3.2 Ciclo biológico de *D. immitis*

O parasita apresenta ciclo heteróxico e indireto. O ciclo inicia-se quando uma fêmea de díptero hematófago realiza o repasto sanguíneo em um animal infectado, ingerindo as larvas de primeiro estágio (L1). Após esse período, as larvas migram até os túbulos de Malpighi, onde se transformam em L2 e L3 (forma infectante). As larvas de terceiro estágio (L3) rapidamente migram pela cavidade corporal em direção a cabeça e aparelho bucal do mosquito, até que aconteça a sua transmissão (AHS, 2020).

Ao realizar novamente o repasto sanguíneo, o díptero elimina a hemolinfa contendo microfírias de terceiro estágio ou L3 (infectantes), as quais penetram na pele do hospedeiro definitivo e após 3 dias, se transformam em larvas de quarto estágio (L4), continuando a percorrer entre os tecidos subcutâneos e musculares do animal infectado. Após esse período, as larvas desenvolvem em adultos jovens entre o 50º e 70º dia, atingem o sistema circulatório, seguindo em direção ao coração e pulmões do hospedeiro intermediário. Entre o 90º e 120º dia, os adultos imaturos chegam aos vasos pulmonares e, nos cães, as fêmeas destes helmintos completam a maturidade sexual, 120 dias após a infecção (AHS, 2020).

As condições ideais para que ocorra a proliferação das microfírias no interior do mosquito até a forma infectante, é de 27°C e 80% de umidade relativa, o que possibilita o desenvolvimento destas larvas em torno de 10 a 14 dias, entretanto, em lugares onde as temperaturas são mais amenas, a maturação destes parasitas pode ocorrer de forma tardia (AHS, 2020). Segundo Dillon (2007), podem ser transmitidas entre 10 a 12 microfírias durante o repasto por apenas um só mosquito.

Em alta parasitemia, as larvas adultas chegam à maturidade sexual após três meses da sua chegada ao coração, porém em casos de baixa parasitemia, os nematódeos migram para artérias pulmonares e por sua vez, quando ocorre a presença de adultos de *D. immitis* fêmeas e machos, estas dão origem a novas microfírias que são liberadas na corrente sanguínea (MEIRELES et al., 2014). No último estágio, as formas adultas do parasita podem viver até mais de sete anos no hospedeiro canino, enquanto que as microfírias podem sobreviver por até dois anos (MEIRELES et al., 2014; ALHO et al., 2014).

### 3.3.3 Fisiopatogenia

A dirofilariose caracteriza-se pela presença de lesões inflamatórias agudas e crônicas que acontecem tanto no pulmão, como em outros órgãos. Isto devido à presença de



*Dirofilaria* adultas e microfilárias no sistema circulatório (MCCALL et al., 2008). Estas alterações inflamatórias podem ser detectadas por exames clínicos previamente e após a morte dos parasitas, seja de maneira natural ou em decorrência de tratamento específico para a infecção (SIMÓN et al., 2007). As primeiras manifestações clínicas de infecção por *D. immitis* estão relacionadas com a primeira fase da doença, assim surgindo entre 3 e 6 meses após a infecção (GOMES, 2009).

Os helmintos adultos de *D. immitis* podem provocar intenso processo inflamatório, cujas lesões da superfície endotelial da artéria pulmonar, representam o início da patogênese da doença (CVBD, 2012). As lesões iniciais incluem descamação do endotélio dos vasos, além de aderência leucocitária e plaquetária. Por esta razão, devido às alterações vasculares, podem causar o aumento da produção de células musculares lisas, o acúmulo de colágeno e o surgimento de fibroses (HOCH; STRICKLAND, 2008).

Os vermes adultos imaturos são os responsáveis pelo dano vascular e possivelmente afecção pulmonar, causando eosinofilia e sinais de acometimento respiratório (ATKINS, 2005). Quando se tornam adultos maduros, os parasitas frequentemente habitam a árvore vascular pulmonar caudal, cujos agravos ocorrem por meio da liberação de substâncias tóxicas, além da própria reação imunológica do hospedeiro a essas substâncias e traumas físicos (HOCH; STRICKLAND, 2008).

Quando ocorre a morte das dirofilárias maduras (L5), também acontece uma exacerbada resposta do sistema imune do hospedeiro vertebrado e por sua vez, provoca a fibrose dos vasos sanguíneos, causando trombose, inflamação granulomatosa e rugosa, bem como a inflamação das vilosidades (HOCH; STRICKLAND, 2008; GOMES, 2009). Em contrapartida, acredita-se que estes parasitas possivelmente podem secretar algumas moléculas que estimulam a produção de interleucinas do tipo 10 (IL-10) [fator desativante de macrófagos], contribuindo dessa forma, para a sobrevivência do parasita e beneficiando o hospedeiro devido a inibição da reação imunomediada (TEKUZA et al., 2003).

Após um período de aproximadamente 9 meses, em decorrência da hipertensão pulmonar, o ventrículo direito pode desenvolver uma hipertrofia excêntrica, o que pode progredir para uma insuficiência cardíaca congestiva, acompanhada de ascite e edema (GOMES, 2009; FREITAS et al., 2017).

Nos casos em que a carga parasitária atinge níveis elevados, sobretudo de L5, podem ocorrer migrações retrógradas da artéria pulmonar em direção a veia cava e as câmaras cardíacas direitas. Por essa razão, provoca o comprometimento da função da válvula tricúspide que aliada a hipertensão pulmonar, desencadeia uma insuficiência cardíaca direita e

consequentemente o desenvolvimento de hepatomegalia, hemólise intravascular e diminuição do débito cardíaco (GOMES, 2009). Em alguns animais com dirofilariose, além de glomerulonefrites, também podem apresentar proteinúria devido a formação de imunocomplexos antígeno-anticorpo (HOCH; STRICKLAND, 2008; LITSTER; ATWELL, 2008).

As migrações erráticas de *D. immitis* também podem ocorrer, sendo encontrados no cérebro, medula espinhal, região ocular, tecido hepático ou tecido cutâneo, entretanto, são mais comumente encontradas em felinos (HOCK; STRICKLAND, 2008; LITSTER; ATWELL, 2008).

Os antígenos provenientes das dirofilárias e aqueles derivados da bactéria do gênero *Wolbachia* (agente intracelular das dirofilárias), também interagem com o organismo do hospedeiro durante as infecções canina, felina e humana, determinando o desenvolvimento da patologia e a resposta imune do hospedeiro. Devido a sua ação, a bactéria *Wolbachia* tornou-se o alvo dos tratamentos farmacológicos, com o objetivo de impedir a fecundidade e a sobrevivência do helminto, além de diminuir a reação inflamatória (SIMÓN et al., 2007).

### 3.3.4 Sinais Clínicos

Nas infecções decorrentes da dirofilariose, a gravidade das lesões e a sintomatologia dependem de alguns aspectos como: a carga parasitária (número de parasitas adultos nas artérias pulmonares e câmaras cardíacas), o tempo de infecção, a resposta imunológica do animal estimulada pela ação dos helmintos e a atividade física do cão (GUERRERO, 2005; SIMONSEN et al., 2014).

De acordo com a sintomatologia, a dirofilariose canina pode ser classificada em: leve, moderada, grave ou muito grave. Na primeira fase da doença, eventualmente os cães não demonstram nenhuma anormalidade, em alguns casos podem ocorrer tosse ocasional, fadiga ao exercício e discreta perda de peso, enquanto que na segunda fase, além de apresentarem os mesmos sinais clínicos, os animais possuem sinais radiográficos como aumento ventricular e anormalidades clinicopatológicas, como discreta anemia e proteinúria. Na fase grave, os cães podem demonstrar perda geral da condição ou caquexia, fadiga ao exercício com atividades leves, dispnéia, insuficiência cardíaca direita, até chegar a fase muito grave, onde levará ao surgimento da síndrome da veia cava (NELSON; COUTO, 2015).

Apesar da enfermidade possuir caráter crônico, muitos animais podem permanecer assintomáticos inicialmente, manifestando sintomas somente no estágio avançado da doença

(ATKINS; SEAKS, 2011). Os sinais clínicos mais frequentes apresentados por animais acometidos por dirofilariose destacam-se: emagrecimento, intolerância ao exercício, letargia, tosse, dispnéia, síncope e aumento do volume abdominal (LARSSON, 2015), muitas vezes devido à presença de ascite.

Em situações em que ocorre uma evolução do quadro clínico para uma insuficiência cardíaca direita, podem surgir sinais como: ascite, edema dos membros, anorexia, seguida por perda de peso, desidratação, ingurgitação de veias jugulares, cutâneas, episclerais ou das veias retinianas, além de congestão venosa visceral. Já em relação às alterações hepáticas, a congestão venosa pode acarretar hepatomegalia e estar associado a icterícia, elevação das enzimas hepáticas e distúrbios de coagulação; além de ocorrer frequentemente congestão esplênica, com esplenomegalia (VENCO, 2009; SIMÓN et al., 2012). Quanto aos casos de efusão pleural, estes são agravos menos ocorrentes.

Durante estágios avançados da doença, também é possível identificar pela auscultação, a presença de sopro protossistólico cardíaco no lado direito do tórax, que ocorre quando há a uma insuficiência da válvula tricúspide e presença de arritmia, decorrente da fibrilação atrial (MCCALL et al., 2008; BOWMAN et al., 2009; VENCO, 2009). Em alguns casos, também podem ocorrer episódios agudos resultantes de tromboembolismo pulmonar, cuja morte espontânea dos parasitas, leva ao surgimento de um quadro clínico agudo e grave de dispnéia e hemoptise (MCCALL et al., 2008; BOWMAN et al., 2009; VENCO, 2009). Entretanto, apesar das alterações pulmonares representarem a principal causa de tosse nos animais infectados, menos de 17% apresentam tosse ou dispnéia (LABARTHE et al., 2014). Em alguns animais ainda podem ser observados a síndrome da veia cava, cujas variações hemodinâmicas, provocadas pelo deslocamento dos helmintos para as câmaras cardíacas, podem ocasionar dispneia, ortopneia, insuficiência respiratória severa, hemólise intravascular aguda e hemoglobinúria, além de coagulação intravascular disseminada e choque cardiogênico. Nestas situações, caso não haja a remoção cirúrgica destes helmintos, conseqüentemente levará a morte dos animais infectados (MCCALL et al., 2008; SIMÓN et al., 2012).

### **3.3.5 *D. immitis* em hospedeiros domésticos, silvestres e humanos**

Dentre as espécies que abrigam a *Dirofilaria immitis*, os cães são descritos como os principais hospedeiros. Entretanto, já foi relatada a presença do parasita em lobos, dingos, coiotes, raposas, felinos (incluindo o gato doméstico), pinípedes, mustelídeos, ursos, pandas,

castores, quatis, coelhos, veados, cavalos, além dos primatas não humanos e humanos. Porém, em grande parte destes indivíduos, as infecções são esporádicas e não apresentam microfilaremia (MANFREDI et al., 2007).

Os humanos e os gatos são hospedeiros acidentais, cuja dirofilariose se comporta de maneira diferente da infecção no cão. Enquanto que o cão representa o hospedeiro definitivo e reservatório natural, o gato é considerado um hospedeiro imperfeito, apresentando migrações erráticas que incluem cavidades corporais, artérias sistêmicas e sistema nervoso central (VIEIRA et al., 2015).

Nos gatos os sintomas podem estar ausentes e geralmente são diagnosticados de forma acidental em 28% dos casos (GENCHI et al., 2018); e outros 25% são considerados naturalmente resistentes à infecção. Em gatos que desenvolvem a dirofilariose, diversos sinais clínicos podem ser encontrados, os quais incluem tosse crônica e dispnéia. Alguns felinos também podem apresentar anorexia e perda de peso e em alguns casos, há ocorrência de sopro sistólico, isto devido a presença de parasitas em região atrioventricular direita. Outros agravos, como ascite, hidrotórax, quilotórax, pneumotórax, ataxia e síncope também podem ocorrer, embora sejam incomuns (VENCO et al., 2015).

Em relação aos seres humanos, pressupõe-se que exista mais de 200 milhões de pessoas no mundo infectadas com nematoides filarióides, provocando o surgimento de enfermidades inflamatórias debilitantes, o que tornam esses parasitas os principais entraves nos países em desenvolvimento (ANDRE et al., 2002). Entretanto, os humanos, não são considerados hospedeiros ideais para as espécies de *Dirofilaria*, como observado no desvio dos padrões de desenvolvimento já descritos na literatura. Porém, em casos de infecção humana, os vermes imaturos de *D. immitis* podem atingir um ramo da artéria pulmonar, desencadeando um processo inflamatório, o que causa a destruição dos vermes e em algumas situações, resulta na formação de nódulos pulmonares (SIMÓN et al., 2005).

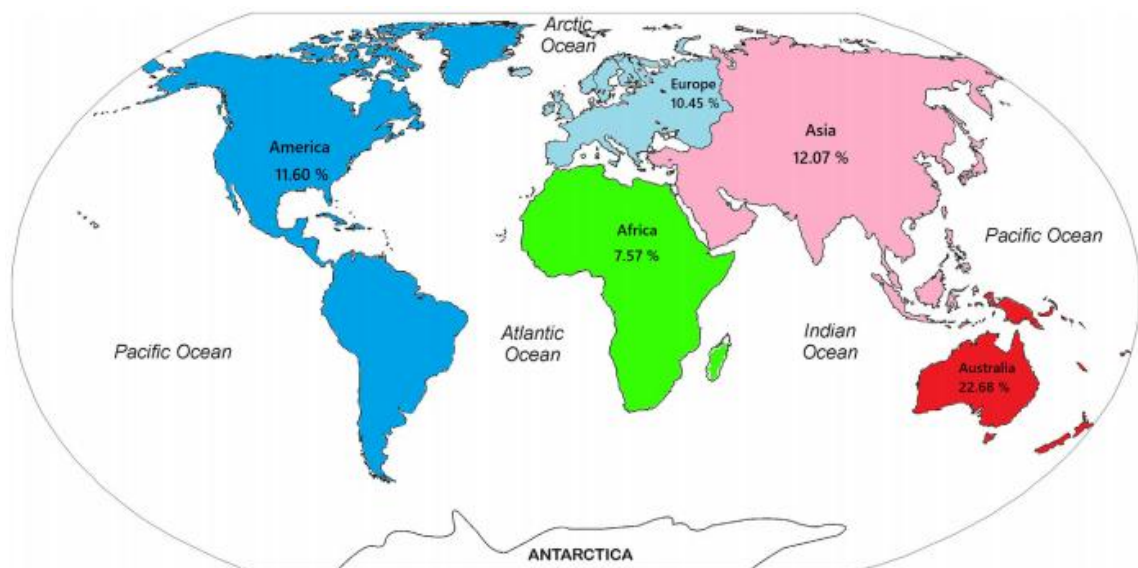
A grande dificuldade em torno da dirofilariose pulmonar humana está relacionada ao erro no diagnóstico dos nódulos pulmonares, que geralmente podem ser confundidos com lesões malignas (SIMÓN et al., 2012). Quando apresentam sintomas, estes são raros e estão relacionados a dor retroesternal, tosse, hemoptise, febre, fadiga, síncope e emagrecimento (KLINGE et al., 2011). Em outros casos, a infecção apresenta-se assintomática e geralmente diagnosticada acidentalmente em exames de rotina para investigação de outras enfermidades pulmonares e respiratórias; portanto, segundo Ogawa et al. (2013), esta zoonose deve fazer parte do diagnóstico diferencial em casos de nódulos pulmonares em humanos.

### 3.3.6 Epidemiologia da Dirofilariose

A Dirofilariose apresenta ampla distribuição mundial com relatos na África, Ásia, Oceania, Europa e nas Américas (SILVA; LANGONI, 2009; OTRANTO et al., 2009; BOWMAN et al., 2009). De acordo com alguns estudos, a dirofilariose canina possui maior prevalência nas regiões litorâneas, especialmente em razão de dispor de condições ambientais ideais para o desenvolvimento de vetores de *D. immitis* durante todo o ano, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2013b). No entanto, a infecção causada pelo parasita possui prevalência variável entre as diversas regiões do mundo devido a fatores epidemiológicos como: a distribuição das espécies de vetores, densidade populacional de mosquito, fertilidade do mosquito, comportamento animal, temperatura ambiente, condições de vida e a média de idade do hospedeiro susceptível (OMAR et al., 2018).

Em estudo realizado por Anvari et al. (2020) sobre a prevalência da infecção canina por *D. immitis* ao redor do mundo, baseados em artigos publicados, relatou uma prevalência global de 10,91% com o intervalo de confiança de 95%, com 10,18% a 11,65% entre os anos de 1965 a 2019. O mesmo estudo revelou por resultados de metanálises as prevalências de *D. immitis* em cães de acordo com os continentes (Figura 1), o que apresentou-se da seguinte forma: Austrália 22,68%, Ásia 12,07%, América 11,60%, Europa 10,45% e África 7,57% (ANVARI et al., 2020).

**Figura 1-** Mapa mundial da prevalência de *Dirofilaria immitis* em cães por continente.



Fonte: Anvari et al., (2020).

Segundo Shi et al. (2017), a maior prevalência de cães com *D. immitis* foi encontrada na Austrália, cujos resultados podem ser atribuídos à alta prevalência de mosquitos do gênero *Culex* na região. Fatores como a umidade e o índice de sazonalidades com variação moderada podem também contribuir para sobrevivência e desenvolvimento dos vetores da dirofilariose no continente Australiano (DEARSLEY et al., 2019).

No continente europeu, a dirofilariose em animais e seres humanos apresenta-se de forma endêmica nos países banhados pelo mar mediterrâneo (GENCHI et al., 2009) e é detectada com mais frequência na região central e oriental do continente (SIMÓN et al., 2009).

A dirofilariose também já foi relatada nos Estados Unidos em todos os 50 estados, e em 49 é considerada endêmica (AHS, 2014; VIEIRA, 2015). A América Latina, aponta o segundo lugar em número de desastres naturais, ficando atrás apenas da Ásia, o que representa uma área de risco para a disseminação de espécies de *Dirofilaria*. Em situações, como no caso em que ocorreu nos Estados Unidos, onde cães infectados por *D. immitis* foram transferidos das áreas atingidas pelo furacão Katrina (como em Louisiana) para outros estados da América do Norte, houve um avanço na introdução destes filarídeos em áreas sem relato de casos anteriores (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2013b).

No Brasil, a doença é considerada endêmica, especialmente as áreas costeiras possuem elevada prevalência de cães microfilarêmicos, porém também ocorre em áreas distantes do litoral (GARCEZ et al., 2006).

A *D. immitis* em cães, já foi detectada no Brasil em 15 áreas hiperendêmicas estando presente em todas as regiões (LABARTHE et al., 2014), no qual a maioria dos estudos estão concentrados nas regiões sudeste, nordeste e sul do país. Segundo Labarthe et al. (2014), no Brasil, na década de 80, a prevalência do parasita foi de 8%, porém no início do novo milênio, houve uma diminuição na prevalência deste parasita, isto ocorreu devido ao aumento na difusão de informações relacionadas a compreensão da dirofilariose, além do avanço na produção de novos fármacos profiláticos.

De acordo com Ahid e Saraiva (1993), na região Nordeste os dados sobre a prevalência da dirofilariose ainda são restritas e a porcentagem de cães infectados variava de 18,7% em Teresina, Piauí e a 43,7% na cidade de São Luís, Maranhão, no bioma amazônico. Também no Maranhão, foram encontradas prevalências de 15% de animais microfilarêmicos de 1495 cães, entre os anos de 1991 a 1994, sendo que o maior número de casos ocorreu no bairro do Olho D'água, que representou 46% do total dos casos (AHID et al., 1999).

### 3.3.7 Diagnóstico

Existem diferentes abordagens para o diagnóstico de infecções filariais caninas. Os métodos clássicos empregados para todas as espécies com microfilárias circulantes no sangue, incluem a identificação morfológica (esfregaços de sangue ou métodos de concentração, como a técnica de Knott ou teste de filtração) ou utilização de coloração histoquímica de microfilárias (GENCHI et al., 2007; PANTCHEV et al., 2011; LATROFA et al., 2012). Para a diferenciação das microfilárias de *A. reconditum* e *D. immitis*, deve ser realizado um exame morfológico cuidadoso (MAGNIS et al., 2013), visto que frequentemente ocorre a detecção de duas ou mais espécies filogeneticamente próximas na mesma população canina.

Para a diferenciação das microfilárias dos parasitas através da morfologia, o principal critério utilizado é a mensuração do comprimento e largura das microfilárias. Entretanto, de acordo com (BOWMAN, 2010), a medida de comprimento é considerada mais tendenciosa e pouco fidedigna como método diferencial. Em outro estudo, no entanto, (LÓPEZ et al., 2012) demonstraram que o método de diferenciação entre as microfilárias de *D. immitis*, *D. repens* e *A. reconditum* através das medidas de comprimento e largura das microfilárias foi eficiente. Além disso, ferramentas moleculares também estão disponíveis para a realização de um diagnóstico confiável (LATROFA et al., 2012), especialmente para profissionais de laboratório que não possuem experiência para uma identificação morfológica fidedigna das espécies.

O diagnóstico da dirofilariose baseia-se na observação dos sinais clínicos, além da utilização de diferentes métodos associados (SILVEIRA, 2018). Desta forma, pode ser realizado pela visualização e identificação das microfilárias circulantes, assim como pela detecção de antígenos na circulação sanguínea do hospedeiro (NELSON et al., 2005), ou através do diagnóstico molecular (OGAWA et al., 2013).

#### 3.3.7.1 Pesquisa de microfilárias

Dentre os métodos de diagnóstico para a pesquisa de microfilárias de *D. immitis*, podem ser empregados o método de filtração, o método direto (por teste da gota espessa) ou de concentração por meio da técnica de Knott modificado (ALMOSNY, 2002).

Através da detecção de microfilárias, é possível obter a confirmação de infecção filarial e diferenciação das espécies de filárias, a partir de estudo morfométrico.

Dentre os animais infectados, grande parte daqueles que apresentam microfilaremia, são assintomáticos e outros que apresentam sinais clínicos evidentes são amicrofilarêmicos (SIMONSEN et al., 2014), portanto, a recomendação para triagem e diagnóstico é que sejam empregados pelo menos dois métodos, principalmente devido às infecções ocultas, que representam até 30% dos cães, os quais não desenvolvem microfilaremia (MCCALL et al., 2008).

A pesquisa de microfilárias pelo teste da gota espessa é um método de diagnóstico amplamente utilizado em estudos populacionais. A técnica consiste no preparo de um esfregaço sanguíneo corado, utilizando uma amostra de sangue periférico de aproximadamente 60µL, para observação de microfilárias por microscópio ótico. Além de ser 100% específica, possui algumas vantagens como o baixo custo e utilização de poucos materiais e equipamentos laboratoriais. Entretanto, a sua principal desvantagem está relacionada a baixa sensibilidade da técnica 100% específica, baixo custo e utilização de poucos equipamentos laboratoriais. Entretanto, a principal desvantagem está relacionada a baixa sensibilidade da técnica (WEIL; RAMZY, 2006).

A técnica de filtração em membrana de polycarbonato representou um grande avanço das técnicas parasitológicas, pois a partir dela, foi possível a identificação de microfilárias em amostras de até 16 mL de sangue venoso, conferindo, portanto, maior sensibilidade ao teste. A técnica baseia-se na filtração de sangue venoso através de uma membrana de polycarbonato, o que possibilita com que as microfilárias se depositem na membrana, as quais são visualizadas pela microscopia óptica, após a coloração (ROCHA, 2004). Em relação a desvantagem, destaca-se para o custo mais elevado, o que torna inviável na rotina de investigação laboratorial (ROCHA, 2000).

Quanto a técnica de Knott (KNOTT, 1939), por sua vez baseia-se na formolização do sangue, permitindo a destruição de hemácias e possibilitando a observação de microfilárias após procedimento de centrifugação (AHS, 2012). Consiste na utilização de amostras de sangue venoso e frequentemente são utilizados 1ml de sangue, o que proporciona maior sensibilidade em relação a gota espessa, isto devido ao volume de sangue utilizado, aumentando assim, as chances de detecção das microfilárias. Apesar de ser antiga, a técnica ainda permanece em uso nas diversas regiões endêmicas do mundo (MELROSE, 2002) e é considerada um método padrão para a identificação das espécies de microfilárias, a qual é utilizada para a visualização da morfologia de cauda, região cefálica e movimento de locomoção (NELSON; COUTO, 2006). De acordo com a AHS (2020), o teste de Knott continua sendo o método de eleição, para a visualização da morfologia e mensuração das



estruturas corporais, com o intuito de distinguir *D. immitis* das demais espécies filariais não patogênicas, como *Acanthocheilonema reconditum* (anteriormente conhecida como *Dipetalonema*).

### 3.3.7.2 Pesquisa de antígenos

Os testes de circulação de antígenos são reconhecidos como os métodos de diagnóstico mais sensíveis, tornando-se de grande importância para a triagem de cães assintomáticos e na investigação de animal suspeito de infecção por *D. immitis* (AHS, 2014).

Na rotina clínica, os testes imunoenzimáticos (ELISA) e os imunocromatográficos são exames mais utilizados no diagnóstico de infecções por *D. immitis*, se apresentando na forma de testes rápidos comerciais (ETTINGER; FELDMAN, 2004), para detecção de antígenos de fêmeas adultas de *D. immitis*. No entanto estes testes devem ser preferencialmente realizados em conjunto aos testes de pesquisa de microfilárias, principalmente se existirem animais suspeitos para a doença ou em situações onde não há o conhecimento sobre o histórico clínico ou patologias pregressas (AHS, 2020), pois embora os testes imunológicos tenham alta sensibilidade, podem apresentar falsos negativos (MCCALL et al., 2008).

Um procedimento em constante utilização no diagnóstico da dirofilariose é a dissociação de imunocomplexos, pela utilização de tratamento com calor ou ácido em amostras de soro ou plasma de cães e gatos antes da realização de testes comerciais de antígeno para a enfermidade (LITTLE et al., 2014; VELASQUEZ et al., 2014; GRUNTMEIR et al., 2017; BEALL et al., 2017; CARMICHAEL et al., 2017; DIGANGI et al., 2017). A principal vantagem dessa prática é detectar as legítimas infecções por dirofilariose pela dissociação de complexos antígeno-anticorpo (BEALL et al., 2017; LITTLE et al., 2018).

A dissociação de imunocomplexos é capaz de identificar as verdadeiras infecções por dirofilariose, como em casos que apresentam baixas quantidades de antígenos e infecção pré-patente, além da possibilidade de aumentar o aparecimento de resultados falso-positivos devido a infecções por alguns nematóides (SCHNYDER; DEPLAZES, 2012; AROCH et al., 2015; SAVADELIS et al., 2018). Por essa razão, as reações cruzadas podem ocorrer em testes de antígenos para dirofilariose devido a coinfeção de parasitas como: *Dirofilaria repens*, *Spirocerca lupi*, e *Angiostrongylus vasorum* (SCHNYDER; DEPLAZES, 2012; AROCH et al., 2015; CIUCĂ et al., 2016; VENCO et al., 2017).

Atualmente, no Brasil existem dois testes de imunodiagnóstico para pesquisas de antígenos de *D. immitis*: o Snap 4DX plus (IDEXX) e Alere Dirofilariose Ag Teste kit

(Alere). Entretanto, embora qualquer que seja o teste é importante ser utilizado de acordo com o manual do fabricante para conferir precisão aos resultados (VIEIRA et al., 2020).

### **3.3.7.3 Detecção Molecular pela Reação em cadeia da polimerase – PCR**

Nos últimos anos, diversos métodos moleculares foram desenvolvidos para a detecção de parasitas. Por sua vez, a especificidade e sensibilidade desses métodos aumentaram gradativamente, possibilitando o diagnóstico molecular de parasitas que anteriormente apresentavam difícil diagnóstico por técnicas convencionais. Por essa razão, foi possível a instituição prévia de tratamentos antes mesmo de causarem maiores danos à população infectada (TAVARES et al., 2011).

Seu uso também é indicado em situações de agravos por microfilárias, o que podem ocorrer em cães tratados incorretamente com medicamentos preventivos ou em casos de coinfeções por mais de uma espécie de filarídeo, o que dificulta a diferenciação das microfilárias (CASIRAGHI et al., 2006).

A técnica compreende a amplificação de um segmento de ácido desoxirribonucleico (DNA) específico do parasita, utilizando iniciadores espécie-específicos que podem ser visualizados em gel de Agarose. Ela permite a detecção da *D. immitis* e assim, evita erros de diagnóstico por métodos de caracterização morfológica, além de ser importante no diagnóstico de animais com baixas contagens do parasita (SARQUIS, 2012). Apesar de ser uma técnica específica, entretanto sua utilização nem sempre é possível, pois necessita de infraestrutura laboratorial adequada, e técnicos especializados (VEZZANI et al., 2008).

### **3.3.7.4 Diagnóstico por imagem**

Os exames complementares como radiografia e ecocardiograma, são ferramentas são ferramentas úteis para confirmação do diagnóstico, determinação da gravidade e progressão da dirofilariose (AHS, 2020), através da avaliação do estado cardiopulmonar do paciente.

A radiografia pode ser útil em casos de animais suspeitos da doença, cujos exames laboratoriais não foram capazes de detectar microfilárias (CICARINO, 2009). Esta técnica revela-se importante para a detecção de doenças tromboembólicas, que são comuns em casos de cães acometidos por *D. immitis*, que apresentam sinais clínicos, assim como sinais radiográficos sugestivos de obstrução na artéria pulmonar (AHS, 2018).

Os sinais mais comuns observados em exames radiográficos são: dilatação e tortuosidade dos vasos, com obstrução dos ramos periféricos intralobares e interlobulares das artérias pulmonares, especialmente nos lobos diafragmáticos (AHS, 2020). As alterações no parênquima pulmonar também podem ser difusas, decorrente de infecção por L5 e tornando-se granulomatosas nas infecções crônicas. São avaliados no parênquima pulmonar quanto à presença de infiltrações, nódulos, linfadenopatia e efusão pleural, além de outras alterações como a presença de padrão alveolar e intersticial misto (HOCH; STRICKLAND, 2008). Já nos piores casos da doença, podem ocorrer eventualmente cardiomegalia, com o aumento do lado direito do coração.

Os sinais radiográficos em geral são variados e podem ser encontrados de forma transitória, onde nem sempre devem significar infecção ativa e apesar da gravidade das alterações vasculares pulmonares, estas não possuem relação direta com a carga parasitária (HOCH; STRICKLAND, 2008).

Em relação ao ecocardiograma, os achados mais comuns são: dilatação ventricular direita, além de ecodensidades paralelas lineares e hipertrofia de parede nas artérias pulmonares, no ventrículo e átrio direito. Os achados como hipertrofia ventricular direita e distúrbios do ritmo cardíaco também são comumente encontrados nos cães com infecção severa (TILLEY et al., 2008).

De acordo com Smith et al. (2015) certas alterações também podem ser vistas no ecocardiograma de maneira a assegurar o diagnóstico de dirofilariose, como: sobrecarga das veias pulmonares, sobrecarga do ventrículo esquerdo, sobrecarga do átrio esquerdo, dilatação do ventrículo direito com hipertrofia, dilatação do átrio direito, achatamento de septo interventricular, movimento assíncronico do septo, alta velocidade de regurgitação da tricúspide e velocidade de regurgitação pulmonar aumentada. Este exame, também pode ser útil na identificação do parasita na artéria pulmonar e nas câmaras cardíacas direitas. Além disso, pode ser utilizado para determinação da carga parasitária, insuficiência tricúspide e a gravidade da hipertensão pulmonar, assim como permite o diagnóstico da síndrome da veia cava (HOCH; STRICKLAND, 2008). Associado ao ecocardiograma, o eletrocardiograma também pode ser realizado. Ele é capaz de detectar arritmias e alterações de ritmo, que ocorrem frequentemente em casos de dilatação cardíaca (HOCH; STRICKLAND, 2008).

### **3.3.8 Tratamento**

No tratamento de infecções por dirofilariose, os animais assintomáticos ou que

possuem sintomas brandos da doença, geralmente não apresentam complicações, caso os exercícios físicos sejam interrompidos. Já em situações de dirofilariose moderada ou grave, ou aqueles que possuem doenças concomitantes, o tratamento torna-se desafiador (AHS, 2020).

A finalidade do tratamento para a dirofilariose é melhorar o estado clínico do paciente, eliminar os estágios de vida, tanto os larvais como as formas adultas, além de minimizar o aparecimento de possíveis complicações (SHEARER, 2011; AHS, 2020). Portanto, antes de iniciar o tratamento é essencial que o médico veterinário possa classificar o quadro clínico do animal para posteriormente decidir o tratamento adequado (MEIRELES et al., 2014).

Geralmente para o tratamento de cães infectados por *D.immitis* recomenda-se o uso do di-hidroclorato de melarsomina, um fármaco bastante eficaz contra helmintos maduros e imaturos do parasita e recomendado para o uso em todos os cães que possuem a infecção e não apenas nos casos mais graves (NELSON; COUTO, 2015).

A melarsomina é o único adulticida aprovado pela Administração de Alimentos e Medicamento dos Estados Unidos (FDA), e deve ser administrado por aplicação intramuscular profunda na musculatura epaxial lombar, entre as vertebrae lombares L3 e L5 (AHS, 2018). Como protocolo clássico ou alternativo da melarsomina foram estabelecidas duas doses de 2,5 mg/kg administradas por via intramuscular com intervalo de 24 horas entre as aplicações (NELSON; COUTO, 2010).

Também é indicado terapia adjuvante com utilização de doxiciclina durante 4 semanas antes da administração de melarsomina para a eliminação de bactérias do gênero *Wolbachia*, as quais são capazes de abrigar parasitas de *D. immitis*. Com isso a droga possibilita a redução dos agravos associados aos vermes mortos e desta forma, interrompe a transmissão da dirofilariose. Além destes medicamentos, um preventivo de lactona macrocíclica também deve ser administrado durante 2 meses, anterior a administração da melarsomina, de modo a reduzir novas infecções e eliminar as larvas existentes (AHS, 2020).

O tratamento da dirofilariose embora seja internacionalmente recomendado com a utilização de dicloridrato de melarsomina (Immiticide, Merial ou Diroban, Zoetis), este mesmo medicamento já não está mais registrado no Brasil. Deste modo, lactonas macrocíclicas são as únicas opções para tratamento adulticida em cães. Este fármaco é utilizado como preventivo mensalmente associado a doxiciclina (NELSON et al., 2014); e amplamente utilizado como protocolo alternativo.

### 3.3.9 Profilaxia

A utilização de métodos de prevenção para a dirofilariose é aconselhada em todos os cães que habitam em regiões endêmicas (NELSON; COUTO, 2015). Nestes casos, portanto, é indicado instituir a quimioprofilaxia logo após oito semanas de idade. Também deve ser indispensável a aplicação destes fármacos a cada 6 meses, seja de forma oral, tópica ou parenteral (AHS, 2014).

Atualmente diversos fármacos estão disponíveis comercialmente para a prevenção da dirofilariose, como as avermectinas (ivermectina, selamectina) e as milbemicinas (oxima milbemicina, moxidectina), cujos efeitos promovem a paralisia neuromuscular e morte de parasitas nemátodes e artrópodes através da interação com canais de cloro da membrana, atuando deste modo, contra as larvas L3 e L4, em adultos jovens e microfilárias (SALGUEIRO, 2016).

Dentre as opções de drogas quimioprofiláticas para prevenção da infecção canina, incluem os tabletes e gomas com princípio ativo a base de milbemicina oxima e ivermectina nas doses de 6 a 10µg/kg mensais e medicamentos tópicos a base de selamectina, que podem ser utilizadas mensalmente, de forma segura e econômica (AHS, 2007). De acordo com Smith et al. (2015), o uso mensal destes fármacos elimina de forma gradual, durante 5 a 9 meses, as microfilárias em cães com vermes adultos.

Além destas medidas, existem outras formas de prevenção como por exemplo, a proteção dos animais quanto a exposição ao mosquito vetor. Devido a isto, podem ser utilizadas ações de controle ambiental as quais incluem o tratamento de fontes de água parada com inseticidas reguladores de crescimento juntamente com medidas adulticidas para o controle dos mosquitos (armadilhas de CO<sub>2</sub> e sprays) (SALGUEIRO, 2016).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

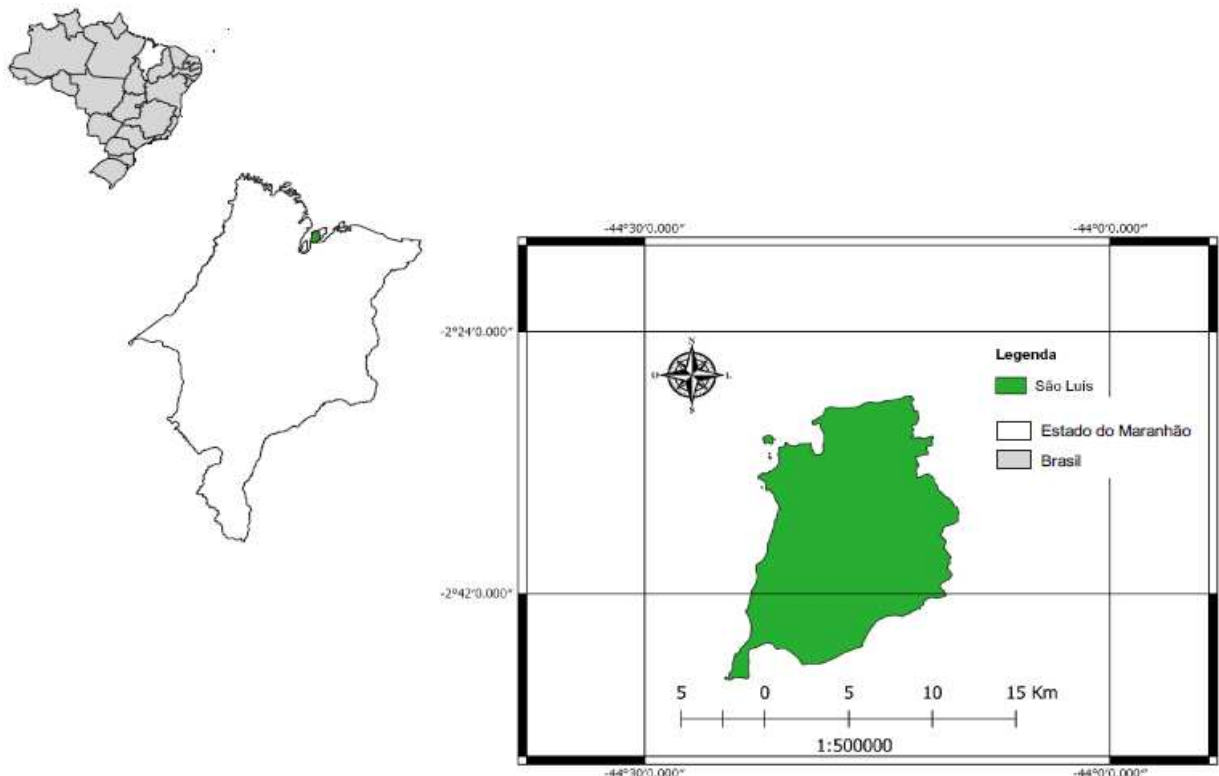
### 4.1 Comitê de Ética

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) do Curso de Mestrado em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão, sob número de protocolo 055/2017.

### 4.2 Área de estudo

A área de estudo foi o município de São Luís, situado na Mesorregião Norte Maranhense, longitude oeste de  $44^{\circ}18'10''$  e latitude sul de  $2^{\circ}31'46''$  (Figura 2). Segundo dados do último censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010), o município ocupa uma área de 834,827 km<sup>2</sup>, com 1.014.837 habitantes, 958.522 vivem em meio urbano e 56.315 moram na zona rural. A região apresenta um clima do tipo equatorial quente e úmido, com índice pluviométrico médio de 2200 mm ao ano, umidade relativa média de 82,8% e temperatura elevada o ano todo.

Figura 2- Mapa de localização da cidade de São Luís.



Fonte: Adaptado a partir do IBGE (2010).

### **4.3 Obtenção das amostras**

Os animais foram selecionados por conveniência e as coletas foram realizadas em cães que se apresentaram a consultas de rotina no Hospital Veterinário Universitário (HVU) —Francisco Edilberto Uchôa Lopes, em clínicas veterinárias particulares e em domicílio, na cidade de São Luís, após a explanação do objetivo da pesquisa ao responsável pelo animal. Depois da autorização por meio da assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), os cães foram submetidos à contenção física, seguida de antissepsia local com álcool a 70%. Em seguida, foram coletados 3 mL de sangue, em média, por punção das veias cefálica, jugular ou safena.

As amostras foram armazenadas em tubos com EDTA (etileno-diamino-tetracetato), devidamente identificados, transportados até o laboratório, sob refrigeração a 4°C, em caixa isotérmica. Para a pesquisa de microfilárias, 2 ml do sangue foram utilizados e o restante foi armazenado a -20 °C até a realização da análise molecular. Todos os animais foram identificados de forma única com numeração sequencial e seus dados registrados em ficha própria, igualmente numerada.

### **4.4 Questionário**

Visando obter dados referentes a aspectos epidemiológicos, concomitante à coleta do sangue, foi aplicado aos responsáveis pelos animais um questionário estruturado com questões objetivas e subjetivas, com perguntas referentes ao histórico do animal, e informações como: raça, idade, sexo, hábitos alimentares, além de manejo ambiental, medidas profiláticas (vacinação, vermifugação, uso de repelentes), presença de sinais clínicos associados a filarioses e o conhecimento do tutor em relação a dirofilariose. Os questionários foram utilizados com a finalidade de avaliar os possíveis fatores de risco relacionados à transmissão de filarídeos e os dados obtidos foram tabulados em planilhas do Microsoft Excel, para posterior análise dos resultados.

### **4.5 Análises laboratoriais**

#### **4.5.1 Técnica da gota espessa**

Para o método da gota espessa, uma gota de sangue fresco de cada amostra é colocada entre lâmina e lamínula para observação ao microscópio óptico, utilizando-se objetiva de 10 e

e 40 vezes. A técnica tem por objetivo detectar a presença e identificar o tipo de movimentação das microfilárias (KNIGHT, 1977).

#### 4.5.2 Teste de Knott modificado

O teste de Knott modificado (NEWTON; WRIGHT, 1956), é um método de concentração para detecção e caracterização morfológica das microfilárias. Para a realização do teste, 1 ml de sangue com anticoagulante (EDTA) foi adicionado a um tubo Falcon de 15 ml contendo 9 ml de água destilada. Após esse período a amostra foi homogeneizada e em seguida centrifugada por 10 minutos a 2.000 rpm e o sobrenadante desprezado. Esse procedimento passou por 3 repetições e em seguida, os sedimentos foram depositados na lâmina e realizados 3 esfregaços espessos, fixados em metanol e corados com Giemsa. Para a análise e identificação da espécie das microfilárias, as lâminas foram observadas em microscópio óptico, utilizando-se objetivas de 10 e 40 vezes (NEWTON; WRIGHT, 1956).

#### 4.5.3 Teste imunocromatográfico

Os testes imunocromatográficos foram realizados através de kit rápido (Alere Dirofilariose Ag Test Kit) (Figura 3), que detecta antígenos específicos produzidos pelo aparelho reprodutor das fêmeas de *D. immitis* presentes no soro, plasma ou sangue canino. No presente estudo, foi processada 1 gota de sangue total de cada animal e os testes foram interpretados individualmente como positivos ou negativos de acordo com o critério descrito pelo fabricante.

**Figura 3-** Teste imunocromatográfico Alere Dirofilariose Ag Test Kit. A presença de duas linhas coloridas (C e T) na janela, indica resultado positivo. A presença somente da linha C na janela, indica resultado negativo.



Fonte: Arquivo pessoal.



#### 4.5.4 Extração de DNA genômico

Para a extração de DNA de filarídeos das amostras de sangue canino, foi utilizado a preparação comercial InstaGene Matrix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida, foi previamente avaliado a qualidade do DNA extraído a partir das amostras obtidas, por meio da eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo o SYBR Safe (Invitrogen) e o conteúdo remanescente da extração foi armazenado a temperatura de -20°C.

#### 4.5.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A detecção de DNA das amostras de sangue, foi realizada por meio da técnica molecular de PCR convencional, para a amplificação de fragmentos de genes 12S rDNA, utilizando iniciadores descritos por (OTRANTO et al., 2011) e disponível no GenBank conforme apresentados a seguir:

Forward: Fila12SF: 5'-CGGGAGTAAAGTTTTGTTTAAACCG-3'

Reverse: Fila12SR: 5'-CATTGACGGATGGTTTGTACCAC-3'

O tamanho esperado para cada fragmento da PCR foi de aproximadamente 330 pb para as regiões conservadas de *Dirofilaria* spp., *Acantocheilonema* spp. e *Cercopithifilaria* spp. Como controle positivo, foi utilizado o DNA extraído de amostra de sangue de um cão comprovadamente infectado com *D. immitis* e considerado positivo nos gota espessa, teste de Knott e imunocromatográfico e um controle negativo, apenas com água ultrapura estéril para utilização em cada reação.

Para a reação de PCR foi utilizado um volume final de 25 µl contendo 14, 5 µl de H<sub>2</sub>O; 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub>; 2,5 de solução tampão Tris-HCl, 2,5 µl de dNTPs; 0,5 µl (1 unidade) de Taq Polimerase; 0,5 µl do oligonucleotídeo Fila12S; 0,5 µl do oligonucleotídeo Fila 12R e 2,5 µl de DNA genômico. As reações ocorreram em um termociclador no modelo LifePro Thermal Cycler 96 Well (Bioer Technology, China) e consistiu-se em uma desnaturação inicial de 95°C por 10 minutos (primeira ativação da polimerase e desnaturação), seguida de 40 ciclos de 95°C por 1 minuto (desnaturação), 58°C por 1 minuto (anelamento), 72°C por 1 minuto (extensão) e uma extensão final de 72° C por 7 minutos.

Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão de corrida TAE, acrescido de 5 µL de DNA Sybr Safe (Invitrogen), 3 µL de

marcador Gel Loading buffer (Invitrogen) e posteriormente os produtos foram visualizados em transiluminador ultravioleta e fotografados.

#### **4.5.6 Sequenciamento de nucleotídeos**

Os produtos amplificados pela PCR foram purificados através do kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), conforme as especificações do fabricante e em seguida, as amostras positivas, foram submetidas a reação de sequenciamento, utilizando o sequenciador automático AB 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) por eletroforese capilar e polímero POP7 (Applied Biosystems). As sequências nucleotídicas obtidas foram comparadas com sequências disponíveis do banco de dados do GenBank, utilizando-se o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para a comprovação da identidade das sequências obtidas.

#### **4.5.7 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada de acordo com a associação entre as variáveis independentes e quanto a presença ou ausência de animais positivos para filarídeos. Para isso, os resultados foram expressos sob forma de variável dicotômica, adotando valor 1 nos cães positivos e 0 para os negativos. Na análise univariada, as frequências foram obtidas de acordo com as variáveis independentes (sexo, idade, raça, uso de doxiciclina, uso de lactona macrocíclica, conhecimento da doença, restrição de movimento e sinais clínicos) e comparadas utilizando-se o teste estatístico qui-quadrado, com intervalo de confiança de 95%, rejeitando-se a hipótese nula com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Foi utilizado o programa estatístico Epi Info®.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Detecção e caracterização molecular das amostras de filarídeos

Do total de 103 cães avaliados, oito (7,7%) animais foram positivos quanto a presença de filarídeos, por pelo menos um dos seguintes testes: exames diretos (Gota espessa e teste de Knott modificado), teste imunológico (teste imunocromatográfico de fluxo lateral/ Alere®) e reação em cadeia da polimerase (Tabela 1). Das oito amostras positivas, cinco reagiram aos quatro testes (Gota Espessa, Knott Modificado, Alere® e PCR), totalizando 62,5% dos positivos. Uma amostra reagiu a três testes (12,5%) (Gota Espessa, Knott Modificado e PCR), uma amostra foi positiva em dois testes (12,5%) (Alere® e PCR) e uma reagiu somente a um teste (12,5%) (Alere®).

**Tabela 1** – Ocorrência de cães positivos para filarídeos, atendidos no Hospital Veterinário Universitário “Edilberto Uchoa Lopes”, em clínicas veterinárias e em domicílio, na cidade de São Luís- MA

Número do cão	Gota Espessa	Knott Modificado	Teste Imunocromatográfico (Alere®)	PCR
1	+	+	+	+
80	-	-	+	-
81	-	-	+	+
82	+	+	+	+
100	+	+	-	+
101	+	+	+	+
102	+	+	+	+
103	+	+	+	+
<b>Total</b>	6	6	7	7

A técnica da gota espessa detectou a presença de microfíliárias em 6 (5,8%) amostras sanguíneas de cães. Dois animais embora positivos em outros métodos de diagnóstico, não foram identificados com microfíliárias no teste. A ausência de microfíliárias circulante na corrente sanguínea pode ser justificada pela presença de fêmeas adultas de *Dirofilaria immitis* e devido a ausência de machos, por sua vez, além de destruição das microfíliárias por resposta imune do hospedeiro (DILLON, 2007).

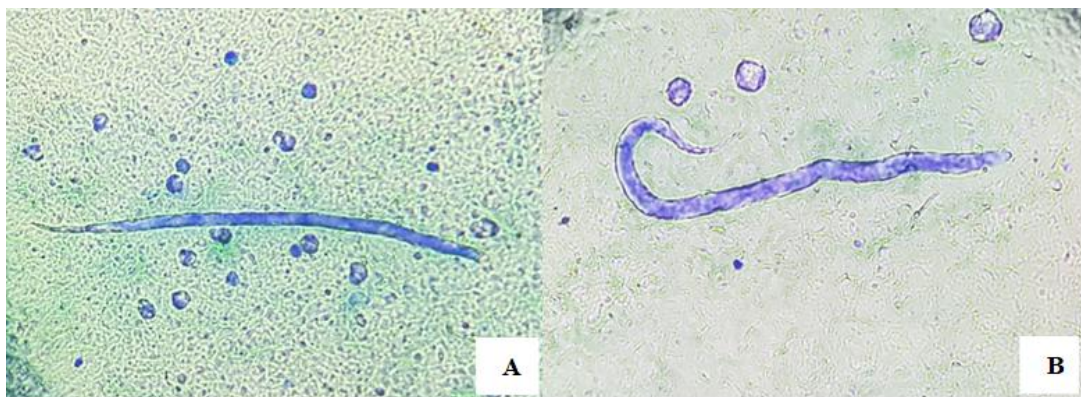
Animais que tem baixa microfíliarêmia ou que possuem infecções ocultas, falsos negativos podem ocorrer. Segundo Courtney e Zeng (2001), a sensibilidade da gota espessa

geralmente aumenta conforme o valor de microfilaremia e que amostras com microfilaremia acima de 50 microfílarias por mL, a gota espessa resulta em sensibilidade de 100%. Já a American Heartworm Society (2020), o método da gota espessa pode ser considerado insensível quando realizado em animais com presença de baixos números de microfílarias (50–100 / mL) na circulação sanguínea.

Em relação aos testes de Knott modificado, o método foi capaz de detectar 6 (5,8%) cães microfilarêmicos. Este resultado, segundo Trancoso et al. (2020) pode estar relacionado ao maior volume de sangue utilizado para o procedimento técnico, bem como, pela concentração das microfílarias em estágios evolutivos, associadas às etapas de fixação e coloração, o que possibilita a identificação do parasita.

Entretanto, Simón et al. (2012) afirmam que a detecção de microfílarias por si só não possibilita um diagnóstico preciso, devido a difícil diferenciação entre as espécies filariais, as quais são identificadas por uma avaliação morfológica da região cefálica e caudal.

**Figura 4-** Microfílarias recuperadas de cães da região Metropolitana de São Luís. A: Microfílaria de *Dirofilaria immitis* detectada por Teste de Knott (cauda reta). B: Microfílaria de *Acanthocheilonema reconditum* (cauda curvada) detectada por Teste de Knott.



Fonte: Arquivo pessoal.

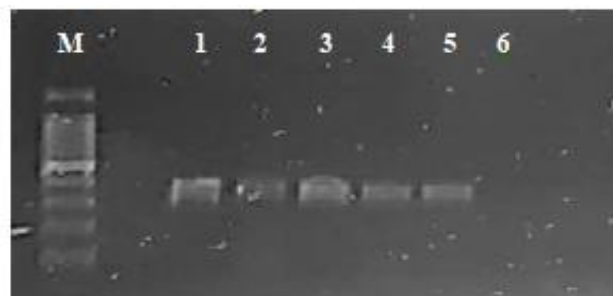
Na totalidade dos animais investigados no teste imunocromatográfico (Alere® Dirofilariose Ag Test Kit), 7 (6,7%) cães exibiram resultados positivos ao teste de antígeno. Em decorrência do aumento da sensibilidade dos testes de antígeno em comparação à detecção de microfílarias de forma isolada, por exame microscópico direto, a maioria das pesquisas que utilizam ambas as abordagens relata que a detecção de antígenos possibilita uma maior identificação das infecções por dirofilariose (LITTLE et al., 2018), assim como ocorreu no presente estudo, cujo teste de antígeno detectou todos os cães infectados com *D. immitis*.

Das 103 amostras analisadas pela PCR, 7 (6,7%) foram positivas, conforme demonstrado na figura 5 e 6.

**Figura 5** - Eletroforese em gel de agarose 1,5% representando os produtos de amplificação via PCR da região 12S do gene rDNA de filarídeos extraídos de amostras de sangue canino. M: Marcador de peso molecular Loading Buffer (6x); Amostras positivas (canaletas 2 e 11); Amostras negativas (canaletas 1 / 3-10/ 12-15); Controle negativo: 16.



**Figura 6** - Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos amplificados por PCR da região 12S do gene rDNA de filarídeos extraídos de amostras de sangue canino. M: Marcador de peso molecular Loading Buffer (6x); Amostras positivas (canaletas 1-5); Controle negativo: 6.



Através da detecção por PCR, 6 (5,8%) cães foram identificados com *D. immitis* e 1 (0,97%) cão identificado com *A. reconditum*. Após análise comparativa das sequências obtidas com as cepas de *D. immitis* depositados no GenBank e auxílio da ferramenta BLAST, foram apresentadas: Amostra 1 com 99,10% de identidade (acesso KF707480.1), amostra 81 com 99,09% de identidade (acesso KF707482.1), amostra 82 com 95,47% de identidade (acesso KF707482.1), amostra 101 com 99,40% de identidade (acesso KF707482.1), amostra 102 com 96,98% de identidade (acesso KF707482.1) e amostra 103 com 97,00% de identidade com a sequência de *D. immitis* (acesso KF707482.1), que também foi encontrada na China e está disponível no GenBank. Além disso, a amostra de número 100 apresentou 100% de identidade com *A. reconditum* (acesso: JF461460), cuja sequência foi semelhante a encontrada por Otranto et al. (2011), em cães infectados na Sicília, Itália.

O único cão positivo para *A. reconditum* apresentou-se negativo ao teste de antígenos para dirofilariose, descartando também a possibilidade de coinfeção por *D. immitis*, confirmado pela técnica de sequenciamento genético.

No Brasil, alguns estudos já relataram a presença de *A. reconditum*, como em Maceió (Alagoas), Uberlândia (Minas Gerais), Guaratuba (Paraná), Itajaí (Santa Catarina), Recife (Pernambuco), municípios da mesorregião do Marajó, Santa Maria (Rio Grande do Sul), além de algumas regiões de Sergipe como Nossa Senhora das Dores e Nossa Senhora da Glória e Cabo Frio (Rio de Janeiro) (BRITO et al., 2001; GOMES, et al., 2012; LEITE et al., 2012; LIRA et al., 2012; RAMOS et al., 2016; DE ARGÔLO et al., 2018; ENGELMANN et al., 2019; VARJÃO et al., 2019; TRANCOSO et al., 2020). No entanto, no Estado do Maranhão, esta é a primeira descrição e caracterização molecular de *A. reconditum*.

Todos os resultados obtidos neste estudo, pelos exames microscópicos diretos (gota espessa e método de Knott) e pela PCR foram similares aos relatos em cães na região de Cabo Frio, RJ (TRANCOSO et al., 2020) e na Ilha de Marajó (GARCEZ et al., 2006), investigados quanto à presença de dirofilariose, cuja concordância entre os resultados foram relacionados a elevadas cargas parasitárias naquelas regiões.

Assim, as técnicas moleculares são formas de diagnóstico mais específico na detecção e diferenciação entre espécies de filarídeos que possam ocorrer em uma determinada região. Por essa razão, casos de detecção molecular também foram utilizados para detecção de *D. immitis* e relatados no Norte da Argélia e na Costa do mediterrâneo (TAHIR et al., 2017).

## 5.2 Características dos cães

Dentre os cães examinados (103), foram 62 (60,19%) fêmeas e 41 (39,80%) machos, dos quais 67 (65,04%) animais apresentavam raça definida e 36 (34,95%) sem raça definida (SRD).

Em relação ao gênero dos cães, houve distribuição homogênea dos casos, onde fêmeas e machos apresentaram 3,8% de positividade para filarídeos. De acordo com alguns estudos, não existe nenhuma influência quanto ao sexo no parasitismo destes filarídeos (MARTIN; COLLINS, 1985). Para Leite et al. (2007), todos os cães sejam de quaisquer tamanhos ou raças são potencialmente susceptíveis a infecção. Entretanto, segundo Almeida et al. (2001), as fêmeas são relatadas como mais resistentes à infecção, o que é justificado pela presença de estrógenos, os quais podem inibir o desenvolvimento dos filarídeos devido à capacidade desses hormônios na ativação do sistema imunológico.

No presente estudo, 90 (87,37%) animais possuíam idade superior a 1 ano e apenas 13 (12,62%) até 1 ano. Salienta-se que todos os cães infectados estavam na faixa etária acima de 1 ano. Este resultado corrobora com Ogawa et al. (2013) ao afirmar que a idade é um fator de risco para ocorrência de filarioses, uma vez que os animais idosos apresentam maior prevalência em relação aos mais jovens e por essa razão, quanto mais tempo de vida tem o animal, maior tempo tem de exposição aos vetores em áreas endêmicas e consequentemente maior a probabilidade de ser infectado.

Das 8 amostras positivas, 4 cães possuíam raça definida e 4 sem raça definida. Este resultado foi semelhante com a pesquisa realizada por Vezzani et al. (2011), em que demonstraram que não houve diferença significativa entre cães de raça ou sem raça definida.

### 5.3 Sinais Clínicos dos animais investigados

Dos animais investigados, 93 (90,29%) não apresentaram sintomas clínicos que poderiam ser característicos de infecções por filarídeos. Nos cães avaliados, apenas 8 animais (7,7%) apresentaram sinais de alterações características de infecção por *D. immitis*. Os sinais clínicos mais frequentes relacionados a dirofilariose foram: linfonodos aumentados, perda de peso, tosse, dispnéia e letargia, entretanto, nenhum dos animais com estas sintomatologias foram diagnosticados com a doença.

No estudo, 2 cães (3,8%) também apresentaram manifestação clínica suspeita de infecção pelo parasito *A. reconditum*, com presença de um único nódulo subcutâneo. Em um dos cães, o nódulo estava na região torácica superior, enquanto no outro indivíduo, foi localizado em região glútea. Entretanto, o diagnóstico definitivo dos cães detectou que na realidade se tratava de uma infecção causada pela espécie *D. immitis*. Este resultado corrobora aos encontrados por Labarthe et al. (2014), cujos sinais clínicos inespecíficos dos cães microfilarêmicos não foram capazes de levantar suspeitas quanto ao diagnóstico para *D. immitis*. Isto devido a dirofilariose ser assintomática ou possuir sintomas comuns a diversas doenças (NAGASHIMA et al., 2009).

Durante a inspeção da cavidade oral do cão positivo para *A. reconditum*, foi constatada a presença de nódulos de coloração avermelhada de formato irregular e aspecto friável localizados na face lateral da língua do animal (Figura 7). A citologia dos nódulos linguais revelou grande quantidade de hemácias em fundo de lâmina, com presença moderada de neutrófilos segmentados, raros macrófagos e discreto número de eosinófilos.



Também foram encontradas células epiteliais descamativas sem atipias, além de estruturas compatíveis com microfilárias (Figura 8). Na literatura disponível até o momento, é considerado o primeiro registro de infecção natural pelo parasita na língua de um canino; que apesar de ser um órgão anatômico com submucosa relativamente delgada, o que provavelmente o torna inadequado para o desenvolvimento de larvas (VELEV et al., 2019), no entanto, foi comprovado que a língua é um órgão capaz de abrigar esta espécie de filarídeo.

No exame histopatológico, foram observados nódulos heterogêneos, com regiões enegrecidas, textura firme. Foi encontrado hiperplasia de epitélio, áreas de necrose, degeneração hidrópica do epitélio e deposição de material eosinofílico e fibrila. Também havia reação inflamatória, com presença de macrófagos espumosos e plasmócitos, caracterizando uma glossite crônica. Nestes casos de inflamações crônicas decorrentes de infecções, as papilas linguais aumentam de volume conferindo à língua uma aparência granular (GASSEN et al., 2010). Além disso, as microfilárias, também podem estar livres na derme, em região subcutânea, ou em granulomas (HARGIS et al., 1999) conforme foi observado neste estudo.

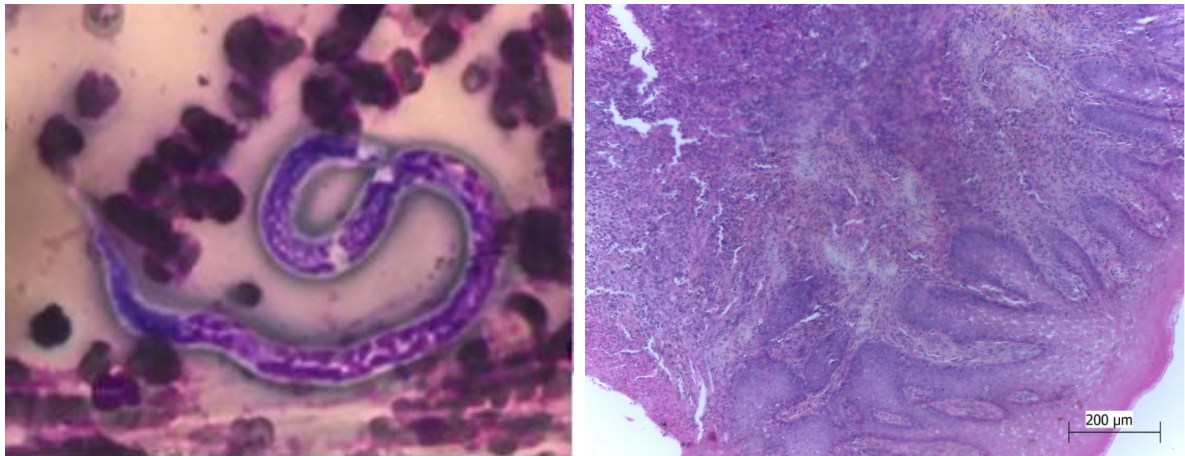
**Figura 7:** Granulomas na face lateral da língua de cão infectado com *A. reconditum*.



Fonte: Arquivo pessoal.



**Figura 8:** Imagem de exame citológico de nódulos linguais com presenças de microfíliarias. Imagem de exame histopatológico apresentando áreas de necrose e degeneração hidrópica de epitélio (glossite crônica).



Fonte: Arquivo pessoal.

#### 5.4 Fatores ambientais

Quando comparados por hábitos de moradia, 79 (76,6%) dos animais eram domiciliados, representando a maioria da população canina e somente 24 (23,3%) semi-domiciliados. Destes animais, 4 circulavam livremente nas ruas e possuíam contato com outros animais. Entretanto, foi observado que todos os cães avaliados no presente estudo tinham acesso às ruas, mesmo quando configurados por eventuais passeios e acompanhados pelos respectivos proprietários; o que demonstra um potencial risco aos seres humanos, principalmente devido a importância zoonótica da *D. immitis* e pela falta de conhecimento das pessoas em relação à enfermidade e suas formas de transmissão (SILVA et al., 2008). Deste modo, segundo Leite et al. (2007), os fatores como densidade da população canina nas áreas urbanas, cujos cães possuem livre acesso, bem como a falta de monitoramento por parte dos órgãos responsáveis pelo controle das populações de animais errantes, podem influenciar de forma negativa para o aumento da prevalência da dirofilariose.

Dentre outros fatores que podem influenciar na ocorrência da doença, está a implantação de novas espécies de vetores induzidas pelo ser humano, através de alterações nos ecossistemas, aumento do número de animais abandonados, resistência aos inseticidas, além de outros fatores correlacionados (FOK, 2012). Em contrapartida, a expansão das áreas urbanas favoreceu o desenvolvimento das chamadas “ilhas de calor”, devido a construção de edifícios e estacionamentos, permitindo a retenção de calor durante os meses com menores temperaturas, o que possibilitou com que esses locais se tornassem propícios ao

desenvolvimento de microfilárias nos vetores competentes, tornando mais duradouro o tempo de transmissão do agente etiológico (DELLING, 2019).

Outro aspecto relatado durante a aplicação do questionário foi a identificação da presença de mosquitos nas residências. Durante a entrevista 68 (66%) dos tutores dos cães confirmaram a presença de mosquitos em região domiciliar e peridomiciliar.

Em relação aos estudos sobre a entomofauna na cidade de São Luís são dados considerados escassos, entretanto Pereira (2016) realizou uma pesquisa no município de São Luís, Maranhão, no bairro do Maracanã, nas delimitações de uma propriedade particular, onde foram identificados 16 subgêneros e 14 gêneros de mosquitos, dentre eles, *Ochlerotatus taeniorhynchus*, importante vetor incriminado na transmissão de dirofilariose canina na cidade de São Luís. Neste mesmo município, Ahid e Oliveira (1999) também detectaram infecção natural por *D. immitis* em dois espécimes: *Culex quinquefasciatus* com estágios larvais infectantes (L3) e *Aedes taeniorhynchus* apresentando estágios não infectantes (L2), caracterizadas como a segunda e terceira espécies mais frequentemente encontradas nas armadilhas, durante o período de estudo.

De acordo com Simón et al. (2014), o aumento da proliferação e da sazonalidade dos vetores, assim como o aquecimento global, com aumento das temperaturas e o prolongamento do período sazonal, são fatores que propiciam a maturação das larvas presentes nos mosquitos infectados durante todo o ano e são responsáveis pela disseminação da infecção filarial.

Em pesquisa realizada em 2001, Labarthe et al. (2003) demonstraram que a incidência da dirofilariose no Brasil era de 2%, um resultado menor ao relatado em estudos anteriores. Por esse motivo, houve o entendimento de que a prevalência da parasitose no país estava em declínio e por consequência, gerou um afrouxamento das medidas profiláticas.

Segundo Labarthe e Guerrero (2005) os programas de controle, atuantes contra enfermidades transmitidas por insetos, como dengue e malária, exerceram pressão sobre a população de vetores, o que contribuiu com a diminuição na prevalência nacional da dirofilariose canina no Brasil, de 7,9% em 1988 para 2% em 2001. No entanto, em algumas regiões, de acordo com Garcez et al. (2006), esses programas podem ter sido ineficazes. Este fator, também sugere correlação aos resultados obtidos no presente estudo.

Até o ano de 2005, a prevalência nacional apresentou média de 10,2% de cães com microfilárias de *D. immitis* e 9,1% dos animais com antígenos circulantes. As prevalências médias de microfilárias nas regiões Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul, também foram relatadas, demonstrando em torno de 10,6%, 17,2%, 5,8% e 12,0%, respectivamente. Por esses resultados, também foi possível determinar que a infecção estava mais presente em

regiões litorâneas (BARBOSA; ALVES, 2006), conforme foi encontrado neste estudo na região metropolitana de São Luís.

Já em relação à transmissão de *A. reconditum*, realizada por pulgas, a forma de dispersão do parasita pode sofrer interferência devido a condições específicas do microambiente onde o cão habita (KANNENBERG et al., 2019). Portanto, no presente estudo devido aos cuidados com a limpeza do ambiente, bem como o uso de repelentes e acesso dos animais ao atendimento veterinário, possibilitou um controle maior de vetores por parte dos tutores dos cães e conseqüentemente, evitando assim a transmissão de *A. reconditum*.

### **5.5 Conhecimento sobre dirofilariose e uso de práticas profiláticas**

Durante o inquérito, a maioria dos tutores entrevistados 76 (73,7%) também relatou que “nunca ouviu falar sobre o verme do coração” (*D. immitis*), assim como não sabiam sobre a dirofilariose e as suas formas de prevenção. A partir do questionário, foi possível observar que esses dados retratam a ausência de conhecimento dos tutores em relação ao agente etiológico da dirofilariose, à própria zoonose e suas formas de transmissão.

Quanto aos conhecimentos e práticas de rotina dos tutores de animais acerca da dirofilariose canina, dentre os entrevistados, 85 (82,5%) disseram que seus cães utilizam anti-helmínticos, porém somente 37 (35,9%) dos tutores, afirmaram que fazem controle de verminoses a cada 4 meses e poucos afirmaram o uso de repelentes.

Em estudo realizado McCall et al. (2015), durante o período de um mês, cães positivos para dirofilariose, foram divididos em grupo tratado com repelente inseticida e outro não tratado, ambos submetidos a exposição semanal a mosquitos. Após o período de estudo, o inseticida demonstrou eficácia superior a 95% na prevenção da dirofilariose e no caso dos mosquitos expostos aos cães tratados com repelentes inseticidas, aqueles que sobreviveram durante um determinado tempo, chegaram a morrer antes de desenvolverem estágios larvais infectantes (L3).

Em outra fase do estudo, McCall et al. (2015) demonstraram a ausência de nematódeo adulto nos animais submetidos a utilização de repelente inseticida e lactona macrocíclica simultaneamente. A partir desses resultados, foi possível concluir que o uso de repelente inseticida, combinado a administração de lactonas macrocíclicas, possui maior eficácia do que apenas a utilização isolada dos produtos. Isso demonstra a importância do uso frequente e concomitante de medidas de prevenção evitando a transmissão da infecção, o que não foi relatado pelos tutores dos cães, no presente estudo. Em questionário, os tutores relataram que

em 84 (81,5%) cães não foram utilizados frequentemente as lactonas macrocíclicas, dando preferência a outros endectocidas e apenas em 14 (13,5%) animais esses fármacos foram administrados associados aos métodos repelentes.

Após análise estatística, nenhuma das variáveis analisadas apresentou significância estatística; apesar de serem frequentemente descritas pela literatura como fatores de risco para a ocorrência de filariose (ALMEIDA et al., 2001; GARCEZ et al., 2006) [Tabela 2]. No entanto, propõe-se aqui o aumento do número amostral para auxiliar no entendimento dessas filariose em futuros trabalhos.

Tabela 2- Análise univariada (teste Qui-quadrado) das associações entre variáveis independentes e presença ou ausência de animais positivos para filarídeos, independente do teste em cães residentes no município de São Luís, Maranhão.

Variável	Categoria	Positivo/ exposto	%	Negativo/ exposto	%	P valor
Sexo	Fêmea	4/62	6,45%	58/62	93,55%	0,28
	Macho	4/41	9,76%	37/41	90,24%	
Raça	Sem raça definida	4/36	11,11%	32/36	88,89%	0,19
	Com raça definida	4/67	5,97%	63/67	94,03%	
Idade	Até 1 ano	0/13	0,00%	13/13	100,00%	0,16
	Acima de 1ano	8/90	8,89%	82/90	91,11%	
Restrição de movimento	Sai à rua	3/24	12,50%	21/24	87,50%	0,17
	Não sai à rua	5/79	6,33%	74/79	93,67%	
Mosquito	Sim	6/68	8,82%	62/68	91,18%	0,31
	Não	2/35	5,71%	33/35	94,29%	
Limpeza do ambiente	Sim	6/88	6,82%	82/88	93,18%	0,20
	Não	2/15	13,33%	13/15	86,67%	
Repelente	Sim	1/35	2,86%	34/35	97,14%	0,10
	Não	7/68	10,29%	61/68	89,71%	
Uso de Lactona	Sim	0/19	0,00%	19/19	100,00%	0,09
	Não	8/84	9,52%	76/84	90,48%	
Uso de Doxiciclina	Sim	0/18	0,00%	18/18	100,00%	0,10
	Não	8/85	9,41%	77/85	90,59%	
Conhecimento da doença	Sim	2/27	7,41%	25/27	92,59%	0,48
	Não	6/76	7,89%	70/76	92,11%	
Sinais clínicos	Sim	2/10	20,00%	8/10	80,00%	0,10
	Não	6/93	6,45%	87/93	93,55%	
		Negativo				

Portanto, a detecção de *A. reconditum* e *D. immitis* em cães constituem um achado importante, uma vez que estes filarídeos são responsáveis pelo surgimento de patologias com consequências leves a graves. Além disso, tem o intuito de chamar atenção aos médicos veterinários sobre a busca ativa de casos suspeitos de dirofilariose, a fim de facilitar o diagnóstico e tratamento dos casos confirmados na região estudada.

## 6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados observados neste trabalho, foi possível determinar por meio das técnicas de exame direto, teste de antígeno, técnica molecular de PCR e sequenciamento genético, a circulação dos filarídeos *Dirofilaria immitis* e *Acanthocheilonema reconditum* em cães na cidade de São Luís- MA. Portanto, ressalta-se a relevância deste estudo, uma vez que servirá como alerta aos médicos veterinários sobre as melhores formas de diagnóstico, ao considerar que todos os cães positivos foram assintomáticos quanto a presença de filarioses. Além disso, o estudo serve de alerta ao chamar atenção aos fatores de risco, tanto aos tutores de cães, como a população em geral, sobre os cuidados e formas de prevenção, servindo também como material de grande importância para a definição de políticas públicas em áreas endêmicas.

## REFERÊNCIAS

- AHID, S. M. M.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; SARAIVA, L. Q. Dirofilariose canina na Ilha de São Luís, Nordeste do Brasil: uma zoonose potencial. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 15, n. 2, p. 405–412, 1999. DOI: 10.1590/s0102-311x1999000200025.
- AHID, S. M. M.; SARAIVA, L. Q. Ocorrência da filariose canina no Município de São Luís – MA. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, p. 70, 1993.
- AHID, S. MM; OLIVEIRA, R. L. Mosquitos vetores potenciais de dirofilariose canina na Região Nordeste do. **Revista de Saúde Pública**, v. 33, n. 6, 1999.
- AHS. AMERICAN HEARTWORM SOCIETY. **Current canine guidelines for the diagnosis, prevention and management of heartworm disease (Dirofilaria immitis) infection in cats**. 2012. Disponível em: <http://www.heartwormsociety.org/>.
- AHS. AMERICAN HEARTWORM SOCIETY. Prevention , Diagnosis , and Management of Infection in Dogs Thank You to Our Generous Sponsors : **Heartworm Society**, 2014.
- AHS. AMERICAN HEARTWORM SOCIETY. **Current Canine Guidelines for the Prevention, Diagnosis, and Management of Heartworm (Dirofilaria immitis) Infection in Dogs**. 2018.
- AHS. AMERICAN HEARTWORM SOCIETY. Guidelines for the Prevention, Diagnosis, and Management of Heartworm (Dirofilaria immitis) Infection in Dogs, 2020.
- ALHO, Ana Margarida; BELO, Silvana; MEIRELES, José; CARVALHO, M. Madeira De. Dirofilariose Canina e Felina , uma Parasitose em Evolução ( II ) – Fisiopatologia , Diagnóstico e Terapêutica. **Revista Clinica animal**, v. 2, n. 20, p. 20–25, 2014.
- ALMEIDA, M. A. O.; BARROS, M. T. G.; SANTOS, E. P.; AYRES, M. C. C.; GUIMARÃES, J. E.; GONDIM, L. F. .. Parasitismo de cães por microfírias de Dirofilaria immitis: influência da raça, sexo e idade. **Online**, v. 2, n. 1971, p. 59- 64, 2001.
- ALMOSNY, N. R. P. Dirofilariose em pequenos animais domésticos e como zoonose. *In*: **Hemoparasitose em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. 1. ed. Rio de Janeiro: L. F. Livros de Veterinária Ltda, 2002. p. 135.
- AMERICAN HEARTWORM SOCIETY. **What is heartworm?**, 2007.
- ANDERSON, R. C. Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and Transmission. **CABI Publishing**, Wallingford, U.K, n. 2, p. 650, 2000.
- ANDRE, A. S. et al. The role of endosymbiotic Wolbachia bacteria in the pathogenesis of river blindness. **Science**, v. 295, n. 5561, p. 1892–1895, 2002. DOI: 10.1126/science.1068732.
- ANVARI, D.; NAROUEI, E.; DARYANI, A.; SARVI, S.; MOOSAZADEH, M.; ZIAEI HEZARJARIBI, H.; NAROUEI, M. R.; GHOLAMI, S. The global status of Dirofilaria immitis in dogs: a systematic review and meta-analysis based on published articles. **Research in Veterinary Science**, v. 131, n. April, p. 104–116, 2020. DOI: 10.1016/j.rvsc.2020.04.002.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.002>.

AROCH, I.; ROJAS, A.; SLON, P.; LAVY, E.; SEGEV, G.; BANETH, G. Serological cross-reactivity of three commercial in-house immunoassays for detection of *Dirofilaria immitis* antigens with *Spirocerca lupi* in dogs with benign esophageal spirocercosis. **Veterinary Parasitology**, v. 211, n. 3–4, p. 303–305, 2015. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.06.010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.06.010>.

ATKINS, C., SEAKS, J. L. Heartworm disease in dogs: an update. , Raleigh, NC. *In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION WORLD CONGRESS PROCEEDINGS 2011*, North Carolina State University, Raleigh, NC. **Anais**. North Carolina State University, Raleigh, NC.

ATKINS, C. Canine heartworm disease. In: Ettinger SJ, Feldman EC. *In: Textbook of veterinary internal medicine*. 6. ed. Saint Louis: Elsevier, 2005. p. 1118–1136.

ATKINS, C. **Heartworm Disease. Textbook of veterinary international medicine**. 7. Ed. ed. St Louis, Missouri: Saunders Elsevier Inc, 2010.

BARBOSA, C.L.; ALVES, L. C. Dirofilariose canina: situação atual no Brasil, v.1, p.57-62, 2006. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, p. 57–62, 2006.

BEALL, M. J.; ARGUELLO-MARIN, A.; DREXEL, J.; LIU, J.; CHANDRASHEKAR, R.; ALLEMAN, A. R. Validation of immune complex dissociation methods for use with heartworm antigen tests. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. Suppl 2, 2017. DOI: 10.1186/s13071-017-2442-8.

BOWMAN, D. D. **Parasitologia veterinária**. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2010.

BOWMAN, Dwight D.; ATKINS, Clarke E. Heartworm Biology, Treatment, and Control. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 39, n. 6, p. 1127–1158, 2009. DOI: 10.1016/j.cvsm.2009.06.003.

BRIANTI, E.; GAGLIO, G.; NAPOLI, E.; GIANNETTO, S.; DANTAS-TORRES, F.; BAIN, O.; OTRANTO, D. New insights into the ecology and biology of *Acanthocheilonema reconditum* (Grassi, 1889) causing canine subcutaneous filariosis. **Parasitology**, v. 139, n. 4, p. 530–536, 2012. DOI: 10.1017/S0031182011002198.

BRITO, A. C. et al. Prevalência da filariose canina causada por *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum* em Maceió, Alagoas, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 6, p. 1497–1504, 2001. DOI: 10.1590/s0102-311x2001000600021.

CARMICHAEL, J.; MCCALL, S.; DICOSTY, U.; MANSOUR, A.; ROYCROFT, L. Evaluation of *Dirofilaria immitis* antigen detection comparing heated and unheated serum in dogs with experimental heartworm infections. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. Suppl 2, 2017. DOI: 10.1186/s13071-017-2445-5.

CASIRAGHI, M.; BAZZOCCHI, C.; MORTARINO, M.; OTTINA, E.; GENCHI, C. A simple molecular method for discriminating common filarial nematodes of dogs (*Canis familiaris*). **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 3–4, p. 368–372, 2006. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.06.006.



CICARINO, C. **Dirofilariose Canina**. 2009. Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, São Paulo, 2009.

CIUCĂ, L.; MUSELLA, V.; MIRON, L. D.; MAURELLI, M. P.; CRINGOLI, G.; BOSCO, A.; RINALDI, L. Geographic distribution of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in stray dogs of eastern Romania. *In*: 2016, Naples, Italy. **Anais**. Naples, Italy p. 318–323.

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, 2001. DOI: 10.1016/S0304-4017(00)00377-0.

CRINGOLI, G.; RINALDI, L.; VENEZIANO, V.; CAPELLI, G. A prevalence survey and risk analysis of filariosis in dogs from the Mt. Vesuvius area of southern Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 102, n. 3, p. 243–252, 2001. DOI: 10.1016/S0304-4017(01)00529-5.

CVBD. **Canine Vector – Borne Diseases**. 2012. Disponível em: <http://www.cvbd.org/%0Aen/mosquito-borne-diseases/heartworm-disease/>.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Dirofilariosis in the Americas: A more virulent *Dirofilaria immitis*? **Parasites and Vectors**, v. 6, n. 1, p. 1–9, 2013. a. DOI: 10.1186/1756-3305-6-288.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Species diversity and abundance of ticks in three habitats in southern Italy. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 3, p. 251–255, 2013. b. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2012.11.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.11.004>.

DE ARGÔLO, E. G. G.; REIS, T.; FONTES, D. A. T.; GONÇALVES, E. C.; GIESE, E. G.; MELO, F. T. de V.; DOS SANTOS, J. N.; FURTADO, A. P. Canine filariasis in the Amazon: Species diversity and epidemiology of these emergent and neglected zoonoses. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, p. 1–9, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0200419.

DE BOSSCHERE, H.; KINDERMANS, E. Toevalsbevinding van *Dirofilaria repens* in een hematoom bij een hond in België Accidental diagnosis of *Dirofilaria repens* in a hematoma in a dog in Belgium. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, v. 88, p. 39–43, 2019.

DEARSLEY, E. J.; O'HANDLEY, R. M.; CARAGUEL, C. G. B. Is canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) endemic to South Australia? **Australian Veterinary Journal**, v. 97, n. 6, p. 191–196, 2019. DOI: 10.1111/avj.12814.

DELLING, Gabriela Fernanda. **Dirofilariose em cão da raça pinscher no município de Joinville – SC: Relato de caso. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária)**. 2019. Universidade Federal de Santa Catarina, Curitiba, 2019.

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

DILLON, R. **Feline heartworm disease. Cats get heartworms too!** 2007. Auburn University. College of Veterinary Medicine, 2007.

ENGELMANN, A. M.; SCHAFER, A. S.; LHAMA, C. L.; DORNELLES, G. L.;

- CARGNELUTTI, J. F.; RAMOS, R. A. N.; MONTEIRO, S. G.; ANDRADE, C. M. Morphological and molecular identification of *Acanthocheilonema reconditum* in a canine. **Comparative Clinical Pathology**, v. 28, n. 1, p. 271–274, 2019. DOI: 10.1007/s00580-018-2859-2.
- ETTINGER, S.; FELDMAN, E. **Textbook of veterinary internal medicine**. Saunders Elsevier, 2004. v. 2
- FERASIN, L.; VENCO, L. Filarial infections. *In: Arthropod- borne Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 2. ed. p. 55–67.
- FOK, E. The spreading of *Dirofilaria* infections in eastern European countries., Parma, 21-22 Junho 2012 (Poster). *In: THIRD EUROPEAN DIROFILARIA DAYS 2012*, Parma. **Anais**. Parma
- FREITAS, E. C. B. de.; OLIVEIRA, Elyara da Silva; LEITE, Isadora Leticia Escaraber; TORRES, Ane Pamela Capucci. DIROFILARIOSE. **REVISTA CONEXÃO ELETRÔNICA**, v. 14, p. 314–321, 2017.
- FURTADO, A. P.; MELO, F. T. V.; GIESE, E. G.; DOS SANTOS, J. N. Morphological redescription of *dirofilaria immitis*. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 3, p. 499–504, 2010. DOI: 10.1645/GE-2178.1.
- GARCEZ, L. M.; DE SOUZA, N. F.; MOTA, E. F.; DICKSON, L. A. J.; ABREU, W. U.; CAVALCANTI, V. De F. Do 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, n. 4, p. 333–336, 2006. DOI: 10.1590/s0037-86822006000400003.
- GASSEN, H. T.; CAYE, L. F. S.; ROVANI, G.; SILVA, S. O. Da; SILVA-JÚNIOR, A. N.; MIGUENS-JÚNIOR, S. A. Q.; HERNÁNDEZ, P. A. G. Linfangioma de cavidade bucal: relato de caso clínico. **Stomatos**, v. 16, n. 30, p. 82–88, 2010.
- GENCHI, C.; RINALDI, L.; MORTARINO, M.; GENCHI, M.; CRINGOLI, G. Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 4, p. 286–292, 2009. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.03.026.
- GENCHI, C.; VENCO, L.; GENCHI, M. Guideline for the laboratory diagnosis of canine and feline *Dirofilaria* infections. *In: C, In Genchi; RINALDI L, Cringoli G. (org.). **Mappe Parassitologiche 8 - Dirofilaria immitis and D. repens in dog and cat and human infections***. Naples: Rolando Editore, 2007. p. 138–144.
- GENCHI, M.; MANGIA, C.; FERRARI, N.; LOUKERI, S. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for the detection of low burden *Dirofilaria immitis* (heartworm) in dogs and cats. **Parasitology Research**, v. 117, n. 1, p. 31–34, 2018. DOI: 10.1007/s00436-017-5709-2.
- GOMES, L. R.; RODRIGUES, R. D.; SOUZA, R. R.; RODRIGUES, G. G. ...; MUNDIM, A. V.; BARBOSA, F. C. Identificação morfológica de *Acanthocheilonema reconditum* em um cão no município de Uberlândia MG: Relato de caso. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 18, 2012.
- GOMES, B. **Doenças parasitárias do cão transmitidas por insectos culicídeos e**

**psicodídeos no funchal e em barcelona.** 2009. Universidade Técnica de Lisboa, 2009.

GRUNTMEIR, J. M.; ADOLPH, C. B.; THOMAS, J. E.; REICHARD, M. V.; BLAGBURN, B. L.; LITTLE, S. E. Increased detection of *Dirofilaria immitis* antigen in cats after heat pretreatment of samples. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 19, n. 10, p. 1013–1016, 2017. DOI: 10.1177/1098612X16670562.

GUERRERO, J. Heartworm Pathophysiology in Dogs and Cats. In: Proceedings of the 30th Congress of the World Small Animal Veterinary Association, México. World Small Animal Veterinary Associ. *In:* 2005, **Anais**.

HARGIS, A. M.; LEWIS, T. P.; DUCLOS, D. D.; LOEFFLER, D. G.; RAUSCH, R. L. Dermatitis associated with microfilariae (Filarioidea) in 10 dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 10, n. 2, p. 95–107, 1999. DOI: 10.1046/j.1365-3164.1999.00136.x.

HOCH, H.; STRICKLAND, K. Canine and feline dirofilariasis: Life Cycle, Pathophysiology, and Diagnosis. *In:* COMPENDIUM: CONTINUING EDUCATION FOR VETERINARIANS 2008, **Anais**.

HOCK, H.; STRICKLAND, K. Canine and Feline Dirofilariasis: Life Cycle, Pathophysiology, and Diagnosis. **Compendium**, v. 30, n. 3, p. 133–141, 2008.

HUYNH, T.; THEAN, J.; MAINI, R. Dipetalonema reconditum in the human eye. **The British Journal of Ophthalmology**, v. 1, n. 85, p. 1384–1393, 2001.

IBGE. **IBGE**. 2010. Disponível em: <https://censo2010.ibge.gov.br/>.

IONICĂ, A. M.; D'AMICO, G.; MITKOVÁ, B.; KALMÁR, Z.; ANNOSCIA, G.; OTRANTO, D.; MODRÝ, D.; MIHALCA, A. D. **First report of Cercopithifilaria spp. in dogs from Eastern Europe with an overview of their geographic distribution in Europe** **Parasitology Research**, 2014. DOI: 10.1007/s00436-014-3931-8.

KANNENBERG, A. K.; FRONDANA, L.; MARTINS, I. H. R.; LONGHI, C. E.; FIALIALKOWSKI, M. M.; MILCZEWSKI, V. Occurrence of filarid parasites in household and sheltered dogs in the City of Joinville - Santa Catarina, Brazil. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 20, p. 1–11, 2019. DOI: 10.1590/1809-6891v20e-53529.

KLINGE, M. E. S.; ROBAYO, P. C.; BARRETO, C. A. M. *Dirofilaria immitis*: una zoonosis presente en el mundo. **Revista de Medicina Veterinaria**, v. 1, n. 22, p. 57, 2011. DOI: 10.19052/mv.560.

KNAUER, K. W. Human dirofilariasis. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 13, n. 2, p. 96–98., 1998. DOI: 10.1016/s1096-2867(98)80013-3.

KNIGHT, D. H. Heartworm heart disease. *Advances of Veterinary Sciences and Comparative Medicine*, n. 21, p. 107–149, 1977.

KNOTT, J. Method for making microfilarial surveys on day blood. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, p. 191–196, 1939. DOI: 10.1016/S0035-9203(39)90101-X.

LABARTHE, N.; GUERRERO, J. Epidemiology of heartworm: What is happening in South

America and Mexico? **Veterinary Parasitology**, v. 133, n. 2- 3 SPEC. ISS, p. 149–156, 2005. DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.04.006.

LABARTHE, Norma; PEREIRA, Marcelo; BARBARINI, Oclydes; MCKEE, William; COIMBRA, Carlos; HOSKINS, Johnny; BASILIO, Paul. Serologic prevalence of dirofilaria immitis, ehrlichia canis, and borrelia burgdorferi infections in Brazil. **Veterinary Therapeutics**, v. 4, n. 1, 2003.

LABARTHE, N. V.; PAIVA, J. P.; REIFUR, L.; MENDES-DE-ALMEIDA, F.; MERLO, A.; PINTO, C. J. C.; JULIANI, P. S.; DE ALMEIDA, M. A. O.; ALVES, L. C. Updated canine infection rates for *Dirofilaria immitis* in areas of Brazil previously identified as having a high incidence of heartworm-infected dogs. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2014. DOI: 10.1186/s13071-014-0493-7.

LAI DOUDI, Y.; BEDJA OUI, S.; MEDKOUR, H.; LATROFA, M. S.; MEKROUD, A.; BITAM, I.; DAVOUST, Bernard; OTRANTO, Domenico; MEDIANNIKOV, Oleg. Molecular approach for the diagnosis of blood and skin canine filarioids. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1–15, 2020. DOI: 10.3390/microorganisms8111671.

LARSSON M.H.M.A. *Dirofilariose canina*. In: JERICÓ M.M., Kogika M. M. & Andrade Neto J. P. (org.). **Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos**. Rio de Janeiro: Roca, 2015. p. 1215–1218.

LATROFA, M. S.; DANTAS-TORRES, F.; ANNOSCIA, G.; GENCHI, M.; TRAVERSA, D.; OTRANTO, D. A duplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection of and differentiation between *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in dogs and mosquitoes. **Veterinary Parasitology**, v. 185, n. 2–4, p. 181–185, 2012. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.10.038. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.10.038>.

LEITE, L. C. et al. PREVALÊNCIA DE *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) EM CÃES DO CANIL MUNICIPAL DE GUARATUBA, PARANÁ, BRASIL. **Estudos de Biologia**, v. 29, n. 66, p. 73–79, 2007. DOI: 10.7213/rev.v29i66.22209.

LEITE, L. C.; LUZ, E.; CIRIO, S. M.; LEITE, M. C.; MOLINARI, H. D. P.; ZADOROSNEI, A. C. B.; OLIVEIRA, T. M. F. D. S.; LEITE, S. C. Infecção de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*, Linnaeus, 1758) da região metropolitana de Guaratuba, Paraná, Brasil por microfilárias circulantes de *Acanthocheilonema reconditum* (Grassi, 1899). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 3, p. 1149–1156, 2012. DOI: 10.5433/1679-0359.2012v33n3p1149.

LEVINE, N. D. **Nematode parasites of domestic animals and of man**. Minneapolis, MN: Burgess Publishing Co., 1968.

LINDEMANN, B. A.; EVANS, T. L.; MCCALL, J. W. Clinical responses of dogs to experimentally induced *Dipetalonema reconditum* infection. **Am. J. Vet. Res.**, v. 44, p. 2170–2172, 1983.

LINDEMANN, B. A.; MCCALL, J. W. Experimental *Dipetalonema reconditum* infections in dogs. **Journal of Parasitology**, v. 70, n. 1, p. 167–168, 1984. DOI: 10.2307/3281950.

LIRA, R. N.; LEMPEK, M. R.; NEVES, C. C.; JUNIOR, J. C. S.; POFFO, G. L. D. Pesquisa de *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum* no canil municipal de Itajaí, Santa Catarina, Brasil. **PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.**, Londrina,

v. 6, n. 204, p. 17, 2012.

LITSTER, A. L.; ATWELL, R. B. Feline heartworm disease: a clinical review. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, n. 2, p. 137–144, 2008. DOI: 10.1016/j.jfms.2007.09.007.

LITTLE, S. E.; MUNZING, C.; HEISE, S. R.; ALLEN, K. E.; STARKEY, L. A.; JOHNSON, E. M.; MEINKOTH, J.; REICHARD, M. V. Pre-treatment with heat facilitates detection of antigen of *Dirofilaria immitis* in canine samples. **Veterinary Parasitology**, v. 203, n. 1–2, p. 250–252, 2014. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.01.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.007>.

LITTLE, S.; SALEH, M.; WOHLTJEN, M.; NAGAMORI, Y. Prime detection of *Dirofilaria immitis*: Understanding the influence of blocked antigen on heartworm test performance. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2018. DOI: 10.1186/s13071-018-2736-5.

LÓPEZ, J.; VALIENTE-ECHEVERRÍA, F.; CARRASCO, M.; MERCADO, R.; ABARCA, K. Identificación morfológica y molecular de filarías caninas en una comuna semi-rural de la Región Metropolitana, Chile. **Revista chilena de infectología**, v. 29, n. 3, p. 248–289, 2012. DOI: 10.4067/s0716-10182012000300006.

MAGNIS, J.; LORENTZ, S.; GUARDONE, L.; GRIMM, F.; MAGI, M.; NAUCKE, T. J.; DEPLAZES, P. 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 and Vectors**, v. 6, n. 1, p. 3–7, 2013. DOI: 10.1186/1756-3305-6-48.

MANFREDI, Maria Teresa; DI CERBO, Annarita; GENCHI, Marco. Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats. In: GENCHI, C.; RINALDI, L.; CRINGOLI, G. (org.). **Mappe Parassitologiche 8, *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections**. Italy: Rolando Editore, 2007. p. 41–45.

MARTIN, T. E.; COLLINS, G. H. Prevalence of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* in greyhounds. **Australian Veterinary Journal**, v. 62, n. 5, p. 159–163, 1985. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1985.tb07278.x.

MCCALL, J. W.; HODGKINS, E.; VARLOUD, M.; MANSOUR, Abdel-Moneim. Inhibition of the transmission of *Dirofilaria immitis* to mosquitoes by weekly exposure of microfilaremic dogs treated topically with dinotefuran-permethrin-pyriproxyfen to uninfected *Aedes aegypti*. In: PROCEEDINGS 60TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOC 2015, **Anais**.

MCCALL, John W.; GENCHI, Claudio; KRAMER, Laura H.; GUERRERO, Jorge; VENCO, Luigi. Heartworm Disease in Animals and Humans. **Advances in Parasitology**, v. 66, n. 08, p. 193–285, 2008. DOI: 10.1016/S0065-308X(08)00204-2.

MEGAT ABD RANI, Puteri Azaziah; IRWIN, Peter J.; GATNE, Mukulesh; COLEMAN, Glen T.; MCINNES, Linda M.; TRAUB, Rebecca J. A survey of canine filarial diseases of veterinary and public health significance in India. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 30, 2010. DOI: 10.1186/1756-3305-3-30. Disponível em: <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-3-30>.

MEIRELES, J.; PAULOS, F.; SERRÃO, I. Dirofilariose canina e felina. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 109, p. 70–78, 2014.

MELROSE, W. D. Lymphatic filariasis: New insights into an old disease. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 8, p. 947–960, 2002. DOI: 10.1016/S0020-7519(02)00062-0.

MORAES, M. F. D.; DA SILVA, M. X.; MAGALHÃES-MATOS, P. C.; DE ALBUQUERQUE, A. C. A.; TEBALDI, J. H.; MATHIAS, L. A.; LUX HOPPE, E. G. Filarial nematodes with zoonotic potential in ring-tailed coatis (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766, Carnivora: Procyonidae) and domestic dogs from Iguazu National Park, Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 8, p. 1–9, 2017. DOI: 10.1016/j.vprsr.2017.01.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.01.003>.

MORCHÓN, Rodrigo; CARRETÓN, E.; GONZÁLEZ-MIGUEL, J.; MELLADO-HERNÁNDEZ, I. Heartworm disease (*dirofilaria immitis*) and their vectors in Europe - new distribution trends. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 1–11, 2012. DOI: 10.3389/fphys.2012.00196.

NAGASHIMA, Julio Cesar; NEVES, Maria Francisca; ZAPPA, Vanessa. Dirofilariose. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**, n. 12, p. 1–7, 2009.

NAPOLI, E. et al. Development of *Acanthocheilonema reconditum* (Spirurida, Onchocercidae) in the cat flea *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera, Pulicidae). **Parasitology**, v. 141, n. 13, p. 1718–1725, 2014. DOI: 10.1017/S0031182014001000.

NELSON, C. T.; MCCALL, J.; CARITHERS, D. Current canine guidelines for the diagnosis, prevention, diagnosis, and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infections in dogs. In: AMERICAN HEARTWORM SOCIETY 2014, Wilmington. **Anais [...]**. Wilmington

NELSON, C. T. et al. Guidelines for the diagnosis, prevention and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 133, n. 2–3, p. 255–266, 2005. DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.07.008.

NELSON, C. T. **Dirofilaria immitis in Cats: Anatomy of a Disease**. v. 30 DOI: 10.1111/j.1751-0813.1992.tb07440.x.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 3. ed. São Paulo: Elsevier, 2006.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **MEDICINA INTERNA DE PEQUENOS ANIMAIS**. 5. ed. Rio de Janeiro.

NELSON, W.; COUTO, R. C. **Medicina Interna De Pequenos Animais**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

NEWTON, M. D.; WRIGHT, L. M. The occurrence of a dog filariid other than *Dirofilaria immitis* in the United States. **Journal of Parasitology**, v. 42, p. 246–258, 1956.

OGAWA, Guilherme Maerschner; DA CRUZ, Edson Neves; CUNHA, Priscila Nayara Araújo; CAMARGO, Luís Marcelo Aranha. Canine heartworm disease in Porto Velho: First record, distribution map and occurrence of positive mosquitoes. **Revista Brasileira de**

**Parasitologia Veterinaria**, v. 22, n. 4, p. 559–564, 2013. DOI: 10.1590/s1984-29612013000400017.

OMAR, Omar I.; ELAMIN, Elgailani A.; OMER, Sawsaan A.; ALAGAILI, Abdulaziz N.; MOHAMMED, Osama B. Serorevalence of dirofilaria immitis in dogs and cats in Riyadh city, Saudi Arabia. **Tropical Biomedicine**, v. 35, n. 2, p. 531–540, 2018.

OTRANTO, D.; TORRES F. D.; BRIANTI, E.; TRAVERSA, D., PETRIĆ, D., GENCHI C.; CAPELLI, G. Vector-borne helminths of dogs and humans - Focus on central and eastern parts of Europe. **Parasites and Vectors**, v. 6, n. 1, p. 1–14, 2013. DOI: 10.1186/1756-3305-6-38.

OTRANTO, D.; BRIANTI, E.; DANTAS-TORRES, F.; WEIGL, S.; LATROFA, M. S.; GAGLIO, Gabriella; CAUQUIL, L.; GIANNETTO, S.; BAIN, O. Morphological and molecular data on the dermal microfilariae of a species of Cercopithifilaria from a dog in Sicily. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 2–4, p. 221–229, 2011. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.05.043. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.043>.

OTRANTO, Domenico; CAPELLI, Gioia; GENCHI, Claudio. Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: Leishmaniosis vs. dirofilariosis. **Parasites and Vectors**, v. 2, p. 1–8, 2009. DOI: 10.1186/1756-3305-2-S1-S2.

OVERGAAUW, P.; VAN DIJK, E. Autochthonous case of Dirofilaria repens in a dog in the Netherlands. **Veterinary Record**, v. 164, n. 5, p. 158, 2009. DOI: 10.1136/vr.164.5.158.

PACÍFICO, L. et al. Haematological and biochemical abnormalities in hunting dogs infected with Acanthocheilonema reconditum, associated risk factors, and a European overview. **Parasitology Research**, [S. l.], v. 120, n. 6, p. 2109–2124, 2021. DOI: 10.1007/s00436-021-07179-8.

PANTCHEV, N.; ETZOLD, M.; DAUGSCHIES, A.; DYACHENKO, V. Diagnosis of imported canine filarial infections in Germany 2008 - 2010. **Parasitology Research**, v. 109, n. SUPPL. 1, p. 61–76, 2011. DOI: 10.1007/s00436-011-2403-7.

PATTON, S.; FAULKER, C. T. Prevalence of Dirofilaria immitis and Dipetalonema reconditum infection in dogs: 805 cases (1980–1989). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, n. 200, p. 1533–1534, 1992.

PEREIRA, A. C. N. **Ecologia de mosquitos (Diptera: Culicidae) na área de proteção ambiental do Maracanã, São Luís**. 2016. INSTITUTO OSWALDO CRUZ, Rio de Janeiro, 2016.

PEREIRA, N. M.; DE CARVALHO, L. M. M.; DE FONSECA, I. M. P.; CORREIA, J. M. J.; DE SILVA, J. M. F. FAZENDEIRO, M. I. Uncommon and ectopic localization of adult form of Acanthocheilonema reconditum at the large ligament and left ventricle of the dog. **Acta Parasitol Port**, v. 11, p. 1–2, 2004.

PIMENTEL, J. L.; BARBOSA, M. A. G.; FÉRRER, M. T.; CLEMENTE, S. M. S.; JÚNIOR, J. W. P. Dirofilariose canina: Relato de caso. In: XIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX 2013 – UFRPE 2013, Recife. **Anais [...]**. Recife p. 1–3.

POOLEY, W. Heartworm. **The Modern Basenji**, v. 4, p. 20, 2014. Disponível em:

[https://issuu.com/modernbasenji/docs/tmb-1q\\_2014-full](https://issuu.com/modernbasenji/docs/tmb-1q_2014-full).

RAMOS, R. A. N.; RÊGO, A. G. O.; FIRMINO, F. E. D.; RAMOS, C. A. N.; CARVALHO, G. A.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D.; ALVES, L. C. Filarioids infecting dogs in northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 226, p. 26–29, 2016. DOI: 10.1016/j.vetpar.2016.06.025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.06.025>.

RANI, P. A. M. A.; IRWIN, P. J.; GATNE, M.; COLEMAN, G. T.; TRAUB, R. J. Canine vector-borne diseases in India: A review of the literature and identification of existing knowledge gaps. **Parasites and Vectors**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2010. DOI: 10.1186/1756-3305-3-28.

REIFUR, L.; THOMAZ- SOCCOL, V.; MONTIANI- FERREIRA, F. Epidemiological aspects of filariosis in dogs on the coast of Paraná state, Brazil: With emphasis on *Dirofilaria immitis*. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 4, p. 273–286, 2004. DOI: 10.1016/j.vetpar.2004.05.017.

REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ROCHA, A. Available laboratory diagnostic methods of lymphatic filariasis. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 32, p. 265–270, 2000.

ROCHA, A. **Filariose bancroftiana: Avaliação dos Testes de Diagnóstico Disponíveis Frente às Diversas Formas Clínicas da Bancroftose**. 2004. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.

ROJAS, A.; ROJAS, D.; MONTENEGRO, V. M.; BANETH, G. Detection of *Dirofilaria immitis* and other arthropod-borne filarioids by an HRM real-time qPCR, blood-concentrating techniques and a serological assay in dogs from Costa Rica. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2015. DOI: 10.1186/s13071-015-0783-8.

SALGUEIRO, J. M. **Dirofilariose Canina. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária**. 2016. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Lisboa, 2016.

SARQUIS, J. G. **Dirofilariose (Dirofilaria immitis) em Cães e Gatos**. 2012. Universidade de Brasília. Brasília – DF, 2012.

SAVADELIS, M. D.; ROVETO, J. L.; OHMES, C. M.; HOSTETLER, J. A.; SETTJE, T. L.; DZIMIANSKI, M. T.; MOORHEAD, A. R. Evaluation of heat-treating heartworm-positive canine serum samples during treatment with Advantage Multi® for Dogs and doxycycline. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2018. DOI: 10.1186/s13071-018-2685-z.

SCARAMOZZINO, P.; GABRIELLI, S.; DI PAOLO, M.; SALA, M.; SCHOLL, F.; CANCRINI, G. Dog filariosis in the Lazio region (Central Italy): First report on the presence of *Dirofilaria repens*. **BMC Infectious Diseases**, v. 5, p. 1–7, 2005. DOI: 10.1186/1471-2334-5-75.

SCHNYDER, M.; DEPLAZES, P. Cross-reactions of sera from dogs infected with *Angiostrongylus vasorum* in commercially available *Dirofilaria immitis* test kits. **Parasites and Vectors**, v. 5, n. 1, p. 1–5, 2012. DOI: 10.1186/1756-3305-5-258.



SHEARER, P. Literature Review – Heartworm Disease. **Banfield Applied Research & Knowledge Team**, p. 1–16, 2011.

SHI, M.; NEVILLE, P. ...; NICHOLSON, J.; EDEN, J. S.; IMRIE A, H. EC. High-Resolution Metatranscriptomics Reveals the Ecological Dynamics of Mosquito-Associated RNA Viruses in Western Australia. **J Virol**, v. 91, n. 17, p. 1–17, 2017.

SILVA, A. M. A.; ALMEIDA, K. S.; SOUSA, J. J. N.; FREITAS, F. L. C. Dirofilariose canina no município de Coari, Amazonas, Brasil. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 2, p. 145–150, 2008.

SILVA, Rodrigo Costa Da; LANGONI, Helio. Dirofilariose. Zoonose emergente negligenciada. **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, p. 1614–1623, 2009. DOI: 10.1590/s0103-84782009005000062.

SILVA, M. S. G.; LELES, D.; SUDRÉ, A. P.; MILLAR, P. R.; UCHÔA, F.; BRENER, B. Prevalence and Molecular Characterization of *Dirofilaria immitis* (Filarioidea: Onchocercidae) in Dogs From Endemic Areas of Rio De Janeiro State, Brazil. **The Journal of parasitology**, v. 105, n. 2, p. 387–390, 2019. DOI: 10.1645/18-96.

SILVEIRA, Ana Rita Morgado Da. **Dirofilariose Canina - Revisão Bibliográfica**. 2018. Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Escola Universitária Vasco da Gama, 2018.

SIMÓN, F.; KRAMER, L. H.; ROMÁN, A.; BLASINI, W.; MORCHÓN, R.; MARCOS-ATXUTEGI, C.; GRANDI, G.; GENCHI, C. Immunopathology of *Dirofilaria immitis* infection. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 2, p. 161–171, 2007. DOI: 10.1007/s11259-006-3387-0.

SIMÓN, F.; LÓPEZ-BELMONTE, J.; MARCOS-ATXUTEGI, C.; MORCHÓN, R.; MARTÍN-PACHO, J. R. What is happening outside North America regarding human dirofilariasis? **Veterinary Parasitology**, v. 133, n. 2- 3 SPEC. ISS, p. 181–189, 2005. DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.03.033.

SIMÓN, F.; MORCHÓN, R.; GONZÁLEZ-MIGUEL, J.; MARCOS-ATXUTEGI, C.; SILES-LUCAS, M. What is new about animal and human dirofilariosis? **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 9, p. 404–409, 2009. DOI: 10.1016/j.pt.2009.06.003.

SIMÓN, Fernando; SILES-LUCAS, Mar; MORCHÓN, Rodrigo; GONZÁLEZ-MIGUEL, Javier; MELLADO, Isabel; CARRETÓN, Elena; MONTOYA-ALONSO, Jose Alberto. Human and animal dirofilariosis: The emergence of a zoonotic mosaic. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 3, p. 507–544, 2012. DOI: 10.1128/CMR.00012-12.

SIMÓN, L.; AFONIN, A.; LÓPEZ-DÍEZ, L. I.; GONZÁLEZ-MIGUEL, J.; MORCHÓN, R.; CARRETÓN, E.; MONTOYA-ALONSO, J. A.; KARTASHEV, V.; SIMÓN, F. Geo-environmental model for the prediction of potential transmission risk of *Dirofilaria* in an area with dry climate and extensive irrigated crops: The case of Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 200, n. 3–4, p. 257–264, 2014. DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.12.027. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.12.027>.

SIMONSEN, P. ...; FISCHER, P. ...; HOERAUF, A.; WEIL, G. J. **Manson's tropical diseases**. 23rd. ed. London: Elsevier Saunders, 2014.

SMITH, F. JR.; TILLEY, L.; OYAMA, M.; SLEEPER, M. **Manual of Canine and Feline Cardiology**. 5th. ed. St. Louis: Elsevier, 2015.

SOARES, R. L.; FRANCO, P. A.; ORTI, K. F. M. S.; DA SILVA, A. O.; COELHO, M. L.; RAMOS, C. A. N. First canine dirofilariosis report (*Dirofilaria immitis*) in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 14, n. 3, p. 152–155, 2020. DOI: 10.21708/AVB.2020.14.3.9254.

SPRINGER, A.; MONTENEGRO, V. M.; SCHICHT, S.; VROHVEC, M. G.; PANTCHEV, N.; BALZER, J.; STRUBE, C. Seroprevalence and current infections of canine vector-borne diseases in Costa Rica. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, n. JUN, p. 1–10, 2019. DOI: 10.3389/fvets.2019.00164.

TAHIR, D.; DAMENE, H.; DAVOUST, B.; PAROLA, P. First molecular detection of *Dirofilaria immitis* (Spirurida: Onchocercidae) infection in dogs from Northern Algeria. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 51, p. 66–68, 2017. DOI: 10.1016/j.cimid.2017.04.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2017.04.001>.

TAHIR, D.; DAVOUST, B.; PAROLA, P. Vector-borne nematode diseases in pets and humans in the Mediterranean Basin: An update. **Vet World**, v. 12(10), p. 1630–1643, 2019.

TAVARES, R. G.; STAGGEMEIER, R.; BORGES, A. L. P.; RODRIGUES, M. T.; CASTELAN, L. A.; VASCONCELOS, J.; ANSCHAU, M. E.; SPALDING, S. M. Molecular techniques for the study and diagnosis of parasite infection. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 17, n. 3, p. 239–248, 2011. DOI: 10.1590/S1678-91992011000300003.

TAYLOR, M. A. .; COOP, R. L. .; WALL, R. **Parasitologia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro.

TEKUZA, H.; IMAI, S.; HIDANO, S.; TSUKIDATE, S.; FUJITA, K. Various types of *Dirofilaria immitis* polyproteins selectively induce a Th2-type immune response. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 7, p. 3802–3811, 2003. DOI: 10.1128/IAI.71.7.3802-3811.2003.

THEIS, J. H.; STEVENS, F.; LAW, M. Distribution, prevalence, and relative risk of filariasis in dogs from the state of Washington (1997-1999). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 37, n. 4, p. 339–347, 2001. DOI: 10.5326/15473317-37-4-339.

TILLEY, L. P.; SMITH, Jr.; FRANCIS, W. K. **Consulta Veterinária em 5 Minutos: Espécie Canina e Felina**. 3. ed. São Paulo: Manole Ltda., 2008.

TORRES, F. D.; FIGUEREDO, L. A. *Heterodoxus spiniger* (Enderlein, 1909) on domestic dogs (*Canis familiaris*, L. 1758) from the city of Recife, Pernambuco State, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, n. 2, p. 77–80, 2007. DOI: 10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2007.26644.

TRANCOSO, T. A. L.; LIMA, N. C.; BARBOSA, S. A.; LELES, D.; FONSECA, A. B. M.; LABARTHE, N. V.; BASTOS, O. M. P.; UCHÔA, C. M. A. Detection of *Dirofilaria immitis* using microscopic, serological and molecular techniques among dogs in Cabo Frio, RJ, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, n. 1, p. 1–12, 2020. DOI: 10.1590/s1984-29612020009.

VARJÃO, R. C.; SANTOS, V. B. P.; BISPO, E. M. P.; DELFINO, N. S. C.; CAMPOS, R. N. S.; LIMA, V. F. S.; NUNES, G. D. L. Primeiro relato de Acanthocheilonema reconditum em cães. *In: ANAIS DA VI SEMANA DE MEDICINA VETERINÁRIA SEMVET – UFAL 2019, Anais.*

VELASQUEZ, L.; BLAGBURN, B. L.; DUNCAN-DECOQ, R.; JOHNSON, E. M.; ALLEN, K. E.; MEINKOTH, J.; GRURUNTMEIR, J.; LITTLE, S. E. Increased prevalence of *Dirofilaria immitis* antigen in canine samples after heat treatment. **Veterinary Parasitology**, v. 206, n. 1–2, p. 67–70, 2014. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.03.021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.021>.

VENCO, L. New insight into HW disease management: from old legends to the present looking to the future. *In: (Genchi C. Morchón R., Simón F., Montoya J. A., Org.)SECOND EUROPEAN DIROFILARIA DAYS 2009, Salamanca. Anais. Salamanca p. 107–113.*

VENCO, L.; MANZOCCHI, S.; GENCHI, M.; KRAMER, L. H. Heat treatment and false-positive heartworm antigen testing in ex vivo parasites and dogs naturally infected by *Dirofilaria repens* and *Angiostrongylus vasorum*. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 2, 2017. DOI: 10.1186/s13071-017-2444-6.

VENCO, L.; MARCHESOTTI, F.; MANZOCCHI, S. Feline heartworm disease: A “Rubik’s-cube-like” diagnostic and therapeutic challenge. **Journal of Veterinary Cardiology**, v. 17, p. S190–S201, 2015. DOI: 10.1016/j.jvc.2015.08.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvc.2015.08.004>.

VEZZANI, D.; CARBAJO, A. E.; FONTANARROSA, M. F.; SCODELLARO, C. F.; BASABE, J.; CANGIANO, G.; EIRAS, D. F. Epidemiology of canine heartworm in its southern distribution limit in South America: Risk factors, inter-annual trend and spatial patterns. **Veterinary Parasitology**, v. 176, n. 2–3, p. 240–249, 2011. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.10.046.

VEZZANI, D.; FONTANARROSA, M. F.; EIRAS, D. F. Are antigen test kits efficient for detecting heartworm-infected dogs at the southern distribution limit of the parasite in South America? Preliminary results. **Research in Veterinary Science**, v. 85, n. 1, p. 113–115, 2008. DOI: 10.1016/j.rvsc.2007.08.001.

VIEIRA, A. **Seroprevalência de Dirofilariose (*Dirofilaria immitis*) na População Canina e Felina do Concelho da Figueira da Foz, Portugal. Um Risco para a Saúde Humana?** 2015. Universidade de Santiago de Compostela. Faculdade de Medicina e Odontologia pelo Departamento de Psiquiatria, Radiologia e Saúde Pública., 2015.

VIEIRA, Ana Luísa; VIEIRA, Maria João; OLIVEIRA, João Manuel; SIMÕES, Ana Rita; DIEZ-BAÑOS, Pablo; GESTAL, Juan. Prevalence of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs of central Portugal. **Parasite**, v. 21, 2014. DOI: 10.1051/parasite/2014003.

VIEIRA, L.; SILVESTRE-FERREIRA, A. C.; FONTES-SOUSA, A. P.; BALREIRA, A. C.; MORCHÓN, R.; CARRETÓN, E.; VILHENA, H.; SIMÓN, F.; MONTOYA-ALONSO, J. A. Seroprevalence of heartworm (*Dirofilaria immitis*) in feline and canine hosts from central and northern Portugal. **Journal of Helminthology**, v. 89, n. 5, p. 625–629, 2015. DOI: 10.1017/S0022149X14000352.

VIEIRA, V. M. A. **Potencial Zoonótico por *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) Raillet &**

**Henry, 1911 na Baixada Fluminense do Rio de Janeiro.** 2019. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019. Disponível em:

<http://scioteca.caf.com/bitstream/handle/123456789/1091/RED2017-Eng->

[8ene.pdf?sequence=12&isAllowed=y%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.regsciurbeco.2008.06.005%0Ahttps://www.researchgate.net/publication/305320484\\_SISTEM\\_PEMBETUNGAN\\_TERPUSAT\\_STRATEGI\\_MELESTARI.](http://dx.doi.org/10.1016/j.regsciurbeco.2008.06.005)

VIEIRA, V. M. A.; LABARTHE, N. V.; MOURA-MARTINIANO, N.O. ALENCAR, M. F. L.; FERNANDES, P. A.; GAZETA, G. S.; MORAES-NETO, A. H. A. Guia Metodológico: “Capacitação profissional de Médicos veterinários para o enfrentamento da dirofilariose caninas no município da Baixada Fluminense, Rio de Janeiro”. **LITEB/IOC/Fiocruz**, p. 16, 2020.

WEIL, Gary J.; RAMZY, Reda M. R. Diagnostic tools for filariasis elimination programs. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 2, p. 78–82, 2006. DOI: 10.1016/j.pt.2006.12.001.