

JOANA RITA DA SILVA SANTOS FERRÃO

**PREVALÊNCIA DA DIROFILARIOSE CANINA EM
SETE CONCELHOS DA REGIÃO DO ALGARVE**

Orientadora: Prof.^a Doutora Ana Maria Araújo Munhoz

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2018

JOANA RITA DA SILVA SANTOS FERRÃO

**PREVALÊNCIA DA DIROFILARIOSE CANINA EM
SETE CONCELHOS DA REGIÃO DO ALGARVE**

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no Curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 4 de Maio de 2018, com o Despacho de Nomeação de Júri nº 168/2018 de 17/04, com a seguinte composição:

Constituição do Júri:

Presidente do Júri: Prof.^a Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Prof.^a Doutora Ludovina Padre

Orientadora: Prof.^a Doutora Ana Maria Araújo Munhoz

Vogal: Prof.^a Doutora Maria Cristina Bressan

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2018

**Se a Medicina cura o Homem,
a Medicina Veterinária cura a Humanidade.**

Louis Pasteur

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof.^a Doutora Ana Maria Munhoz, por me auxiliar na elaboração desta dissertação de mestrado, agradecendo todo o apoio e disponibilidade, que contribuíram para a finalização da mesma. Agradeço também por ter sido uma excelente professora nesta área que é do meu interesse.

Um agradecimento em especial à Prof.^a Doutora Inês Viegas, que foi fundamental para a concretização estatística desta dissertação, estando sempre disponível para esclarecer todas as minhas dúvidas. Foi uma pessoa crucial para que conseguisse dar seguimento à minha dissertação numa fase de alguma desmotivação. Um agradecimento é tão pouco, comparado ao papel importante que teve para mim.

Um agradecimento ao Hospital Veterinário de Portimão, em especial à Prof.^a Doutora Josefina Coucelo, ao Dr. Pedro Coucelo e à Dr.^a Michelle Paralta por permitirem que fizesse parte desta equipa durante o meu estágio curricular, foi uma experiência enriquecedora quer a nível profissional como pessoal. Agradeço mais uma vez à Prof.^a Doutora Josefina Coucelo por fazer do seu laboratório, um pouco meu para que a concretização deste estudo fosse possível.

Um agradecimento à Dr.^a Ana Rebelo, por ser a companhia dos durante os turnos noturnos. À Dr.^a Michelle Paralta por ser um exemplo a seguir na área da cirurgia. À Dr.^a Carolina Carrujo, que foi sempre uma excelente médica veterinária, pronta a esclarecer as minhas dúvidas. E a toda a equipa em geral, que me recebeu sempre de “braços abertos” fazendo sentir-me parte da vossa “família”.

Um agradecimento aos meus colegas estagiários, Joana Margarida e Cláudio Grou, que sempre entendiam as minhas dúvidas. Um obrigada.

À Dr.^a Carolina Rocha, que além de uma médica veterinária que tenho imenso orgulho em conhecer, é um exemplo a seguir na área da medicina interna, tenho tanto mas tanto a aprender com ela, que não me canso de nenhuma conversa. Além de uma excelente médica tem sido uma amiga fantástica, apoiando-me e dando sempre força para não desistir dos meus sonhos quando eles já estão tão perto.

Um agradecimento à minha família, em especial ao meu pai e à minha mãe, pelo apoio que me deram durante este percurso, e por permitirem que este sonho fosse possível. Sem eles teria sido impossível ganhar asas e ir estudar para Lisboa. Mas principalmente à minha mãe, que sempre me apoiou quando a “caminhada” se tornava difícil, quando não me sentia capaz de concretizar o que tinha prometido a mim mesma conseguir. Agradeço também à minha irmã e ao meu cunhado, e à minha pequena Violeta, a minha sobrinha que tanto adoro.

Ao meu marido, que apesar de não ter feito parte desta caminhada do início, sempre conseguiu entender esta minha paixão. E por me apoiar sempre, mas sem pressionar, permitindo-me concretizar os meus passos no meu tempo. E por entender e partilhar comigo a paixão pelo mundo felino.

A todos os meus amigos, em especial às minhas amigas de infância, Telma Viana e Inês Martins, que apesar da distância Lisboa-Algarve, sempre permitiram que a nossa amizade permanecesse igual, sem que a distância afetasse. E a todas as minhas outras amizades algarvias que nunca me abandonaram, tornando este percurso menos penoso, apesar do quanto me custou a distância.

Agradeço também às minhas queridas amigas de universidade, em especial à Natacha Lima e à Yara Zau, que foram fundamentais neste percurso, em especial à Natacha, que fez parte da minha vida académica desde o início, apesar desta amizade só ter fortalecido no 2º ano do curso, um obrigada por seres o meu ombro amigo sempre que era necessário. À Yara, apesar da amizade mais recente, foi fundamental para mim. É uma pessoa genuína e fantástica, uma das melhores pessoas que Lisboa me podia ter dado. Agradeço também à Joana Martins, que apesar de a nossa amizade não ter começado da melhor maneira, é uma das pessoas mais importantes que ganhei nesta fase.

Por último, mas com a maior importância, um agradecimento a todos os meus 4 patas, à Luna, que entrou na minha vida no 2º ano da universidade mas fez com que me apaixonasse verdadeiramente pelo mundo felino. Ao Lucky, que me acompanha há 15 anos, e que tal como pretendia conseguiu fazer parte deste sonho até à reta final. Ao Jimmy, que me fez olhar com outros olhos para a área da parasitologia, por ser o meu grandalhão que infelizmente tem Leishmaniose. À Maggie que me adotou durante um estágio extracurricular, deixando-me completamente rendida aos seus miados assim que chegava ao internamento

pela manhã, acabando por traze-la para casa. E ao Koda, um guerreiro que nasceu de uma cesariana complicada. À minha estrelinha Fina, que me deixou a meio deste percurso e tanto mas tanto me custou, uma dor que ainda hoje faz parte de mim, a minha pequena Fina. À minha estrelinha Putchy, nascemos e crescemos juntos, mas partiste demasiado cedo. Um obrigada a todos os patudos que passaram pela minha vida. Foram todos importantíssimos para que este fosse o meu sonho. Um enorme obrigada.

Resumo

A Dirofilariose é uma doença endémica em Portugal, sendo uma das doenças parasitárias do cão com maior relevância do país. Trata-se de uma doença cardiopulmonar provocada pelo nemátode *Dirofilaria immitis* que tem como microbiótopos principais o ventrículo direito, a artéria pulmonar e veia cava. O cão é o principal hospedeiro, porém pode afetar também o gato e menos frequentemente outras espécies domésticas e selvagens, assim como o Homem. Trata-se portanto de uma parasitose que é uma zoonose e que nos seres humanos se manifesta principalmente pela forma pulmonar. Por ser uma doença transmitida por vetores, o controlo e prevenção dos mosquitos vetores da *Dirofilaria immitis* é de extrema importância limitando a sua disseminação.

Com o presente trabalho pretendeu-se avaliar a prevalência da Dirofilariose em sete concelhos da região do Algarve, nomeadamente Portimão, Lagoa, Silves, Olhão, Vila do Bispo, Albufeira e Lagos.

Foram analisados 135 animais que se apresentaram para consulta no HVP ao longo do ano de 2016 que apresentaram sintomatologia compatível com dirofilariose ou que fossem iniciar tratamento preventivo da doença. Os métodos de diagnóstico foram o teste de antígeno sérico para *Dirofilaria immitis* e o esfregaço sanguíneo.

Os resultados indicaram prevalência de 15,6% dos animais positivos, sendo 5,9% de Portimão, 5,9% de Lagoa, 2,2% de Lagos e 1,5% de Silves. Nos concelhos de Olhão, Vila do Bispo e Albufeira não se observaram animais positivos. Quanto ao porte dos animais e tipo de habitação, comprovou-se que os animais de porte médio e grande, assim como animais que permaneciam mais tempo no exterior das habitações foram os mais afetados pela parasitose.

De acordo com o resultado observado, torna-se fundamental alertar os proprietários para a importância da prevenção da Dirofilariose.

Palavras-chave: *Dirofilaria immitis*, prevalência, cão, Algarve

Abstract

Dirofilariosis is an endemic disease in Portugal, being one of the most important parasitic diseases of the dog in the country. It is a cardiopulmonary disease caused by a nematode, *Dirofilaria immitis*, which occurs mainly in the right ventricle, pulmonary artery and vena cava, and may affect other organs such as the kidneys and liver. As the dog is the main reservoir of *Dirofilaria immitis*, it is extremely important to control and prevent this disease in the same, limiting the dissemination of Heartworm disease.

The aim of this study was to evaluate the prevalence of heartworm disease in seven counties in the Algarve region, namely Portimão, Lagoa, Silves, Olhão, Vila do Bispo, Albufeira and Lagos.

A total of 135 animals that were submitted for consultation at the HVP throughout the year 2016 that presented symptoms compatible with heartworm disease or that were to initiate preventive treatment of the disease were analyzed. Diagnostic methods were the serum antigen test for *Dirofilaria immitis* and the blood smear.

The results indicated a prevalence of 15.6% of positive animals, 5.9% in Portimão, 5.9% in Lagoa, 2.2% in Lagos and 1.5% in Silves. In the municipalities of Olhão, Vila do Bispo and Albufeira no positive animals were observed. Regarding the size of the animals and the type of housing, it was verified that the animals of medium and large size, as well as animals that stayed longer outside the dwellings were the ones most affected by parasitosis.

According to the observed result, it becomes essential to alert the owners to the importance of preventing heartworm disease.

Key words: *Dirofilaria immitis*, prevalence, dog, Algarve

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Acrónimos

® - Marca registada

Ag - Antigénio

AHS – American Heartworm Society

ALT – Alanina transaminase

AST – Aspartato transaminase

BID – A cada 12 horas

CID – Coagulação intravascular disseminada

ECG – Eletrocardiograma

EDTA – Ethylenediamine Tetraacetic Acid

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EOD – A cada 48 horas

FAS – Fosfatase alcalina

FDA – Food and Drug Administration”

GGT – Gama GT

HVP – Hospital Veterinário de Portimão

IgG – Imunoglobulina G

IM - Intramuscular

L1 – Primeiro estágio larvar de *D. Immitis*

L2 – Segundo estágio larvar de *D. immitis*

L3 – Terceiro estágio larvar de *D. immitis*, designada de microfilária

L4 – Quarto estágio larvar de *D. immitis*

L5 – Quinto estágio larvar de *D. immitis*

Mf - microfilarémia

rpm – Rotações por minuto

SID – A cada 24 horas

Índice Geral

1.	Descrição do Estágio Curricular	17
1.1	Casuística do estágio.....	18
1.1.1	Distribuição dos casos por área clínica.....	18
1.1.1.1	Clínica médica.....	19
1.1.1.2	Clínica cirúrgica	20
2	Revisão Bibliográfica.....	21
2.1	Dirofilariose	21
2.1.1	Etiologia	21
2.1.2	Ciclo de vida.....	22
2.1.2.1	Transmissão.....	23
2.1.2.1.1	Condições ideais para o desenvolvimento do hospedeiro invertebrado...	24
2.1.2.2	Hospedeiro definitivo	25
2.1.3	Fatores predisponentes ao desenvolvimento da doença	27
2.2	Dirofilariose canina.....	28
2.2.1	Prevalência.....	28
2.2.1.1	Prevalência da dirofilariose no mundo.....	28
2.2.1.2	Prevalência da dirofilariose em Portugal	30
2.2.2	Patogenia	32
2.2.2.1	Papel da simbiose com <i>Wolbachia</i> spp.	34
2.2.3	Sintomatologia.....	35
2.2.3.1	Diagnósticos diferenciais	37
2.2.4	Diagnóstico.....	38
2.2.4.1	História clínica e exame físico	38
2.2.4.2	Exames laboratoriais	39
2.2.4.2.1	Análises clínicas	39
2.2.4.2.2	Testes para antígenos	39

2.2.4.2.3	Deteção de microfilárias.....	41
2.2.4.3	Exames complementares de diagnóstico.....	43
2.2.4.3.1	Radiografia torácica	43
2.2.4.3.2	Eletrocardiograma	44
2.2.4.3.3	Ecocardiografia	44
2.2.5	Tratamento.....	45
2.2.5.1	Terapia adulticida.....	47
2.2.5.1	Terapia microfilaricida.....	48
2.2.5.2	Tratamento da <i>Wolbachia</i>	49
2.2.5.3	Uso de doxiciclina com lactonas macrocíclicas	49
2.2.5.4	Tratamento recomendado pela Sociedade Americana de Dirofilariose	50
2.2.5.1	Tratamento cirúrgico	51
2.2.5.2	Complicações pulmonares após tratamento adulticida	52
2.2.6	Profilaxia	52
2.2.7	Prognóstico	53
3	Objetivos	55
4	Material e métodos.....	55
4.1	Metodologia	55
4.2	Área geográfica do estudo	55
4.3	Caracterização da amostra	58
4.3.1	Sexo e estado fértil	58
4.3.2	Classe de idades.....	59
4.3.3	Portes	59
4.3.4	Raças.....	60
4.3.5	Pelagem	60
4.3.6	Tipo de habitat e presença de coabitantes	61
4.3.7	Local de residência	62

4.3.8	Viagens realizadas	63
4.3.9	Profilaxia – vacinação e desparasitação	63
4.3.10	Presença de sinais clínicos.....	63
4.4	Meios de diagnóstico utilizados na deteção de <i>D. immitis</i>	64
4.4.1	Pesquisa da presença de antígenos séricos de <i>D. immitis</i>	64
4.4.2	Esfregaço sanguíneo	65
4.5	Análise estatística	65
5	Resultados	66
5.1	Prevalência da dirofilariose.....	66
5.2	Prevalência da dirofilariose por concelho.....	67
5.3	Análise estatística inferencial	67
5.3.1	Relação com o sexo	67
5.3.2	Relação com o estado fértil	68
5.3.3	Relação com a idade	68
5.3.4	Relação com o porte	68
5.3.5	Relação com a raça	69
5.3.6	Relação com a pelagem	69
5.3.7	Relação com o tipo de habitat	69
5.3.8	Relação com a presença de coabitantes	70
5.3.9	Relação com viagens realizadas	70
5.3.10	Relação com o local de residência.....	70
5.3.11	Relação com a profilaxia	71
5.3.12	Relação com a presença de sintomatologia	72
5.3.12.1	Relação com a tosse	72
5.3.12.2	Relação com a prostração.....	73
5.3.12.3	Relação com a distensão abdominal.....	73
5.3.12.4	Relação com a anorexia.....	74

5.3.12.5	Relação com a perda de peso	74
5.3.12.6	Relação com a dispneia	74
5.3.12.7	Relação com a síncope	74
5.3.12.8	Relação com as alterações cardíacas	75
5.3.12.9	Relação com outra sintomatologia	75
6	Discussão.....	76
7	Conclusão	81
8	Referências Bibliográficas	83
9	Apêndice I	87
10	Anexo	88
10.1	Anexo I	88
10.2	Anexo II	89

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Classificação da dirofilariose canina.....	37
Tabela 2 – Protocolo de tratamento recomendado pela AHS.....	50
Tabela 3 – Fármacos profiláticos para a dirofilariose.....	53

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Distribuição dos animais observados por espécie.....	18
Gráfico 2 – Distribuição dos casos pelas diferentes áreas.....	19
Gráfico 3 – Distribuição dos casos acompanhados por especialidade e espécie.....	19
Gráfico 4 – Distribuição dos casos cirúrgicos por especialidade e espécie.....	20
Gráfico 5 – Caracterização da amostra quanto ao sexo.....	58
Gráfico 6 – Caracterização da amostra quanto ao estado fértil.....	58
Gráfico 7 – Caracterização da amostra relativamente à classe de idades.....	59
Gráfico 8 – Distribuição da amostra pela classe de pesos.....	60
Gráfico 9 – Distribuição da amostra pelo tipo de pelagem.....	61
Gráfico 10 – Distribuição da amostra pelo tipo de habitat.....	61
Gráfico 11 – Distribuição da amostra por cães sem e com coabitantes.....	62
Gráfico 12 – Distribuição da amostra pelos 7 concelhos englobados no estudo.....	62
Gráfico 13 – Prevalência da dirofilariose nos 7 concelhos da região do Algarve.....	66
Gráfico 14 – Prevalência da dirofilariose de acordo com o tipo de diagnóstico.....	66
Gráfico 15 – Relação do sexo do animal com a presença da dirofilariose.....	67
Gráfico 16 – Relação entre a presença da dirofilariose e o estado fértil do animal.....	68
Gráfico 17 – Relação entre a classe de pesos e a presença da doença.....	69
Gráfico 18 – Relação entre a presença da dirofilariose e o tipo de habitat do animal.....	70
Gráfico 19 – Relação entre a presença da doença e o local de residência.....	71
Gráfico 20 – Relação da presença da dirofilariose com a vacinação dos animais.....	71
Gráfico 21 – Relação entre a presença da doença e a desparasitação externa.....	72
Gráfico 22 – Relação entre a presença da doença e a sintomatologia.....	72
Gráfico 23 – Relação da sintomatologia de tosse com a presença da doença.....	73
Gráfico 24 – Relação da sintomatologia de prostração com a presença da doença.....	73
Gráfico 25 – Relação entre a perda de peso e a presença da dirofilariose.....	74
Gráfico 26 – Relação entre a presença da doença e outra sintomatologia apresentada.....	75

Índice de Figuras

Figura 1 – <i>Culex pipiens</i>	24
Figura 2 – <i>Dirofilaria immitis</i> : microfilária visível ao microscópio.....	25
Figura 3 – Esquema do ciclo de vida da <i>D. immitis</i>	27
Figura 4 – Distribuição da dirofilariose canina provocada pela <i>D. immitis</i> em Portugal e na Espanha.....	32
Figura 5 – Radiografia torácica de dirofilariose moderada.....	44
Figura 6 – Ecocardiografia com presença de dirofilarias.....	45
Figura 7 – Ilustração no mapa do Algarve com uma “estrela” dos concelhos incluídos no estudo.....	55
Figura 8 – Rio Arade a passar entre Portimão e Lagoa.....	57
Figura 9 – Rio Arade em Silves, junto à Ponte Romana.....	57
Figura 10 – Técnica do Uranotest Dirofilaria.....	65

1. Descrição do Estágio Curricular

A realização do estágio curricular teve por objetivo melhorar a prática e conhecimentos na área da clínica de pequenos animais desse modo foi realizado no Hospital Veterinário de Portimão, sob a orientação da Professora Doutora Josefina Coucelo, com a duração de 4 meses e 25 dias, iniciado a 1 de Setembro de 2016 e terminado a 25 de Janeiro de 2017.

O Hospital Veterinário de Portimão encontra-se aberto 24 horas por dia durante todos os dias da semana e presta serviços nas diversas áreas de medicina e cirurgia de animais de companhia e exóticos, destacando-se a área de cardiologia, cirurgia, cuidados intensivos, oftalmologia, endocrinologia, estomatologia, gastroenterologia, medicina interna, imagiologia, nefrologia, ortopedia e dermatologia. As instalações do Hospital são compostas por 2 consultórios destinados a consultas com cães, e 1 consultório destinado a consultas de gatos, assim como 2 áreas de internamento distintas para cães e gatos. Tem também uma sala de tratamentos ampla, bem como uma sala de internamento específica para animais com doenças infecto-contagiosas. Para fins imagiológicos, apresenta uma sala de radiologia, relativamente aos exames com ecógrafo, quer ecografias como ecocardiografias, são efetuados na sala de tratamento numa bancada específica para o efeito. Ainda para fins de diagnóstico, apresenta também um laboratório interno que permite análises bioquímicas, hematológicas, bem como visualização de lâminas ao microscópio. Relativamente aos atos cirúrgicos, tem para esse fim uma sala de cirurgia bem como uma sala de esterilização dos materiais.

Deste modo, ao longo do estágio curricular foram cumpridos 3 turnos distintos, à terça e quarta-feira da semana era cumprido o horário das 8h às 16h, às quintas e sextas das 16h às 00h, e domingo das 00h às 8h, sendo assim cumpridas 40 horas semanais.

Durante os vários turnos eram efetuadas as várias funções necessárias, nomeadamente a presença nas consultas de modo a assistir e auxiliar o médico veterinário presente, bem como acompanhar e monitorizar os animais internados, assim como auxiliar em todos os meios de diagnóstico necessários aos animais em consulta bem como os internados.

Perante os atos cirúrgicos era feito o auxílio na preparação pré-cirúrgica do animal bem como o acompanhamento do médico veterinário responsável pela cirurgia durante a cirurgia, permitindo a monitorização da anestesia antes, durante e após a cirurgia.

No horário de urgência, cumpria o turno na presença de um médico veterinário auxiliando nas urgências que decorriam e monitorizando os internados presentes, bem como todos nos atos médicos necessários durante esse período.

1.1 Casuística do estágio

Durante o período do estágio foram observados 823 animais, que se distribuem por espécie segundo a seguinte gráfico:

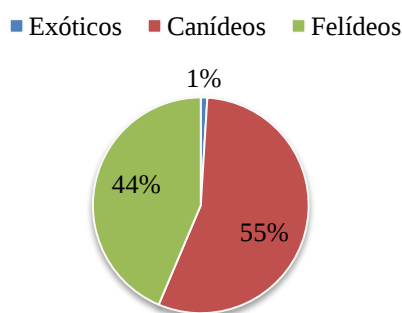


Gráfico 1 – Distribuição dos animais observados por espécie (n=823)

Com base nos dados apresentados no gráfico 1, verifica-se que os canídeos foram a espécie dominante (55%), seguindo-se os felídeos (44%).

1.1.1 Distribuição dos casos por área clínica

Ao longo do estágio foram acompanhados diversos casos que se distribuem por 3 áreas: medicina preventiva, clínica cirúrgica e clínica médica. Os dados apresentados nesta seção dizem respeito ao número de ocorrências por espécie animal, e não ao número de animais, razão pela qual o mesmo animal poderá ser contabilizado mais do que uma vez caso

tenha sido submetido a diversos procedimentos ou tenha sido diagnosticado com mais do que uma condição clínica ou cirúrgica.

Distribuição dos Casos

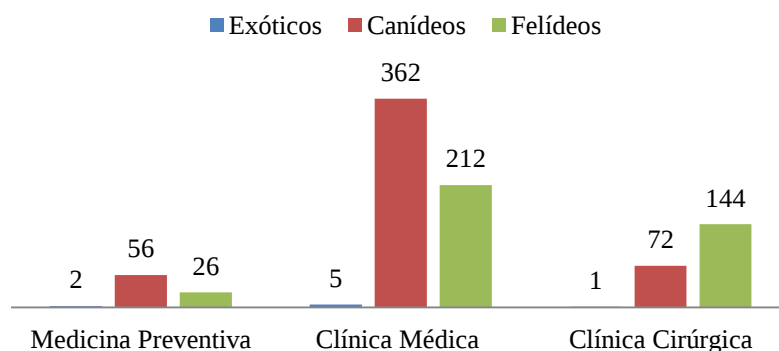


Gráfico 2 – Distribuição dos casos pelas diferentes áreas

Na medicina preventiva são contempladas consultas de vacinação, desparasitação e colocação de identificação eletrónica. Esta área deve ser de extrema importância para o médico-veterinário, pois possibilita ao mesmo a divulgação e promoção da saúde por meios preventivos.

1.1.1.1 Clínica médica

A clínica médica apresentada consiste em todos os casos acompanhados nas consultas e nos internamentos, e encontra-se dividido por várias especialidades:

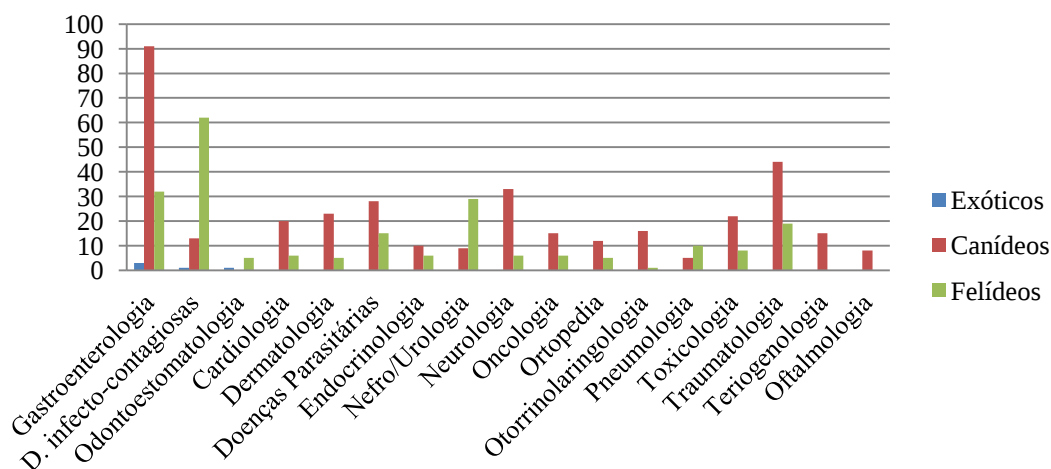


Gráfico 3 – Distribuição dos casos acompanhados por especialidade e espécie

Como é visível no gráfico, a especialidade de Gastroenterologia foi a mais frequente nos canídeos, assim como nos exóticos. Relativamente aos felídeos, a mais frequente foram as doenças infecto-contagiosas.

1.1.1.2 Clínica cirúrgica

Na área da clínica cirúrgica foram acompanhadas 4 especialidades distintas ilustradas no seguinte gráfico:

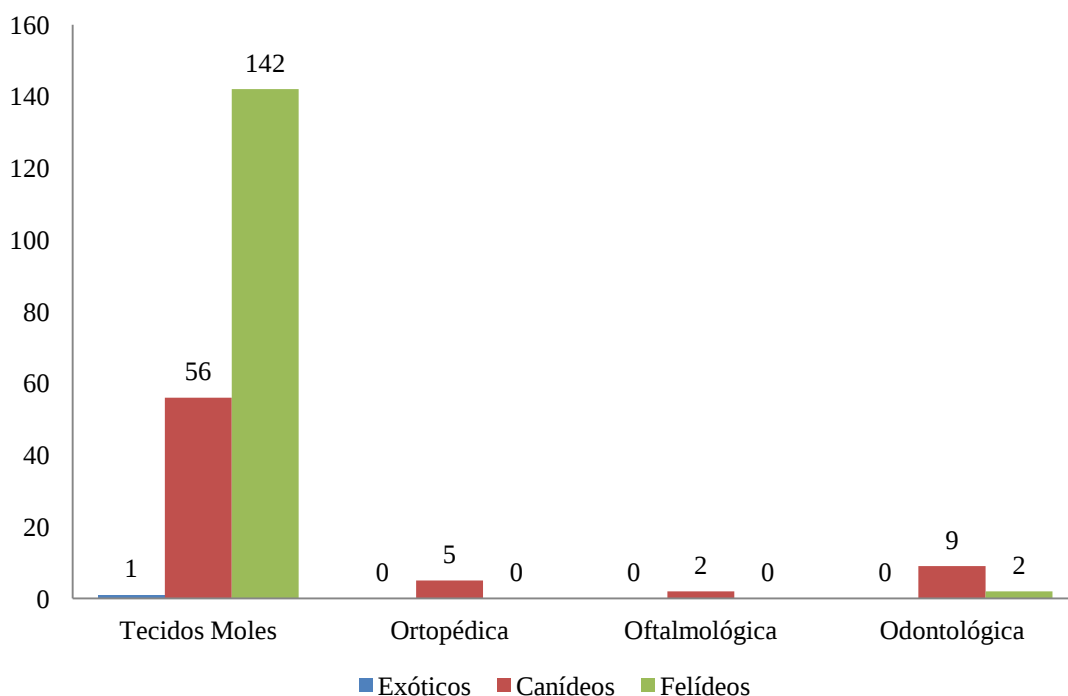


Gráfico 4 – Distribuição dos casos cirúrgicos por especialidade e espécie

A área mais acompanhada em todas as espécies foi a área de tecidos moles, nomeadamente com cirurgias de ovário-histerectomia e orquiectomia. Contudo foi possível acompanhar outras cirurgias de tecidos moles, nomeadamente uretostomia, mastectomia, entre outras.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Dirofilariose

2.1.1 Etiologia

A dirofilariose é uma doença cardiopulmonar, que ocorre principalmente no ventrículo direito, artéria pulmonar e na veia cava, podendo afetar outros órgãos como os rins e o fígado (Romero, 1984; Urquhart *et al.*, 1996; Campillo *et al.*, 1999; MSD Animal Health [Brochura], 2013). O agente etiológico desta doença é um parasita, como tal pertence ao Reino Animal, inserindo-se no Filo *Nematelmintos* e Classe *Nematoda*, Ordem *Spirurida*, Subordem *Spirurina*, Superfamília *Filarioidea*, Família *Onchocercidae*, Género *Dirofilaria*, tratando-se da espécie *Dirofilaria immitis* (Urquhart *et al.*, 1996; Campillo *et al.*, 1999).

Dirofilaria immitis apresenta um corpo filiforme alongado de coloração branca e não segmentado com simetria bilateral. Externamente apresenta uma cutícula que é incolor e possui estriações transversais e longitudinais. Esta cutícula juntamente com a musculatura existente permite os movimentos independentes do esófago e a movimentação do parasita através de movimentos ondulatórios (Campillo *et al.*, 1999).

Relativamente à cápsula bucal, observa-se a presença de seis pequenas papilas ao redor da abertura bucal, e em relação ao esófago, apresenta uma porção anterior muscular e outra posterior glandular, porém mal delimitadas (Campillo *et al.*, 1999).

O dimorfismo sexual desta espécie permite distinguir os machos das fêmeas, sendo que nos machos o tamanho é menor, cerca de 120 – 200 mm de comprimento e 0,7 – 0,9 mm de largura (Romero, 1984; Campillo *et al.*, 1999). Além da diferença de tamanho, o extremo posterior termina em espiral com uma cauda afilada arredondada (Romero, 1984). Os órgãos reprodutores são constituídos por um único testículo contínuo e um canal deferente que termina num ducto ejaculador na cloaca (Urquhart *et al.*, 1996). Na cauda são visíveis espículas desiguais em tamanho e forma, sendo a direita mais pequena, que são introduzidas no orifício genital da fêmea durante a cópula. Apesar da existência de espículas esta espécie é desprovida de gubernáculo (Urquhart *et al.*, 1996; Campillo *et al.*, 1999).

Relativamente à fêmea, apresenta um tamanho de 250- 310 mm de comprimento e 1,0 – 1,3 mm de largura (Romero, 1984; Campillo *et al.*, 1999). Os órgãos reprodutores consistem no ovário, oviduto e útero que se abrem na vulva (Urquhart *et al.*, 1996). A vulva

encontra-se junto ao esófago e a cauda é arredondada sem terminar em espiral. As fêmeas são responsáveis por libertar para a circulação as larvas, que se denominam microfírias e apresentam um tamanho de cerca de 218 – 340 µm de comprimento com 4,5 – 7,3 µm de largura com um corpo fusiforme (Campillo *et al.*, 1999).

A distribuição da *Dirofilaria immitis* é essencialmente em zonas temperadas quentes e tropicais em todo o mundo, incluindo o sul da Europa e o Canadá (Urquhart *et al.*, 1996). Em Portugal, a prevalência da dirofilariose canina foi descrita por Araújo (1996) com prevalência em cães das regiões do sul de Portugal, como Algarve (12%), Alentejo (16,5%), Ribatejo (16,7%); regiões do norte de Portugal, como Beira Litoral (4,2%) e Entre Douro e Minho (6,9%) e na Ilha da Madeira (30%), com uma prevalência global de 14,1% de cães que apresentavam microfilaremia.

No estudo realizado por Alho (2017), Setúbal registou a maior prevalência (24,8%), seguido de Coimbra (13,8%) e Santarém (13,2%), observando-se uma prevalência média global de 15,1%. A espécie *D. immitis* foi detetada nos três distritos, durante os três anos de estudo. Este mesmo autor também estudou a prevalência em outras regiões como Beja, que no presente estudo, registou o maior número de casos de infeção por *D. immitis* (8,9%), seguido pela Guarda (6,7%), Faro (2,7%) e Castelo Branco (2,5%). No total observou uma prevalência global de 11,9% de cães positivos a *D. immitis*.

2.1.2 Ciclo de vida

Este nemátode apresenta um ciclo de vida heteroxeno, quer isto dizer que necessita de um hospedeiro intermediário ou vetor para completar o seu ciclo de vida. (Campillo *et al.*, 1999).

O ciclo evolutivo se completa após quatro mudas, sendo os sucessivos estágios larvares designados L₁, L₂, L₃, L₄ e finalmente o L₅ que corresponde ao adulto imaturo. Estas mudas ocorrem em 2 hospedeiros, as duas primeiras mudas ocorrem no hospedeiro intermediário e a infeção do hospedeiro definitivo ocorre através da inoculação das L₃ quando o hospedeiro intermediário se alimenta. Depois da infeção ocorrem as restantes mudas, iniciando-se um novo ciclo após a cópula do macho com a fêmea (Urquhart *et al.*, 1996).

2.1.2.1 Transmissão

O vetores responsáveis pela transmissão da Dirofilariose são mosquitos culicídeos pertencentes aos géneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* (Romero, 1984; Silva & Langoni, 2008). Na Europa *Culex pipiens* é considerado o principal vetor.

Em Portugal *Culex theileri*, *Culex pipiens*, *Anopheles maculipennis*, *Anopheles atroparvus*, *Aedes caspius* e *Aedes detritus* foram apontados como vetores naturalmente infectados com *D. immitis* (Ferreira et al., 2015).

Somente o mosquito fêmea tem a capacidade hematófaga advindo daí o seu papel transmissor da doença. A fêmea ao alimentar-se de um animal infetado irá ingerir microfilárias que se encontram na corrente sanguínea do hospedeiro definitivo que no mosquito, passarão do intestino médio para os túbulos de Malpighi, local onde é feita a muda e as microfilárias atingem a fase infetante, ou seja, L₁, L₂ e L₃. Este período de muda tende a demorar cerca de 2 a 2,5 semanas e posteriormente as larvas L₃ migram até as peças bucais onde ficam depositadas junto com a hemolinfa, aderidas à pele, até que o mosquito se alimente de novo (Campillo *et al.*, 1999; Nelson & Couto, 2010). Para que este ciclo se complete são precisas duas semanas a uma temperatura ambiente superior a 16°C, porém em ambientes tropicais e no verão apenas demora 8-10 dias (Campillo *et al.*, 1999).

A larva L₃ durante a picada do mosquito é transmitida através de uma solução de continuidade para o hospedeiro definitivo (Campillo *et al.*, 1999).



Figura 1 – *Culex pipiens* (<https://research.pasteur.fr/en/culex-pipiens-2-jpg/>)

2.1.2.1.1 Condições ideais para o desenvolvimento do hospedeiro invertebrado

Os mosquitos culicídeos necessitam de ambientes húmidos para que ocorra o desenvolvimento das larvas e de temperaturas médias superiores a 14°C para completar o ciclo biológico. O aumento da população de mosquitos depende da temperatura, humidade relativa, chuvas e intensidade da luz. A intensidade da luz e o vento são fatores críticos para a disseminação deste vetor e consequentemente da transmissão da Dirofilariose (Campillo *et al.*, 1999).

As microfilárias têm a capacidade de completar o seu desenvolvimento no hospedeiro intermediário em apenas 2 semanas a temperaturas de 14-16°C. Contudo o seu desenvolvimento é inibido a temperaturas de 12°C, porém tem a capacidade de hibernar e completar o seu desenvolvimento assim que as temperaturas aumentem (Campillo *et al.*, 1999). A temperatura de 27°C e humidade relativa de 80%, permite o desenvolvimento de L1 a L3, no interior do hospedeiro intermediário, em 10 a 14 dias (AHS, 2014).

A estação do ano favorável para o desenvolvimento dos mosquitos e transmissão da *Dirofilaria immitis*, está dependente da temperatura a que as larvas do parasita estão expostas durante a maturação, no interior do mosquito. O pico de transmissão da doença nas regiões temperadas do hemisfério norte ocorre entre Julho e Agosto (Nelson & Couto, 2010). Na Europa, o pico de transmissão ocorre entre Junho e Setembro, e em Portugal desde Maio até

Outubro, podendo este período vir a aumentar devido ao aquecimento global (Alonso & Gómez, 2015)

2.1.2.2 Hospedeiro definitivo

O principal hospedeiro definitivo e reservatório desta doença é o cão, tendo também um papel importante na transmissão para outros hospedeiros. Mamíferos como canídeos silvestres, principalmente lobos, coiotes e raposas também podem ser hospedeiros definitivos (Campillo *et al.*, 1999; Ettinger & Feldman, 2010; Simón *et al.*, 2012, citado por Alho *et al.*, 2014a). Além dos canídeos silvestres também os furões, cavalos, leões-marinhos e castores podem ser infetados porém com microfilarémia rara (Ettinger & Feldman, 2010; Simón *et al.*, 2012, citado por Alho *et al.*, 2014a). Menos frequentemente os felinos e os humanos podem ser hospedeiros acidentais de *Dirofilaria immitis* (Simón *et al.*, 2012, citado por Alho *et al.*, 2014a).

Durante a alimentação os vectores que foram previamente infetados e que albergam as formas infetantes L3, deposita as numa gota de hemolinfa na pele do hospedeiro definitivo através de uma solução de continuidade originada pela picada, ocorrendo neste momento a transmissão da *D. immitis* (AHS, 2014; Simón *et al.*, 2012, citado por Alho *et al.*, 2014a). No momento da picada são transmitidas no máximo 10 a 12 formas larvares L3 (Simón *et al.*, 2012, citado por Alho *et al.*, 2014a).



Figura 2 – *Dirofilaria immitis*: microfilaria visível ao microscópio (<https://www.idexx.com/images/small-animal-health/products-and-services/snap-products/common/integration-ref-labs-antigen-microfilaria.jpg>)

No hospedeiro definitivo a L3 sofre a muda para L4 depois de 3 a 12 dias após a infeção e a muda posterior para L5 ocorre 50 a 70 dias após a infeção (AHS, 2014; Simón *et al.*, 2012, citado por Alho *et al.*, 2014a; Monchón *et al.*, 2012, citado por Alho *et al.*, 2014a). Estas mudas ocorrem no tecido subcutâneo, adiposo e musculo-esquelético. As formas larvares L5 têm o comprimento de 1 a 2 centímetros e são libertadas na corrente sanguínea (Ettinger & Feldman, 2010). No período de 70 a 85 dias após a infeção, as L5 alcançam o coração e alojam-se nas artérias pulmonares onde se fixam definitivamente. Quando a infeção é muito intensa, os adultos podem localizar-se no ventrículo e átrio direitos, veia cava e veia hepática (Simón *et al.*, 2012, citado por Alho *et al.*, 2014a; Monchón *et al.*, 2012, citado por Alho *et al.*, 2014a). Aos 120 dias após infeção atingem a maturidade, apresentando um tamanho de 5 a 18 centímetros de comprimento no caso do macho e 25 a 30 centímetros no caso da fêmea (Ettinger & Feldman, 2010; Simón *et al.*, 2012, citado por Alho *et al.*, 2014a; Monchón *et al.*, 2012, citado por Alho *et al.*, 2014a). Na presença de adultos de ambos os sexos é iniciada a cópula, dando origem às microfilárias 6 a 9 meses após a infeção (Simón *et al.*, 2012, citado por Alho *et al.*, 2014a; Monchón *et al.*, 2012, citado por Alho *et al.*, 2014a).

Os cães desenvolvem uma infeção patente (com presença de microfilárias circulantes) a partir dos seis meses mas geralmente ocorre por volta dos 7 a meses após a infeção, tornando-se microfilarémico (Ettinger & Feldman, 2010; AHS, 2014). As microfilárias (L3) que estão presentes nos cães infetados, mostram periodicidade sazonal e diurna, ocorrendo um aumento em número no sangue periférico durante a noite e no verão (Campillo *et al.*, 1999; Ettinger & Feldman, 2010).

O período pré-patente varia entre os 6 meses e 8 meses após a infeções, dado tratar-se do período desde o momento transmissão de formas larvares L3, que originam a infeção até à produção de microfilárias pelas filárias adultas (Silva & Langoni, 2008; AHS, 2014).

Em condições ótimas, o ciclo da *D. immitis* completa-se em 184 a 210 dias (Figura 3) (Ettinger & Feldman, 2010).

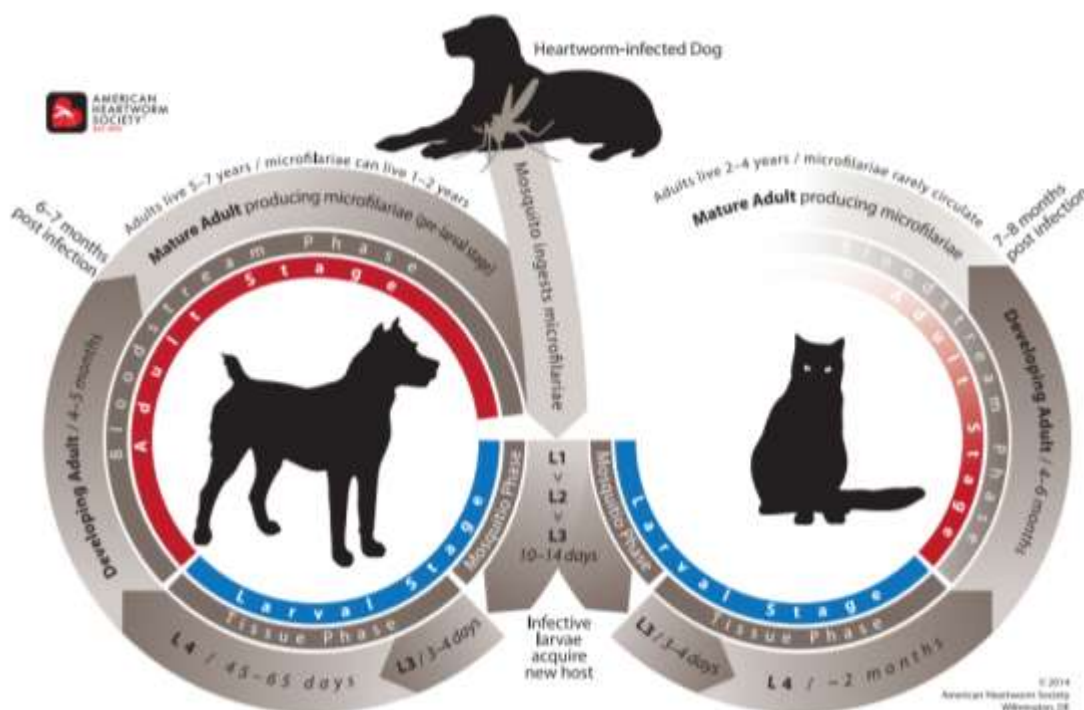


Figura 3 – Esquema do ciclo de vida da *D. immitis* (AHS, 2014)

2.1.3 Fatores predisponentes ao desenvolvimento da doença

O principal fator de desenvolvimento da dirofilariose numa região é a introdução de canídeos domésticos e silvestres com microfilárias circulante, podendo gerar as condições para que o ciclo de vida se desenvolva.

A presença de uma ou mais espécies de mosquitos com competência vetorial predispõe à transmissão da doença; além destes fatores, também as condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento dos vetores são importantes para a disseminação da doença.

Alterações em qualquer um destes fatores podem ter efeitos significativos sobre o potencial de transmissão da dirofilariose canina numa determinada área geográfica (AHS, 2014).

2.2 Dirofilariose canina

A Dirofilariose é uma doença endémica em Portugal, sendo uma das doenças parasitárias do cão com maior relevância do país (Alho *et al.*, 2014a). Sendo o cão o principal reservatório da *D. immitis*, é de extrema importância o controlo e prevenção desta doença nos mesmos, limitando a disseminação da Dirofilariose (AHS, 2014).

2.2.1 Prevalência

Na Europa e também a nível mundial o aumento nas viagens de animais de estimação e as mudanças climáticas, provavelmente exercem forte influência na situação epidemiológica atual de certas parasitoses, e a sua introdução em diferentes regiões.

As viagens dos proprietários com seus animais de estimação, em grande número de cães e em menor frequência os gatos, que são introduzidos em área onde os parasitas, como *Dirofilaria immitis*, são altamente prevalentes, influencia a disseminação da doença.

2.2.1.1 Prevalência da dirofilariose no mundo

A dirofilariose canina é uma doença parasitária que já foi diagnosticada em todo o mundo. Nos Estados Unidos da América a doença foi detetada em todos os cinquenta estados, à exceção do Alasca, apesar da existência de mosquitos vetores e condições climáticas compatíveis apesar de ser por curtos períodos. Sendo a doença considerada endémica em 49 estados dos Estados Unidos da América (McCall *et al.*, 2008; AHS, 2014). A Dirofilariose é enzoótica nos estados ao longo da Costa Atlântica dos EUA e da Costa do Golfo, na Flórida, onde a prevalência pode atingir os 48,8% (Levy, *et al.*, 2007, citado por Simón *et al.*, 2012; Bowman *et al.*, 2009, citado por Simón *et al.*, 2012; McCall *et al.*, 2008;).

Na América Central e do Sul, as taxas de prevalência variam de 20% a 42% nas cidades da Costa do Golfo, na Florida, e do México e de 20,4% a 63,2% no Caribe; de 2,3% a 45% no Brasil e de 5% a 74% na Argentina (Mancebo *et al.*, 1992, citado por Simón *et al.*, 2012; Kozek *et al.*, 1995, citado por Simón *et al.*, 2012; Labarthe & Guerrero, 2005, citado por Simón *et al.*, 2012). No Brasil, a prevalência detetada no Rio de Janeiro foi de 21,3%, contudo o estado de São Paulo apresenta uma prevalência mais significativa de até 45% (McCall *et al.*, 2008). Na Bolívia, a doença foi diagnosticada em cães e em canídeos selvagens e apenas em cães nas Ilhas Galápagos do Equador. Nas regiões com climas mais

frios as taxas de prevalência são muito menores como é o caso do Canadá, onde a taxa de prevalência é de 0,24%. No entanto, mesmo em áreas frias pode atingir os 8,4% como é o caso do sul de Ontário (Slocombe & Villeneuve, 1993, citado por Simón *et al.*, 2012; Klotins *et al.*, 2000, citado por Simón *et al.*, 2012; Levy *et al.*, 2008, citado por Simón *et al.*, 2012; Bronson *et al.*, 2008, citado por Simón *et al.*, 2012).

No caso do continente Africano, a distribuição da Dirofilariose não é bem conhecida devido à escassez de estudos epidemiológicos, a falta de detalhes metodológicos sobre os ensaios utilizados para esses estudos e a grande variedade de espécies de filárias endémicas. Porém segundo Genchi *et al.* (2001) citado por Simón *et al.* (2012), a Dirofilariose canina está presente em Marrocos, Tunísia, Egito, Tanzânia, Quênia, Moçambique, Malawi, Senegal, Angola, Gabão, Nigéria e Serra Leoa. Relativamente à África do Sul, as infeções por *D. immitis* indicam que tenham sido importadas (Genchi *et al.*, 2001 citado por Simón *et al.*, 2012).

Relativamente à Ásia, é detetada a presença de *D. immitis* em vários países da Ásia Central. No Irão foram confirmados casos de Dirofilariose em populações caninas mas as taxas são variáveis nas diferentes regiões do país. Na Índia está distribuído principalmente em toda a região Nordeste do país. A prevalência de *D. immitis* atingiu 70% em algumas áreas da Malásia. No Japão, Coreia do Sul e Taiwan as taxas de prevalência são altas (Lee, *et al.*, 1996, citado por Simón *et al.*, 2012; Artamonova *et al.*, 1997, citado por Simón *et al.*, 2012; Nogami & Sato, 1997, citado por Simón *et al.*, 2012; Genchi *et al.*, 2001, citado por Simón *et al.*, 2012; Azari-Hamidian *et al.*, 2007, citado por Simón *et al.*, 2012; Megat, *et al.*, 2010, citado por Simón *et al.*, 2012).

Na Austrália, a doença é endémica ao longo de toda a costa e nas províncias orientais, com taxas semelhantes às encontradas na costa sudoeste dos Estados Unidos. Na Nova Zelândia foram relatados alguns casos, porém a doença não é considerada endémica neste país (Bidgood & Collins, 1996, citado por Simón *et al.*, 2012; McKenna, 2000, citado por Simón *et al.*, 2012). Em Sidney, a prevalência da infeção mais recentemente relatada foi de 11,4% (McCall *et al.*, 2008).

Na Europa, a Dirofilariose canina caracteriza-se pela presença de *D. immitis* e *Dirofilaria repens*, existindo mesmo uma coexistência de ambas as espécies em alguns países

e a sua expansão de países endêmicos para outros países do norte e centro da Europa (Araujo, 1996).

A Dirofilariose está presente na maior parte da Espanha, apresentando uma taxa de prevalência de 33 a 40% nas ilhas Canárias e algumas regiões mais húmidas da península, sendo nestes casos pela presença da *D. immitis*. Ao longo da Costa mediterrânea da Espanha está presente a *D. repens* com prevalência elevada em alguns locais, chegando a ser de 37,1% (Cancrini *et al.*, 2000, citado por Simón *et al.*, 2012; Montoya *et al.*, 2007, citado por Simón *et al.*, 2012)

Na França, foi relatado que a *D. repens* é mais comum que a *D. immitis* e está presente em 19 dos 62 distritos, com uma prevalência média estimada de 1,3% (Chauve, 1997, citado por Simón *et al.*, 2012; Tarello, 2010, citado por Simón *et al.*, 2012)

Na Itália, a prevalência de *D. immitis* excede os 50% na ampla área de endemicidade do vale do rio Pó e as taxas de prevalência mais moderadas estão presentes nas áreas centrais do país. Existindo atualmente uma expansão geográfica e uma prevalência crescente nas regiões do norte do país, onde a doença é hiperendêmica (Genchi *et al.*, 2001, citado por Simón *et al.*, 2012; Tarello, 2010, citado por Simón *et al.*, 2012)

Na Grécia a prevalência de *D. immitis* é de 10%. Estudos epidemiológicos recentes indicam a expansão e emergência da Dirofilariose para países do centro e norte da Europa onde os casos eram esporádicos (Papazahariadou *et al.*, 1994, citado por Simón *et al.*, 2012)

No sul da Rússia, a prevalência de Dirofilariose por *D. immitis* é de 30,3% (Kartashev *et al.*, 2011, citado por Simón *et al.*, 2012).

2.2.1.2 Prevalência da dirofilariose em Portugal

Atualmente a prevalência da dirofilariose em Portugal ainda não está completamente estudada, apesar do aumento do número de distritos analisados ainda existem muitos distritos que não se tem informação e provavelmente alguns em que não foram detetadas infeções porque não foram devidamente amostrados. Também deve ser tido em consideração que apesar da *D. immitis* ser muito frequente em algumas áreas, pode estar ausentes noutras áreas muito próximos em consequências das diferenças ambientais drásticas existentes no nosso

país, desse modo os dados já existentes não representam a situação epidemiológica real (Diosdado *et al.*, 2016).

Os estudos epidemiológicos têm demonstrado que a prevalência é maior nas ilhas, nas áreas costeiras e nas regiões interiores perto de áreas irrigadas ou húmidas, por apresentarem temperaturas médias-altas durante períodos de duração variável. Assim sendo, de um modo geral, em aglomerações urbanas, a prevalência é mais baixa. No entanto, a situação contrária já foi observada, como é o caso da Figueira da Foz, pertencente ao distrito de Coimbra em que a prevalência detetada foi de 27,3%, enquanto em todo o distrito de Coimbra foi de 8,8%. Isto deve-se ao fato da Figueira da Foz ser uma cidade costeira com grandes espaços verdes e que é atravessada pelo rio Mondego, favorecendo o desenvolvimento dos vetores (Diosdado *et al.*, 2016). Em Aveiro, a taxa de prevalência detetada foi de 6,8% (Baldeira *et al.* 2011, citado por Alho *et al.*, 2014c).

A prevalência mais elevada detetada até a atualidade em Portugal foi na ilha da Madeira com uma percentagem de 30% (Araujo, 1996; Simón *et al.*, 2012). Através de estudo baseado exclusivamente na deteção de microfilárias, sem diferenciação de espécies, foram encontradas taxas de prevalência de 16,7% no Ribatejo, 16,5% no Alentejo, 12% no Algarve (Araujo, 1996). Porém segundo Maia *et al.* (2016), verificou-se uma prevalência de 10,9% no Algarve mais recentemente.

Segundo Alho *et al.* (2014c), a prevalência em Setúbal foi de 24,8% e a de Santarém de 13,2%. Também a prevalência em Coimbra foi observada como sendo superior ao esperado, atingindo o valor de 13,8%. Contudo pode dever-se ao fato do estudo ter sido realizado em animais de abrigo, sendo por isso mais predispostos à doença por não receberem tratamento profilático (Alho *et al.*, 2014c).

A sul do nosso país temos dados que sugerem uma prevalência de 8,9% para Beja, com base num estudo epidemiológico realizado entre 2011-2015 envolvendo 944 cães de abrigo. Este estudo teve por base a técnica de knott e o uso do kit comercial de deteção de antígenos circulantes. Neste mesmo estudo também foi detetada uma prevalência de 2,7% para Faro (Alho *et al.*, 2016).

Estes resultados apresentados confirmam a endemicidade da *D. immitis* no nosso país, tornando-se um alerta para a importância da profilaxia da dirofilariose (Alho *et al.*, 2014a).

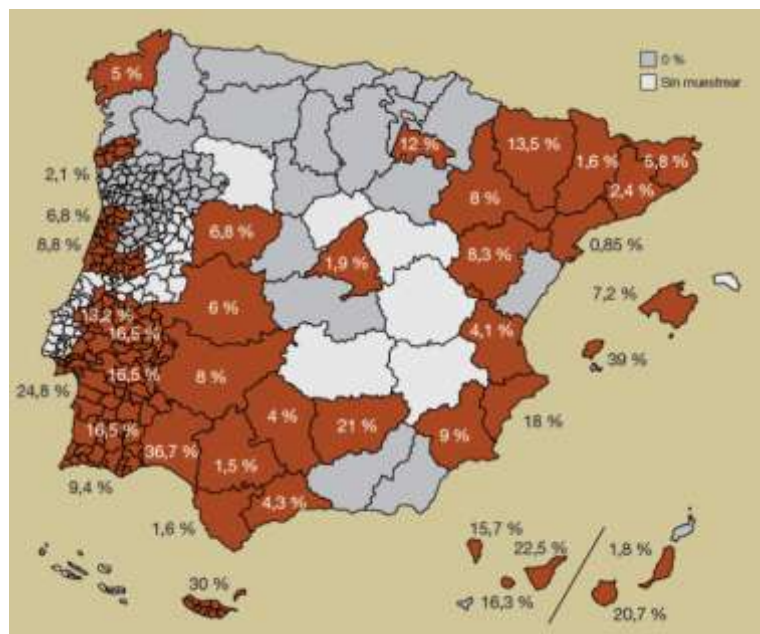


Figura 4- Distribuição da dirofilariose canina provocada pela *D. immitis* em Portugal e na Espanha (Diosdado *et al.*, 2016)

2.2.2 Patogenia

A dirofilariose Canina é uma doença de progressão crónica que caracteriza-se pelas lesões inflamatórias agudas e crónicas nos pulmões e noutros órgãos devido à presença das *D. immitis* adultas e pelas microfilárias circulantes (McCall *et al.*, 2008; Alho *et al.*, 2014b).

A resposta fisiopatológica à doença ocorre principalmente devido à presença das filárias adultas de *D. immitis* nas artérias pulmonares, que posteriormente progridem para o parênquima pulmonar e coração (McCall *et al.*, 2008; Alho *et al.*, 2014b). As filárias L5 irão promover múltiplos e sucessivos traumatismos na parede dos vasos pulmonares, bem como a libertação de fatores tóxicos, despoletando a libertação de mediadores inflamatórios. A túnica íntima dos vasos sofre proliferação, que consiste em músculo liso e colagénio onde ocorre inflamação ao nível do endotélio provocando a hipertrofia com a formação de vilosidades, isto é, endarterite pulmonar proliferativa (Alho *et al.*, 2014b; Meireles *et al.*, 2014). Estas alterações proliferativas ocorrem 3 a 4 semanas após a chegada dos parasitas aos vasos pulmonares (Nelson & Couto, 2010). A gravidade da endarterite está relacionada com a carga parasitária, duração da infeção e com a resposta imunológica do hospedeiro (Alho *et al.*, 2014b; Meireles *et al.*, 2014). As alterações na parede endotelial e a estenose luminal favorecem a ocorrência de tromboembolismo pulmonar e potenciam o desenvolvimento de hipertensão pulmonar, *cor pulmonale* e insuficiência cardíaca congestiva direita (McCall *et*

al., 2008; Alho *et al.*, 2014b). A vasoconstrição hipóxica também pode ter participação nas alterações vasculares que aumentam a resistência vascular pulmonar e consequentemente, a hipertensão pulmonar (Nelson & Couto, 2010).

A hipertensão pulmonar crónica pode levar à falência ventricular direita do miocárdio, aumento da pressão diastólica ventricular direita e sinais de falência cardíaca congestiva direita, especialmente em associação a insuficiência tricúspide secundária. O débito cardíaco diminui progressivamente na medida em que ocorre a falha do ventrículo direito. Quando o débito cardíaco se torna insuficiente durante a prática de exercício pode ocorrer dispneia, fadiga e síncope (Nelson & Couto, 2010).

Pode ocorrer também uma pneumonite eosinofílica, que é provocada pela destruição imunológica de microfilárias na microcirculação pulmonar, resultado em hospedeiros amicrofilarémicos. Esta síndrome resulta quando as microfilárias revestidas por anticorpos e aprisionadas na circulação pulmonar incitam uma reação inflamatória. Além desta alteração pulmonar também foram descritos casos de granulomatose eosinofílica pulmonar, porém é menos comum e a patogénese é ainda desconhecida. Contudo é postulado que as microfilárias juntamente com os neutrófilos e os eosinófilos poderão eventualmente provocar os granulomas e a linfadenopatia brônquica associada (Ettinger & Feldman, 2010).

Em casos de grande carga parasitária, principalmente se esta for em L5, podem ocorrer deslocamentos retrógrados dos parasitas desde a artéria pulmonar até veia cava e ao ventrículo direito, provocando um comprometimento da válvula tricúspide. Este episódio em associação à hipertensão pulmonar é responsável pelo desenvolvimento da insuficiência cardíaca direita que irá resultar em hepatomegalia, hemólise intravascular e débito cardíaco diminuído. Este processo resulta na síndrome da veia cava que poderá provocar a morte do cão em apenas 2 a 3 dias devido à hemólise, hemoglobinúria e a coagulação intravascular disseminada (CID). Contudo esta síndrome tem demonstrado ser mais frequente em cães de pequeno porte (Alho *et al.*, 2014b; Meireles *et al.*, 2014). Casos de migração arterial sistémica causando claudicação de membros posteriores, parestesia e necrose são descritos esporadicamente (Nelson & Couto, 2010).

Numa segunda fase da doença ocorre então a morte dos nemátodes adultos quer por causas naturais, dado o tempo de vida dos parasitas ser de cerca de 7 anos, ou por ação dos fármacos adulticidas (Ettinger & Feldman, 2010; Meireles *et al.*, 2014). Os parasitas mortos e

as partículas deste irão ser responsáveis por provocar tromboembolismos pulmonares e enfartes que podem mesmo ser fatais. Sendo esta uma das preocupações no tratamento adulticidas, visto haver uma morte súbita de grande quantidade de adultos com provável comprometimento do fluxo sanguíneo nos pulmões. A interrupção do fluxo sanguíneo pulmonar e a hipertensão pulmonar resultam num aumento do consumo de oxigénio e da tensão ventricular direita, despoletando também a insuficiência cardíaca, hipotensão e a isquemia miocárdica (Nelson & Couto, 2010; Meireles *et al.*, 2014).

Além dos efeitos já descritos, *D. immitis* pode também provocar alterações renais graves, como a glomerulonefrite em consequência da deposição de imunocomplexos e de microfílias, resultando numa proteinúria, nomeadamente por albuminúria (Ettinger & Feldman, 2010; Nelson & Couto, 2010; Alho *et al.*, 2014b). A amiloidose renal também tem sido associada à dirofilariose em cães, porém em raros casos (Nelson & Couto, 2010).

A congestão hepática secundária crónica devido à dirofilariose pode levar a dano hepático permanente e cirrose (Nelson & Couto, 2010).

Além dos órgãos comumente afetados pelas filárias também podem ocorrer migrações erráticas para o cérebro, câmara anterior do olho e medula espinhal ocorrendo mesmo manifestações neuromusculares e oculares nestes casos (Ettinger & Feldman, 2010; Nelson & Couto, 2010; Alho *et al.*, 2014b). A migração de L5 para a bifurcação aórtica também é responsável por provocar trombose arterial (Ettinger & Feldman, 2010).

2.2.2.1 Papel da simbiose com *Wolbachia* spp.

Após a descoberta da bactéria *Wolbachia* spp. que é uma bactéria gram-negativa, foram desenvolvidos inúmeros estudos que demonstraram que esta pode ter um papel biológico importante na reprodução assim como na sobrevivência de *D. immitis* no hospedeiro (McCall *et al.*, 2008).

Até a data, apenas foi identificada a espécie *W. pipientis*, que pertence à ordem *Rickettsia*. Esta bactéria foi detetada em todas as etapas do ciclo de vida da *D. immitis*, embora em proporções variadas entre nemátodes e entre fases do desenvolvimento das filárias. Nas dirofilarias fêmeas, está presente nos ovários, ovócitos e estádios embrionários em desenvolvimento dentro do útero. No entanto, não foi detetada no sistema reprodutor dos

machos, sugerindo que a transmissão da bactéria é feita pelo citoplasma do ovo (McCall *et al.*, 2008).

Todos os estudos sugerem que a *Wolbachia* spp. é um simbiote de *D. immitis*, ou seja, a presença da bactéria é essencial para a sobrevivência do nemátode, existindo várias características da relação entre a bactéria e este nemátode que sugerem esta natureza simbiótica. Existindo uma prevalência de 100%. Outra evidência é a evolução das bactérias coincidirem com a dos nemátodes, demonstrado por estudos filogenéticos. Também foi demonstrado que a eliminação da bactéria, através da administração de antibióticos, leva à esterilidade das fêmeas e eventualmente a morte dos adultos (McCall *et al.*, 2008).

Esta simbiose permitiu que as bactérias se tornassem capazes de fornecer os metabolitos necessários aos nemátodes durante a muda e no desenvolvimento do embrião, já o nemátode por sua vez garante a sobrevivência da *Wolbachia* spp. e a sua transmissão (McCall *et al.*, 2008).

Se por um lado se defende que a presença de *Wolbachia* na *D. immitis* é indispensável para a sobrevivência do mesmo, também se sabe que a interação entre o sistema imunitário do hospedeiro e a bactéria é um importante mecanismo de patogénese. Segundo estudos realizados, a proteína de superfície localizada na parede celular da bactéria leva o hospedeiro com *D. immitis* a desenvolver uma resposta imunitária por IgG. Há evidências de que a doença pulmonar associada à presença da *D. immitis* está na verdade mais relacionada com a *Wolbachia*, e que os efeitos inflamatórios provocados se mantem mesmo depois do parasita ter sido eliminado do hospedeiro (Meireles *et al.*, 2014).

De forma a eliminar a *Wolbachia*, recorre-se à terapia antibiótica, com tetraciclina ou derivados sintéticos, que provocam drasticamente a redução ou até mesmo a eliminação da mesma. Em consequência ocorre a inibição do desenvolvimento larvar de *D. immitis*, esterilidade das fêmeas e efeitos adulticidas, sendo crucial no tratamento dos animais infetados (McCall *et al.*, 2008).

2.2.3 Sintomatologia

A maioria dos animais infetados com *D. immitis* são assintomáticos, no entanto pode surgir sinais clínicos principalmente em casos crónicos. O aparecimento de sinais clínicos

depende essencialmente da duração da infeção e da carga parasitária, e refletem os efeitos do parasita nas artérias pulmonares, pulmões e secundariamente, no coração (Ettinger & Feldman, 2010; Meireles *et al.*, 2014). A severidade é exacerbada pelo stress do alto fluxo sanguíneo relacionado com o exercício físico. A descrição clássica da síndrome pulmonar é induzida em cães com um padrão de exercício que force uma hipertrofia ventricular direita originária de uma saída cardíaca aumentada e resistência pulmonar (Silva & Langoni, 2008). Nos cães, pode ser observada uma mudança de comportamento, tornando-se agitados ou apáticos, podem também surgir mudanças ou ausência de latidos (Nelson & Couto, 2010; Meireles *et al.*, 2014).

Achados históricos em cães infetados incluem de forma variável a perda de peso, a diminuição da tolerância ao exercício, edema dos membros, síncope, dispneia e tosse crónica, podendo ser acompanhada de hemoptise em casos de tromboembolismo pulmonar. Nas formas graves, ocorrem manifestações de insuficiência cardíaca direita como ascite, congestão aguda do fígado e dos rins, hemoglobínúria e até mesmo morte em 24 a 72 horas (Silva & Langoni, 2008; Ettinger & Feldman, 2010; Nelson & Couto, 2010; Meireles *et al.*, 2014).

Ao exame físico do animal pode observar-se a evidente perda de peso. À auscultação, pode ser audível ruído de galope, *split* de S2 e sopro no lado direito do coração devido à insuficiência da tricúspide (Ettinger & Feldman, 2010; Nelson & Couto, 2010; Meireles *et al.*, 2014). Nestes casos, em que a insuficiência cardíaca direita está presente ocorre uma distensão e pulsação venosa jugular, normalmente acompanhada por hepatosplenomegalia, ascite e taquipneia ou dispneia (Ettinger & Feldman, 2010; Nelson & Couto, 2010). Relativamente à auscultação, pode também ser audível aumento dos sons pulmonares ou ruídos anormais como crepitações, murmúrios de ejeção do lado esquerdo da base do coração, murmúrio de insuficiência da tricúspide ou arritmias cardíacas (Nelson & Couto, 2010). Em casos de Dirofilariose crónica, as arritmias cardíacas e os distúrbios de condução são incomuns (Ettinger & Feldman, 2010).

Nos cães que apresentem manifestações parenquimatosas pulmonares por Dirofilariose ocorre tosse e à auscultação é audível crepitação pulmonar. Nos casos com granulomatose, uma ocorrência rara, os sons pulmonares estão abafados com dispneia e até mesmo cianose (Ettinger & Feldman, 2010).

Relativamente aos cães que desenvolvem a síndrome da veia cava, a grande maioria apresenta histórico de sinais clínicos relacionados com a dirofilariose. O colapso agudo é comum, normalmente acompanhado por anorexia, fraqueza, taquipneia ou dispneia, palidez, hemoglobinúria e bilirrubinúria. Este quadro é acompanhado por murmúrio da tricúspide, insuficiente distensão e pulsação jugular, pulso fraco, desdobramento e som mais alto de S2 e ritmo cardíaco de galope. Algumas vezes pode ocorrer tosse ou hemoptise e ascite (Nelson & Couto, 2010).

Em casos mais raros, pode ser observada claudicação dos membros posteriores, parestesia ou necrose se por ventura ocorrer migração arterial sistémica (Nelson & Couto, 2010).

Em suma, segundo a American Heartworm Society (AHS), os sinais clínicos podem ser classificados da seguinte forma:

Tabela 1 - Classificação da dirofilariose canina (AHS, 2014)

Leve	Assintomático ou apresenta tosse
Moderada	Tosse, intolerância ao exercício físico, presença de sons anormais nos pulmões
Severa	Tosse, intolerância ao exercício, dispneia, sons anormais no coração e nos pulmões, hepatomegalia, síncope (perda temporária da consciência devido a diminuição do fluxo sanguíneo no cérebro), ascite, morte
Síndrome da Veia Cava	Aparecimento súbito de letargia e fraqueza, acompanhado por hemoglobinúria e hemoglobulinémia

2.2.3.1 Diagnósticos diferenciais

A hipertensão pulmonar em cães pode estar associada a outras doenças, incluindo a doença pulmonar hipóxica e a doença vascular obstrutiva, com por exemplo tromboembolismo pulmonar. A obstrução vascular reduz a área vascular pulmonar por meio da obstrução mecânica das veias, provocando vasoconstrição pulmonar hipóxica local assim como outras alterações reativas (Nelson & Couto, 2010).

A insuficiência cardíaca direita pode também ocorrer devido a estenose subaórtica ou estenose pulmonar do lado direito, causas que levam à sobrecarga de pressão (Bazan *et al.*, 2009).

2.2.4 Diagnóstico

Um dos métodos mais utilizados é o teste para pesquisa de antígeno de fêmeas adultas de *D. immitis*, tratando-se de um método rápido, fácil e sensível. Nos cães, os antígenos circulantes aumentam entre 5 a 6 meses pós infecção. Após o diagnóstico devem ser efetuados outros exames tais como radiografia torácica e ecocardiografia para avaliar o risco de complicações (Alho *et al.*, 2014b).

2.2.4.1 História clínica e exame físico

Não há idade específica ou predisposição racial para a dirofilariose canina, porém a maioria dos animais afetados têm entre 4 e 8 anos de idade, sendo também diagnosticada em cães com menos de 1 ano, assim como em animais idosos. Cães de porte grande e que vivem em ambientes abertos possuem um maior risco de infecção do que os de raça pequena e que vivem em ambientes fechados (Nelson & Couto, 2010).

Os cães com doença oculta são aqueles que não são rotineiramente testados e têm uma maior probabilidade de apresentar doença pulmonar avançada e sinais clínicos (Nelson & Couto, 2010).

Nos cães, pode ser observada uma mudança no comportamento, os animais tornam-se agitados ou apáticos. Pode ocorrer uma perda de peso, intolerância ao exercício, ascite, edema dos membros, episódios de síncope, dispneia e tosse com hemoptise, caso haja tromboembolismo pulmonar. Esta sintomatologia permite-nos direcionar para a suspeita de dirofilariose (Meireles *et al.*, 2014).

Ao exame físico, na auscultação pode-se ouvir ruído galope, *split* de S2 e um sopro no lado direito do coração devido à insuficiência da tricúspide (Meireles *et al.*, 2014).

2.2.4.2 Exames laboratoriais

2.2.4.2.1 Análises clínicas

A eosinofilia, basofilia e monocitose são achados hematológicos inconsistentes. Porém, menos de metade dos cães com dirofilariose apresenta eosinofilia (Nelson & Couto, 2010). Os cães com dirofilariose podem apresentar uma anemia não regenerativa de baixo grau com diminuição da hemoglobina, sendo classificada como normocrômica e normocítica (Vieira, 2015). Pode haver trombocitopenia, que resulta destruição imunomediada de plaquetas no sistema arterial pulmonar, especialmente 1 a 2 semanas após tratamento adúlticida (Nelson & Couto, 2010; Vieira, 2015). A CID também pode ocorrer em alguns cães com dirofilariose em estado avançado (Vieira, 2015).

A resposta imune à dirofilariose provoca gamopatia policlonal. Pode ocorrer um aumento da atividade enzimática e azotémia (Nelson & Couto, 2010). Deste modo, pode ocorrer um aumento da fosfatase alcalina (FAS), da aspartato transaminase (AST), da alanina transaminase (ALT) e a da Gama GT (GGT), nomeadamente em 10% dos casos, em animais com doença severa e com presença de insuficiência cardíaca direita. Ocasionalmente é detetada hiperbilirrubinémia. Relativamente à azotémia, está presente em apenas em 5% dos cães, mas pode ser de origem pré-renal se estiver presente desidratação ou insuficiência cardíaca, ou pode ser secundária a uma glomerulonefrite (Vieira, 2015). A albuminúria está presente em 10% a 30% dos casos mas se a doença glomerular for severa, a hipoalbuminémia pode complicar o quadro clínico (Vieira, 2015).

2.2.4.2.2 Testes para antígenos

Os testes para antígenos são recomendados como principal teste de triagem para dirofilariose em cães. Os testes para antígenos atualmente disponíveis têm elevada precisão. Como os fármacos de uso mensal para prevenção da dirofilariose favorecem a ocorrência de infeções ocultas por eliminarem as microfilárias circulantes, os testes antigénicos têm elevada sensibilidade para o diagnóstico (Ettinger & Feldman, 2010; Nelson & Couto, 2010; AHS, 2014). O antígeno circulante é normalmente detetável por volta dos 6 a 7 meses após infeção (Nelson & Couto, 2010; AHS, 2014). Deste modo, não é aconselhável testar animais com

menos de 7 meses de idade. Além disso, é recomendado testar os animais adultos aproximadamente 7 meses após a época mais propícia à transmissão (Nelson & Couto, 2010).

Os kits comerciais de teste disponíveis baseiam-se em ensaios imunológicos que detetam antigénios circulantes do trato reprodutivo da fêmea adulta (Nelson & Couto, 2010; AHS, 2014). A maioria dos testes são testes imunoenzimáticos, isto é por ELISA, embora os testes por imunocromatografia e por hemaglutinação também estejam disponíveis (Nelson & Couto, 2010; AHS, 2014). Resultados consistentes são obtidos quando há presença de no mínimo três fêmeas adultas com 7 a 8 meses de vida. A maioria dos testes não deteta infeções com menos de 5 meses e machos não são detetados (Ettinger & Feldman, 2010; Nelson & Couto, 2010). Para obter resultados confiáveis e reproduzíveis, os testes de antigénios circulantes devem ser realizados de acordo com as instruções do fabricante. A precisão dos testes no diagnóstico é influenciada pelo cumprimento das instruções do fabricante, pelo armazenamento e manuseio do kit de diagnóstico, assim como das amostras a serem testadas. Deste modo, os fabricantes têm vindo a simplificar os testes, minimizando as etapas e automatizando o processo. Porém, caso o resultado do teste não seja o esperado, o teste deve ser repetido. Se ainda assim permanecer duvidoso, a confirmação deve ser realizada por um laboratório de referência (AHS, 2014).

Relativamente à intensidade da cor de um resultado positivo, esta não pode ser utilizada com segurança para determinar o nível de carga parasitária. A quantidade de antigénios circulantes tem uma relação direta, mas imprecisa com o número de fêmeas adultas de *D. immitis*. Uma reação sorológica associada à carga parasitária pode ser visibilizada no teste ELISA, mas o mesmo não ocorre em ensaios imunocromatográficos. Contudo, a utilidade do teste ELISA para avaliar o nível da carga parasitária é limitado pela interferência de fatores como o aumento transitório da antigenemia, associada à morte recente de nematodes ou antigenemia baixa decorrente de infeções com fêmeas adultas jovens ou baixa carga parasitária de fêmeas. Portanto, a análise quantitativa dos resultados referente à pesquisa de antigénios circulantes é altamente especulativa, devendo ser baseada em outros meios de diagnóstico (AHS, 2014).

Os resultados falsos negativos ocorrem quando as infeções são moderadas, ou por fêmeas imaturas, ou na presença somente de nematodes machos e/ou quando as instruções do kit do teste não são seguidas corretamente. Também foram documentados falsos negativos

devido ao complexo antígeno-anticorpo, que interfere na deteção dos antígenos circulantes. Devido a esta possibilidade de interferência, os resultados dos testes para Dirofilariose somente deve ser registado como positivos ou ausência de antígeno circulante, não devendo ser considerado como negativo. Os resultados da deteção de antígenos circulantes devem ser interpretados com cuidado, levando em consideração outras informações clínicas (AHS, 2014).

Os testes ELISA permitem determinar a eficácia da terapia adulticida utilizada. Geralmente a concentração de antígenos torna-se indetetável entre as 8 e as 12 semanas após uma terapia adulticida eficaz. Caso o teste positivo persista após as 12 semanas é sugerido indicar uma infeção persistente. Contudo só é sugerido uma falha na terapia adulticida caso o teste de antígeno seja positivo 6 meses após a terapia adulticida (Ettinger & Feldman, 2010).

Atualmente está disponível o teste Uranovet® - Uranotest *Dirofilaria* baseado na imunocromatografia para a deteção qualitativa dos antígenos de *D. immitis*. Apresenta uma sensibilidade de 94,4% e uma especificidade de 100% na deteção de antígenos de *D. immitis*. Apresenta a vantagem de não necessitar de adicionar reativos à amostra de sangue, podendo também ser usado soro ou plasma (Anexo I; Anexo II).

O teste da UranoVet® permite detetar parasitas machos e fêmeas, detetando casos de parasitismo com uma carga parasitária de um único parasita adulta de qualquer género, nomeadamente machos, fêmeas adultas e fêmeas imaturas, isto deve-se à deteção do antígeno 14 KDa, que é comum nas microfilárias circulantes, assim como nos machos e fêmeas adultas (Anexo I; Anexo II).

2.2.4.2.3 Deteção de microfilárias

Os testes para deteção de microfilárias são úteis para identificar pacientes que constituem um reservatório da infeção, além de permitir averiguar se há um grande número de microfilárias antes da administração preventiva mensal de fármacos (Nelson & Couto, 2010). No entanto, muitos animais infetados podem apresentar-se sem microfilarémia. Isto pode ocorrer no período de pré-patência quando a infeção consiste somente num nematode de um único sexo ou quando há destruição de microfilárias por ação de fármacos preventivos (Meireles *et al.*, 2014). O uso de lactona macrocíclica é responsável por reduzir e eliminar as

microfilárias existentes por impedir a função reprodutiva das fêmeas e possivelmente dos machos também. Deste modo, o baixo número de microfilárias podem provocar resultados falsos negativos nestes testes. Além desta causa, também podem ocorrer devido a variações diurnas no número de microfilárias circulantes no sangue periférico (Nelson & Couto, 2010). A identificação microscópica de microfilárias utilizando a gota de sangue a fresco, um esfregaço de sangue e a observação de movimento das microfilárias abaixo da *buffycoat* num tubo de microhematócrito eram as formas mais comuns para detetar a presença de microfilárias (Ettinger e Feldman, 2010). Contudo estes testes não avaliam a concentração de microfilárias existentes, deste modo não são os mais recomendados, embora permitam observar a mobilidade das microfilárias, existe a dificuldade de detetar microfilárias quando existe baixo número de microfilárias, 50 – 100 por mililitro (Nelson & Couto, 2010; AHS, 2014). Porém, estes animais possuem menor risco de sofrer uma reação grave após a administração de microfilaricidas e são menos propenso a representar uma ameaça como reservatório da infeção (AHS, 2014). Por outro lado, o teste modificado de *Knott* ou a filtração por um filtro milipórico são os métodos mais sensíveis, devido à capacidade de concentração das microfilárias existentes aumentando assim as hipóteses de diagnóstico (Ettinger & Feldman, 2010; Nelson & Couto, 2010; AHS, 2014). Ambas as técnicas causam a lise dos eritrócitos e fixam as microfilárias existentes (Nelson & Couto, 2010). Contudo, o teste modificado de *Knott*, é o método preferencial por permitir observar as microfilárias a nível morfológico e as duas dimensões, de modo a permitir a diferenciação entre *D. immitis* e *Acanthocheilonema reconditum* (AHS, 2014; Meireles *et al.*, 2014).

O teste modificado de *Knott* é realizado pela junção de 1,0 mL de sangue colhido em EDTA, com 9,0 mL de formalina a 2% num tubo de centrifugação. A homogeneização do sangue com a formalina através da inversão do tubo por várias vezes provoca a lise dos eritrócitos. O tubo é centrifugado a 1100 – 1500 rpm durante 5 a 8 minutos, e posteriormente desprezado o sobrenadante. Uma gota de azul-de-metileno é adicionada ao sedimento e colocado sobre uma lâmina de vidro coberta com uma lamela. A leitura da lâmina é realizada ao microscópio com a objetiva de 100x para a pesquisa de microfilárias. Para observar as características da microfilária, a lâmina deve ser examinada com a objetiva de 400x (AHS, 2014).

Todos os cães positivos aos testes serológicos ou sujeitos a tratamentos preventivos com dietilcarbamazina devem ser sujeitos à realização do teste modificado de *Knott* de forma a determinar se existe microfilarémia (Ettinger & Feldman, 2010).

Contudo, não se pode determinar a severidade da infeção pelo número de microfilárias detetadas, já que não existe correlação entre o número de microfilárias e os adultos presentes no cão (Ettinger & Feldman, 2010).

2.2.4.3 Exames complementares de diagnóstico

2.2.4.3.1 Radiografia torácica

O exame radiográfico é o método mais objetivo para avaliar a gravidade da doença cardiopulmonar secundária à infeção por *D. immitis*. Os sinais típicos, quase patognomónicos, da dirofilariose vascular são dilatação e aspeto tortuoso dos vasos, muitas vezes com obstrução nos ramos periféricos intralobares e interlobulares das artérias pulmonares, particularmente no lobo diafragmático caudal. Estes achados são acompanhados por graus variáveis de doença pulmonar parenquimatosa (AHS, 2014). As alterações mais subtis e precoces nas artérias pulmonares são encontradas na porção dorsal e causal do lobo diafragmático, onde o fluxo pulmonar é superior e onde se depositam os parasitas imaturos (AHS, 2014; Vieira, 2015). Conforme a gravidade da infeção e cronicidade da doença, os sinais de doença pulmonar arterial são evidenciados nos ramos maiores (AHS, 2014). Estas alterações são melhor visualizadas numa projeção latero-lateral (Vieira, 2015).

O alargamento das artérias lobos pulmonares, sem distensão venosa concomitante, é altamente sugestivo de dirofilariose ou outra causa de hipertensão pulmonar. Também o alargamento da veia cava pode ser observado. Infiltrados intersticiais ou alveolares dispersos, sugestivos de edema, pneumonia ou fibrose, são comumente encontrados ao exame radiográfico (Nelson & Couto, 2010).

Nos casos mais graves, o coração direito pode eventualmente apresentar-se cardiomegália (AHS, 2014).

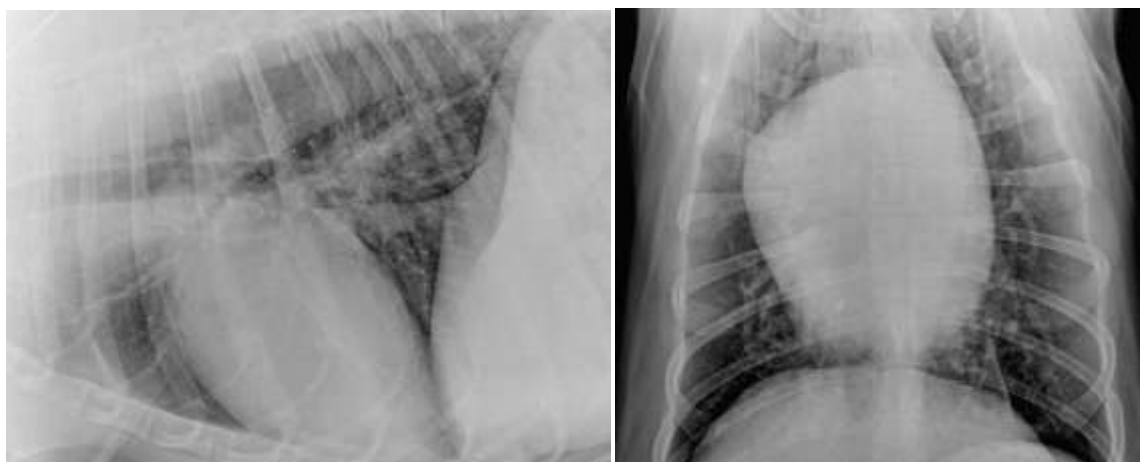


Figura 5 – Radiografia torácica de dirofilariose moderada (AHS, 2014)

2.2.4.3.2 Eletrocardiograma

Os achados no eletrocardiograma (ECG) são muitas vezes normais, embora a doença avançada possa causar desvio do eixo direito ou uma arritmia (Nelson & Couto, 2010). Contudo é um método pouco sensível para detetar dilatações das câmaras induzidas por dirofilariose (Vieira, 2015). Por vezes são detetadas ondas P altas sugestivas de alargamento atrial direito (Nelson & Couto, 2010).

2.2.4.3.3 Ecocardiografia

A ecocardiografia pode fornecer evidência definitiva da dirofilariose, bem como permitir a avaliação das consequências patológicas cardíacas da doença (AHS, 2014). Permite a visualização direta das câmaras cardíacas e dos vasos associados, o que facilita a observação do parasita nas câmaras cardíacas direita, veia cava caudal, artéria pulmonar e no trato proximal de ambas as artérias pulmonares caudais (Vieira, 2015). A parede do corpo das dirofilarias adultas é altamente ecogênica, deste modo são facilmente visualizadas, como uma linha dupla linear, assemelhando-se ao “sinal de igual”, sendo possível observar todo o parasita a flutuar nas câmaras cardíacas ou no lúmen dos vasos (AHS, 2014; Vieira, 2015).

Este método complementar de diagnóstico não é eficiente nos animais com baixa carga parasitária, pois nestes casos os nemátodes localizam-se nos ramos periféricos das artérias pulmonares, sem estarem acessíveis à ecocardiografia (Nelson & Couto, 2010; AHS,

2014; Vieira, 2015). Quando a carga parasitária é alta, é mais provável que os nemátodes estejam localizados na artéria pulmonar, nos ramos interlobar proximal direito e esquerdo ou no lado direito do coração, onde podem ser visualizados com facilidade (AHS, 2014). Em cães com hemoglobinúria, a observação de dirofilarias na válvula tricúspide fornece o diagnóstico conclusivo do Síndrome da Veia Cava (Nelson & Couto, 2010; AHS, 2014; Vieira, 2015).

A ecocardiografia é útil para avaliar a dilatação cardíaca direita, a hipertrofia ventricular direita, o aumento da espessura do septo e dilatação da artéria pulmonar (Nelson & Couto, 2010). A ecocardiografia “Doppler” pode ser usada para identificação da regurgitação tricúspide, mesmo que o sopro audível esteja ausente. O espectro Doppler mede a regurgitação máxima da tricúspide ou pulmonar com velocidade permitindo a avaliação da hipertensão pulmonar (Nelson & Couto, 2010).



Figura 6 – Ecocardiografia com presença de dirofilarias (Vieira, 2015)

A ecocardiografia permite uma melhor avaliação da severidade da doença e estimar a carga parasitária, sendo importante para iniciar o tratamento e avaliar o prognóstico do animal (Vieira, 2015).

2.2.5 Tratamento

O objetivo do tratamento da dirofilariose é melhorar as condições clínicas do animal e eliminar todos os estádios do parasita com o mínimo de complicações possíveis (AHS, 2014). O histórico completo deve ser obtido e os cães infetados com dirofilariose devem ser submetidos a avaliação clínica minuciosa. As radiografias torácicas pré-tratamento

possibilitam uma melhor avaliação geral do quadro arterial e do parênquima pulmonar. Outros exames pré tratamento devem incluir hemograma completo, perfil bioquímico sérico e urianálise. A contagem de plaquetas é importante nos animais com doença pulmonar arterial grave (Nelson & Couto, 2010).

Em animais assintomáticos ou que exibem sinais clínicos leves normal não ocorrem complicações durante o tratamento, contudo deve haver controlo das atividades físicas. Caso apresentem um grau de infeção moderado a grave, o tratamento tem um nível de dificuldade maior. Nestas situações em que os cães apresentam sinais clínicos significativos da dirofilariose, o tratamento deve ser iniciado até que os sinais clínicos sejam estabilizados. Dependendo do caso, pode ser necessário a utilização de glicocorticoesteroides, diuréticos, vasodilatadores, agentes inotrópicos positivos e fluidoterapia (AHS, 2014). Nomeadamente nos animais que apresentam azotémia pré-renal é necessário tratar inicialmente através da fluidoterapia, antes da administração do adulticida (Nelson & Couto, 2010). O uso de glicocorticoesteroides é aconselhável para controlar os sinais clínicos de tromboembolismo pulmonar (AHS, 2014).

As dirofilárias adultas vivas podem causar endoarterites e hipertrofia muscular das paredes arteriolas, especialmente nas artérias pulmonares caudais, contudo a morte das mesmas causam uma parte significativa das patologias que podem ser visualizadas nos animais que apresentam doença clínica. A morte leva à decomposição e a fragmentos que migram para as arteríolas distais dos pulmões e para os seios capilares, no lobo caudal do pulmão, diminuindo o fluxo sanguíneo. Estes fragmentos causam inflamações e agregação plaquetária, o que pode resultar em tromboembolismo (AHS, 2014). Também a presença de doença glomerular grave com perda de antitrombina, assim como de outras proteínas, pode aumentar o risco de tromboembolismo (Nelson & Couto, 2010).

Pode ser útil o uso mensal de doses profiláticas de ivermectina por até 6 meses antes da administração de um adulticida em cães que estão clinicamente estáveis. Esta estratégia permite reduzir a massa de antígenos de dirofilaria pela diminuição ou eliminação de microfilárias circulantes e larvas migrantes, estabilizar o crescimento das dirofilárias imaturas e prejudicar o sistema reprodutivo das fêmeas adultas. Este método permite aumentar a suscetibilidade ao efeito adulticida. Cães positivos para microfilárias devem ser observados clinicamente depois da primeira dose de ivermectina, no caso de possibilidade de ocorrer

reações adversas. O tratamento microfilaricida específico não é necessário antes do uso do adulticida (Nelson & Couto, 2010).

2.2.5.1 Terapia adulticida

O diidrocloridrato de melarsomina (Immiticide[®], Merial) é o adulticida de escolha. É efetivo tanto contra as dirofilarias imaturas como contra as formas adultas, porém os machos são mais suscetíveis do que as fêmeas (Nelson & Couto, 2010). A melarsomina é administrada através de injeção intramuscular profunda na musculatura epaxial lombar, entre a L3 – L5. “Um leve edema e uma dor breve no local da injeção podem ser observados por poucos dias após a aplicação do fármaco, podendo ser minimizado quando a aplicação do injetável é realizada no local exato da musculatura epaxial com uma agulha do tamanho adequado de acordo com o porte do cão e a sua condição corporal, seguindo rigorosamente as instruções do fabricante. A restrição ao exercício físico durante o período de recuperação é essencial e obrigatório para minimizar as complicações cardiopulmonares” (AHS, 2014).

Os sinais clínicos maioritariamente observados nos animais tratados com melarsomina têm sido letargia, tremores, instabilidade, ataxia, cansaço, respiração ofegante e crepitações. A tosse, engasgos e dispneia após tratamento podem estar associados à própria Dirofilariose, embora a congestão pulmonar seja relatada como efeito tóxico da dose excessiva. Os efeitos adversos são geralmente discretos nas doses recomendadas, causando de um modo geral menos toxicidade sistémica do que a tiacertarsamida (Nelson & Couto, 2010).

A gravidade da doença é levada em consideração para orientar a terapia com melarsomina. A terapia padrão é utilizada para cães com doença leve (classe 1) a moderada (classe 2). Esta terapia baseia-se na aplicação de duas doses de melarsomina, duas aplicações de 2,5 mg/kg administradas por via intramuscular com o intervalo de 24 horas (Nelson & Couto, 2010; AHS, 2014). De acordo com a bula do produto, este tratamento irá permitir eliminar cerca de 90% dos parasitas adultos (AHS, 2014). O protocolo alternativo de três doses é indicado para a dirofilariose grave (classe 3) e alguns casos de classe 2, que se baseia na aplicação de 2,5 mg/kg e após um mês de intervalo administra-se novamente a mesma dose em duas aplicações espaçadas por 24 horas. Este tratamento permite eliminar 98% dos parasitas adultos (AHS, 2014).

O protocolo alternativo tem a vantagem adicional de diminuir o risco de complicações, nomeadamente tromboembolismo pulmonar maciço, além de apresentar uma maior eficácia, pois diminui parcialmente a carga parasitária com a injeção inicial, e acaba por eliminar a maioria ou a totalidade dos nematodes restantes (Nelson & Couto, 2010; AHS, 2014).

A divisão da doença em fases e o uso do protocolo de tratamento de duas doses não foi capaz de assegurar o sucesso do tratamento de forma adequada, portanto sem dar importância à gravidade da doença (com exceção no caso da síndrome da veia cava), a American Heartworm Society recomenda o protocolo de três doses, pela sua maior segurança e eficácia (AHS, 2014).

2.2.5.1 Terapia microfilaricida

O uso de lactonas macrocíclicas administradas como microfilaricida pode causar um rápido decréscimo no número de microfilarias circulantes e deve ser administrado com precaução em cães com elevado número de microfilárias (AHS, 2014).

A ivermectina oral (a 50 µg/kg) e a oxima milbemicina (0,5 mg/kg) podem rapidamente reduzir as microfilárias. A morte rápida de muitas microfilárias pode causar efeitos sistémicos dentro de 3 a 8 (e ocasionalmente 12) horas após a primeira dose. Os efeitos sistémicos incluem letargia, inapetência, salivação intensa, engasgos, defecação, palidez e taquicardia. Tais efeitos adversos são normalmente discretos, mas cães com alto número de microfilárias circulantes podem sofrer colapso respiratório. Estes casos normalmente respondem à terapia com glucorticóides e a administração de fluidoterapia, contudo deve ser instituída rapidamente (Nelson & Couto, 2010).

De forma a minimizar as reações adversas é aconselhado um pré-tratamento com anti-histamínicos e glucocorticoides. A moxidectina tópica foi aprovada pela “Food and Drug Administration” (FDA) para uso em cães positivos para Dirofilariose, como tratamento microfilaricida. Nos estudos de laboratório ou de campo conduzidos para a aprovação do produto nenhuma reação adversa devido ao elevado número de microfilárias circulantes foi observada (AHS, 2014).

2.2.5.2 Tratamento da *Wolbachia*

A relação de simbiose que se verifica entre a *D. immitis* e a bactéria *Wolbachia* tem vindo a ser uma mais-valia no tratamento da Dirofilariose, pois o uso de antibioterapia para eliminar a bactéria conduz à inibição do desenvolvimento larvar, esterilidade das fêmeas e efeito adulticida (Ettinger & Feldman, 2010).

Deste modo deve ser incorporada a antibioterapia no protocolo de tratamento da Dirofilariose, sendo comumente usada a doxiciclina que deve ser usada antes da administração da melarsomina, para que a *Wolbachia* e os seus metabólitos sejam reduzidos ou estejam ausentes quando os nematodes sejam eliminados. A doxiciclina é administrada a 10 mg/kg BID durante 4 semanas. Estudos demonstraram que o número de *Wolbachia* permanece baixo por pelo menos 12 meses após a administração da doxiciclina (AHS, 2014).

Caso a doxiciclina não esteja disponível é sugerido o uso de micociclina que é altamente eficaz na eliminação da bactéria. A dose utilizada é a mesma que é usada na doxiciclina (AHS, 2014).

2.2.5.3 Uso de doxiciclina com lactonas macrocíclicas

A utilização conjunta de algumas lactonas macrocíclicas com a doxiciclina causa a supressão individual da embriogénese e fragiliza os nematodes adultos. Tem sido demonstrado que a administração de doxiciclina em combinação com ivermetina fornece uma atividade adulticida mais rápida do que o uso somente de ivermetina, assim como o uso combinado reduz de forma mais eficaz o número da bactéria *Wolbachia*, do que só a administração da doxiciclina (AHS, 2014).

Nos casos em que a terapia à base de melarsomina não é possível ou é contraindicada, a utilização de um produto preventivo mensal (a base de lactonas macrocíclicas) juntamente com a doxiciclina a 10 mg/kg, BID, durante um período de 4 semanas pode ser considerado eficaz (AHS, 2014).

2.2.5.4 Tratamento recomendado pela Sociedade Americana de Dirofilariose

Tabela 2 – Protocolo de tratamento recomendado pela AHS, 2014

Dia	Tratamento
Dia 0	Cão diagnosticado positivo para Dirofilariose: • Positivo no teste de antígeno e teste de microfilárias circulantes • Se não for observada presença de microfilárias circulantes, repetir o teste de antígeno, com um teste de diagnóstico diferente Restrição aos exercícios • Quanto mais severos os sintomas apresentados, maior a restrição Se o cão for sintomático: • Estabilizar a doença com terapia e cuidados adequados • Prednisona pode ser prescrita na dose de 0,5 mg/kg BID na primeira semana, 0,5 mg/kg SID na segunda semana, 0,5 mg/kg EOD na terceira e quarta semanas
Dia 1	Administrar terapêutica presentiva (lactona macrocíclica) • Se forem detectadas microfilárias circulantes, instituir um pré-tratamento com anti-histamínico e glucocorticoides, se ainda não tiver sido administrada prednisona, para reduzir o risco de reação anafilática • Observar por pelo menos 8 horas para verificar se há reação adversa
Dia 1-28	Administrar doxiciclina 10 mg/kg BID por 4 semanas • Reduz a patologia associada aos nematodes mortos • Interrompe a transmissão da dirofilariose
Dia 30	Administrar terapêutica preventiva (lactona macrocíclica)
Dia 60	Administrar terapêutica preventiva (Lactona macrocíclica) Primeira aplicação de melarsomina 2,5 mg/kg (IM) Prescrever prednisona 0,5 mg/kg BID na primeira semana, 0,5 mg/kg SID na segunda semana, 0,5 mg/kg EOD na terceira e na quarta semanas Diminuir o nível de atividade física ainda mais • Restringir o espaço do animal ou, quando no quintal, utilizar a coleira para evitar exercícios
Dia 90	Administrar terapêutica preventiva (lactona macrocíclica) Segunda aplicação de melarsomina 2,5 mg/kg (IM)
Dia 91	Terceira aplicação de melarsomina 2,5 mg/kg (IM) Prescrever prednisona 0,5 mg/kg BID na primeira semana, 0,5 mg/kg SID na segunda semana, 0,5 mg/kg EOD na terceira e quarta semanas. Continuar a restrição de exercícios físicos por mais 6 – 8 semanas após a injeção de melarsomina
Dia 120	Pesquisa de microfilárias circulantes • Se positivo, tratamento com microfilaricida e refazer o teste após 4

	semanas • Estabelecer prevenção contra Dirofilariose durante o ano todo
Dia 271	Teste de antígeno circulante seis meses após o fim do tratamento e teste para microfilárias

2.2.5.1 Tratamento cirúrgico

A terapia cirúrgica está aconselhada em cães com elevada carga parasitária, com parasitas presentes nas câmaras cardíacas, nomeadamente átrio direito e orifício da válvula tricúspide, com quadro clínico de síndrome da veia cava e com risco severo de desenvolver tromboembolismo pulmonar (Vieira, 2015).

A remoção cirúrgica dos parasitas adultos do átrio direito e da válvula tricúspide direita pode ser realizada através de uma leve sedação e anestesia local, e requer o uso de pinças flexíveis (pinças de jacaré longa) ou uma pinça de resgate introduzida preferencialmente através da veia jugular externa, com a orientação da fluoroscopia quando disponível ou ecocardiograma (Ettinger & Feldman, 2010; AHS, 2014; Vieira, 2015).

Imediatamente após uma operação bem-sucedida, o murmuro cardíaco deve ser amenizado ou desaparecer dentro de 12 a 24 horas, assim como a hemoglobinúria. Nos cães em estado crítico com hipovolémia pode ser necessário fluidoterapia para restaurar a hemodinâmica e a sua função renal. Dentro de poucas semanas após a recuperação de uma cirurgia, o tratamento adulticida é recomendado para eliminar quaisquer parasitas restantes, especialmente se ainda houver carga parasitária visível na ecocardiografia (AHS, 2014).

O risco de mortalidade intraoperatório é baixo e a taxa de sobrevivência e de recuperação está relacionada com o número de nemátodes removidos. A taxa de sobrevivência e de recuperação em cães com risco elevado de tromboembolismo pulmonar é melhorado significativamente pela remoção física dos parasitas antes do tratamento adulticida (Vieira, 2015).

Outra técnica que tem sido utilizada em cães muito pequenos é a canulação auricular direita realizada através de uma toracotomia, para remoção dos vermes (Nelson & Couto, 2010).

2.2.5.2 Complicações pulmonares após tratamento adulticida

O tromboembolismo pulmonar é uma consequência inevitável da terapia adulticida bem sucedida e pode ser grave se a carga parasitária for alta e a doença pulmonar arterial for severa (AHS, 2014). Isso ocorre porque os nemátodes mortos ou durante a morte levam a trombose e obstrução arterial pulmonar com exacerbação da agregação plaquetária, hipertrofia das vilosidades, arterite granulomatose, edema perivascular e hemorragia. Podem surgir insuficiência do débito cardíaco, hipotensão e isquemia do miocárdio. Podem ser visíveis sinais de embolia, tais como, febre, depressão, tosse, hemoptise e exacerbação da insuficiência cardíaca direita, que geralmente são mais evidentes dentro de 7 a 10 dias, porém podem aparecer com quatro semanas após a terapia adulticida (Nelson & Couto, 2010; AHS, 2014). Um fator crucial na redução do risco de complicações tromboembólicas é a restrição do exercício físico por completo (AHS, 2014).

O tratamento do tromboembolismo pulmonar inclui repouso absoluto, podendo ser necessário o confinamento em jaula, e terapia com glucocorticoides para reduzir a inflamação pulmonar, através de prednisona, 1-2 mg/kg/dia inicialmente via oral, que deve ser diminuída gradualmente. É recomendado recorrer a terapia suplementar com oxigénio com o objetivo de reduzir a hipoxia mediada pela vasoconstrição pulmonar (Nelson & Couto, 2010).

As alterações endoteliais nos cães que sobrevivem regridem em 4 a 6 semanas, quanto à hipertensão pulmonar e a doença arterial, assim como as alterações radiográficas só diminuem após alguns meses (Nelson & Couto, 2010).

2.2.6 Profilaxia

A dirofilariose é uma doença que pode ser evitada, apesar da alta suscetibilidade dos cães. A quimioprofilaxia é a melhor opção de prevenção a ser considerada em cães que vivem em áreas endémicas da dirofilariose. Os cães jovens devem iniciar a profilaxia o mais cedo possível, de preferência antes da oitava semana de idade. Após a oitava semana, os cães que vivam no exterior, ao ar livre, e sem proteção em áreas com alta endemicidade, devem ser testados seis meses após a dose inicial, seguido por testes anuais. Antes de ser iniciada prevenção em cães com sete meses de idade ou mais deve ser feito o teste de antigénio e de microfilárias circulantes (AHS, 2014; Vieira, 2015).

Os fármacos destinados à prevenção da dirofilariose que são atualmente comercializados, nomeadamente ivermectina, milbemicina oxima, moxidectina e selamectina, pertencem à classe das lactonas macrocíclicas. Estes fármacos são eficazes contra microfilárias, L3 e L4, em alguns casos de uso contínuo, filarias adultas. Esta classe de fármacos é altamente eficaz e estão entre os medicamentos mais seguros utilizados. Todos os fármacos à base de lactona macrocíclica que são administrados de forma oral ou tópica, é recomendado o uso em doses com intervalos de 30 dias. Para uma eficácia segura, a profilaxia deve ser realizada durante todo o ano (AHS, 2014).

É de salientar que as doses profiláticas das lactonas macrocíclicas aprovadas para cães demonstraram ser seguras em todas as raças, nomeadamente raça Collie, Border Collie, entre outras raças que por apresentarem deficiência na glicoproteína – P são sensíveis a vários medicamentos (Vieira, 2015)

Além das lactonas macrocíclicas, também pode ser usada a dietilcarbamazina para a prevenção da Dirofilariose, sendo uma substância segura e eficaz, porém só pode ser usada em cães amicrofilarémicos e que, devido à reduzida janela de eficácia terapêutica, deve ser dada diariamente (Ettinger & Feldman, 2010). Estes fatores têm levado a que o uso da dietilcarbamazina tenha sido substituído pelas lactonas macrocíclicas (Meireles *et al.*, 2014).

Tabela 3 – Fármacos profiláticos para a dirofilariose

Fármaco	Dose	Administração
Ivermectina	6 – 12 µg/kg	Mensal – Oral
Milbemicina	0,5 - 0,99 mg/kg	Mensal – Oral
Moxidectina	3 mg/kg	Mensal – Oral
Selamectina	6 – 12 mg/kg	Mensal – Tópica
Dietilcarbamazina	3 mg/kg	Diária – Oral

2.2.7 Prognóstico

O prognóstico para os cães assintomáticos com dirofilariose é bom, mas à medida que a severidade da doença aumenta, o prognóstico torna-se cada vez mais reservado. O prognóstico é reservado nomeadamente quando a apresentação inicial está associada a CID severa, síndrome da veia cava, embolização massiva, granulomatose eosinofílica, doença pulmonar arterial severa e insuficiência cardíaca. As lesões radiográficas começam a melhorar

após 3 a 4 semanas do tratamento adulticida e a hipertensão pulmonar reduz após alguns meses. Casos as lesões pulmonares persistam, é sugestivo de que a terapia adulticida não obteve sucesso total. Relativamente à insuficiência cardíaca deve melhorar com a terapia sintomática, repouso e remoção dos parasitas (Ettinger & Feldman, 2010; Vieira, 2015).

3 Objetivos

O objetivo do estudo consistiu em estabelecer a prevalência da infeção por *D. immitis* em cães residentes em sete Concelhos da Região do Algarve que se apresentaram à consulta no Hospital Veterinário de Portimão (HVP).

4 Material e métodos

4.1 Metodologia

A metodologia consistiu em avaliar através de métodos serológicos e por esfregaços sanguíneos cães residentes em sete concelhos da região do Algarve que se apresentaram à consulta no HVP no ano de 2016 quer por motivos de análise de rotina para iniciar a prevenção, quer por suspeita de dirofilariose. Deste modo, foram testados e acompanhados casos durante o estágio curricular e incluídos casos já avaliados previamente no HVP. Todos os casos testados, foram acompanhados de um questionário que se encontra no Apêndice I neste documento.

4.2 Área geográfica do estudo

Neste estudo foram incluídos todos os cães residentes no Algarve, sujeitos à análise de dirofilariose no HVP, deste modo incluiu-se cães de vários concelhos, nomeadamente Portimão, Lagoa, Lagos, Silves, Albufeira, Vila do Bispo e Olhão, como é demonstrado na figura 7.



Figura 7 – Ilustração no mapa do Algarve com uma “estrela” dos concelhos incluídos no estudo

Como se pode observar no mapa, todos os concelhos que fizeram parte do estudo localizam-se na zona litoral do Algarve, apresentando condições favoráveis para o desenvolvimento dos vetores de *D. immitis*. Além desta localização, contribui também para o desenvolvimento dos mosquitos, a presença do Rio Arade, que nasce na Serra do Caldeirão e passa por Silves, Lagoa e Portimão, contribuindo também para o meio ideal para o seu desenvolvimento.

Relativamente ao Concelho de Portimão, é composto por 3 juntas de freguesias, nomeadamente Portimão, Alvor e Mexilhoeira Grande, apresentando uma área de cerca de 182,08 km² com cerca de 55 614 habitantes (INE, 2011), sendo a cidade de Portimão a maior cidade do Algarve (PNMF, 2018).

O concelho de Vila do Bispo também fez parte do estudo e apresenta uma área de 178,99 km² com cerca de 5 258 habitantes (INE, 2011), dividindo-se em 4 juntas de freguesias, nomeadamente Barão de São Miguel, Budens, Vila de Sagres e União das Freguesias de Vila do Bispo e Raposeira (PNMF, 2018).

Lagos, concelho que separa Portimão de Vila do Bispo, está dividido em 4 juntas de freguesias, designadamente União de Freguesias de Bensafrim e Barão de São João, União de Freguesias de Lagos (São Sebastião e Santa Maria), Luz e Odiáxere, sendo composto por cerca de 31 048 habitantes (INE, 2011) (PNMF, 2018).

O concelho de Lagoa, que se encontra separado do concelho de Portimão apenas pelo Rio Arade, é um município mais pequeno com uma área de apenas 88,50 km² e com cerca de 22 975 habitantes (INE, 2011), dividindo-se em 4 juntas de freguesias, designadamente União de Freguesias de Estômbar e Parchal, Ferragudo, União de Freguesias de Lagoa e Carvoeiro e Porches (PNMF, 2018).

Relativamente a Silves, é um concelho com uma área de 680,02 km² e cerca de 37 126 habitantes (INE, 2011), sendo o principal local de passagem do Rio Arade. Está dividido em 6 juntas de freguesias, nomeadamente União de Freguesias de Alcantarilha e Pêra, União de Freguesias de Algoz e Tunes, Armação de Pêra, São Bartolomeu de Messines, São Marcos da Serra e Silves (PNMF, 2018).

O concelho de Albufeira tem cerca de 22 000 habitantes (INE, 2011), e apresenta 4 juntas de freguesias, designadamente Albufeira e Olhos de Água, Ferreiras, Guia e Paderne (PNMF, 2018).

Por fim, o concelho de Olhão tem uma área de 130.89 km² e cerca de 45 396 habitantes (INE, 2011), que inclui uma parte continental e a Ilha da Armona, na Ria Formosa. É composto por 4 juntas de freguesias nomeadamente União das Freguesias de Moncarapacho e Fuseta, Olhão, Pechão e Quelfes.

A localização destes concelhos na zona litoral do país e o seu ambiente húmido e quente, leva a preocupação sob a prevalência da dirofilariose e a sua prevenção.



Figura 8 – Rio Arade a passar entre Portimão (à direita) e Lagoa (à esquerda) (23-01-2018)
(<http://barlavento.pt/wp-content/uploads/2016/04/vista-aerea-geral-rio-arade-975x596.jpg>)



Figura 9 – Rio Arade em Silves, junto à Ponte Romana (23-01-2018).
(<http://cdn.olhares.pt/client/files/foto/big/737/7372991.jpg>)

4.3 Caracterização da amostra

Este estudo integrou 135 cães, que se apresentaram à consulta no Hospital Veterinário de Portimão. Estes animais foram testados sob a necessidade médica, nomeadamente por apresentarem sinais clínicos compatíveis com a doença ou para iniciar prevenção da dirofilariose. Todos os cães testados foram incluídos no estudo, independentemente da raça, género, presença ou ausência de sintomatologia e tipo de habitat. O único critério de exclusão foi a idade inferior a 1 ano, todos os cães que apresentassem esta condição foram excluídos.

Dado tratar-se de testes por motivos médicos, não ocorreram testes em cães que faziam corretamente a prevenção para a dirofilariose, sendo testados apenas quando se justificava pelo quadro clínico. Deste modo garantiu-se que não entravam no estudo cães que faziam a prevenção para a dirofilariose.

O questionário, que se encontra no Apêndice I, teve como objetivo obter informações sobre os cães que entraram no estudo, permitindo agrupar os dados para discutir e estudar os vários itens e a sua correlação, para poder retirar as informações como idade, género, porte, tamanho da pelagem, estado reprodutivo, tipo de habitat, existência de coabitantes, viagens para fora do Algarve, desparasitações externas e internas, vacinações e a presença ou ausência de sintomatologia.

4.3.1 Sexo e estado fértil

Relativamente à distribuição dos cães por sexo, a amostra foi composta por 60% de machos e 40% de fêmeas (Gráfico 5). Quanto ao estado fértil, apenas 29% dos cães estavam esterilizados e 71% dos animais eram inteiros (Gráfico 6).

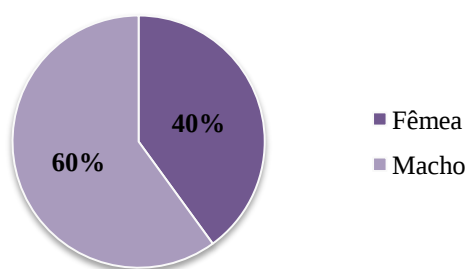


Gráfico 5 - Caracterização da amostra quanto ao sexo (Frequência relativa, n=135)

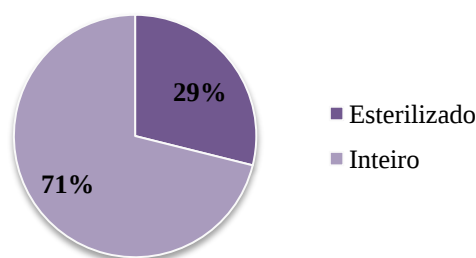


Gráfico 6 - Caracterização da amostra quanto ao estado fértil (Frequência relativa, n=135)

4.3.2 Classe de idades

Neste estudo o intervalo de idades encontrava-se entre 1 ano de idade e os 14 anos apresentando uma média de idades de $4,61 \pm 3,42$ anos. Deste modo as idades foram agrupadas em juvenil, adulto e sénior. Na classe juvenil foram incluídos todos os animais que apresentassem um ano de idade. Na classe adulta foram inseridos animais com 2 a 7 anos de idade, sendo considerados seniores os cães com idade superiores a 7 anos. A distribuição dos animais por classe de idades encontra-se ilustrada no Gráfico 7.

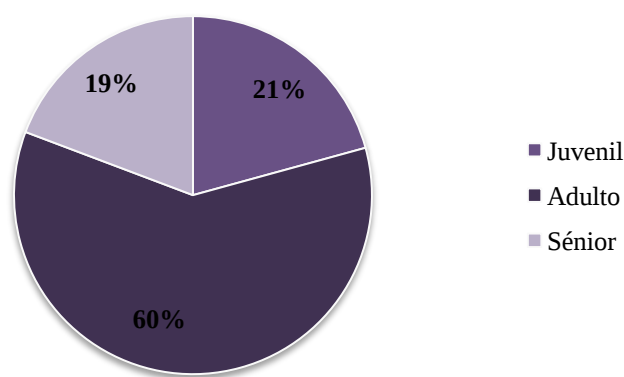


Gráfico 7 – Caracterização da amostra relativamente à classe de idades (Frequência relativa, n=135)

4.3.3 Portes

Com os dados obtidos dos pesos dos animais do estudo foram agrupados em 5 classes de portes, nomeadamente miniatura, pequeno, médio, grande e gigante. Deste modo na classe miniatura foram incluídos todos os cães que apresentassem um peso inferior a 6 kg. Relativamente à classe de pequeno foram englobados os cães com pesos entre os 6 kg e os 15 kg, seguindo-se a classe de médio que inclui os cães com pesos entre os 15,1 kg a 25 kg. Quanto aos animais da classe grande apresentavam um peso entre os 25,1 kg e os 45 kg, sendo considerados os cães da classe gigante aqueles que apresentassem um peso superior a 45 kg. Em relação aos pesos dos cães do estudo, obtivemos como peso mínimo 2,4 kg enquanto o máximo foi de 60 kg, com uma média de $16,81 \pm 12,74$ kg. Deste modo segue-se a distribuição da amostra por estas classes no seguinte gráfico:

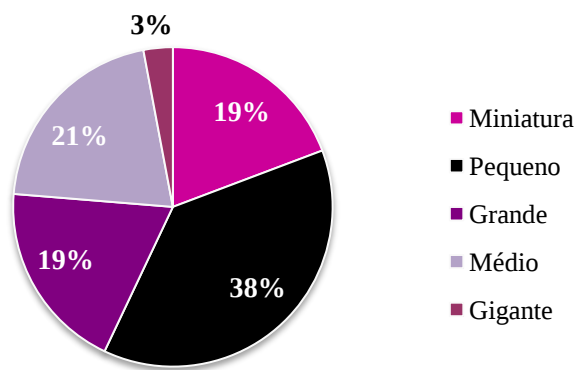


Gráfico 8 – Distribuição da amostra pelos portes (Frequência relativa, n=135)

4.3.4 Raças

Na amostra do presente estudo foram incluídos cães de 34 raças diferentes, sendo que 43% (n=58) da amostra correspondeu cães cruzados ou de raça indefinida, deste modo 57% (n=77) correspondeu a animais de raça pura. A raça pura em maior percentagem foi Bulldog Francês (6,7%; n=9), seguida pela Yorkshire Terrier (4,4%; n=6), Labrador (3,7%; n=5), Chihuahua (3,7%; n=5) e Spitz (3,7%; n=5). Relativamente às raças Border Collie, Boxer e Cocker Spaniel apresentaram uma percentagem de 3% (n=4). Em menor número tivemos o Pastor Alemão e Pequeno em 2,2% (n=3) da nossa amostra, seguindo-se o Beagle, Border Terrier, Caniche, Golden Retriever, Podengo Português e Shitzu com 1,5% (n=2). As restantes raças foram representadas por um único animal, significando 0,7%, nomeadamente American Bully, Bichon Maltês, Braco Alemão, Bull Terrier, Bulldog Inglês, Chow-chow, Dogue Alemão, Dogue de Bordeus, Grand Danois, Jack Russel Terrier, Leão da Rodésia, Patterdale Terrier, Pitbull Terrier, Rottweiler, Sharp ei, Weimaraner e Whippet.

4.3.5 Pelagem

No presente estudo, os cães foram agrupados pelo tipo de pelagem quanto ao seu comprimento em 3 tipos, nomeadamente curta, média e longa. Esta distribuição é demonstrada no seguinte gráfico:

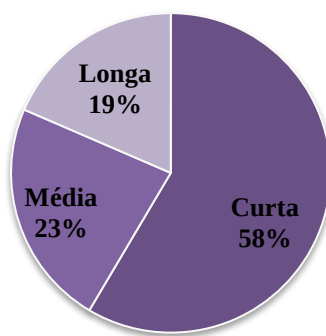


Gráfico 9 – Distribuição da amostra pelo tipo de pelagem (Frequência relativa, n=135)

4.3.6 Tipo de habitat e presença de coabitantes

Os cães presentes neste estudo foram distribuídos pelo tipo de habitat que tinham, podendo ser interior, exterior e misto, sendo considerado misto todos os cães que tanto permaneciam no exterior como interior da habitação, por tempos prolongados.

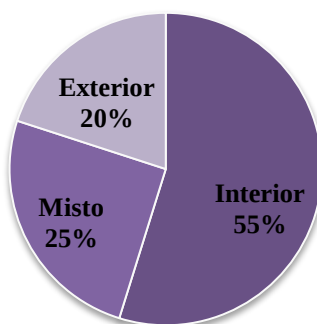


Gráfico 10 – Distribuição da amostra pelo tipo de habitat (Frequência relativa, n=135)

Relativamente à presença de coabitantes, foi considerada a presença quer de cães quer de gatos como coabitantes possíveis para os cães do estudo, sendo considerado afirmativo todos os cães que tivessem quer cães, quer gatos ou ambos no mesmo local. Esta distribuição é demonstrada no seguinte gráfico:

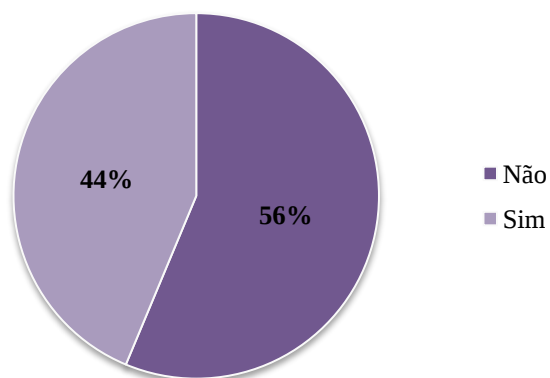


Gráfico 11 – Distribuição da amostra por cães sem e com coabitantes (Frequência relativa, n=135)

4.3.7 Local de residência

No presente estudo foram incluídos cães de 7 concelhos distintos, nomeadamente Portimão, Lagoa, Albufeira, Lagos, Olhão, Silves e Vila do Bispo. Na sua maioria, os cães pertenciam ao concelho de Portimão, numa percentagem de 60% (n=81/135). Seguindo Lagoa com 20% (n=27/135) e Lagos com 10% (n=14/135). Quanto a Silves correspondeu a 6% (n=8/135). Relativamente a Albufeira, demonstrou uma percentagem de 2% (n=3/135). Quanto a Olhão e Vila do Bispo, foram uma minoria no estudo, ambos com 1% (n=1/135). A distribuição dos casos encontra-se ilustrada no Gráfico 12.

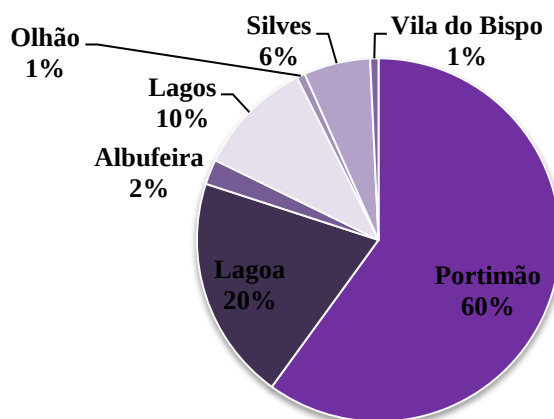


Gráfico 12 – Distribuição da amostra pelos 7 concelhos englobados no estudo (Frequência relativa, n=135)

4.3.8 Viagens realizadas

No presente estudo, foram consideradas todas as viagens realizadas para fora do Algarve. Sendo que 87% (n=118/135) dos cães testados nunca tinham viajado para fora do Algarve, enquanto dos 13% (n=17/135) dos animais que tinham viajado 52,9% foi para fora de Portugal (n=9/17).

4.3.9 Profilaxia – vacinação e desparasitação

Na profilaxia vacinal verificou-se que 81,5% (n=110/135) dos cães testados eram vacinados. Quanto à administração de profilaxia para endoparasitas constatou-se que 77% (n=104/135) dos animais não cumpriam nenhuma profilaxia. Nos animais em que era cumprida a profilaxia, os fármacos usados incluem, por ordem decrescente de utilização: praziquantel (Profender®), praziquantel e pirantel (Drontal®), e milbemicina oxima (Milbemax®), sendo este último usado esporadicamente, não tendo sido usado nos últimos 6 meses.

Quanto à administração de profilaxia para ectoparasitas verificou-se que apenas 34,1% (n=46/135) eram sujeitos à desparasitação externa. Os fármacos usados, por ordem decrescente, incluem: imidaclopramide (Advantix®), fluralaner (Bravecto®), deltametrina (Scalibor®) e imidacloprid e flumetrina (Seresto®).

4.3.10 Presença de sinais clínicos

Dos 135 animais que entraram neste estudo, apenas 34,1% (n=46/135) apresentavam sintomatologia, sendo que 11,9% (n=16/135) dos animais estudados apresentava tosse como sintomatologia. Quanto a anorexia e perda de peso era apresentado como sintomatologia em apenas 2,2% (n=3/135), já a prostração foi apresentada em 11,1% (n=15/135). Quanto a distensão abdominal constatou-se que apenas 3% (n=4/135) dos animais apresentavam esta sintomatologia à consulta. Outra sintomatologia apresentada à consulta foi a dispneia com 5,9% (n=8/135), assim como a síncope em apenas 1,5% (n=2/135). Além da sintomatologia frequentemente associada à doença também foram apresentados à consulta animais com vômitos, diarreia, hemoptise e claudicação, sendo 9,6% (n=13/135) da amostra. Ao exame

físico apenas 14,8% (20/135) da amostra apresentou alterações cardíacas, nomeadamente sopro cardíaco.

4.4 Meios de diagnóstico utilizados na deteção de *D. immitis*

Os cães apresentados à consulta no HVP que eram sujeitos à análise para dirofilariose foram devidamente preparados para a colheita de sangue, nestes casos foi feita a tosquia da zona a puncionar, nomeadamente a zona da veia jugular ou veia cefálica. De seguida fez-se a desinfeção da zona e a punção da veia. Colheu-se 1 ml de sangue para um tubo com anticoagulante, nomeadamente EDTA. Com as amostras colhidas procedia-se ao teste de antígenos de dirofilariose e ao esfregaço sanguíneo.

4.4.1 Pesquisa da presença de antígenos séricos de *D. immitis*

A pesquisa de antígenos séricos de *D.immitis* foi realizada através da utilização do teste comercial da UranoVet® - Uranotest Dirofilaria, que apresenta uma sensibilidade de 94,4% e uma especificidade de 100% na deteção de antígenos de *D. immitis* (Anexo I).

O teste da UranoVet® é baseado num só passo, sem necessidade de adicionar reativos à amostra de sangue. Apresenta a vantagem de detetar parasitas machos e fêmeas, detetando casos de parasitismo com uma carga parasitária de um único parasita adulta de qualquer género, nomeadamente machos, fêmeas adultas e fêmeas imaturas (Anexo I).

A técnica para a realização do teste baseia-se nos seguintes passos:

1. Após colheita do sangue, coloca-se num tubo de EDTA
2. Coloca-se o teste na posição horizontal num local estável
3. Colocar 2 gotas de sangue no poço de amostra do teste
4. Aguarda-se 5 a 10 minutos, de modo a permitir que a amostra corra a janela de resultados
5. Interpretar a leitura dos resultados

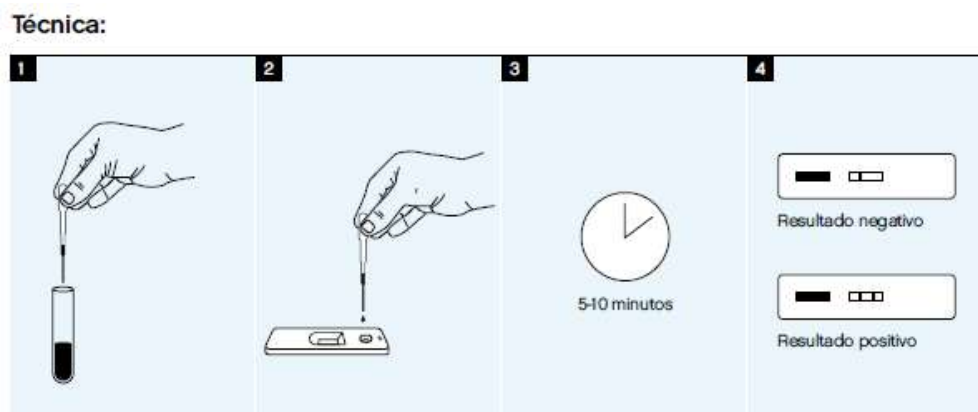


Figura 10 – Técnica do Urotest Dirofilaria

4.4.2 Esfregaço sanguíneo

Para a pesquisa de microfilarémia recorreu-se ao esfregaço sanguíneo, que é realizado rotineiramente no HVP quando é colhido sangue para análises sanguíneas. Para a realização do esfregaço seguiu-se os seguintes passos:

1. Retirou-se uma gota de sangue da amostra colhida inicialmente
2. Colocou-se a gota numa lâmina, devidamente limpa e seca
3. Usando uma segunda lâmina, lâmina extensora, colocou-se sob a gota de sangue num ângulo de 45°
4. Deslizou-se a lâmina extensora pela lâmina da amostra num movimento ligeiro e uniforme
5. Secou-se a lâmina ao ar, agitando ligeiramente
6. Corou-se a lâmina com Eosina e Azul-de-metileno segundo Giemsa
7. Observou-se a lâmina ao microscópio na objetiva de 10x, ou seja, numa ampliação de 100x

4.5 Análise estatística

Os dados obtidos neste estudo foram transferidos para uma tabela no programa Microsoft Excel 2007 e analisados através do programa IBM SPSS Export Facility, que serão abordados ao longo da apresentação e discussão dos resultados.

5 Resultados

5.1 Prevalência da dirofilariose

Com base na avaliação da microfilarémia ao esfregaço sanguíneo e do teste de antígenos séricos de *D. immitis* foi possível obter a prevalência da doença nos sete concelhos da região do Algarve. Sendo que ao esfregaço sanguíneo foram detetados 14,8% (n=20) animais positivos para microfilarémia. Relativamente ao teste de antígenos séricos de *D. immitis* verificou-se uma prevalência de 8,9% (n=12/135).

A prevalência da doença da dirofilariose canina no Hospital Veterinário de Portimão foi de 15,6% (n=21/135) (Gráfico13), apesar de se verificar distintos tipos de infeção, por microfilarémia, pela presença de microfírias em circulação, ou por antigenémia, pela presença de *D. immitis* adultas, como é possível verificar no Gráfico 14.

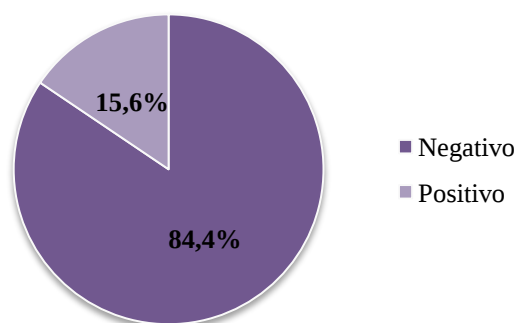


Gráfico 13 – Prevalência da dirofilariose nos 7 concelhos da região do Algarve (Frequência relativa, n=135)

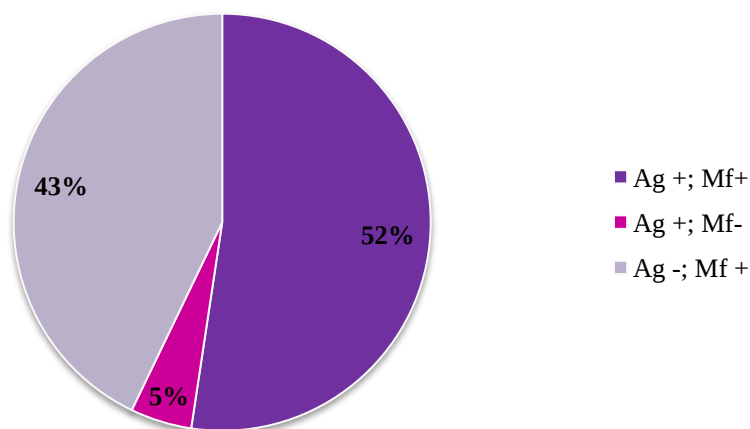


Gráfico 14 – Prevalência da dirofilariose de acordo com o tipo de diagnóstico (ag – antígeno; Mf – microfilarémia) (Frequência relativa, n=21)

5.2 Prevalência da dirofilariose por concelho

A prevalência global da doença nos sete concelhos verificou-se ser 15,6% como referido anteriormente, sendo que Portimão corresponde a 5,9% ($n=8/135$), assim como Lagoa com 5,9% ($n=8/135$). Seguiu-se Lagos a corresponder a 2,2% ($n=3/135$), e Silves com 1,5% ($n=2/135$). Quanto a prevalência por concelho, da mais elevada para a menos elevada temos Lagoa com 29,6% ($n=8/27$), Silves com 25% ($n=2/8$), Lagos com 21,4% ($n=3/14$) e Portimão com 9,9% ($n=8/81$). Nos concelhos de Vila do Bispo, Olhão e Albufeira não se observou animais positivos.

5.3 Análise estatística inferencial

Nesta análise estatística pretendeu-se relacionar algumas variáveis mais relevantes com a presença da doença na amostra em estudo, e avaliar eventual relação através da aplicação do teste chi-quadrado, para um nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$).

5.3.1 Relação com o sexo

Na amostra em estudo não parece existir relação entre o sexo do animal e a presença da doença, no entanto é tendencialmente significativa nos machos que apresentavam predisposição para a doença (chi-quadrado (1, $N=135$) = 2,716, $p=0,099$). Podemos verificar essa tendência no Gráfico 15, sendo que 76,2% ($n=16/21$) foram positivos à doença os animais do sexo masculino.

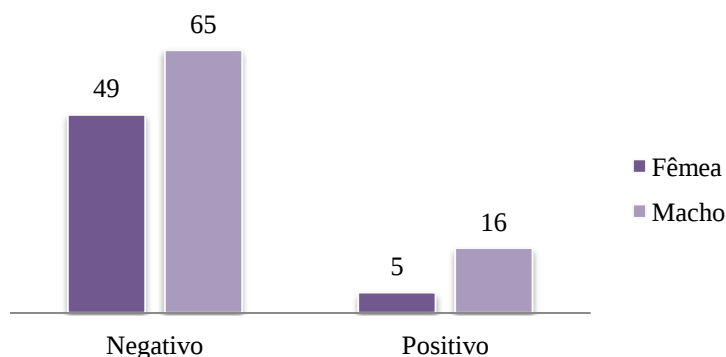


Gráfico 15 – Relação do sexo do animal com a presença da dirofilariose (Frequência relativa, $n=135$)

5.3.2 Relação com o estado fértil

Na amostra em estudo não revelou existir relação entre o estado fértil do animal e a presença da doença, no entanto é tendencialmente significativa para os animais inteiros apresentarem predisposição para a doença (chi-quadrado (1, N=135) = 2,582, $p=0,108$). Podemos verificar essa tendência no Gráfico 16, sendo que 85,7% ($n=18/21$) foram positivos e eram animais inteiros.

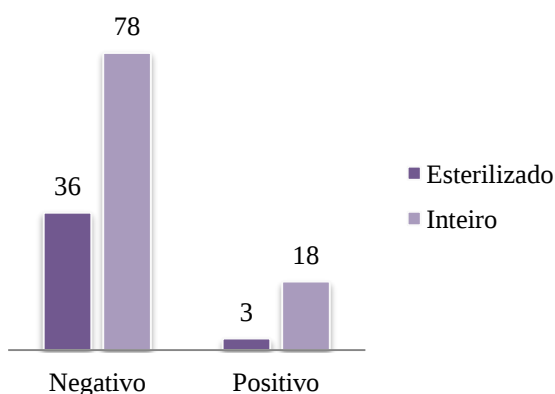


Gráfico 16 – Relação entre a presença da dirofilariose e o estado fértil do animal (Frequência relativa, $n=135$)

5.3.3 Relação com a idade

Na amostra em estudo não se verificou relação entre a idade dos animais e a presença da doença.

5.3.4 Relação com o porte

Através do teste de chi-quadrado foi encontrada uma relação significativa entre o porte, ou seja, animais de porte médio e grande e a presença da dirofilariose, sendo demonstrado que existe uma relação significativa entre a presença da doença e os animais de porte médio e grande (chi-quadrado (4, N=135) = 14,504, $p=0,006$). No Gráfico 17 é demonstrada esta relação.

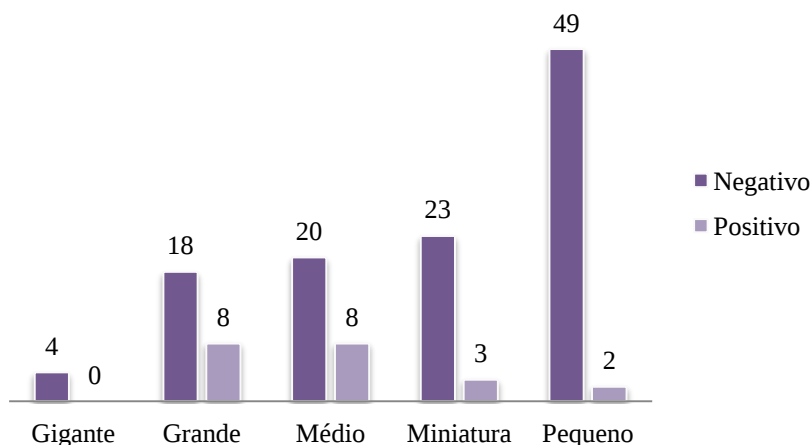


Gráfico 17 – Relação entre a classe de pesos e a presença da doença (Frequência relativa, n=135)

5.3.5 Relação com a raça

A amostra recolhida no estudo impossibilitou se estabelecer uma relação entre a raça e a presença da doença devido tratar-se uma amostra de conveniência, existindo uma discrepância entre os animais de cada raça e os animais de raça indeterminada.

5.3.6 Relação com a pelagem

Na amostra em estudo não foi estabelecida relação entre o tipo de pelagem do animal e a presença de doença.

5.3.7 Relação com o tipo de habitat

Através do teste chi-quadrado foi encontrada uma relação entre o tipo de habitat do animal e a presença de dirofilariose, sendo demonstrado que existe uma relação significativa entre a presença da doença nos animais de exterior (chi-quadrado (2, N=135) = 13,960, $p=0,001$). Esta relação é demonstrada no Gráfico 18.

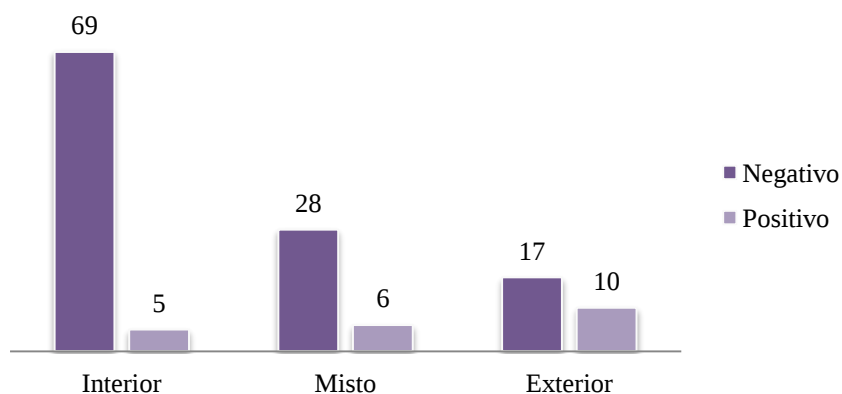


Gráfico 18 – Relação entre a presença da dirofilariose e o tipo de habitat do animal (Frequência relativa, n=135)

5.3.8 Relação com a presença de coabitantes

Na amostra em estudo não foi estabelecida nenhuma relação entre a presença de coabitantes e a presença da doença.

5.3.9 Relação com viagens realizadas

Na amostra em estudo não foi estabelecida nenhuma relação entre a presença da doença e as viagens realizadas para fora do Algarve.

5.3.10 Relação com o local de residência

Na amostra em estudo não foi estabelecida nenhuma relação entre o local de residência e a presença da doença mas note-se no Gráfico 19 que o número de positivo em Lagoa é igual a Portimão, apesar da grande discrepância de animais testados nos distintos concelhos.

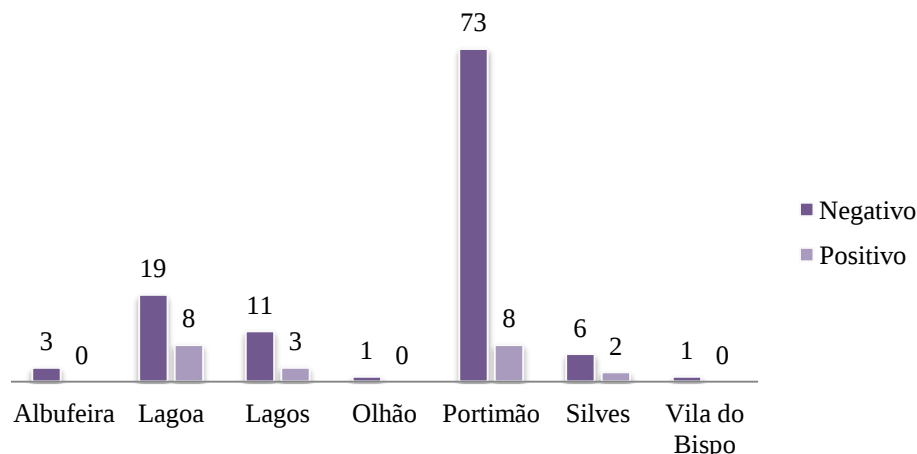


Gráfico 19 – Relação entre a presença da doença e o local de residência (Frequência relativa, n=135)

5.3.11 Relação com a profilaxia

Dentro da profilaxia será abordada a relação com a desparasitação interna e externa, assim como a vacinação.

A vacinação dos animais demonstrou através do chi-quadrado ter uma relação significativa para a presença da doença, nomeadamente está relacionada com a não vacinação dos animais (chi-quadrado (1, N=135) = 9,763, $p = 0,002$). Esta relação é demonstrada no Gráfico 20.

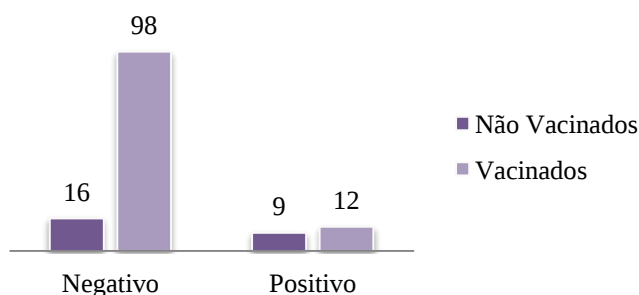


Gráfico 20 – Relação da presença da dirofilariose com a vacinação dos animais (Frequência relativa, n=135)

A desparasitação externa dos animais em estudo demonstrou através do teste chi-quadrado que há uma relação tendencialmente significativa para que animais não desparasitados apresentassem a doença (chi-quadrado (1, N=135) = 2,500, $p = 0,114$). Esta relação é demonstrada no Gráfico 21.

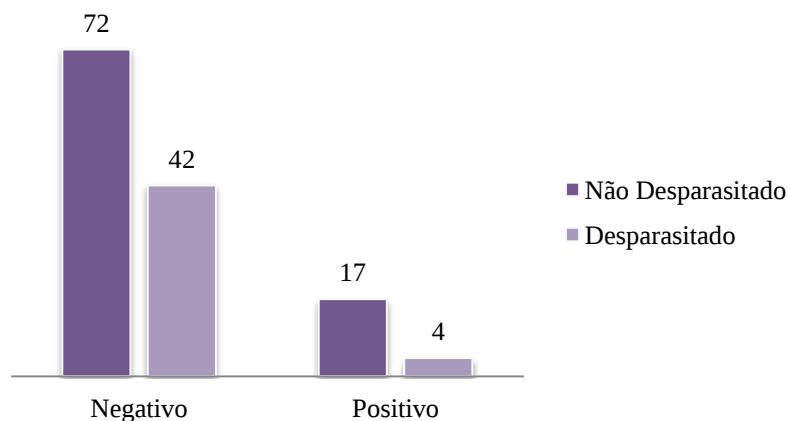


Gráfico 21 – Relação entre a presença da doença e a desparasitação externa (Frequência relativa, n=135)

Relativamente à desparasitação interna não se verificou nenhuma relação com a presença da doença.

5.3.12 Relação com a presença de sintomatologia

Através do chi-quadrado foi possível verificar que existiu uma relação significativa entre a presença da doença e a presença de sintomatologia neste estudo (chi-quadrado (1, N=135) = 11.760, $p = 0,001$). Esta relação é demonstrada no Gráfico 22.

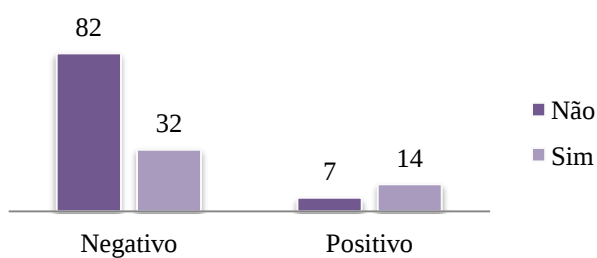


Gráfico 22 – Relação entre a presença da doença e a sintomatologia (Frequência relativa, n=135)

5.3.12.1 Relação com a tosse

Através do teste do chi-quadrado foi possível demonstrar que houve relação da tosse com a presença da doença, sendo tendencialmente significativa (chi-quadrado (1, N=135) = 3,404, $p = 0,065$). Esta relação é demonstrada no Gráfico 23.

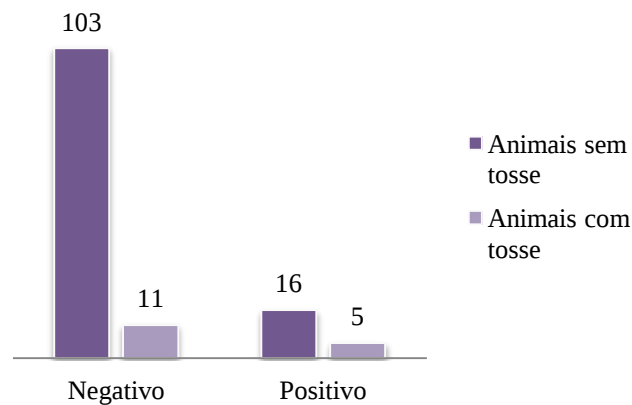


Gráfico 23 – Relação da sintomatologia de tosse com a presença da doença (Frequência relativa, n=135)

5.3.12.2 Relação com a prostração

O teste de chi-quadrado indicou que existiu uma relação tendencialmente significativa para que animais prostrados apresentassem a doença (chi-quadrado (1, N=135) = 4,060, $p = 0,044$). Esta relação é demonstrada no Gráfico 24.

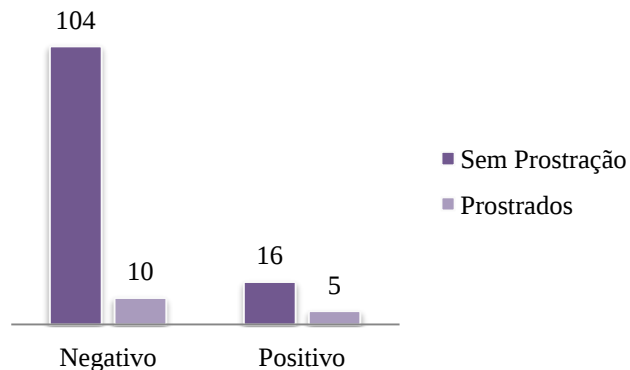


Gráfico 24 – Relação da sintomatologia de prostração com a presença da doença (Frequência relativa, n=135)

5.3.12.3 Relação com a distensão abdominal

Na amostra em estudo não foi demonstrada relação entre a distensão abdominal e a presença da doença.

5.3.12.4 Relação com a anorexia

Na amostra em estudo não foi demonstrada relação entre a anorexia e a presença da doença.

5.3.12.5 Relação com a perda de peso

O teste de chi-quadrado sugere que a relação da perda de peso e a presença da doença é tendencialmente significativa (chi-quadrado (1, N=135) = 6,102, p = 0,014). Esta relação é demonstrada no Gráfico 25.

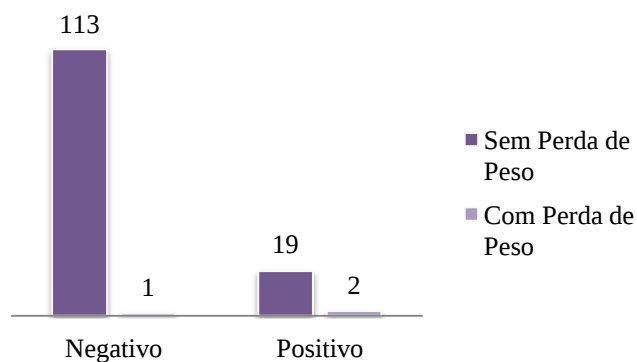


Gráfico 25 – Relação entre a perda de peso e a presença da dirofilariose (Frequência relativa, n=135)

5.3.12.6 Relação com a dispneia

Na amostra do estudo não se estabeleceu nenhuma relação entre a dispneia e a presença da doença.

5.3.12.7 Relação com a síncope

Na amostra do estudo não se estabeleceu nenhuma relação entre a síncope e a presença da Dirofilariose.

5.3.12.8 Relação com as alterações cardíacas

Na amostra do estudo não se estabeleceu nenhuma relação entre as alterações cardíacas e a presença da doença.

5.3.12.9 Relação com outra sintomatologia

O teste de chi-quadrado sugere que há relação significativa entre a presença da doença e outra sintomatologia ($\chi^2(1, N=135) = 5,746, p = 0,017$). Note-se que a variável “Outra Sintomatologia” inclui sintomatologia tal como vómitos, diarreia, hemoptise e claudicação. A relação é demonstrada no Gráfico 26.

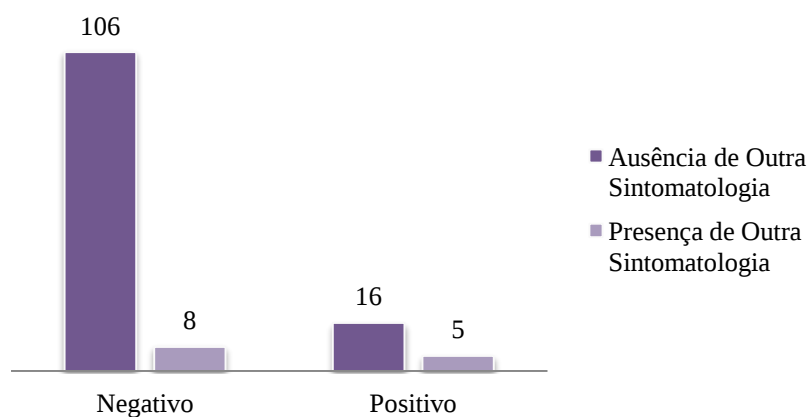


Gráfico 26 – Relação entre a presença da doença e outra sintomatologia apresentada (Frequência relativa, n=135)

6 Discussão

O presente estudo consistiu num estudo transversal, com base nos dados de 2016, cujo objetivo foi determinar a prevalência da dirofilariose canina, nos animais residentes no Algarve que eram assistidos no Hospital Veterinário de Portimão. Deste modo apenas foram incluídos os dados de animais que apresentassem risco para estarem parasitados e que vivessem no Algarve.

Segundo o estudo realizado por Maia *et al.* (2016), a prevalência observada no Algarve foi de 10,9%), sendo inferior aos resultados obtidos no presente estudo que foi de 15,6% de animais positivos. É possível que se deva à inclusão apenas de animais que apresentavam às consultas e que se suspeitasse de estar parasitados, quer por apresentarem sintomatologia compatível com a dirofilariose ou aqueles que foram testados devido à ausência de protocolo preventivo para a doença. Além deste facto é de salientar que em relação aos animais positivos da amostra, 43% desta prevalência é proveniente de animais que foram apenas positivos para microfilarémia, desde modo podem estar a ser considerados positivos para *D. immitis*, tratando-se de *Acanthocheilonem reconditum*. Relativamente aos animais positivos da amostra, 5% de animais foram positivos ao teste de antígenos séricos para *D. immitis*, porém negativos para a microfilarémia, pode ser justificado pela existência de animais na amostra que já foram sujeitos a profilaxia para a doença, porém com falhas mensais. Contudo também podem não ter sido detetadas microfilárias nestes casos devido à metodologia usada, sendo o teste de Knott o ideal para a pesquisa de microfilárias por possibilitar a concentração das mesmas na amostra a ser observada ao microscópio.

Na amostra analisada verificou-se que existiu uma relação tendencialmente significativa para os machos apresentarem-se positivos para a doença, segundo o Gráfico 15. Contudo, a prevalência da doença, de acordo com o sexo do animal tem opiniões contraditórias entre vários investigadores, porém estes resultados vão de encontro aos que McCall *et al.* (2008) e Vieira (2015) obtiveram.

No presente estudo avaliou-se o estado fértil como fator de risco para a doença, sendo demonstrado que foi tendencialmente significativo os animais inteiros apresentarem a doença. Porém também é de salientar que 71% dos animais da amostra do estudo não era esterilizada, o que demonstrou que ainda há a necessidade de informar aos proprietários a

importância da esterilização dos animais para o bem-estar e prevenção de futuras doenças reprodutivas.

Relativamente à idade não se verificou nenhuma relação no presente estudo, verificando-se que pode ser detetada em qualquer idade. Este fator também não é consensual entre todos os investigadores. Segundo alguns investigadores como é o caso de Vieira *et al.* (2014), defendem que a prevalência é influenciada pela idade, nomeadamente animais entre 4 a 9 anos sendo um fator de risco para apresentarem a doença. Quanto a Montoya *et al.* (1998), a idade não é um fator de risco. Contudo na sua maioria, os investigadores defendem que a idade é um fator de risco importante, pois está relacionado com a exposição à doença, tendo em conta que à medida que a idade aumenta, os cães têm uma maior predisposição de serem infetados (Vieira, 2015).

Quanto ao porte, verificou-se uma relação significativa entre a prevalência da doença e os cães de porte médio e grande, como é demonstrado no Gráfico 17. Este resultado vai de encontro ao que é defendido pelos vários investigadores, que defendem que a prevalência é maior em cães de médio e grande porte, as razões apontadas para este facto foram que, por norma, os cães de raça grande passam mais tempo no exterior e têm uma maior superfície corporal exposta ao mosquito (Vieira, 2015), como se verifica comumente no Algarve, com a existência de diversas moradias, sendo comum os animais de porte médio e grande se encontrem no exterior da casa.

Relativamente à raça dos cães, não se estabeleceu nenhuma relação, contudo este resultado já era esperado devido à amostra do estudo, que impossibilitou conclusões relativamente a alguma raça em particular. Porém, este resultado vai de encontro aos resultados apresentados em outros estudos (Liu *et al.*, 2013; Vieira, 2015).

Quanto à pelagem, no presente estudo não se estabeleceu nenhuma relação entre o tamanho da pelagem e a prevalência da doença, porém os investigadores ainda não conseguiram estabelecer relação entre o tamanho da pelagem e a presença da dirofilariose (Vieira, 2015).

Relativamente ao tipo de habitat, o presente estudo estabeleceu a relação entre a prevalência da doença e os animais que residem no exterior das casas, justificado pelo facto de que os animais que se encontram no exterior estão mais expostos à picada do mosquito (Liu *et al.*, 2013; Vieira, 2015).

Quanto à presença de coabitantes não se encontrou nenhuma relação entre a prevalência da doença e a presença de outros animais, como outros cães e gatos.

Também as viagens realizadas não demonstraram qualquer relação com a prevalência da doença no presente estudo.

Relativamente ao local de residência não se estabeleceu nenhuma relação quanto ao local onde os animais residem e a presença da dirofilariose, porém note-se no Gráfico 19 Portimão e Lagoa apresentam o mesmo número de positivos, 8 cães positivos, apesar da discrepância entre o número de animais testados em ambos os locais, resultando numa maior prevalência para Lagoa com 29,6% ($n=8/27$), para os 9,9% de Portimão ($n=8/81$).

Este resultado pode-nos alertar para a necessidade de estudar as prevalências individualmente por concelhos na região do Algarve. Porém este resultado de positivos em Lagoa, poderá ser devido à maior área em contacto com o mar pelo concelho de Lagoa como é possível observar na Figura 8, além deste facto, o concelho de Lagoa é atravessado numa maior extensão pelo rio Arade, além da existência na União de Freguesias Estômbar e Parchal do local “Sítio das Fontes” com águas provenientes do maior lençol freático de águas algarvio, o Lias-Dodger, que proporciona um excecional reduto para a proliferação de grande diversidade de fauna e flora e um meio excelente para a proliferação de mosquitos (CMLagoa, 2016).

Quanto aos fatores de risco para a dirofilariose observados no presente estudo, observou-se que o porte dos cães, sendo estes os portes médio e grande apresentavam-se como fatores predisponentes, assim como o tipo de habitat nos quais os animais que habitavam no exterior das residências, também apresentavam maior predisposição à contraírem a doença.

Dentro dos fatores de risco para a presença da doença também foram avaliados os parâmetros de vacinação e desparasitações internas e externas dos animais. Apenas a vacinação demonstrou ter uma relação significativa para a presença da doença, em que se observou que a não vacinação dos animais teve influência no número de animais positivos. Uma justificação plausível para este facto poderia ser o facto de que proprietários que não têm por hábito levar os seus animais ao veterinário não são devidamente informados da importância da desparasitação e prevenção das doenças, nomeadamente a dirofilariose. Ao se avaliar este fator, note-se que 18,5% dos animais não se encontram vacinados, demonstrando

assim a desinformação dos proprietários sobre os aspetos de profilaxia de doenças. Ao contrário do esperado, no presente estudo não foi demonstrada nenhuma relação entre a desparasitação interna e a presença da doença, contudo este facto pode dever-se à inclusão de animais que já tinham feito prevenção, usando milbemicina oxima mas não sendo possível determinar quando foi realizada. Quanto à desparasitação externa foi demonstrada uma relação tendencialmente significativa para a dirofilariose, resultado esperado, dado o controlo dos vetores ser uma das formas de profilaxia para a doença, limitando-se a picada dos mosquitos limita-se a continuação do ciclo.

Relativamente à sintomatologia, tal como esperado foi obtida uma relação significativa entre a mesma e a presença da doença (Gráfico 22). Contudo pretendeu-se avaliar a relação entre as diversas sintomatologias apresentadas à consulta e o diagnóstico da Dirofilariose. Tanto a tosse como a prostração demonstram uma relação tendencialmente significativa, contudo era esperada uma relação significativa na tosse, dado ser uma sintomatologia apresentada mesmo num quadro inicial da doença sintomática. Tanto a distensão abdominal como a anorexia não apresentaram relação com a presença da doença no presente estudo, no entanto tal pode dever-se ao facto dos positivos à Dirofilariose se encontrarem num estado mais inicial da doença. Apesar de a anorexia não apresentar uma relação com a doença no presente estudo, foi demonstrada uma relação tendencialmente significativa entre a perda de peso e a dirofilariose (Gráfico 25).

Dentro da sintomatologia da dirofilariose num quadro mais avançado também a síncope não demonstrou relação com a doença, podendo ser justificado pelo mesmo motivo apresentado para a distensão abdominal. Assim como este caso, o mesmo se sucede para as alterações cardíacas, contudo neste caso poderia ser encontrada relação se existem-se meios de diagnóstico como radiográfica torácica ou ecocardiografia que auxiliasse na deteção de alterações cardíacas, deste modo só foram contabilizadas alterações detetadas ao exame físico, tais como sopros à auscultação cardíaca.

Apesar do esperado, também a dispneia não apresentou relação com a Dirofilariose no presente estudo, porém pode dever-se ao estado inicial da doença, dado ser uma sintomatologia apresentada em casos mais severos da doença.

Por fim, foi estabelecida uma relação significativa entre o parâmetro “outra sintomatologia” e a dirofilariose, porém deve-se à facto de serem incluídos vários sintomas no

mesmo parâmetro, tais como vômitos, diarreia, claudicação e ainda a hemoptise, que poderá influenciar este resultado.

Deste modo, este estudo veio complementar o trabalho num dos principais centros veterinários do Algarve, nomeadamente o único no Barlavento Algarvio, permitindo sensibilizar os médicos veterinários deste hospital para a importância de continuar a divulgar a importância da doença e a sua prevenção aos proprietários durante as consultas e sensibilizar para a necessidade de realizar o diagnóstico da doença.

As limitações sentidas na realização deste estudo foram a impossibilidade de incluir na metodologia a técnica de Knott que através da coloração com azul-de-metileno que permite a distinção entre *D. immitis* e *Acanthocheilonema reconditum*. Deste modo, apenas foi incluída como metodologia o protocolo praticado no Hospital Veterinário de Portimão, podendo deste modo serem considerados animais positivos a microfilarémia que estão parasitados com *A. reconditum*. Outra limitação crucial foi por tratar-se de uma amostra de conveniência, o que limita o rigor estatístico e impossibilita algumas afirmações gerais estatísticas. Deste modo, impossibilita a extrapolação dos resultados para a população canina no Algarve.

Apesar das limitações existentes, este estudo é importante e um alerta para o Hospital Veterinário de Portimão, sendo o único Hospital Veterinário no Barlavento Algarvio, trata-se de um Hospital importante para esta região do Algarve, deste modo tem um papel fundamental na comunicação com os proprietários desta região quanto à importância da profilaxia da Dirofilariose, quer através da desparasitação interna, como externa. Assim sendo este estudo de prevalência permite alertar para o trabalho que ainda há a fazer com os proprietários da região.

7 Conclusão

O Algarve é uma região que apresenta as condições propícias para o desenvolvimento dos vetores da dirofilariose, pelo seu clima temperado mediterrâneo, com verões longos e quentes, invernos amenos e curtos, precipitação concentrada no Outono e no Inverno, reduzido número anual de dias com precipitação e elevado número de horas de sol por ano. A temperatura média anual do litoral do sotavento e da região central do Algarve é mais elevada de Portugal Continental e uma das mais elevadas da Península Ibérica, rondando os 18 °C, toda a região algarvia possui um clima temperado mediterrânico.

O turismo é a principal atividade económica da região algarvia, graças ao clima apelativo e à melhoria das condições de vida das populações que registam um crescimento constante.

A maioria dos turistas que vistam esta região vem de outras partes de Portugal, Reino Unido, Espanha, Alemanha, Holanda e Irlanda, assim como uma forte presença de franceses e escandinavos. Estes visitantes frequentemente trazem consigo animais de estimação principalmente cães, tornando o risco de introdução de novos animais portadores da dirofilariose ainda maior..

Este estudo que decorreu em um centro médico veterinário de referência, o Hospital Veterinário de Portimão, demonstrou que a dirofilariose é uma doença que não deve ser menosprezada e o médico veterinário apresenta um papel fundamental na sensibilização dos proprietários para o diagnóstico, tratamento e prevenção, evitando assim o aumento do número de casos de muitos animais.

Neste estudo observou-se a prevalência de 15,6% de cães infetados oriundos de sete concelhos algarvios. Quanto aos fatores de riscos, foi observada a maior prevalência em cães que vivam no exterior das habitações e cães de porte médio a grande.

Futuros estudos são necessários para se avaliar a prevalência da dirofilariose no Algarve e se conhecer mais profundamente a real situação epidemiológica de cada concelho individualmente. Em suma, o presente trabalho indicou que a população de cães nesta região do Algarve se encontra em risco considerável de ser parasitada por *D. immitis*, e que devido à importância desta doença quer para a saúde animal como para a saúde humana, é importante

que o diagnóstico seja realizado como procedimento de rotina nos centros de atendimento médico veterinários mesmo em animais assintomáticos e que não estejam sujeitos à profilaxia.

8 Referências Bibliográficas

- AHS (2014) *Orientações atuais para Prevenção, Diagnóstico e Controle da Dirofilariose (Dirofilaria immitis) em cães*. American Heartworm Society. Acedido a 15 de Outubro de 2017 em: https://www.heartwormsociety.org/images/documents/2014_AHS_Canine_Guidelines.Portuguese.Pesquis%C3%A1vel.pdf
- Alho, A.; Meireles, J.; Belo, S.; Carvalho, L. (2014a). *Dirofilariose Canina e Felina, uma Parasitose em Evolução (I) – Etiologia, Biologia e Epidemiologia*. Acedido a 19 de Outubro de 2017 em: https://www.researchgate.net/publication/270898480_Dirofilariose_canina_e_felina_uma_parasitose_em_evolucao_I_-_Etiologia_Biologia_e_Epidemiologia
- Alho, A.; Meireles, J.; Belo, S.; Madeira de Carvalho, L. (2014b). *Dirofilariose Canina e Felina, uma Parasitose em Evolução (II) – Fisiopatologia, Diagnóstico e Terapêutica*. Acedido a 8 de Novembro de 2017 em: <https://www.researchgate.net/publication/270898504>
- Alho, A.; Landum, M.; Ferreira, C.; Meireles, J.; Gonçalves, L.; Madeira de Carvalho, L.; Belo, S. (2014c). *Prevalence and seasonal variations of canine dirofilariosis in Portugal*. *Veterinary Parasitology* 206 (2014) 99–105
- Alho, A.; Belo, S.; Meireles, J.; Cardoso, L.; Deplazes, P.; Madeira de Carvalho, L. (2016). *Detection of Dirofilaria spp. and Angiostrongylus vasorum in canids from Portugal*. Poster para a Conferência “Vector-borne Diseases 2016”. Acedido a 7 de Novembro de 2017 em: https://www.researchgate.net/publication/309429809_Detection_of_Dirofilaria_spp_and_Angiostrongylus_vasorum_in_canids_from_Portugal
- Alonso, J.; Gómez, E. (2015). *Dirofilariose: Uma zoonose emergente* [Brochura]. Campifarma, Elanco.
- Araujo, A. M. (1996). *Canine and Human Dirofilaria immitis Infections in Portugal. A Review*. *Parassitologia* 38 (N 1-2), 366 (Abstracts)

- Bazan, C. T.; Monteiro, M. E.; Bissoli, E. G. (2009). *Fisiopatologia da insuficiência Cardíaca em Cães*. Revista Científica Eletrónica d Medicina Veterinária – ISSN: 1679-7353 (Ano VII, Número 12, Janeiro de 2009 – Periódicos Semestral)
- Brochura Dirofilariose (Fevereiro, 2013). [Brochura] MSD Animal Health, Scalibor
- Campillo, M.; Vazquez, F.; Fernandez, A.; Acedo, M.; Rodriguez, S.; Lopez-Cozar, I., et al. (1999). *Parasitologia Veterinaria*. (1ª edição, pp. 113 - 114, 679 – 689). Aravaca: McGraw-Hill-Interamericana de Espanha, S. A.U.
- CMLagoa (2016). *Património do Concelho de Lagoa*. Acedido a 9 de Fevereiro de 2018 em: <https://www.cm-lagoa.pt/index.php/pt/5-maravilhas/parque-municipal-do-sitio-das-fontes>
- Diosdado, A.; Simón, F.; Morchón, R.; Montoya-Alonso, A.; Carretón, E.; González-Miguel, J. (2016). *Estatus actual de la distribución de la dirofilariosis animal y humana en España y Portugal*. Acedido a 2 de Novembro de 2017 em <http://argos.portalveterinaria.com/noticia/12408/articulos/estatus-actual-de-la-distribucion-de-la-dirofilariosis-animal-y-humana-en-espana-y-portugal.html>
- Ettinger, S.; Feldman, E. (2010). *Textbook of Veterinary Internal Medicine – Diseases of the dog and cat*. (7ª Edição, Volume II, Capítulo 254). Missouri: Saunders Elsevier
- Ferreira, C.A., de Pinho Mixão, V., Novo, M.T., Calado, M.M., Gonçalves, L.A., Belo, S.M. & de Almeida, A.P. (2015). First molecular identification of mosquito vectors of *Dirofilaria immitis* in continental Portugal. *Parasites & Vectors*, 8, 139.
- Liu, C.; Yang, N.; He, J.; Yang, M.; Sun, M. (2013). *Prevalence of Dirofilaria immitis in Dogs in Shenyang, Northeastern China*. *Korean J Parasitol* Vol. 51, No. 3: 375-377
- Maia, C.; Altet, L.; Serrano, L.; Cristóvão, J. M.; Tabar, M. D.; Francino, O. et al. (2016). *Molecular detection of Leishmania infantum, filariae and Wolbachia spp. in dogs from southern Portugal*. *Parasites & vectors* 9(1): 170.
- McCall, J.; Genchi, C.; Kramer, L.; Guerrero, J.; Venco, L. (2008). *Heartworm disease in animals and humans - Advances in Parasitology* 66 (1ª Edição, pp. 199 – 207). Elsevier

- Meireles, J.; Paulos, F.; Serrão, I. (2014). *Dirofilariose Canina e Felina*. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias: RCPV (2014) 109 (591-592) 70-78
- Montoya, J. A.; Morales, M.; Ferrer, O.; Molina, J. M.; Corbera, J. A. (1998). *The prevalence of Dirofilaria immitis in Gran Canaria, Canary Islands, Spain (1994-1996)*. Veterinary parasitology. 75:221-6.
- Nelson, R.; Couto, C. (2010). *Medicina Interna de Pequenos Animais* (Tradução da 4ª edição, pp. 169). Rio de Janeiro: Elsevier
- Romero, H. (1984) *Parasitologia*. (1ª edição, pp. 620 – 625). Balderas: Editorial Limusa, S.A.
- Slater, M. R. (2003). *Veterinary Epidemiology – Practical Veterinarian*. St. Louis: Elsevier Science, 2003. THURFIELD, M.
- Otranto, D.; Dantas-Torres, F.; Brianti, E.; Traversa, D.; Petric, D.; Genchi, C.; Capelli, G. (2013). *Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe*. Parasites & Vectors 6(1):16. Acedido a 14 de Dezembro de 2017 em: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-16>
- PNMF (2018). *Portal Nacional dos Municípios e Freguesias*. Acedido a 22 de Janeiro de 2018 em <http://www.municipiosefreguesias.pt/>
- Silva, R.; Langoni, H. (2008). *Dirofilariose. Zoonose emergente negligenciada*. Ciência Rural, Santa Maria. Acedido a 4 de Agosto de 2016 em <http://www.scielo.br/pdf/cr/2009nahead/a168cr554.pdf>
- Simón, F.; Siles-Lucas, M.; Morchón, R.; González-Miguel, J.; Mellado, I.; Carretón, E. et al. (2012). *Human and Animal Dirofilariasis: the Emergence of a Zoonotic Mosaic*. Acedido a 27 de Outubro de 2017 em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3416488/>
- UranoVet (2014). *Uranotest Dirofilaria Folheto*. Acedido a 26 de Janeiro de 2018 em: <http://uranovet.com/wp/wp-content/uploads/2014/10/folleto-dirofilaria.pdf>
- Urquhart, G.; Armour, J.; Duncan, J.; Dunn, A.; Jennings, F. (1996). *Parasitologia Veterinária* (2ª edição, pp. 5, 75, 77 – 79). Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.

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

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

9 Apêndice I

Hospital Veterinário de Portimão

Prevalência da *Dirofilaria immitis*

DADOS DO PACIENTE

Nome do animal: _____ Nº de Ficha: _____

1. Sexo: ☐ Macho ☐ Fêmea

2. Estado Fértil: ☐ Castrado ☐ Inteiro

3. Idade (>1 ano): _____

4. Pelagem: _____; Raça: _____; Peso: _____ kg;

5. Tipo de Habitat: ☐ Indoor ☐ Misto ☐ Outdoor

6. Hábitos de viagem (passeios) ☐ Sim ☐ Não

Se respondeu sim, onde? _____

7. Co- habitantes: Não/ Sim; Quais? _____

DADOS DO PROPRIETÁRIO

Nome do Proprietário: _____

Local de Residência: _____

CONSULTA

1. Motivo da consulta: _____

2. Desparasitação externa: ☐ Sim ☐ Não

Se respondeu sim, qual? _____

3. Desparasitação interna: ☐ Sim ☐ Não

Se sim, qual? _____

4. Vacinação: _____

5. Sinais Clínicos: _____

6. História clínica relevante: _____

7. Exames complementares: _____

AMOSTRA DE SANGUE

Data da colheita: __/__/____ Nº de amostra: _____;

Resultado do teste: Positivo / Negativo

Microfilarémia: Positivo / Negativo

10 Anexo

10.1 Anexo I

Uranotest Dirofilaria



uranovet
www.uranovet.com

Especificaciones:

Finalidad: Detección de antígeno de *Dirofilaria immitis*
 Muestra: Sangre entera, suero, plasma
 Sensibilidad: 94,4 % versus necropsia
 Especificidad: 100 % versus necropsia
 Tiempo de realización: 30 segundos
 Tiempo de lectura: 5 - 10 minutos
 Presentación: Cajas individuales de 1 test/ cajas de 5 tests
 No necesita reactivos
 Tubos con EDTA para la recogida de sangre incluidos
 N° registro: 1645 RD

Características:

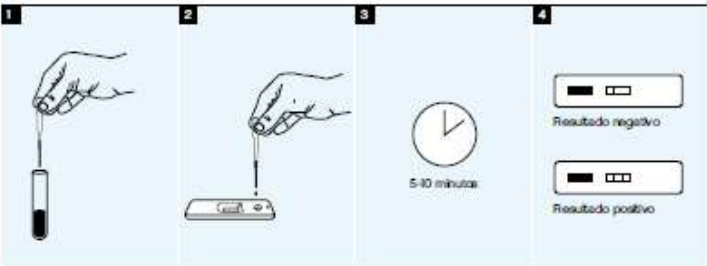
Innovadora técnica de un solo paso:
 2 gotas de muestra son suficientes.
 Sin necesidad de añadir reactivos.
 Ahorro de tiempo, menos errores.

Cassette transparente que facilita la visualización de la técnica.

Detecta parásitos macho y hembra.

Detecta infestaciones con una carga a partir de tan solo 1 parásito adulto de cualquier tipo (machos, hembras adultas, hembras inmaduras, hembras no propagadas).

Técnica:



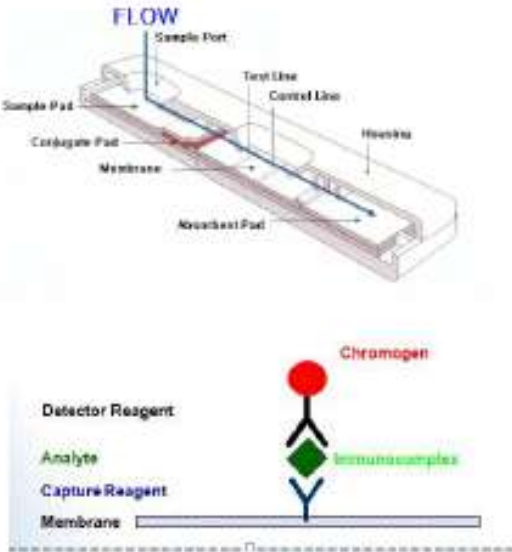
Estudio de sensibilidad y especificidad de Uranotest Dirofilaria frente a adultos hembras y machos y formas juveniles:

Resultados necropsia

	Estado de la infestación	Muestras	Parásitos/perro	Nº muestras positivas testadas con Uranotest Dirofilaria
Negativo		102	0	0
Positivo	Solo formas juveniles	7	1 a 6	4
	Solo gusanos adultos machos	4	1 a 3	4
	Solo gusanos adultos hembras	8	1 a 2	7
	Adultos y formas juveniles machos	6	1-2 gusanos adultos	6
	Adultos y formas juveniles machos	11	Más de 2 gusanos adultos	11
	Adultos y formas juveniles hembras	8	1-2 gusanos adultos	8
	Adultos y formas juveniles hembras	6	Más de 2 gusanos adultos	6
	Adultos y formas juveniles de ambos sexos	12	1-2 gusanos adultos	12
	Adultos y formas juveniles de ambos sexos	10	Más de 2 gusanos adultos	10

Sensibilidad del 94,4 % (68/72) y especificidad del 100 % (102/102)

10.2 Anexo II

Principles and description of the test	Chromatographic immunoassay for the qualitative detection of antigen of <i>Dirofilaria immitis</i>. The selected <i>Dirofilaria immitis</i> antibodies are used in the test band as both capture and detector materials. This enables URANOTEST DIROFILARIA Ag Test Kit to identify <i>Dirofilaria immitis</i> antigen in whole blood, serum or plasma with a high degree of accuracy.  The diagram illustrates the test strip components and the flow of the assay. The top part shows a 3D view of the test strip with labels: Sample Port, Sample Pad, Conjugate Pad, Membrane, Test Line, Control Line, Absorbent Pad, and Housing. A blue arrow indicates the 'FLOW' direction from left to right. The bottom part is a detailed view of the immunoreaction on the membrane, showing a 'Detector Reagent' (red dot) binding to an 'Analyte' (green diamond), which is then captured by a 'Capture Reagent' (blue Y-shape) on the 'Membrane'.
Kind of antigen detected	It detects 14 KDa antigen of <i>D. immitis</i>. The 14 KDa Ag is a common antigen of circulating microfilaria and adult female and male worm.
Sensitivity*	94 % versus necropsy results

Specificity*	100 % versus necropsy results				
Detection limit					
		Infestation status	Samples	Number of worms/dog	Positive results with URANOTEST
	Negative		102	0	0
	Positive	Only juvenile forms	7	1-6	4
		Only male adults worms	4	1-3	4
		Only female adults worms	8	1-2	7
		Adult and juvenile male worms	6	1-2 adult worms	6
		Adult and juvenile male worms	11	> 2 adult worms	11
		Adult and juvenile female worms	8	1-2 adult worms	8
		Adult and juvenile female worms	6	>2 adult worms	6
		Adult and juvenile worms of both sexes	12	1-2 adult worms	12
		Adult and juvenile worms of both sexes	10	>2 adult worms	10
Validation of sensitivity and specificity	*Internal evaluation				
	*Official validation by Central Animal Health Laboratory of Santa Fé-Granada- Spain (Ministerio de Agricultura Medio Rural y Marino)				

Cross reactions	The following pathogens have been tested to evaluate possible cross reactions: <table><tr><th>Pathogens</th><th>Titre</th><th>Results</th></tr><tr><td>Canine Parvo virus</td><td>10 ^{4.0} TCID ₅₀/ml</td><td>Negative</td></tr><tr><td>Canine Distemper virus</td><td>10 ^{4.0} TCID ₅₀/ml</td><td>Negative</td></tr><tr><td>Canine Parainfluenza virus</td><td>10 ^{6.0} TCID ₅₀/ml</td><td>Negative</td></tr><tr><td>Infectious Canine Hepatitis virus</td><td>10 ^{5.0} TCID ₅₀/ml</td><td>Negative</td></tr><tr><td>Porcine Parvovirus</td><td>1,024 HAU</td><td>Negative</td></tr><tr><td><i>Leptospira icterohaemorrhage</i></td><td>OD 1.0 at 560nm</td><td>Negative</td></tr><tr><td><i>E. coli</i> spp</td><td>10 ^{8.0} CFU/ml</td><td>Negative</td></tr><tr><td><i>Salmonella</i> spp.</td><td>10 ^{8.0} CFU/ml</td><td>Negative</td></tr><tr><td><i>Ascaris</i> homogenate</td><td>10% homogenates in PBS</td><td>Negative</td></tr></table> No cross reaction has been detected with <i>Dipetalonema reconditum</i>	Pathogens	Titre	Results	Canine Parvo virus	10 ^{4.0} TCID ₅₀ /ml	Negative	Canine Distemper virus	10 ^{4.0} TCID ₅₀ /ml	Negative	Canine Parainfluenza virus	10 ^{6.0} TCID ₅₀ /ml	Negative	Infectious Canine Hepatitis virus	10 ^{5.0} TCID ₅₀ /ml	Negative	Porcine Parvovirus	1,024 HAU	Negative	<i>Leptospira icterohaemorrhage</i>	OD 1.0 at 560nm	Negative	<i>E. coli</i> spp	10 ^{8.0} CFU/ml	Negative	<i>Salmonella</i> spp.	10 ^{8.0} CFU/ml	Negative	<i>Ascaris</i> homogenate	10% homogenates in PBS	Negative
Pathogens	Titre	Results																													
Canine Parvo virus	10 ^{4.0} TCID ₅₀ /ml	Negative																													
Canine Distemper virus	10 ^{4.0} TCID ₅₀ /ml	Negative																													
Canine Parainfluenza virus	10 ^{6.0} TCID ₅₀ /ml	Negative																													
Infectious Canine Hepatitis virus	10 ^{5.0} TCID ₅₀ /ml	Negative																													
Porcine Parvovirus	1,024 HAU	Negative																													
<i>Leptospira icterohaemorrhage</i>	OD 1.0 at 560nm	Negative																													
<i>E. coli</i> spp	10 ^{8.0} CFU/ml	Negative																													
<i>Salmonella</i> spp.	10 ^{8.0} CFU/ml	Negative																													
<i>Ascaris</i> homogenate	10% homogenates in PBS	Negative																													
Number of Registration (Spain)	1645 RD																														