João David Molarinho Marques

Estudo epidemiológico e dos fatores de risco da infeção por *Dirofilaria* spp. em cães no concelho de Leiria

Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa

Faculdade de Medicina Veterinária

Orientadora: Professora Doutora Ana Maria Munhoz

Lisboa

2023

João David Molarinho Marques

Estudo epidemiológico e dos fatores de risco da infeção por *Dirofilaria* spp. em cães no concelho de Leiria

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 – Centro Universitário de Lisboa, no dia 24 de Fevereiro de 2023, perante o júri, com despacho de nomeação Nº 139/2023 de 27 de Janeiro de 2023, com a seguinte composição:

Presidente: Professora Doutora Mariana Batista, por delegação da professora Doutora Laurentina Pedroso;

Arguente: Professor Doutor Eduardo Marcelino;

Orientadora: Professora Doutora Ana Maria Munhoz

Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2023

Agradecimentos

Gostaria de agradecer o auxílio que me foi prestado durante a realização da minha tese, cujo contributo foi essencial para a sua conclusão:

À minha Orientadora Professora Dr.ª Ana Maria Araújo Munhoz, pela fundamental ajuda na escolha do tema, auxílio prestado na colheita de amostras, por todo o apoio durante a tese e por me ter cultivado paixão pelo mundo da parasitologia.

A todo os professores da FMV-ULHT por todo o conhecimento que me transmitiram durante a minha vida académica, em especial, ao professor Eduardo Marcelino e à professora Sónia Catarina Ramos pela ajuda fundamental na colheita de amostras para a execução do meu estudo.

A toda a equipa da Clínica Veterinária Dr. Marques Vieira; Dr.ª Ana Marques Vieira, Enfª Andreia Gorjão, Dr. Afonso Moura, Dr. António Marques Vieira, Enfª Filipa Beato, Enfª Sofia Pires, Dr.ª Telma Almeida e Dr.ª Vanessa Grosso. Um especial agradecimento à minha orientadora externa, Dr.ª Liliana Fernandes Marques Vieira, pela sua total disponibilidade para me ensinar durante o meu período de estágio curricular.

À equipa do Hospital Veterinário do Arco do Cego pela excelente oportunidade que me proporcionarem em me integrarem na equipa e por todo o apoio. Um especial agradecimento à minha orientadora externa Drª Sheila Teodoro.

A nível familiar, quero agradecer aos meus avós por desde pequeno servirem de inspiração para as minhas ambições profissionais, aos meus pais e às minhas tias Lucília e Teresa por me proporcionarem todas as ferramentas que hoje tenho para encarar qualquer adversidade, à minha irmã e ao David pelo exemplo brilhante académico e pessoal que desde sempre me deram e por último, gostaria de agradecer aos meus "irmãos" de quatro patas, pois foi neles que encontrei a motivação para ultrapassar os momentos mais difíceis do curso.

A nível pessoal, quero agradecer especialmente à minha melhor amiga, Clara, pois sem ela a conclusão desta fase seria impossível e agradecer também às pessoas que me acompanharam na minha vida académica e pessoal durante este período, Ana Carolina, Carolina, Francisco, Inês, Pedro e Rita.

Para terminar, também quero agradecer à Pardal, a pessoa que aturou todo o desespero e stress que veio de mãos dadas com a escrita da tese. Sem o seu apoio ainda estaria à procura de microfilárias "aberrantemente posicionadas".

Resumo

A dirofilariose afeta maioritariamente cães mas também gatos, sendo esta causada por nematodes, dos quais *Dirofilaria immitis* e *Dirofilaria repens* são os mais importantes devido à sua alta patogenicidade e o seu potencial impacto negativo sobre a saúde pública visto apresentarem carácter zoonótico. Esta doença tem uma distribuição geográfica cosmopolita, marcada pelo alastramento de novos casos registados em regiões previamente consideradas como não endémicas. A *Dirofilaria immitis* é endémica em Portugal sendo o território nacional categorizado com condições favoráveis para o desenvolvimento dos vetores e consequente propagação da doença.

Pretendeu-se, com este estudo, determinar a prevalência de dirofilariose no concelho de Leiria e avaliar o estado de conhecimento sobre a doença em Portugal.

Para tal, entre Julho de 2022 e Dezembro de 2022, foram colhidas 92 amostras de sangue de cães no concelho de Leiria, em ambiente hospitalar ou de clínica e de canil. Posteriormente, todas as amostras foram submetidas a testes de diagnóstico, nomeadamente teste modificado de Knott e DFV® Test Dirofilaria – Heartworm para determinação da prevalência no distrito. Adicionalmente foram realizados 700 inquéritos *online* a tutores de cães a nível nacional.

A prevalência de *Dirofilaria immitis* em cães no concelho de Leiria é de 2,17%. Relativamente ao inquérito realizado a nível nacional, foi possível determinar um maior conhecimento da doença em regiões mais a sul do país, indo em concordância com a maior prevalência da doença previamente registada.

Com base nos resultados obtidos neste estudo, é possível afirmar que embora não possamos catalogar o concelho de Leiria como livre de dirofilariose, também não está correto caracterizar esta região como endémica. Juntamente com a informação colhida através dos inquéritos, foi possível determinar a importância do médico veterinário na comunicação e divulgação de informação sobre a dirofilariose, tornando-o assim no pilar principal para a sua prevenção.

Palavras-chave: *Dirofilaria immitis*, dirofilariose, cão, prevalência, Leiria.

Abstract

Dirofilariosis affects mainly dogs but also cats. This disease is caused by a nematode, from which *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* are the most important due to their high pathogenicity and its negative impact in public health because of their zoonotic nature. This disease has a cosmopolitan geographic distribution, marked by the spread of new cases registered in regions previously considered non-endemic. *Dirofilaria immitis* is endemic in Portugal and the national territory is categorized with favorable conditions for the development of vectors and consequent spread of the disease.

The aim of this study was to determine the prevalence of heartworm disease in the county of Leiria and to assess the state of knowledge about the disease in Portugal.

To this end, between July 2022 and December 2022, 92 blood samples were collected from dogs in the county of Leiria, in a hospital, clinic and kennel environment. Subsequently, all samples were submitted to diagnostic tests, namely the modified Knott test and DFV® Test Dirofilaria – Heartworm to determine the prevalence in the county. Additionally, 700 online surveys were carried out to dog owners nationwide.

The prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs in the municipality of Leiria is 2.17%. With regard to the survey carried out at national level, it was possible to determine greater knowledge of the disease in the southern regions of the country, in line with the higher prevalence of the previously recorded disease.

Based on the results obtained in this study, it is possible to state that although we cannot catalogue Leiria as heartworm free, it´s also not correct to characterize this region as endemic. Together with the information collected from the surveys, it was possible to determine the importance of the veterinarian in the communication and dissemination of information about heartworm disease, thus making him the main pillar for its prevention.

Keywords: *Dirofilaria immitis,* heartworm, dog, prevalence, Leiria.

Lista de abreviaturas e símbolos

% – Percentagem

® – Marca registada

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AHS – American Heartworm Society

BID – Duas vezes ao dia, do latim *bis in die*

CAPC – Companion Animal Parasite Council

CID – Coagulação intravascular disseminada

Cm – Centímetros

Cm – Centímetros

cTnI – Troponina cardíaca I

DPI – Dias após infeção, do inglés *days post infection*

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EOD – Dia sim, dia não, do inglês *every other day*

ESCCAP – European Scientific Counsel Companion Animal Parasites

ESDA – European Society of Dirofilariosis and Angiostringylosis

Et al. – E outros, do latim *et alli*

ET-1 – Endotelina-1

HARD – Doença respiratória associada à dirofilariose

HI – Hospedeiro intermediário

ICT – Imunocromatografia

ICT – Imunocromatografia

IGE – Imunoglobulina E

L1 – Estádio larvar L1

L2 – Estádio larvar L2

L3 – Estádio larvar L3

L4 – Estádio larvar L4

L5 – Estádio larvar L5

mg/kg – Miligramas/quilogramas

MLs – lactonas macrocíclicas

mm – milímetros

NT-proBNP – N-terminal do pro-péptido natriurético tipo B

ºC – Graus Celsius

PCR – Polymerase Chain Reaction

SID – uma vez por dia, do latim *semel in die*

SNPs – Polimorfismo de nucleotídeo simples

spp. – Espécie

SVC – Síndrome da veia cava

µm – micrómetro

Índice geral

Agradecimentos 3
Resumo 4
Abstract 5
Lista de abreviaturas e símbolos 6
Casuística do estágio curricular 13
1. Introdução 16
1.1. Etiologia 16
1.1.1. Ciclo de vida 17
1.1.1.1 Papel da *Wolbachia* 19
1.1.2. Morfologia de *D. immitis* 20
1.1.3. Morfologia de *D. repens* 21
1.2. Epidemiologia 22
1.2.1. Distribuição 22
1.2.1.1. Distribuição em Portugal 24
1.2.2. Sazonalidade 25
1.2.3. Fatores de risco 26
1.2.3.1. Clima e alterações climáticas 26
1.2.3.2. Presença de vetores 27
1.2.3.3. Animais reservatório 27
1.2.3.4. Movimentação de animais 27
1.2.3.5. Urbanização 27
1.2.3.6. Idade 28
1.2.3.7. Ciclo circadiano 28
1.3. Fisiopatologia 29
1.3.1. Fisiopatologia no cão 29
1.3.1.1. Dano renal 30
1.3.1.2. Síndrome da veia cava 30
1.3.1.3. Pneumonia alérgica 31
1.3.1.4. Alterações noutros órgãos 31
1.3.2. Fisiopatologia no gato 31
1.4. Sinais clínicos de dirofilariose 32
1.4.1. Sinais clínicos da infeção por *D. immitis* no cão 32

1.4.2. Sinais clínicos da infeção por *D. immitis* no gato 33
1.4.3. Sinais clínicos da infeção por *D. immitis* em humanos 33
1.4.4. Sinais clínicos da infeção por *D. repens* no cão 34
1.4.5. Sinais clínicos da infeção por *D. repens* no gato 34
1.4.6. Sinais clínicos da infeção por *D. repens* em humanos 35
1.5. Diagnóstico da dirofilariose em cães 35
1.5.1. Deteção de microfilárias 35
1.5.2. Diagnóstico imunológico 37
1.5.3. Diagnóstico molecular 37
1.5.4. Análises clínicas 37
1.5.5. Diagnóstico imagiológico 38
1.5.6. Biomarcadores 39
1.6. Tratamentos e profilaxia 40
1.6.1. Tratamento adulticida 40
1.6.1.1. Abordagem farmacológica 40
1.6.1.1.1. Combinação de lactonas macrocíclicas (MLs) e doxiciclina 40
1.6.1.1.2. Dicloridrato de melarsomina 41
1.6.1.1.3. Tratamento de suporte 41
1.6.1.1.4. Retestagem 41
1.6.1.2. Abordagem cirúrgica 41
1.6.2. Profilaxia 42
1.6.3. Particularidades sobre o tratamento 44
1.7. Monitorização 45
1.7.1. Monitorização de prevalências 45
1.7.2. Controlo dos vetores 45
1.8. Objetivos do estudo 46
2. Material e métodos 46
2.1. Caracterização das amostras 47
2.1.1. Diagnóstico 47
2.1.1.1. Colheita e processamento das amostras 47
2.1.1.2. Técnicas de diagnóstico 48
2.1.1.2.1. Teste de Imunocromatografia 48
2.1.1.2.2. Teste modificado de Knott 48
2.1.1.3. Interpretação dos resultados do DFV® test Dirofilaria e do teste modificado de Knott 49

2.2. Inquéritos *online* aos tutores de cães 49
2.3. Análise estatística descritiva 50
3. Resultados 50
3.1. Diagnóstico da dirofilariose canina no concelho de Leiria 50
3.2. Inquérito aos tutores participantes da amostra de Leiria 51
3.3. Inquérito *online* 52
3.3.1. Género, idade, raça e estado reprodutivo 52
3.3.2. Distribuição geográfica e movimentação dos animais 53
3.3.3. Tipo de habitação e caracterização do passeio diário 54
3.3.4. Tratamentos profiláticos de desparasitação 55
3.3.5. Conhecimento dos tutores sobre a dirofilariose 56
3.3.6. Realização de prevenção e teste para a deteção da dirofilariose 58
4. Discussão 59
4.1. Diagnóstico da dirofilariose e inquérito aos tutores de cães do concelho de Leiria 59
4.2. Inquérito *online* 61
5. Conclusão 63
6. Referências bibliográficas 65
7. Anexos e apêndices 73

Índice de Figuras

Figura 1 - Ciclo de vida de *D. immitis* ……..……..18
Figura 2 - Ciclo de vida de *Dirofilaria repens* …….19
Figura 3 - Imagem de formas adultas de *Dirofilaria immitis* no coração de um cão……....20
Figura 4 - Imagem de formas adultas de *Dirofilaria immitis* removidas de um coração de cão ……...20
Figura 5 - Extremidade anterior de *Dirofilaria immitis* visível no método de Knott……21
Figura 6 - Extremidade posterior de *Dirofilaria immitis* visível no método de Knott……..21
Figura 7 - Extremidade cefálica de *Dirofilaria repens* visível no método de Knott…….22
Figura 8 - Extremidade posterior de *Dirofilaria repens* visível no método de Knott……22
Figura 9 - Presença e distribuição de *Dirofilaria immitis* e *Dirofilaria repens* no mundo……23
Figura 10 - Ecocardiografia paraesternal direita de eixo longo…….39

Figura 11 - Microfilária (compatível com *Dirofilaria immitis*) presente no teste modificado de Knott……..50

Figura 12 – Distribuição da origem dos questionários de cães pelo território nacional ……...53

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Distribuição de horas pelas diferentes áreas rotacionais……..13

Gráfico 2 - Discriminação percentual de casos observados em âmbito de consulta…….14

Gráfico 3 - Distribuição de casuística clínica por espécie de animal no estágio curricular do Arco do Cego……14

Gráfico 4 - Distribuição de casuística clínica por espécie de animal no estágio curricular na Clínica Dr. Marques Vieira……14

Gráfico 5 - Distribuição da casuística cirúrgica por especialidade……15

Gráfico 6 - Representação percentual do género da população de cães a nível nacional……..52

Gráfico 7 - Representação do estado reprodutivo da população de cães a nível nacional…….52

Gráfico 8 - Distribuição da população de cães consoante a categoria de idade…….53

Gráfico 9 - Distribuição da população de cães consoante raça……..53

Gráfico 10 - Distribuição percentual de tipo de habitação pelas diferentes regiões……..55

Gráfico 11 - Frequência de desparasitação dos cães……..……56

Gráfico 12 - Distribuição percentual de tutores de cães com e sem conhecimento sobre dirofilariose……...57

Gráfico 13 - Representação da origem do conhecimento da doença…….57

Gráfico 14 - Conhecimento sobre a dirofilariose por região ……57

Gráfico 15 - Representação percentual de proprietários que realizam tratamentos preventivos específicos contra a dirofilariose por região ……..58

Gráfico 16 - Representação percentual de proprietários que realizam testes de diagnóstico específicos para deteção da dirofilariose por região …….58

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Prevalências descritas por região em Portugal……..24

Tabela 2 - Caraterísticas morfológicas de microfilárias em circulação sanguínea…….36

Tabela 3 - Lista de produtos aprovados na Europa para uso na prevenção ou tratamento contra infeções de *Dirofilaria* spp…….....44

Tabela 4 - Interpretação dos resultados de ICT e teste modificado de Knott.……49

Tabela 5 - Caracterização dos animais do estudo……..…….51

Casuística do estágio curricular

O curso de Mestrado integrado em Medicina veterinária tem a sua conclusão com a execução de um estágio curricular de componente prática, bem como a realização de uma dissertação e a sua respetiva defesa pública.

O estágio curricular do autor foi desenvolvido em dois locais distintos. Primeiramente no Hospital Veterinário Arco do Cego entre o dia 13 de Setembro de 2021 e 20 de Dezembro de 2021, com uma carga horária total de 560 horas. De seguida o autor prosseguiu o estágio curricular na Clinica Veterinária de Cascais, Dr. Marques Vieira, Lda. entre o dia 3 de Janeiro e 14 de Março de 2022, com uma carga horária total de 630 horas. Desempenhou atividades na prática clínica e no acompanhamento dos serviços de Internamento, Cirurgia e Consultas. No Gráfico 1, encontra-se discriminado as horas relativas às diferentes áreas rotacionais durante o período do estágio, perfazendo um total de 1210 horas.

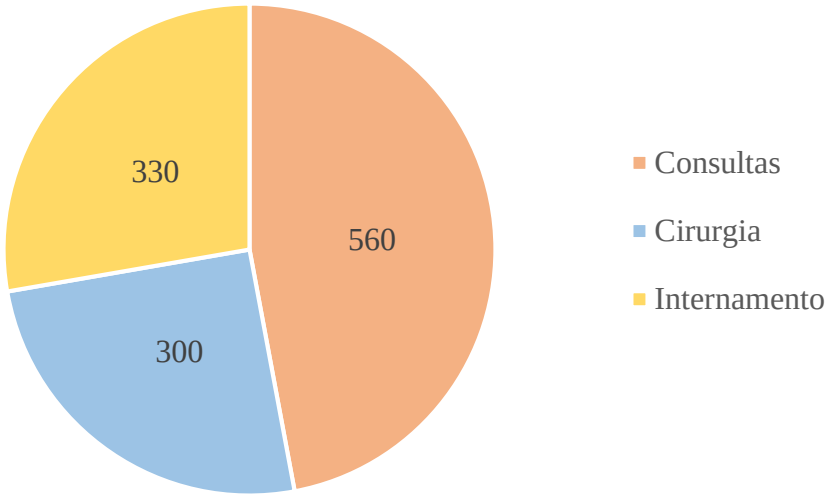


Gráfico 1 – Distribuição de horas pelas diferentes áreas rotacionais.

Relativamente às atividades no âmbito de consultas em ambos locais foi permitido ao autor observar as consultas onde foi possível a apreensão da história pregressa e execução do exame físico sob o supervisionamento do médico veterinário responsável e posterior discussão sobre possíveis diagnósticos diferencias, exames complementares sugeridos e terapêutica a instituir segundo o diagnóstico final. Foi também possível a preparação e administração de vacinas em consultas de carácter profilático. No Gráfico 2 encontra-se discriminados em termos percentuais o número de casos observados no âmbito de consulta.

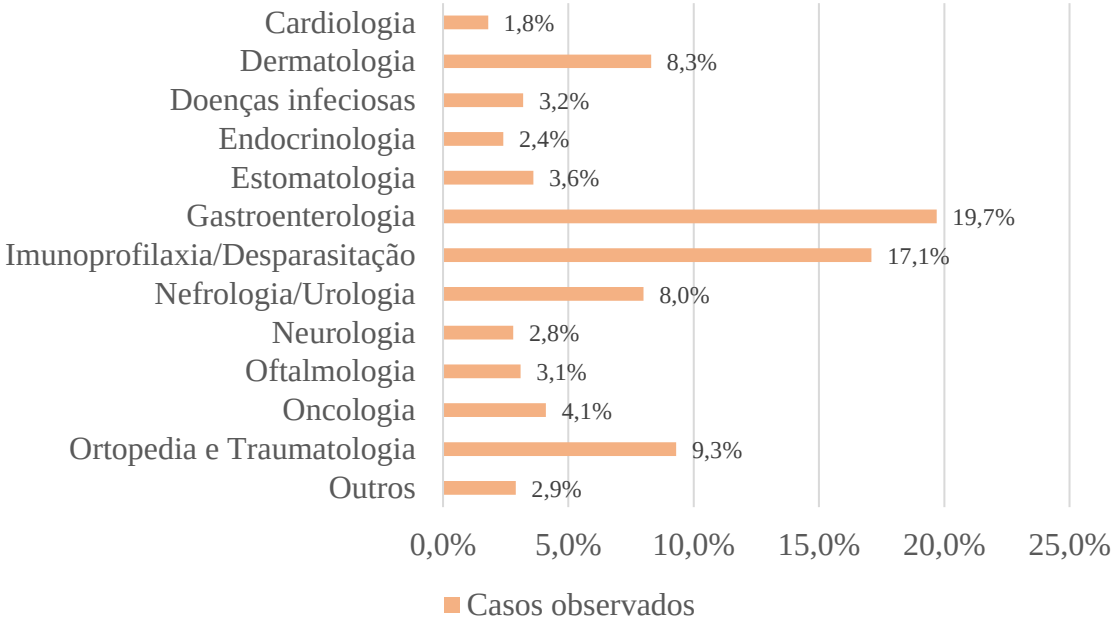


Gráfico 2 – Discriminação percentual de casos observados em âmbito de consulta.

Nos Gráficos 3 e 4 é possível observar a casuística clínica por espécie apresentadas nas consultas em ambos locais de estágio, sendo que os valores podem não ser representativos, visto o mesmo animal poderia voltar à consulta para reavaliação.

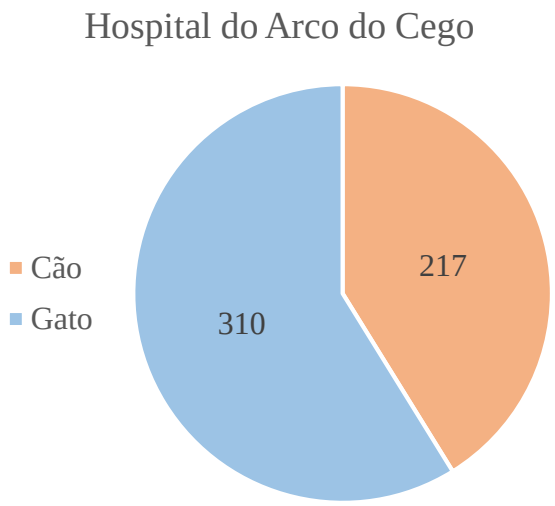


Gráfico 3 – Distribuição de casuística clínica por espécie de animal no estágio curricular do Arco do Cego.

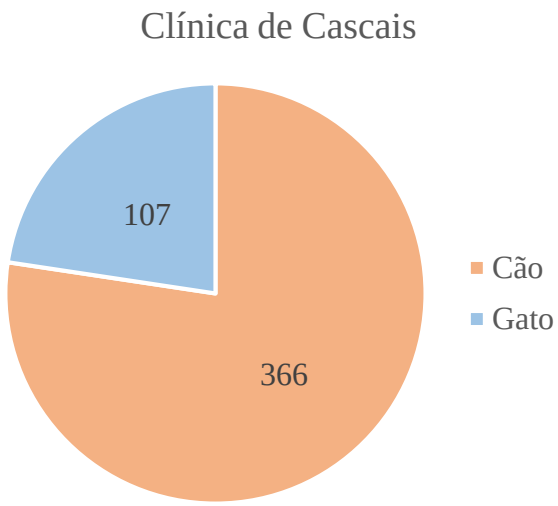


Gráfico 4 – Distribuição de casuística clínica por espécie de animal no estágio curricular na Clínica Dr. Marques Vieira.

No serviço de internamento foi possível ter a oportunidade de acompanhar os casos clínicos através de realização de exames complementares, diagnóstico, realização de um plano terapêutico e prognóstico. Também foi possível realizar o maneio dos pacientes internados,

através de exame físico, preparação da alimentação, limpeza, preparação de medicação e administração da mesma, assim como a realização de procedimento de eutanásia. Durante o tempo passado no internamento, o autor teve a oportunidade de ajudar na realização de atividades tais como contenção de pacientes para realização de atos médicos, colocação de catetéres endovenosos, recolha de sangue para posterior análise hematológica, bioquímica sanguínea, medição de glicémia, assim como o envio de amostras para laboratórios externos (para pesquisa de determinados agentes patogénicos ou parâmetros hematológicos), medição de pressão arterial, algaliação de animais para recolha de urina e lavagens vesicais e realização de testes rápidos de diagnóstico (como por exemplo: testes rápidos de FIV e Felv).

Durante o serviço de cirurgia, o autor teve a oportunidade de assistir e quando possível ajudar na preparação do paciente para cirurgia como colocação de cateter, pré-medicação, tricotomia, entubação endotraqueal e assepsia cirúrgica, preparação da sala (limpeza, e preparação do material cirúrgico para a cirurgia) e auxílio da cirurgia e manutenção anestésica do animal. No Gráfico 4, encontra-se discriminada a casuística cirúrgica, desde cirurgia ortopédica, dentisteria e cirurgia de tecidos moles onde estão incluídas as esterilizações e castrações.

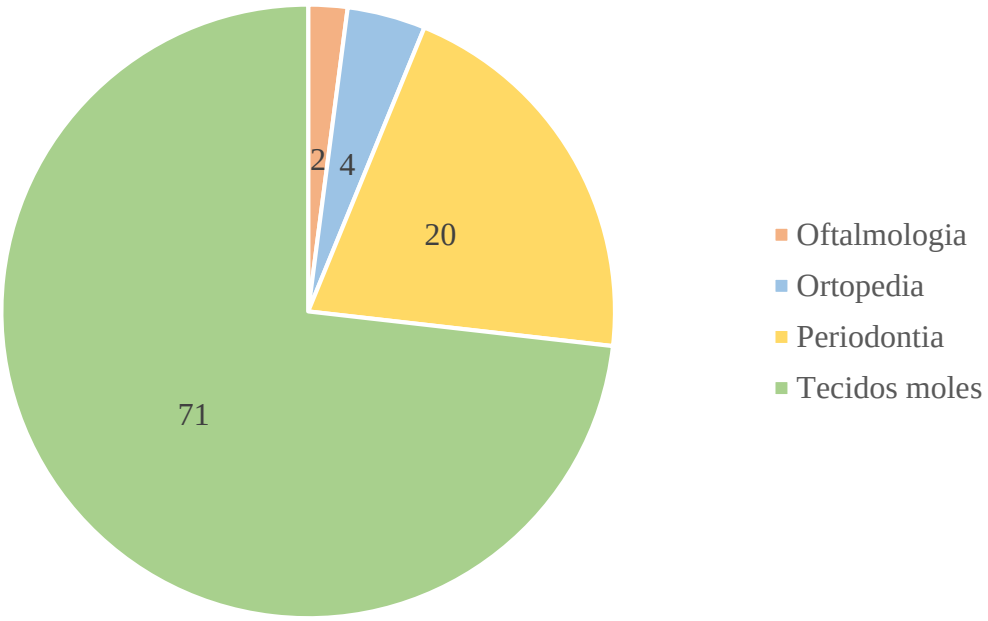


Gráfico 5 – Distribuição da casuística cirúrgica por especialidade.

1. Introdução

A dirofilariose é uma das doenças parasitárias mais estudada, sendo considerada de extrema importância não só devido à sua evolução emergente em muitas zonas do mundo como também pelo seu carácter zoonótico. Esta doença afeta maioritariamente cães, mas também pode acometer outros hospedeiros mamíferos, nomeadamente gatos, furões e humanos. É causada pelo nematode do género *Dirofilaria* sendo que existem duas espécies com maior relevância, *Dirofilaria immitis* e *Dirofilaria repens*.

A infeção por *D. immitis* provoca sinais clínicos cardiorrespiratórias, que podem culminar em falha cardíaca e consequente morte provocada pelas lesões exercidas nas artérias pulmonares e nas câmaras cardíacas direitas provocadas pelas formas adultas do parasita (Silva & Langoni, 2009). Já *D. repens* induz sinais dermatológicos e formação de nódulos subcutâneos devido ao alojamento da fase adulta no tecido subcutâneo do hospedeiro (Traversa, Di Cesare, & Conboy, 2010).

A distribuição geográfica da dirofilariose é considerada cosmopolita, com casos registados por todo o mundo (Silva & Langoni, 2009), tendo sido recentemente identificado um alastramento de áreas endémicas para regiões não endémicas, como do sul de Europa para o norte, respetivamente, sendo este fenómeno maioritariamente atribuído ao aquecimento global (Noack, Harrington, Carithers, Kaminsky & Selzer, 2021).

Dirofilaria immitis é considerada endémica em Portugal (Alho *et al*., 2014 a; Vieira *et al*., 2015), sendo o território nacional categorizado com condições favoráveis para o desenvolvimento dos vetores e consequente propagação da doença (Vieira et al., 2015).

Embora a presença desta parasitose em Portugal seja indiscutível, a informação sobre a sua prevalência em certas regiões e os fatores de risco ainda são escassos.

1.1. Etiologia

Pertencentes ao filo Nematoda, tanto *D. immitis* como *D. repens* pertencem à superfamília *Filarioidea*, vulgarmente conhecidas como filárias. Na superfamília *Filarioidea* são agrupadas três famílias, sendo uma delas *Onchoccercidae*, que se subdivide na subfamília *Dirofilarinae* e sequencialmente ao género *Dirofilaria* que engloba as espécies *D. immitis* e *D. repens,* sendo estas duas espécies responsáveis pela dirofilariose em carnívoros. Em ambas as espécies o principal hospedeiro definitivo é o cão podendo, por vezes, infetar outros animais

suscetíveis como o gato, o furão, o humano entre outros mamíferos. Como a maioria das filárias possuem um ciclo de vida heteroxeno, necessitam de artrópodes hematófagos como hospedeiros intermediários para completar o seu ciclo de vida (Silva & Langoni, 2009; Meireles, Paulos & Serrão, 2014; Noack *et al*, 2021). A dirofilariose pode ser transmitida por uma série de mosquitos vetores Culicídeos (*Anopheles*, *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Culex*, *Culiseta* e *Coquillettidia*, entre outros) (Morchón, Carretón, González-Miguel & Mellado-Hernández, 2012; Carretón *et al*., 2017; Dumitrache *et al*., 2021).

1.1.1. Ciclo de vida

O ciclo de vida do nematode *Dirofilaria* compreende 5 estádios de desenvolvimento sendo que três dos quais ocorrem no hospedeiro intermediário (HI) e os dois restantes num hospedeiro definitivo. O primeiro estádio larvar (L1) começa com a libertação de microfilárias pelas fêmeas adultas presentes no hospedeiro definitivo. Estas larvas são libertadas para a circulação sanguínea, sendo posteriormente ingeridas por um mosquito vetor durante a sua alimentação (Silva & Langoni, 2009; Simón *et al*., 2012). As microfilárias podem permanecer no hospedeiro definitivo até 2 anos e os parasitas adultos podem ter uma longevidade de cerca de 7 anos (Venco, Genchi & Simón, 2011). Uma vez infetado, a microfilária muda do primeiro estádio larvar (L1) para o segundo (L2) ao chegar aos túbulos de Malpighi nos 8 a 10 dias pós-infeção (dpi) e posteriormente muda para o terceiro estádio larvar (L3) aproximadamente 3 dpi ainda antes de migrar para o proboscis do vetor. As L3 de seguida serão inoculadas no hospedeiro definitivo durante a próxima alimentação deste vetor. Cerca de dez a doze microfilárias podem ser transmitidas por um só mosquito.

O desenvolvimento das microfilárias até ao estádio infetante L3 está diretamente dependente de fatores climáticos. A temperatura de 27ºC e humidade relativa de 80% podem ser favoráveis ao desenvolvimento em cerca de 10-14 dias (Slocombe, 1990).

As larvas L3 da espécie *D. immitis* inoculadas através da picada na pele do hospedeiro pelo vetor migram e maturam durante vários meses até alcançarem as artérias pulmonares e o ventrículo direito do coração (Figura 1). O período pré-patente varia entre 4 e 8 meses. A larva infetante L3 desenvolve-se 3 a 4 meses após a inoculação, evolui para o quarto estádio larvar (L4) nos vasos sanguíneos, entre 3 e 12 dpi, ocorrendo uma última muda para o quinto estádio larvar (L5) ou fase pré-adulta entre 50 e 70 dpi. As L5 chegam às artérias pulmonares e artérias lobares, e, em caso de alta carga parasitária também podem ser encontradas no ventrículo direito

20 dias após a última muda, aproximadamente 70 dias após a inoculação, onde se tornam sexualmente maduras em cerca de 120 dias. A maturação das formas adultas no gato estende-se até 8 meses após a infeção, produzindo formas mais curtas relativamente ao cão e com uma expetativa de vida inferior a 2 anos, sendo que geralmente não produzem microfilárias (Silva & Langoni, 2009; Simón *et al*., 2012; Alho, Meireles, Belo & Carvalho, 2014 b; European Scientific Counsel Companion Animal Parasites [ESCCAP], 2019; Noack *et al*., 2021).

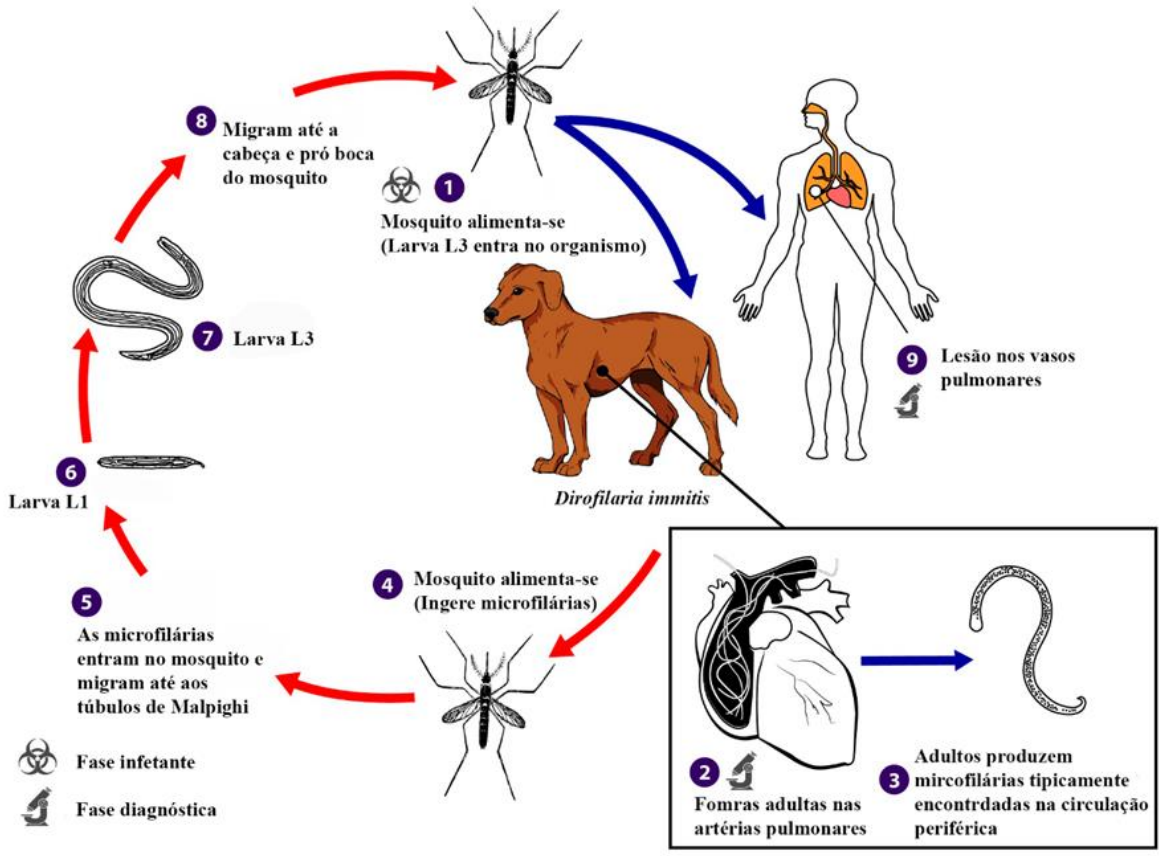


Figura 1 – Ciclo de vida de *D. immitis* (Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Dirofilariasis. Retirado a 16 de Julho 2022 de: CDC - DPDx - Dirofilariasis)

O ciclo de vida de *D. repens* é semelhante ao de *D. immitis* exceto a localização dos parasitas adultos. Estes podem ser observados no tecido subcutâneo do hospedeiro definitivo, embora também possam ser encontrados na cavidade abdominal e nas conexões das fáscias musculares (Figura 2) (Traversa *et al*., 2010; Simón *et al*., 2012; Capelli *et al*., 2018).O seu período pré-patente é de aproximadamente 6 a 9 meses (Capelli *et al*., 2018; Pupić-Bakrač *et al*., 2021). As formas adultas podem viver até um máximo de 10 anos, sendo que a média varia

entre 2 a 4 anos, e as fêmeas têm a capacidade de produzir microfilárias durante toda a sua vida (Genchi & Kramer, 2017; Capelli *et al*., 2018).

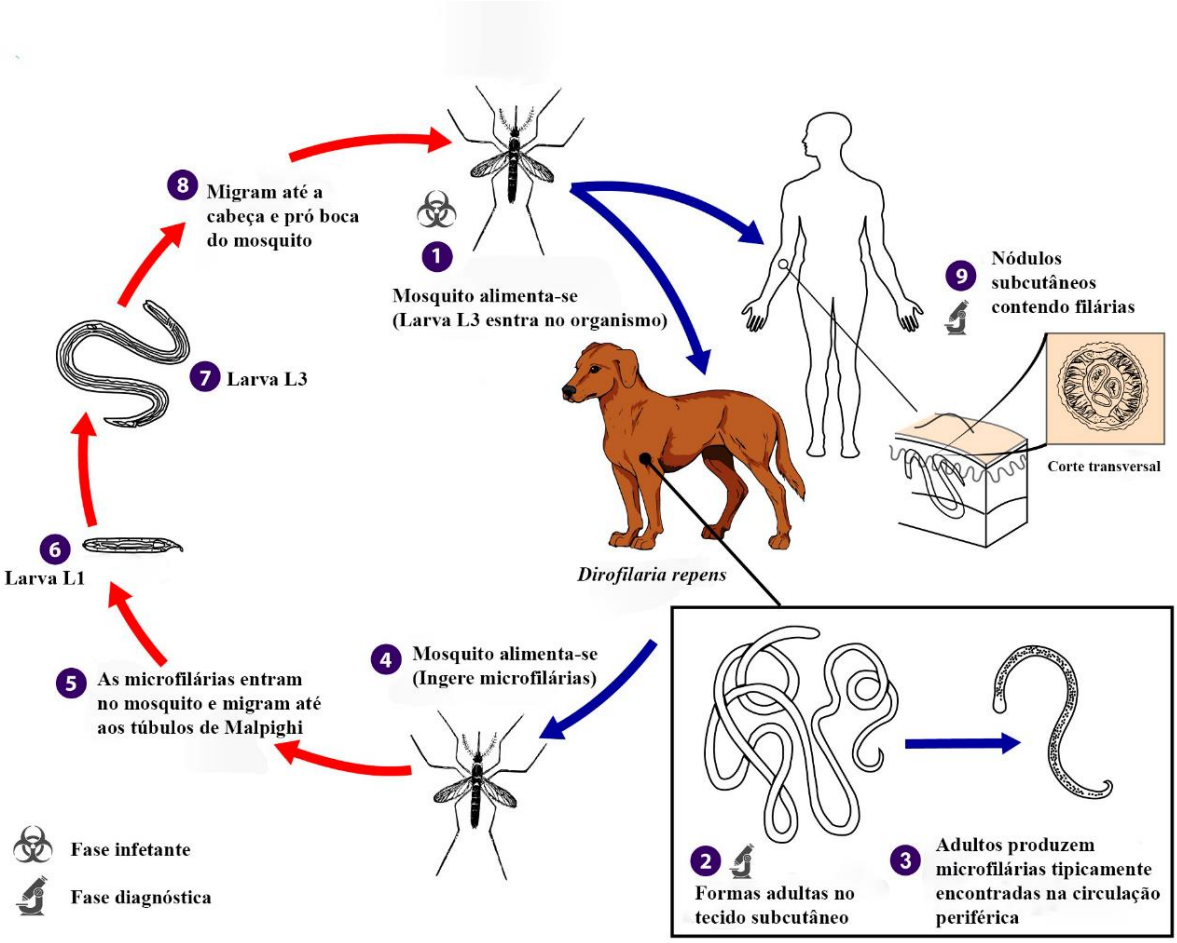


Figura 2 – Ciclo de vida de *Dirofilaria repens* (Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Dirofilariasis. Retirado a 16 de Julho 2022 de: CDC - DPDx - Dirofilariasis)

1.1.1.1 Papel da *Wolbachia*

A maioria das espécies de filarídeos abriga e depende de endossimbiontes bacterianos, como é o caso de *D. immitis* e *D. repens* que dependem da bactéria gram-negativa *Wolbachia* para embriogénese, desenvolvimento e sobrevivência, contribuindo em contrapartida com aminoácidos para o crescimento bacteriano (Simón *et al*., 2012; ESCCAP, 2019; Carretón *et al*., 2020; Noack *et al*, 2021).

Estudos sobre o genoma de *Wolbachia* mostram que esta codifica genes em falta no genoma de *D. immitis*, como a biossíntese de heme (precursor da hemoglobina), riboflavina, purinas, pirimidinas e folatos (Noack *et al*, 2021). Estas contribuições metabólicas essenciais de *Wolbachia* no desenvolvimento, fertilidade e sobrevivência do parasita, tornam-na num alvo

para os fármacos com intuito de controlar as filarias nos portadores de dirofilariose (European Scientific Counsel Companion Animal Parasites [ESCCAP], 2019; Carretón *et al*., 2020; Noack *et al*, 2021).

1.1.2. Morfologia de *D. immitis*

As formas adultas têm uma aparência filiforme sendo que, os machos podem medir entre 12 a 20 cm de comprimento e 0,7 a 0,9 mm de diâmetro e as fêmeas adultas podem medir entre 25 a 31 cm de comprimento e 1 a 1,3 mm de diâmetro (Figura 3 e 4) (Silva & Langoni, 2009; Simón *et al*., 2012; ESCCAP, 2019; Noack *et al*., 2021).

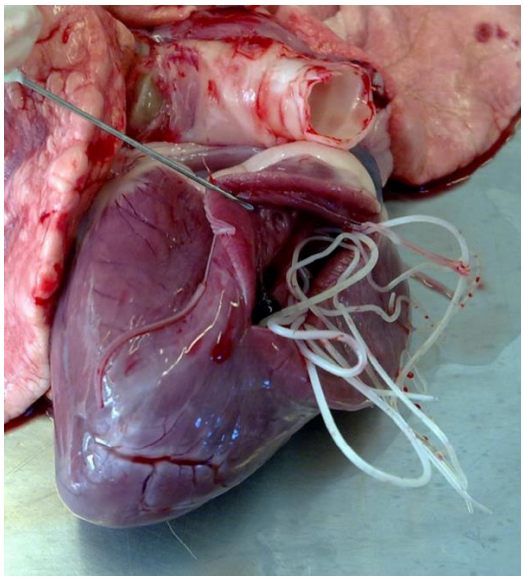


Figura 3 – Imagem de formas adultas de *Dirofilaria immitis* no coração de um cão (Simón *et al*., 2012).



Figura 4 – Imagem de formas adultas de *Dirofilaria immitis* removidas de um coração de cão (fêmeas à esquerda e machos à direita) (European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis [ESDA], 2017 b).

As fêmeas são ovovivíparas, das quais são libertadas as microfilárias que circulam na corrente sanguínea, estas medem 250 a 330 µm de comprimento e 5 a 7,3 µm de diâmetro e apresentam uma extremidade cefálica fusiforme (Figura 5) e uma cauda reta (Figura 6) (Silva & Langoni, 2009; Simón *et al*., 2012; Noack *et al*., 2021).



Figura 5 – Extremidade anterior de *Dirofilaria immitis* visível no método de Knott (Traversa *et al*., 2010).

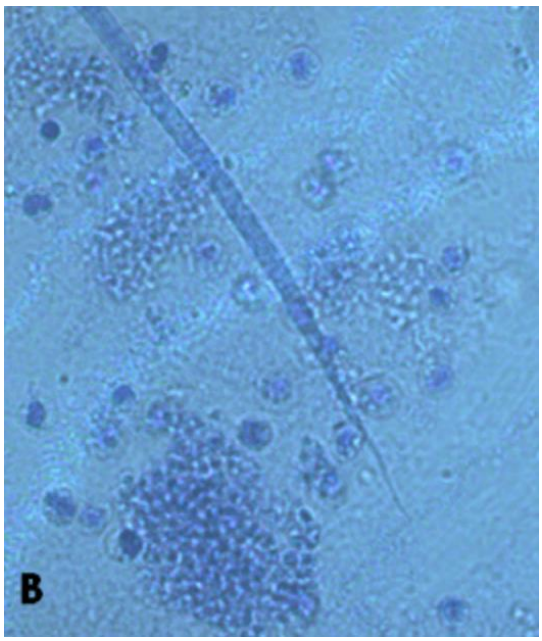


Figura 6 – Extremidade posterior de *Dirofilaria immitis* visível no método de Knott (Traversa *et al*., 2010).

1.1.3. Morfologia de *D. repens*

As formas adultas têm dimensões inferiores comparativamente com *D. immitis*. As formas adultas dos machos podem medir entre 50 a 70 mm de comprimento e 3,7 a 4,5 mm de diâmetro, e as fêmeas podem medir entre 100 a 170 mm de comprimento e 4,6 a 6,3 mm de diâmetro. (Simón *et al*., 2012; ESCCAP, 2019.).

As microfilárias de *D. repens* também circulam na corrente sanguínea, medindo entre 350 a 385 μm de comprimento e 7 a 8 μm de diâmetro, apresentando uma extremidade cefálica arredondada (Figura 7) e uma cauda curva (Figura 8) (Simón *et al*., 2012).



Figura 7 – Extremidade cefálica de *Dirofilaria repens* visível no método de Knott (Traversa *et al*., 2010).



Figura 8 – Extremidade posterior de *Dirofilaria repens* visível no método de Knott (Traversa *et al*., 2010).

1.2. Epidemiologia

A ocorrência de dirofilariose está intimamente ligada à presença de mosquitos (como *Aedes* spp., *Anopheles* spp., *Culex* spp.) que servem como vetores, das condições climáticas favoráveis e ainda ao trânsito recentemente identificado de animais infetados entre regiões indenes e endémicas/epidémicas (Silva & Langoni, 2009; Montoya-Alonso *et al*., 2020 a; Dumitrache *et al*., 2021).

1.2.1. Distribuição

A dirofilariose tem uma distribuição geográfica cosmopolita, com casos registados por todo o mundo (Silva & Langoni, 2009; Anvari *et al*., 2020). A presença de infeções por *Dirofilaria immits* em gatos e cães está amplamente identificada em regiões tropicais e temperadas, já as infeções por *Dirofilaria repens* estão restringidas a África e Eurásia (Figura 9) (Noack *et al*., 2021).

Tem-se observado uma diminuição da incidência de dirofilariose em regiões tradicionalmente endémicas, como é o caso de Portugal, em contrapartida tem-se observado uma propagação desta incidência para as regiões anteriormente não endémicas, como os países de Europa central, leste e norte (Morchón, Carretón, González-Migue & Mellado-Hernández,

2012; Vieira *et al*., 2015; Fuehrer *et al*., 2016; Dumitrache *et al*., 2021; Noack *et al*., 2021; Sonnberger, Fuehrer, Sonnberger & Leschnik, 2021). Esta tendência relativamente à distribuição deve-se à maior consciencialização da doença nas regiões tradicionalmente endémicas e consequentemente à maior utilização de medidas preventivas, bem como uma redução da população de mosquitos devido aos fenómenos de urbanização, industrialização e uso de inseticidas. Relativamente às regiões não endémicas, este aumento deve-se às alterações climáticas que levaram a uma disseminação dos vetores para estas regiões, nomeadamente do mosquitos-tigre-asiático (*Aedes albopictus*), à falta de experiência e conhecimento tanto dos médicos veterinários como dos tutores, da movimentação de animais de regiões endémicas para não endémicas e também do grande número de hospedeiros que servem de reservatório para a doença, como o caso do chacal dourado (*Canis aureus*) ou também de cães errantes (Anvari *et al*., 2020; Montoya-Alonso *et al*., 2020 a; Dumitrache *et al*., 2021; Noack *et al*., 2021; Sonnberger *et al*., 2021).

De acordo com Anvari *et al*., (2020) a prevalência mundial estimada de *D. immitis* em cães é de 10,91%, sendo esta definida pela presença de cães infetados com formas adultas capazes de produzir microfilárias. Segundo este mesmo estudo a prevalência de *D. immitis* em cães na Austrália é de 22,68%, na Ásia de 12,07%, nas América de 11,60%, na Europa de 10,45% e em África de 7,57%.

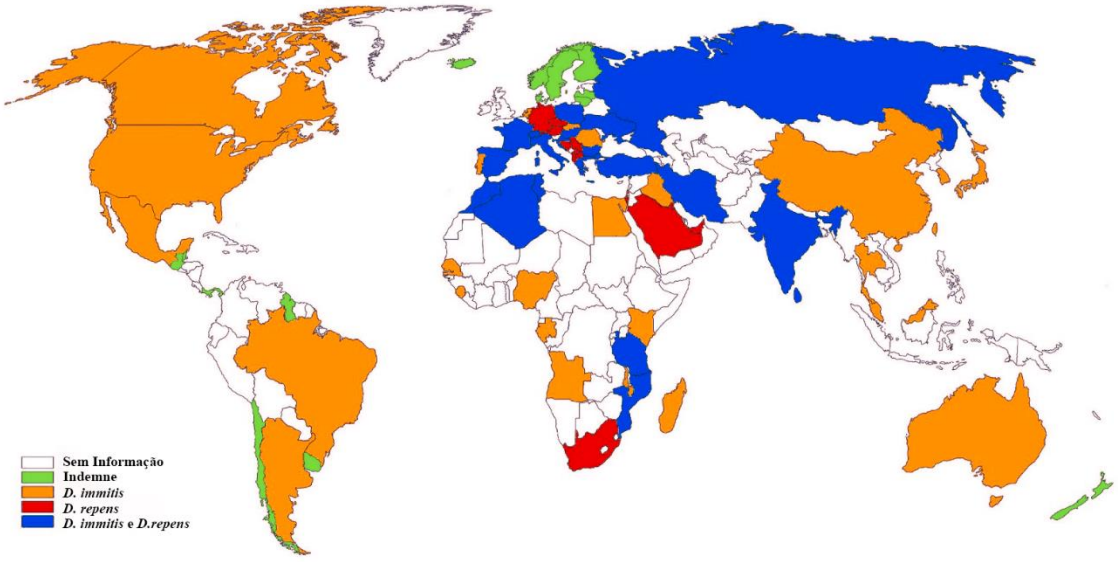


Figura 9 – Presença e distribuição de *Dirofilaria immitis* e *Dirofilaria repens* no mundo (adaptado de Noack *et al*., 2021).

1.2.1.1. Distribuição em Portugal

Dirofilaria immitis é endémica em Portugal de acordo com estudos desenvolvidos por diversos autores nacionais (Alho *et al*., 2014a; Vieira *et al*., 2015). Quanto ao clima em Portugal continental, segundo a classificação climática de Köppen-Geiger, é do tipo temperado continental (tipo C) com alguns subtipos Cs, caracterizados por temperaturas quentes e por verões secos, indicando assim condições favoráveis para o desenvolvimento dos vetores e consequentemente da transmissão da doença (Vieira *et al*., 2015; Fontes-Sousa *et al*., 2019).

Os valores de prevalências de dirofilariose canina nas regiões norte e centro do país, reportadas nos estudos realizados por Cardoso, Medão, Madeira de Carvalho (2012) e Vieira e colaboradores (2015) foram de 8,8% e 6,8% em Coimbra e Aveiro respetivamente, e valores entre 2,1 e 2,9% em Viana do Castelo. De acordo com Alho e colaboradores (2014a), as prevalências mais elevadas no território central português foram de 24,8% em Setúbal, 13,8% em Coimbra e 13,2% em Santarém. Em outro estudo realizado por Vieira e colaboradores (2015) as prevalências do território Sul foram de 16,7% no Ribatejo, 16,5% no Alentejo e 12% no Algarve e por último, de acordo com Araújo (1996), a prevalência em cães na ilha da Madeira foi de 30% (Tabela 1).

Tabela 1 – Prevalências descritas por região em Portugal.

Norte	Viana do Castelo	2,1% - 2,9%	Cardoso *et al*., 2012; Vieira *et al*., 2015
Centro	Aveiro	6,8%	Vieira *et al*., 2015
	Setúbal	24,8%	Alho *et al*., 2014
	Coimbra	8,8 - 13,8%	Alho *et al*., 2014; Vieira *et al*., 2015
	Santarém	13,2%	Alho *et al*., 2014
Sul	Ribatejo	16,7%	Vieira *et al*., 2015
	Alentejo	16,5%	Vieira *et al*., 2015
	Algarve	12,0%	Vieira *et al*., 2015
Ilha da Madeira		30,0%	Araújo, 1996

As regiões com maior prevalência da doença em Portugal são as regiões mais a sul, sendo que este fenómeno pode ser atribuído a fatores bioclimáticos e ecológicos, uma vez que as temperaturas médias tendem a ser mais elevadas nas zonas meridionais, proporcionando condições mais favoráveis para a propagação de vetores (Alho *et al*., 2014).

A variação crescente da prevalência descrita de acordo com Alho *et al*., (2014), sugere que as infeções por *Dirofilaria* estão a aumentar em Portugal e, graças a um modelo de previsão, podemos determinar que existe um pico de transmissão no verão. Embora a temperatura seja um dos principais fatores que contribui para a transmissão, a precipitação, a humidade relativa, o índices de vegetação e densidade populacional (tanto de animais como de humanos) constituem também importantes fatores de transmissão. Um exemplo da influência destes fatores é a abundância de arrozais na região de Setúbal que contribuem para uma sobrevivência e desenvolvimento da fase larvar dos mosquitos (Alho *et al*., 2014).

Outro exemplo de um fator que influencia crescentemente a prevalência de dirofilariose em Portugal é a presença de animais reservatório, tendo sido identificada uma prevalência de dirofilariose em raposas-vermelhas (*Vulpes vulpes*) desde 3,23% em regiões do norte e centro, como Coimbra, até 11,8% em regiões de centro e sul, como Santarém ou Setúbal (Alho *et al*., 2014a). Adicionalmente, também foi reportado casos de dirofilariose em três lontras europeias (*Lutra lutra*) em território português (Morchón *et al*., 2012; Alho *et al*., 2014a).

1.2.2. Sazonalidade

A abundância e distribuição de dirofilariose está intimamente ligada à biologia e ecologia do vetor, onde o mosquito, em condições climáticas favoráveis, proporciona o desenvolvimento das microfilárias até o estádio L3 (Morchón *et al*., 2012; Noack *et al*, 2021). Mais de 60 espécies de mosquitos são capazes de suportar o desenvolvimento do estádio L3 de *D. immitis* (Noack *et al*, 2021; Worsley-Tonks, Gehrt, Anchor, Escobar & Craft, 2021). Tem sido demonstrado experimentalmente que o desenvolvimento da forma infetante, o estádio L3, requer 8-10 dias a 28-30˚C, 11-12 dias a 24˚C e 16-20 dias a 22˚C e embora o desenvolvimento cesse a temperaturas inferiores a 14ºC, este pode ser reiniciado quando a temperatura ambiente aumenta acima deste limite (Morchón *et al*., 2012).

As alterações climáticas ao longo do ano, nomeadamente alterações pluviais e de temperatura, podem desempenhar um papel fundamental na ocorrência da doença, pois interferem diretamente no ciclo biológico dos vetores, como *Culex quinquefasciatus*, *Aedes scapularis* e *Aedes taeniorhynchus*, podendo haver maior população destes vetores em meses específicos ao longo do ano (Silva & Langoni, 2009; Traversa *et al*., 2010; Morchón *et al*., 2012). O fator climático pode ser determinante e motivo pelo qual existem regiões com maior

frequência da doença ao longo do ano propiciada pelas condições climáticas favoráveis e potenciada pelo aquecimento global. Tem sido observado um prolongamento dos períodos anuais de atividade dos vetores, encurtando o tempo entre os estádios de desenvolvimento e aumentando a transmissão da doença para novas regiões (Silva & Langoni, 2009; Morchón *et al*., 2012).

Na Europa, de modo geral a atividade dos vetores está limitada ao período entre a primavera e o verão, embora este comportamento de procura de um hospedeiro para se alimentar seja diferente dependendo da espécie. Alguns vetores são ativos apenas durante a noite, como *Culex pipiens*, *Anopheles* spp., enquanto outros são ativos predominantemente ao amanhecer ou durante o dia, como *Anopheles maculipennis* ou *Aedes albopictus*, e algumas espécies apresentam dois picos de atividade: ao entardecer e ao amanhecer, como *Aedes Caspius* (Morchón *et al*., 2012).

1.2.3. Fatores de risco

A dirofilariose está ligada a um vasto número de fatores de risco desde fatores ambientais que influenciam o desenvolvimento dos vetores e do parasita nestes vetores. Não estão descritos fatores intrínsecos do hospedeiro definitivo que influencie de forma notória a recetividade a esta parasitose, porém são fatores ambientais que não só aumentam a ocorrência da doença como auxiliam na disseminação de regiões endémicas para regiões não endémicas.

1.2.3.1. Clima e alterações climáticas

O desenvolvimento e sobrevivência dos vetores da dirofilarose são maioritariamente influenciados pelas condições ambientais, nomeadamente da temperatura, humidade e disponibilidade de água, levando assim à categorização do clima como um dos maiores fatores de risco de dirofilariose (Traversa *et al*., 2010; Morchón *et al*., 2012 Montoya-Alonso *et al*., 2016; Anvari *et al*., 2020). Devido às alterações climáticas influenciadas pelo fenómeno de aquecimento global, as populações de vetores passaram a ter melhores condições para o seu desenvolvimento em determinadas regiões com um aumento na sua distribuição geográfica e devido às temperaturas adequadas que permitem uma ampliação da época de risco de transmissão da doença (Traversa *et al*., 2010; Morchón *et al*., 2012).

1.2.3.2. Presença de vetores

Outro fator fundamental é a presença de vetores competentes para o desenvolvimento do estádio L3, bem como a existência de vários fatores como humidade, vegetação, urbanização e condições climáticas favoráveis para o seu correto desenvolvimento (Morchón *et al*., 2012; Anvari *et al*., 2020; Noack *et al*., 2021). Para além disso, também é necessário ter em consideração a introdução de novos vetores competentes em novas regiões que desencadeiam uma competição entre diferentes espécies de mosquitos (Morchón *et al*., 2012; Noack *et al*., 2021). Um claro exemplo disto trata-se de *Aedes albopictus*, que se disseminou pela Europa, África e América, sendo esta espécie altamente adaptável, uma vez que o seu período de atividade é limitado ao verão em regiões temperadas, mas consegue sobreviver durante o inverno na sua fase de ovo (Traversa *et al*., 2010; Morchón *et al*., 2012; Worsley-Tonks *et al*., 2021).

1.2.3.3. Animais reservatório

Alguns animais podem ser reservatórios de dirofilariose, como é o caso das raposas e dos lobos na Europa. Este pode ser um fator importante a ser considerado quando se realizam estudos sobre outros fatores de risco para a manutenção e propagação da doença (Morchón *et al*., 2012).

1.2.3.4. Movimentação de animais

A presença e movimentação de animais reservatório, como o do aumento da movimentação de cães tanto relativamente a viagens com tutores como também do comércio de cães de regiões endémicas para regiões não endémicas, é um fator importante na manutenção da doença nas regiões endémicas e na propagação para novas regiões (Traversa *et al*., 2010; Morchón *et al*., 2012).

1.2.3.5. Urbanização

A expansão da construção e da atividade humana em novas áreas levou também a um aumento da presença de potenciais hospedeiros e proporcionou o desenvolvimento de um

ambiente favorável à proliferação de certas espécies de mosquitos que podem servir como vetores da dirofilariose (Montoya-Alonso *et al*., 2017; Worsley-Tonks *et al*., 2021).

O desenvolvimento de áreas residenciais em regiões não endémicas alterou a drenagem natural da água do território, resultando em novas fontes de água paradas, e, por consequência, num aumento da prevalência de dirofilariose nestes locais (Morchón *et al*., 2012; Montoya-Alonso *et al*., 2017; Worsley-Tonks *et al*., 2021). Para além disso, a expansão urbana levou à formação de "ilhas de calor" provocadas pela retenção de calor durante o dia exercida pelos edifícios e asfalto, o que potencializa a criação de microambientes que suportam o desenvolvimento de estádios larvares de vetores durante os meses mais frios, prolongando assim a sua sazonalidade de transmissão (Morchón *et al*., 2012; Montoya-Alonso *et al*., 2017; Worsley-Tonks *et al*., 2021).

1.2.3.6. Idade

A idade está identificada por muitos autores como de maior prevalência de dirofilariose em cães acima de 2 anos (Anvari *et al*., 2020; Dumitrache *et al*., 2021), devendo-se ao aumento da exposição aos vetores ao longo da vida do animal (Vieira *et al*., 2014). Assim, quanto mais tempo de exposição um animal tiver ao vetor, mais provável será de contrair a doença; desta forma, animais mais velhos têm uma maior prevalência de dirofilariose.

1.2.3.7. Ciclo circadiano

A presença de microfilárias em maior ou menor número na circulação, principalmente em capilares periféricos foi reportada por diversos autores que observaram uma significativa variação deste número em determinadas horas. Catcott (1979) observou um pico máximo nas últimas horas da tarde, enquanto Grieve e Lauria (1983) observaram que o maior pico ocorria entre as 12 e 16 horas. Em um estudo mais recente realizado por Ionică *et al*. (2017) na Roménia foram estudados 4 cães naturalmente infetados por *D. immitis* e *D. repens*, em que o sangue foi recolhido a cada 2 horas durante 2 dias. Neste estudo também se realizou a identificação e contagem das microfilárias. O pico de microfilaremia foi muito semelhante em todos os cães e o máximo número de microfilárias de *D. immitis* foi observado à 1 hora em todos os animais e o mínimo entre as 5 e 9 horas, indicando que a máxima microfilaremia ocorreu durante a noite.

1.3. Fisiopatologia

1.3.1. Fisiopatologia no cão

As lesões mais importantes da infeção por *D. immits* provocada no cão localizam-se nas artérias pulmonares e no parênquima pulmonar, por este motivo é caracterizada como uma doença cardiopulmonar, no entanto pode haver alterações noutros órgãos, nomeadamente nos rins. Em infeções com uma carga parasitária muito elevada, a localização de parasitas na veia cava caudal e veias hepáticas causa alterações importantes no fígado. A extensa patologia apresentada por esta doença é maioritariamente atribuída à presença de formas adultas e a presença de seus antigénios. Tanto as formas adultas como as microfilárias podem causar importantes alterações renais e glomerulonefrite induzida pela deposição de imunocomplexos desencadeados pelos antigénios de vermes adultos e de microfilárias (Paes-de-Almeida, Ferreira, Labarthe, Caldas & Mc-Call, 2003).

O animal infetado pode apresentar hipertensão pulmonar ou falha congestiva do coração direito. Para além destas patologias, a dirofilariose pode provocar síndrome da veia cava e falha hepática, pneumonia alérgica por dirofilariose oculta e complicações tromboembólicas, principalmente provocadas após tratamento adulticida (Simón *et al*., 2012).

A dirofilariose geralmente desenvolve-se numa progressão crónica, primeiro mostrando efeitos vasculares e pulmonares e, eventualmente, afetando as câmaras direitas do coração (Simón *et al*., 2012; Noack *et al*., 2021). As primeiras lesões ocorrem nas paredes das artérias pulmonares e são estas lesões primárias que dão origem ao aparecimento subsequente da patologia pulmonar e cardíaca (Simón *et al*., 2012; Meireles, Paulos & Serrão, 2014). Após a chegada dos parasitas às artérias pulmonares, ocorre espessamento das células endoteliais na túnica íntima vascular, resultando no estreitamento dos vasos, originando endarterite (Simón *et al*., 2012; Meireles, Paulos & Serrão, 2014). Adicionalmente, os espaços intercelulares aumentam, as células começam a sofrer deformações e a elasticidade das paredes arteriais altera-se (Simón *et al*., 2012). A superfície da artéria danificada permite a passagem de albumina, plasma e células sanguínea para o espaço perivascular, estimulando a proliferação de células musculares lisas na túnica média vascular, que migram para o lúmen e induzem a formação de vilosidades intravasculares, denominando-se este processo como endarterite pulmonar proliferativa (Simón *et al*., 2012). Neste processo as células semelhantes às endoteliais e fibras de colagénio também contribuem (Simón *et al*., 2012). A gravidade de proliferação de vilosidades está relacionada diretamente com o tempo de infeção, a carga

parasitária e a força da resposta imunitária do hospedeiro (Simón *et al*., 2012). A parede arterial torna-se áspera e acidentada, com redução tanto do lúmen como da elasticidade das artérias pulmonares (Simón *et al*., 2012). A doença pulmonar desenvolve-se após estas alterações vasculares serem observadas (Simón *et al*., 2012). Fluídos e proteínas passam através das paredes vasculares danificadas causando edema e inflamação do parênquima pulmonar (Simón *et al*., 2012; Meireles, Paulos & Serrão, 2014). As lesões vasculares podem levar à rutura dos vasos pulmonares devido a um aumento abrupto da carga cardíaca que associada ao esforço leva ao desenvolvimento de hemoptise ou hemorragia pulmonar grave (Simón *et al*., 2012; Meireles, Paulos & Serrão, 2014).

1.3.1.1. Dano renal

A patologia produzida por *D. immitis* também está relacionada à disfunção renal grave (Simón *et al*., 2012 Carretón *et al*., 2020). A glomerulonefrite membranosa tem sido descrita como resultado de alterações na membrana basal glomerular na dirofilariose, desencadeando o surgimento de proteinúria (Simón *et al*., 2012; Carretón *et al*., 2020). A glomerulonefrite está associada à deposição de imunocomplexos estimulados por antigénios de microfilárias, larvas e formas adultas na membrana basal, que provocam danos no endotélio glomerular. Histologicamente, a glomerulonefrite é caracterizada pela presença de células mesangiais, endoteliais e inflamatórias, depósitos na membrana glomerular basal, espessamento e vacuolização e expansão da matriz mesangial (Simón *et al*., 2012; Carretón *et al*., 2020). As lesões renais podem progredir para nefrose grave induzida por proteinúria com insuficiência renal e azotemia (Simón *et al*., 2012).

1.3.1.2. Síndrome da veia cava

Uma das consequências mais graves frequentemente observadas em cães de pequeno porte é a síndrome da veia cava (SVC) (Simón *et al*., 2012; ESCCAP, 2019). Esta síndrome ocorre devido ao deslocamento de um grande número de parasitas das artérias pulmonares para o ventrículo direito, onde interferem na função da válvula tricúspide, resultando no aumento da pressão no ventrículo direito e obstrução do lúmen da válvula e do sangue circulante, resultando assim em insuficiência da tricúspide (Simón *et al*., 2012; Noack *et al*., 2021). Estes fatores produzem sobrecargas volumétricas e de pressão no átrio direito e a veia cava caudal, com um significativo aumento da pressão venosa e dificuldade na circulação de retorno (Simón *et al*.,

2012). Esta situação leva muitas vezes à morte do animal devido a hemólise, hemoglobinúria e coagulação intravascular disseminada (CID) (Simón *et al*., 2012; Noack *et al*., 2021).

1.3.1.3. Pneumonia alérgica

Alguns cães com dirofilariose oculta apresentam pneumonia eosinofílica, que produz desconforto respiratório grave. Esta patologia é causada por uma reação inflamatória eosinofílica a antigénios das microfilariais, que leva à disfunção alveolar e prejudica a troca gasosa, resultando em hipoxémia, hipóxia e insuficiência respiratória grave (Simón *et al*., 2012).

1.3.1.4. Alterações noutros órgãos

Dirofilaria immitis pode provocar lesões noutros órgãos devido a localizações aberrantes, incluindo o cérebro, fígado, olhos e cavidade peritoneal (Simón *et al*., 2012). Muitos cães não manifestam sintomas por meses ou anos, dependendo das cargas parasitárias, reatividade individual e esforço animal. O dano arterial é significativamente superior em animais que exercem exercício vigoroso (Simón *et al*., 2012).

1.3.2. Fisiopatologia no gato

Nos gatos, a grande maioria das infeções é amicrofilarémica, caracterizada por baixa carga parasitária e apresentação geralmente assintomática ou de sinais clínicos inespecíficos, frequentemente de origem respiratória ou digestiva (Silva & Langoni, 2009; Morchón *et al*., 2012; Simón *et al*., 2012; Noack *et al*., 2021). Os sinais clínicos são evidentes quando as formas adultas chegam à vasculatura pulmonar, embora formas imaturas possam desencadear uma resposta inflamatória vascular e parenquimatosa provocada por macrófagos intravasculares nos leitos capilares do pulmão caracterizada por sinais clínicos como tosse, dispneia e vómito intermitente, mimetizando a asma felina (Simón *et al*., 2012; European Socienty of Dirofilariosis and Angiostrongylosis [ESDA], 2017 c; Noack *et al*., 2021). Quando isto sucede é designado como doença respiratória associada à dirofilariose (HARD) (Simón *et al*., 2012; ESDA, 2017 c; Noack *et al*., 2021). Histologicamente, o pulmão apresenta infiltração de eosinófilos no parênquima e na vasculatura pulmonar provocando bronquite (Simón *et al*., 2012). A morte de formas imaturas ou de adultos pode provocar extravasamento de plasma

pelos vasos e aumento da atividade dos macrófagos intravasculares provocando edema pulmonar (Simón *et al*., 2012). As endotoxinas dos parasitas mortos, citocinas e outros mediadores promovem em conjunto lesões das células alveolares tipo I, com subsequente hiperplasia de células alveolares tipo II, resultando em diminuição da função pulmonar, hipoxemia, dispneia e tosse, podendo ainda levar a doenças respiratórias crónicas em alguns gatos (Simón *et al*., 2012; ESDA, 2017 c). Esta reatividade bronquial é devida à atividade de macrófagos intravasculares pulmonares, só existente em gatos (Simón *et al*., 2012; ESDA, 2017 c).

A localização aberrante de formas larvares L4 é mais frequente em gatos que em cães, podendo ser encontradas formas nas cavidades do corpo e sistema nervoso, provocando sinais como ataxia, síncope, alterações vestibulares, cegueira e até morte súbita (Simón *et al*., 2012; ESDA, 2017 c; Pennisi *et al*.,2020).

1.4. Sinais clínicos de dirofilariose

1.4.1. Sinais clínicos da infeção por *D. immitis* no cão

Podem ser identificadas três fases durante o curso clínico da Dirofilariose cardiopulmonar canina (Sonnberger *et al*., 2021).

A primeira fase (sinais clínicos leves) é assintomática ou expressa sintomas muito leves, como dispneia induzida por exercício, tosse ocasional e apatia ligeira (Silva & Langoni, 2009; American Heartworm Society [AHS], 2018; Sonnberger *et al*., 2021).

A segunda fase (sinais clínicos moderados) é caracterizada por tosse crónica não produtiva, dispneia, intolerância ao exercício, presença de sons anormais nos pulmões, perda de peso, anemia ligeira e vómitos frequentes (Simón *et al*., 2012; AHS, 2018; Sonnberger *et al*., 2021).

A terceira fase (sinais clínicos severos) é classificada após a progressão da doença com uma carga parasitária significativa. É caracterizada pela lesão do endotélio pulmonar e oclusão vascular provocada pela morte de formas adultas do parasita, que desencadeiam uma hipertensão pulmonar resultando no aumento compensatório do lado direito do coração que progride para uma falha cardíaca direita (Noack *et al*., 2021; Sonnberger *et al*., 2021). Nesta fase podem ser observados sintomas como taquicardia, taquipneia, síncope, ascite, sons

anormais no coração, hepatomegalia e congestão aguda do fígado e rins, para além dos sintomas observados na fase anterior (Silva & Langoni, 2009; AHS, 2018; Sonnberger et al., 2021).

Uma sequela menos comum sucede quando ocorre a obstrução súbita do fluxo sanguíneo através dos pulmões, causada por um grande número de formas adultas nas artérias pulmonares, reduzindo o fluxo sanguíneo até ao ponto em que os parasitas migram e ocupam localizações aberrantes no átrio e ventrículo direito e muitas vezes na veia cava (Noack *et al*., 2021). Esta forma de bloqueio é denominada síndrome da veia cava e causa uma forma de insuficiência cardíaca com risco de vida caracterizada pelo aparecimento súbito de letargia e fraqueza, dispneia, murmúrio cardíaco da válvula tricúspide acompanhado de hemoglobulinemia e hemoglobinúria (AHS, 2018; ESCCAP, 2019; Noack *et al*., 2021).

1.4.2. Sinais clínicos da infeção por *D. immitis* no gato

Nos gatos, a grande maioria das infeções é amicrofilarémica, caracterizada por baixa carga parasitária e apresentação geralmente assintomática ou de sinais clínicos inespecíficos, frequentemente de origem respiratória ou digestiva (Silva & Langoni, 2009; Morchón *et al*., 2012; Simón *et al*., 2012; Noack *et al*., 2021). Os felinos apresentam menor tolerância imunológica a infeções por *D. immitis*, contudo, apresentam baixo desenvolvimento de formas adultas (0 a 25%), quando comparados aos cães (40 a 90%) (Silva & Langoni, 2009; Morchón *et al*., 2012; Noack *et al*., 2021). Os sinais clínicos mais comuns na fase aguda são colapso, dispneia, convulsões, diarreia, vómito, taquicardia, síncope e raramente morte. Já na fase crónica, observa-se tosse, vómito, dispneia, letargia, anorexia, perda de peso e quilotórax (Silva & Langoni, 2009). Nos gatos, a morte de microfilárias nas artérias pulmonares pode causar sintomas pulmonares severos, denominando esta condição como doença respiratória associada à dirofilariose (HARD), que mimetiza os sinais clínicos de asma felina, sendo sempre necessário excluir este diagnóstico antes de executar o plano de tratamento (Noack *et al*., 2021).

1.4.3. Sinais clínicos da infeção por *D. immitis* em humanos

Dirofilaria immitis é o agente causador da dirofilariose pulmonar em humanos tendo um carácter zoonótico, sendo deste modo considerada um problema para a saúde pública. O ser humano pode ser acidentalmente infetado e, embora em grande maioria dos casos esta infeção seja assintomática, o parasita pode progredir até à vasculatura pulmonar onde morre, ocasionando nódulos pulmonares. Estes nódulos são de grande preocupação pois são

indistinguíveis radiograficamente de outras patologias como tumores pulmonares, sendo a biópsia a maneira de alcançar o diagnóstico definitivo, embora tenha limitações devido ao seu caráter invasivo (Morchón *et al*., 2012; Simón *et al*., 2012; Cabrera *et al*., 2018; Fontes-Sousa *et al*., 2019; Noack *et al*., 2021).

Para além dos sinais clínicos pulmonares, existem estudos recentes onde propõem determinar uma relação entre a infeção por *D. immitis* e o desenvolvimento de alergias, com base nas medições dos níveis de IgE específicos do alergénio nos tutores de cães bem como a carga parasitária nos cães (Matos *et al*., 2020; Montoya-Alonso *et al*., 2020 b). Embora estes estudos não tenham logrado demonstrar o proposto, estes autores propõem que mais estudos devem ser realizados.

1.4.4. Sinais clínicos da infeção por *D. repens* no cão

Dirofilaria repens é o agente de dirofilariose subcutânea em cães que geralmente tem uma manifestação assintomática ou leve. Devido aos sinais clínicos serem pouco percetíveis, e por isso, em conjunto com a falta de ferramentas rápidas e viáveis de diagnóstico, muitas vezes acaba por não ser diagnosticada (Simón *et al*., 2012; Genchi & Kramer, 2017; Capelli *et al*., 2018; Dumitrache *et al*., 2021). No entanto, variáveis tipos de lesões cutâneas podem ocorrer, como lesões não inflamatórias, nódulos dermatológicos, alopecia focal ou multifocal, eritema localizado e hiperpigmentação das áreas afetadas em casos crónicos (Simón *et al*., 2012; Capelli *et al*., 2018; Dumitrache *et al*., 2021). Dependendo da localização e de reações imunes, estas lesões podem ser pruriginosas ou dolorosas, mas geralmente não há manifestação clínica percetível (Dumitrache *et al*., 2021). Para além de sinais clínicos dermatológicos, também pode ocorrer conjuntivite, anorexia, vómitos, febre, letargia e linfadenomegalia (Simón *et al*., 2012).

1.4.5. Sinais clínicos da infeção por *D. repens* no gato

Assim como nos cães, *D. repens* apresenta geralmente manifestação assintomática também em gatos, com casos reportados de nódulos subcutâneos (Manzocchi *et al*., 2017) e dermatite com presença de pápulas e crostas (Tarello, 2011).

1.4.6. Sinais clínicos da infeção por *D. repens* em humanos

A dirofilariose subcutânea em humanos é provocada na maioria das vezes por formas pré adultas de *D. repens*, não sendo capazes de alcançar a sua forma adulta, localizam-se no tecido subcutâneo, apresentando nódulo subcutâneo indolor que aumenta de tamanho gradualmente por períodos entre semanas a meses (Simón *et al*., 2012; European Socienty of Dirofilariosis and Angiostrongylosis [ESDA], 2017 a; Genchi & Kramer, 2017). Este nódulo tem uma consistência firme e está associado a eritema (Simón *et al*., 2012). Na grande maioria das vezes, apenas uma larva se desenvolve, pois o sistema imune do hospedeiro previne o desenvolvimento de mais larvas (Capelli *et al*., 2018).

A dirofilariose ocular está associada a infeções por *D. repens* em regiões oculares como a zona orbital, pálpebras, por baixo da conjuntiva e tecido vítreo, causando sinais como prurido, ardor e movimentos oculares dolorosos, podendo em certas localizações causar sinais clínicos mais severos como danificação da visão, moscas volantes ou perda de visão (Simón *et al*., 2012; ESDA, 2017 a; Capelli *et al*., 2018).

1.5. Diagnóstico da dirofilariose em cães

De acordo com as *guidelines* de várias organizações científicas como a Companion Animal Parasite Council (CAPC), a American Heartworm Society (AHS), a European Society of Dirofilariosis and Angiostringylosis (ESDA) e a European Scientific Counsel Companion Animal Parasites (ESCCAP) é recomendo que todos os cães, incluindo aqueles sob tratamentos preventivos contra a dirofilariose, sejam testados anualmente usando testes de antigénio e testes de deteção de microfilárias.

Diferentes testes parasitológicos, sorológicos ou moleculares estão disponíveis para detetar diferentes estádios parasitários, tendo em consideração que nem todos os estádios podem estar presentes num cão infetado num determinado momento (Dumitrache *et al*, 2021; Noack *et al*, 2021).

1.5.1. Deteção de microfilárias

O diagnóstico de microfilárias pode ser realizado pela observação destas no *buffy coat* após a realização de um microhematócrito, tendo a vantagem de ser um exame rápido e fácil de

realizar em contexto clínico (CAPC, 2020; ESDA, 2017 b). O problema deste teste é a sua baixa sensibilidade comparativamente com os testes mencionados a seguir (ESDA, 2017 b).

Outro método diagnóstico microscópico para avaliação da vitalidade e mobilidade das microfilárias utilizado em clínica é o esfregaço direto de sangue, tendo este uma sensibilidade entre 80-89% (Sonnberger *et al,*. 2021). Este teste tem a vantagem de ser rápido, barato e instrutivo pois permite a visualização das microfilárias vivas por parte dos tutores na clínica, fazendo com que estes sejam sensibilizados sobre a importância da doença (ESDA, 2017 b).

Por último, a avaliação de sangue concentrado, através do teste de Knott modificado, permite o diagnóstico diferencial entre microfilárias de *D. immitis* e outras microfilárias, particularmente *Acanthocheilonema reconditum* e *Dirofilaria repens* (AHS, 2018). Neste teste diagnóstico é possível a distinção de diferentes espécies de filarias através da diferenciação de características morfológicas (Tabela 2).

Tabela 2 – Caraterísticas morfológicas de microfilárias em circulação sanguínea (adaptado de ESCCAP, 2019).

Espécie	**Comprimento (µm)**	**Largura (µm)**	**Características morfológicas**
Dirofilaria immitis	290-330	5-7	Sem bainha; Extremidade cefálica pontiaguda; Cauda reta com extremidade pontiaguda.
Dirofilaria repens	300-370	6-8	Sem bainha; Extremidade cefálica obtusa; Cauda afiada e filiforme terminando muitas vezes como uma alça de guarda-chuva.
Acanthocheilonema reconditum	260-283	4	Sem bainha; Extremidade cefálica obtusa com gancho cefálico proeminente; Botão da cauda enganchado e curvado.
A. dracunculoides	190-247	4-6,5	Com bainha; Extremidade cefálica obtusa; Extremidade caudal afiada e estendida.

No entanto, esta técnica não é a mais adequada em casos de infeções mistas por filarídeos (Noack *et al*, 2021) e a sensibilidade e especificidade depende do operador (ESDA, 2017 b). Além disso, o uso de formalina, componente cancerígeno, está descrito no seu protocolo (ESDA, 2017 b), embora recentemente tenha sido comprovado de acordo com Genchi

(2021) que a formalina pode ser substituída com sucesso no teste modificado de Knott por água destilada para a diferenciação entre espécies de *Dirofilaria* spp..

1.5.2. Diagnóstico imunológico

Foram desenvolvidos vários testes sorológicos, para serem utilizados em clínica rotineiramente, baseados em ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) ou imunocromatográficos (ICT) para a deteção de antigénios produzidos pelas formas adultas de *D. immitis* (Simón *et al*., 2012; Burton *et al*., 2020; Noack *et al*., 2021). Os testes antigénicos disponíveis no mercado são altamente específicos (98%-100%) embora só detetem infeções 6-7 meses após a infeção (Burton *et al*., 2020; Noack *et al*., 2021). Para estes testes é sempre necessário a presença de pelo menos uma fêmea do parasita e em casos de infeções com baixa carga parasitária esta pode não ser detetada (Noack *et al*., 2021). O uso destes testes é ideal para a realização de triagem diagnóstica em caso de infeções subclínicas ou casos amicrofilarémicos ou para confirmação de infeções com formas adultas em cães com sinais clínicos (Simón *et al*., 2012; Burton *et al*., 2020).

1.5.3. Diagnóstico molecular

O diagnóstico molecular é particularmente apropriado para cães com suspeita de infeção, mas com resultados negativos para microfilárias (Noack *et al*., 2021). A diferenciação entre espécies também é possível através da coloração histoquímica de regiões anatómicas com atividade da fosfatase e através da ampliação do ADN de microfilárias por PCR (Simón *et al*., 2012).

Foi demonstrado que em amostras com apenas quatro microfilárias por ml, um ensaio multiplex de PCR foi capaz de fornecer resultado positivo confiável e distinguir entre *D. immitis* e *D. repens* (Simón *et al*., 2012; Noack *et al*, 2021), e também noutro ensaio de PCR em tempo real foi capaz de detetar *D. immitis* e diferenciá-la de *D. repens* em cães e mosquitos (Latrofa *et al*., 2012).

1.5.4. Análises clínicas

Análises clínicas também podem ser realizadas, porém não existem alterações específicas que contribuam para um diagnóstico final de dirofilariose (CAPC, 2020). As

alterações mais frequentes no hemograma são eosinofilia, basofilia, neutrofilia, anemia não regenerativa e trombocitopenia; nas análises bioquímicas pode-se observar aumento das enzimas hepáticas, azotemia e hiperbilirrubinemia. Já a urianálise pode apresentar proteinúria e albuminúria em casos avançados ou com síndrome de veia cava (CAPC, 2020).

1.5.5. Diagnóstico imagiológico

Exames imagiológicos como a radiografia, ecocardiografia ou electrocardiografia são ferramentas fundamentais para avaliar o estado clínico do animal e determinar a gravidade da infeção (Silva & Langoni, 2009; Simón *et al*., 2012).

A radiografia torácica proporciona a observação do aumento da artéria pulmonar, alterações no parênquima pulmonar, presença de efusão pleural e cardiomegalia na região direita do coração em estádios avançados de dirofilariose canina. Este teste complementar de diagnóstico não serve para avaliar a carga parasitária do animal infetado (Simón *et al*., 2012; Carretón *et al*., 2017; Maerz, 2020)

A ecografia deve ser ponderada nos casos em que os sinais clínicos e os achados radiológicos sugiram uma infeção severa, pois este exame proporciona informação relativamente ao estado da doença, através da avaliação das dimensões das câmaras cardíacas, presença de hipertensão e velocidade, direção e características do fluxo sanguíneo, para além de estimar a carga parasitária presente. Todos os resultados ecográficos são determinantes na abordagem terapêutica (Silva & Langoni, 2009; Simón *et al*., 2012; Carretón *et al*., 2017; Dumitrache *et al*., 2021). Nomeadamente, no caso de síndrome da veia cava, o animal irá apresentar sinais clínicos sugestivos como: letargia severa, dispneia, mucosas pálidas, fraqueza e alterações analíticas como hemoglobinemia e hemoglobinúria, podendo-se obter confirmação da síndrome através da observação das formas parasitárias localizadas no orifício da tricúspide e veia cava posterior na ecografia (AHS, 2018) (Figura 10).

O doppler ecográfico é usado para determinar com exatidão a presença e a severidade da hipertensão pulmonar (Simón *et al*., 2012; Maerz, 2020).



Figura 10 – Ecocardiografia paraesternal direita de eixo longo. Presença de massa de parasitas presentes no orifício da válvula tricúspide (seta). O ventrículo direito está hipertrofiado e severamente dilatado. O átrio direito e a artéria pulmonar também estão severamente dilatados. LA - átrio esquerdo; LV - ventrículo esquerdo; PA - artéria pulmonar; RV - ventrículo direito (AHS, 2018).

1.5.6. Biomarcadores

A função cardiorrespiratória em animais com dirofilariose pode ser analisada rotineiramente através de exames imagiológicos, embora a medição de biomarcadores serológicos seja comprovadamente uma importante informação adicional sobre o estado do animal. Marcadores como Troponina cardíaca I (cTnI) e N-terminal do pro-péptido natriurético tipo B (NT-proBNP) são usados em exames cardíacos. O primeiro avalia a cronicidade, resposta ao tratamento e dano na parede do miocárdio, o segundo é um marcador de stress cardíaco (Carretón, Costa-Rodríguez, Falcón-Cordón, Morchón & Montoya-Alonso, 2022). Outros marcadores têm também demonstrado utilidade: a endotelina-1 (ET-1) avalia a presença e severidade da hipertensão pulmonar em casos de cães infetados, o D-dímero deteta casos de tromboembolismo pulmonar, a proteína C-reativa diagnostica hipertensão pulmonar; e o aumento de cortisol está associado a stress provocado pela infeção por *Dirofilaria immitis* em cães (Carretón *et al*., 2022; Costa-Rodríguez *et al*., 2022). A literatura refere que mais estudos continuam a ser executados na avaliação de biomarcadores.

1.6. Tratamentos e profilaxia

1.6.1. Tratamento adulticida

O objetivo principal do tratamento adulticida é o melhoramento do estado clínico do animal e a eliminação do estádio adulto e pré-adulto do parasita (AHS, 2018). Quantas mais formas parasitárias forem eliminadas através do tratamento adulticida, maior será a probabilidade de ocorrência de patologias obstrutivas e inflamatórias (AHS, 2018). Com a morte das filárias, estas são deslocadas pela corrente sanguínea até aos ramos distais das artérias pulmonares provocando juntamente com a inflamação desencadeada e agregação plaquetária, fenómenos tromboembólicos (ESDA b, 2017; AHS, 2018). À medida que estes fenómenos vão restringindo o fluxo sanguíneo, a pressão pulmonar pode aumentar e em casos graves pode provocar insuficiência cardíaca do lado direito (AHS, 2018). Estas complicações devem sempre ser evitadas ao máximo com o uso de uma avaliação diagnóstica do estado do animal previamente ao início do tratamento (ESDA b, 2017; AHS, 2018).

Cães com sinais clínicos significativos de dirofilariose devem ser estabilizados antes do início do tratamento, através da administração de corticoesteróides, diuréticos, vasodilatadores, agentes iotrópicos positivos e fluidoterapia (AHS, 2018). A restrição de exercício é essencial durante o tratamento, pois a falha da mesma pode gerar complicações cardiopulmonares como tromboembolismo. (ESDA b, 2017; AHS, 2018; ESCCAP, 2019).

1.6.1.1. Abordagem farmacológica

1.6.1.1.1. Combinação de lactonas macrocíclicas (MLs) e doxiciclina

Ainda antes de dar início ao tratamento farmacológico para eliminação das formas adultas, deve ser realizada a administração de uma combinação de doses preventivas de lactonas macrocíclicas (MLs) juntamente com um antibiótico ativo contra a *Wolbachia* (ESDA b, 2017; AHS, 2018). Esta combinação elimina as larvas migratórias e nas filárias circulantes, suprime a embriogénese e enfraquece as formas adultas, demonstrando também ter uma ação adulticida (ESDA b, 2017; AHS, 2018). Está recomendado, segundo as *guidelines*, o uso de doxiciclina na dose de 10 mg/kg BID durante um mês e duas doses mensais de uma ML previamente ao tratamento com dicloridrato de melarsomina, embora segundo Carretón e colaboradores (2020)

esta dose antibiótica alta pode favorecer a emergência de estirpes resistentes como *Staphylococcus* ou *Enterococcus*.

1.6.1.1.2. Dicloridrato de melarsomina

O tratamento farmacológico para a eliminação das formas adultas é feito com diclorhidrato de melarsomina administrado por via intramuscular na musculatura lombar (ESDA b, 2017; AHS, 2018). O protocolo de execução universalmente aceite é composto por 3 injeções, sendo a primeira injeção na dose de 2,5 mg/kg, seguida de uma nova administração 1 mês após com a mesma dose, e por último uma terceira injeção 24 horas a seguir, também com a mesma dosagem (ESDA b, 2017; AHS, 2018).

1.6.1.1.3. Tratamento de suporte

Pode ser necessário realizar tratamento de suporte durante a terapia adulticida para controlar os sinais clínicos de tromboembolismo pulmonar. Esta terapia é realizada com a administração de prednisona em doses de 0,5 mg/kg BID na primeira semana, 0,5 mg/kg SID na segunda semana e 0,5 mg/kg EOD na terceira e na quarta semana (ESDA b, 2017; AHS, 2018).

1.6.1.1.4. Retestagem

Deve ser realizado um novo teste antigénico a cada 6 meses como também, um controlo de microfilárias. Só quando se obtiver dois resultados negativos consecutivos o cão é considerado livre de dirofilariose (ESDA b, 2017; AHS, 2018).

1.6.1.2. Abordagem cirúrgica

A intervenção cirúrgica para remoção de filárias é o único tratamento disponível no caso de síndrome da veia cava, que é caracterizada por uma alta carga parasitária na válvula tricúspide, dificultando a passagem de sangue e o funcionamento da válvula. O progresso natural desta patologia pode ser fatal sem a remoção cirúrgica rápida das filárias (AHS, 2018; Noack *et al*., 2021).

Em casos críticos de hipovolemia pode ser necessária fluidoterapia para restaurar o estado hemodinâmico e a função renal antes da cirurgia (AHS, 2018).

Geralmente o animal é colocado sob anestesia geral, embora possa ser só necessário uma sedação leve e anestesia local na zona da incisão durante a cirurgia. O animal é colocado em decúbito lateral esquerdo e é executada a venotomia da veia jugular externa direita. A extração das filárias é feita através do uso de pinças flexíveis (pinça jacaré longa) ou de pinças de resgate introduzidas através da veia jugular externa direita. Dependendo da disponibilidade, a fluoroscopia pode ser usada para direcionar o equipamento dentro do coração direito, já a ultrassonografia transtorácica ou transesofágica também podem ser usadas para visualização dos parasitas e do material cirúrgico dentro do coração (Ames & Atkins, 2020).

É recomendado o uso de tratamento adulticida após a cirurgia para eliminar os parasitas restantes, especialmente se ainda houver sinais de carga parasitária visível na ecocardiografia de controlo (Ames & Atkins, 2020).

Não é recomendável a testagem antigénica após a cirurgia devido à antigenemia presente, deste modo deve ser respeitado um tempo mínimo de 6 meses para a realização de uma nova testagem (ESDA b, 2017).

1.6.2. Profilaxia

A prevenção continua a ser a melhor opção de proteção dos cães contra a dirofilariose e consequentemente, de combate à expansão da doença (Tabela 3). A prevenção é alcançada quase exclusivamente através da administração de fármacos pertencendo à mesma classe química, as lactonas macrocíclicas (MLs). Estas podem ser divididas em dois grupos: as avermectinas e as milbemicinas.

- Avermectinas:
    - Ivermectina: mostra atividade contra um largo espetro de nematodes mas não contra cestodes e trematodes. Relativamente a ectoparasitas, também demonstra ação contra diferentes artrópodes como pulgas, piolhos, ácaros e algumas espécies de carraças. Embora seja eficaz contra microfilárias nos estádios L3 e L4, não é totalmente eficaz contra as formas adultas (Noack *et al*., 2021).

  - Eprinomectina: foi desenvolvida exclusivamente para uso em medicina veterinária como endectocida para bovinos, incluindo animais em lactação (Noack *et al*., 2021).
  - Abamectina: é o único fármaco pertencente ao grupo das MLs que é usado tanto na saúde animal como também na proteção de plantações (Noack *et al*., 2021).
  - Selemectina: mostra ação contra *D. immitis*, nematodes gastrointestinais, pulgas e carraças (Noack *et al*., 2021).
- Milbemicinas:
  - Milbemicina oxima: apresenta ação acaricida muito elevada. Além disso, também demonstra eficácia contra estádios imaturos e adultos de outros parasitas como nematodes e helmintes (Noack *et al*., 2021).
  - Moxidectina: é caracterizada por ser muito lipofílica e tem uma semi-vida longa, o que a torna particularmente adequada para formulações injetáveis de ação prolongada (Noack *et al*., 2021).

O tratamento sem o auxílio de lactonas macrocíclicas é feito com citrato de dietilcarbamazina, sendo este o fármaco mais antigo utilizado como prevenção de dirofilariose. Embora demonstre uma boa atividade contra microfilárias e formas adultas ao aumentar a sua suscetibilidade a um ataque imunitário inato pelo organismo do hospedeiro, tem a contrapartida de ter de ser administrado diariamente (Noack *et al*., 2021).

Tabela 3 – Lista de produtos aprovados na Europa para uso na prevenção ou tratamento contra infeções de *Dirofilaria* spp. (adaptado de Noack *et al*., 2021).

Princípio ativo	**Espécie**	**Via de administração**	**Nome comercial**	**Companhia Farmacêutica**
Eprinomectina	Gato	Tópica	NexGard Combo	Boehringer Ingelheim AH
	Cão	Tópica	Broadline	Boehringer Ingelheim AH
Ivermectina	Cão	Subcutânea	Guardian inj.	Elanco
	Cão	Oral	Hearthard/Cardotek plus	Boehringer Ingelheim AH
Milbemicina oxima	Cão	Oral	Program plus	Elanco
	Cão, Gato	Oral	Milbemax ou genéricos do mesmo: Milbactor, Milprazon, Milquantel, Milpro	Elanco, Krka, Virbac
	Cão	Oral	Nexgard Spectra	Boehringer Ingelheim AH,
	Cão	Oral	Trifexis	Elanco
Moxidectina	Cão	Subcutânea	Afilaria	Fatro
	Cão, Gato, Furão	Tópica	Advocate/Prinovox	Bayer AH
	Gato	Tópica	Bravecto Plus	Intetvet
	Cão	Oral	Simparica Trio	Zoetis
Selamectina	Cão, Gato	Tópica	Stronghold ou genéricos do mesmo: Chanhold, Evicto	Zoetis, Chanelle Pharmaceuticals, Virbac AH
	Gato	Tópica	Stronghold Plus, Felisecto Plus	Zoetis
Dicloridrato de melarsomina	Cão	Intramuscular	Immiticide	Boehringer Ingelheim AH

1.6.3. Particularidades sobre o tratamento

A ineficácia do tratamento preventivo com MLs pode ser derivada da falta de comprometimento do tutor, na subdosagem ou dosagem em intervalos irregulares e/ou devido

a populações de dirofilárias resistentes a medicamentos (Noack *et al*., 2021). Esta falha de eficácia de MLs no uso preventivo da dirofilariose canina foi inicialmente reportada em 1998 com algum ceticismo da comunidade científica e só em 2011 foi confirmada geneticamente *in vitro* a existência da primeira estirpe resistente a MLs localizada na região do Mississipi, nos Estados Unidos da América (Sanchez, 2020; Diakou & Prichard, 2021). Estes casos desencadearam um estudo levado a cabo por Bourguinat e colaboradores (2015) com uma abordagem ao genoma inteiro, onde foram identificados 186 SNPs (polimorfismo de nucleotídeo simples) associados a fenótipos resistentes assim como outro estudo realizado por Ballesteros e colaboradores (2018) onde logrou reduzir o número de SNPs previamente identificados para apenas dois.

Embora em geral as MLs sejam consideradas seguras para a maioria dos mamíferos, algumas raças de cães, incluindo collies e pastores, são propensas a graves efeitos secundários neurológicos. (Noack *et al*., 2021).

1.7. Monitorização

1.7.1. Monitorização de prevalências

A divulgação de informação sobre os dados de prevalência é imprescindível para preencher as lacunas existentes na avaliação de risco das populações (Jacobson, Ward, Lacaden & Hornak (2020). A necessidade desta informação atualizada e precisa torna-se cada vez mais importante. Deste modo foi criada uma plataforma onde profissionais da área veterinária e laboratórios podem partilhar casos de animais positivos para certas doenças infeciosas, nomeadamente a dirofilariose. Cada caso partilhado irá contribuir para um melhor entendimento sobre a distribuição e potencial propagação da doença, sendo esta informação vital para uma implementação de medidas profiláticas eficazes (Varloud, Chassain, El Ouatik, Dupuis & Crippa 2022).

1.7.2. Controlo dos vetores

Para além da monitorização dos animais infetados, deve também existir uma monitorização dos vetores de transmissão da doença.

De acordo com Tomazatos e colaboradores (2018) é imperativo a monitorização de vetores competentes para compreender melhor os fatores de risco ambientais para a transmissão da doença, para desta forma ser possível implementar medidas de vigilância e controlo eficazes.

Novos estudos para a monitorização de vetores estão a ser desenvolvidos, nomeadamente aqueles propostos por Park e colaboradores (2020), que mostram que embora não seja possível determinar vetores infetados e não infetados através da medição da frequência do batimento de asas destes com o auxílio de um *smartphone*, é possível determinar a carga parasitária de larvas L3 de *D. immitis* presente nestes.

1.8. Objetivos do estudo

De acordo com recentes estudos que indicam a expansão de dirofilariose de zonas endémicas para zonas não endémicas a nível mundial, assim como o carácter zoonótico da doença, torna-se imprescindível a realização de estudos para determinar prevalências e avaliar riscos. A parasitose por *D. immitis* é considerada endémica em Portugal, sendo o território nacional categorizado com condições favoráveis para o desenvolvimento dos vetores e consequente propagação da doença (Vieira et al., 2015). Embora a presença desta doença no território português seja indiscutível, a informação sobre a sua prevalência em certas regiões, como no caso do concelho de Leiria, ainda é escassa.

Este estudo visa determinar a prevalência da dirofilariose em cães no concelho de Leiria, como também obter uma maior compreensão sobre a doença a nível nacional.

2. Material e métodos

Este trabalho foi dividido em dois segmentos: quanto à parte de caracterização epidemiológica da dirofilariose no concelho de Leiria: 1- análise antigénica para deteção de animais positivos para *D. immitis* e realização do teste de Knott modificado para deteção de microfilárias; 2- recolha de informação dos animais através de um inquérito aos tutores para identificação de fatores de risco para a infeção por *D. immitis*.

As amostras sanguíneas foram recolhidas em um hospital, uma clínica, um canil e uma associação protetora de animais do concelho de Leiria.

Também foi realizado um inquérito *online* para recolha de informação a tutores de cães por todo o país, para obter uma maior compreensão sobre a perceção dos tutores a respeito da doença e dos possíveis hábitos que representassem risco para transmissão da dirofilariose.

2.1. Caracterização das amostras

Foram recolhidas 92 amostras sanguíneas através da venopunção em cães para realização dos testes laboratoriais. De cada amostra foram retiradas 2 gotas de sangue para realização de um teste de imunocromatografia (ICT) para deteção de antigénio específico de *D. immitis* e cerca de 0,5 ml para a realização do teste modificado de Knott para pesquisa de microfilárias.

Os critérios de inclusão dos animais objeto deste estudo foram:

- Espécie canina (*Canis lupus familiaris*);
- Habitação no concelho de Leiria;
- Idade igual ou superior a seis meses;
- Preenchimento do formulário de consentimento pelos tutores (Apêndice 1);
- Preenchimento de um inquérito, à exceção de animais de canil (Apêndice 2);
- Não terem sido tratados profilaticamente para a dirofilariose.

2.1.1. Diagnóstico

2.1.1.1. Colheita e processamento das amostras

As 92 amostras sanguíneas foram recolhidas por venopunção jugular ou cefálica, de acordo com os critérios de inclusão mencionados previamente.

Foi colhido 1ml de sangue por animal para um tubo com anticoagulante (EDTA) e imediatamente invertido 8 a 10 vezes, sem agitar, para favorecer a mistura com o anticoagulante. Cada amostra foi identificada com um número e numa tabela este número correspondia à identificação de cada animal.

As amostras foram refrigeradas imediatamente após a recolha, mantidas sob refrigeração e transportadas para o laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona onde foram processadas.

Para o primeiro teste de diagnóstico foi utilizado o teste rápido de imunocromatografia, DFV® test Dirofilaria – Heartworm. Neste teste utilizou-se 20 µl da amostra e em seguida realizou-se o teste de Knott modificado onde foi utilizado 0,5 ml de sangue.

2.1.1.2. Técnicas de diagnóstico

2.1.1.2.1. Teste de Imunocromatografia

Foi realizado um teste rápido comercial de imunocromatografia, DFV® test Dirofilaria – Heartworm, para deteção de antigénios específicos de *Dirofilaria immitis* nas amostras. Este teste necessita de pelo menos uma fêmea do parasita e em casos de infeções com baixa carga parasitária este pode não ser detetada (Noack et al., 2021). Para a realização do teste utilizou-se o sangue total, porém, segundo o fabricante pode-se também utilizar o soro ou plasma.

Uma quantidade de 20 µl de sangue foi colocado no pocinho da placa do teste, pelo qual passou por um filtro antes de atingir a membrana de nitrocelulose. Em seguida esta entrou em contacto com os anticorpos conjugados com ouro coloidal, ligando-se a estes e iniciando a migração. Foi realizada a leitura e interpretação dos resultados após 10 minutos. Os possíveis resultados são:

- Positivo (+): uma faixa de cor rosada aparece na zona de teste (T) e outra na zona de controlo (C).
- Negativo (-): apresentação de uma única faixa de cor rosada na zona de controlo (C).
- Teste não válido: ausência de faixa na zona de controlo (C).

2.1.1.2.2. Teste modificado de Knott

O teste de Knott modificado baseia-se na observação microscópica de microfilárias. Porém, é importante fazer a distinção através de características morfológicas destas microfilárias para identificar microfilárias de *D. immitis* de outras microfilárias como de *D. repens* ou *Acanthocheilonema reconditum*.

Para a realização do teste de Knott modificado foi utilizado 0,5 ml de sangue com 4,5 ml de solução de formalina a 2% num tubo de centrífuga que foi invertido suavemente várias vezes para misturar corretamente a solução com a amostra de modo a provocar a lise dos glóbulos vermelhos. De seguida, centrifugado a 1500 rpm durante 8 minutos e no fim foi

removido o sobrenadante e adicionado 1 gota de azul de metileno ao sedimento, procedendo-se a sua homogeneização. Foi retirada, com uma pipeta, uma gota do sedimento e colocada sobre uma lâmina e coberta com uma lamela. A observação microscópica foi realizada em toda a extensão com a objetiva de 10X inicialmente e com a objetiva de 40X para observação de características morfológicas.

2.1.1.3. Interpretação dos resultados do DFV® test Dirofilaria e do teste modificado de Knott

O teste para a deteção de antigénios é o método de diagnóstico mais sensível para testar cães sem manifestações clínicas, porém é recomendado que seja associado a este procedimento um teste para a pesquisa e identificação de microfilárias (Tabela 4). Ainda que o teste antigénico possa ser o mais recomendado, podem ocorrer resultados falso-negativos quando a infeção é baixa ou em situações em que as instruções dos testes não foram seguidas corretamente. Um resultado falso-negativo pode ser devido também à formação de complexos antigénio-anticorpo que interferem com a deteção de antigénios (Simón *et al*., 2012; Velasquez *et al*., 2014).

Tabela 4 – Interpretação dos resultados de ICT e teste modificado de Knott.

Teste de imunocromatografia	Teste modificado de Knott	Interpretação
Negativo (-)	Negativo (-)	Negativo (-)
Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)
Negativo (-)	Positivo (+)	Positivo (+)
Positivo (+)	Negativo (-)	Positivo (+)

2.2. Inquéritos *online* aos tutores de cães

Foi elaborado um questionário que foi disponibilizado entre os meses de Junho e Setembro de 2022 destinado a tutores de cães. Os questionários foram realizados no programa Google forms (Apêndice 3) e partilhado nas redes socias (grupos de Facebook de tutores de cães) e enviados a amigos e colegas. Foi feita a recolha de informação a um total de 700 tutores de cães residentes em Portugal.

De acordo com a origem dos questionários recebidos, dividiu-se a informação em 6 regiões distintas (Porto e Norte, Centro, Lisboa e Vale do Tejo, Alentejo, Algarve e Ilhas).

2.3. Análise estatística descritiva

Os resultados dos testes de diagnóstico, informação dos animais participantes na amostra de Leiria e respostas aos inquéritos *online* foram registados num ficheiro do programa Microsoft Excel 2011®, analisados de forma estatística e estão descritos ao longo da apresentação e discussão dos resultados.

3. Resultados

3.1. Diagnóstico da dirofilariose canina no concelho de Leiria

Do total de amostras (n=92) de sangue colhidas de cães no concelho de Leiria tanto em ambiente hospitalar como de canil, somente em 2 amostras foram detetadas microfilárias, sendo estas compatíveis morfologicamente com microfilárias de *D. immitis*, representando assim uma prevalência de 2,17% de animais positivos estudados no concelho de Leiria. Todos os animais apresentaram resultado negativo no teste antigénico. Os resultados positivos foram unicamente confirmados através do teste modificado de Knott (Figura 11). Dos animais com proprietário a prevalência foi de 1,89% (n=1); já nos animais de canil a prevalência foi de 2,56% (n=1).

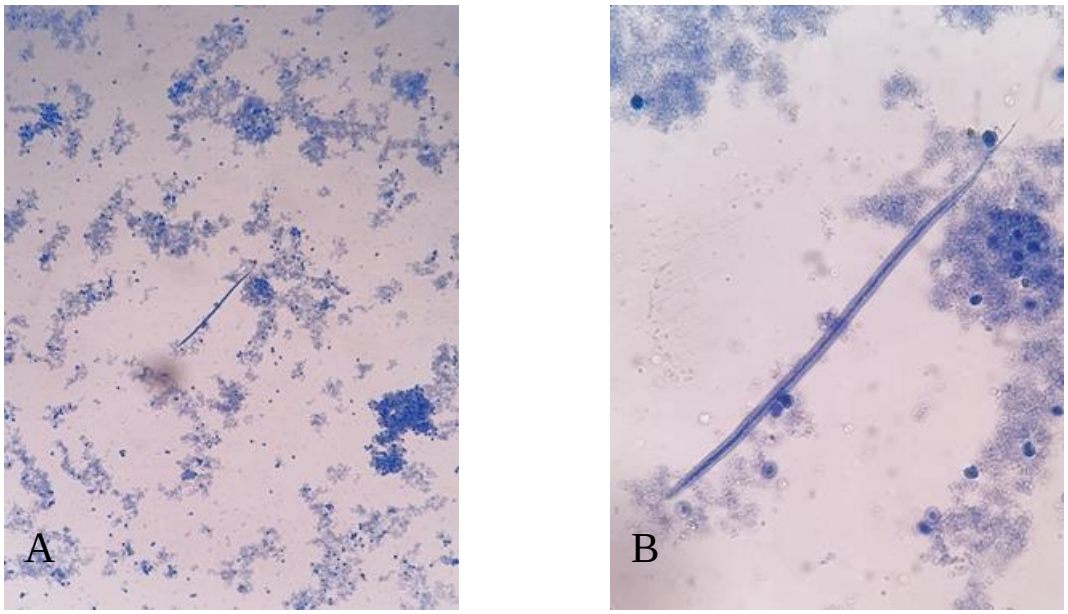


Figura 11 – Microfilária (compatível com *Dirofilaria immitis*) presente no teste modificado de Knott. A) Ampliação de 10X. B) Ampliação de 40X. Fotografias originais do autor.

3.2. Inquérito aos tutores participantes da amostra de Leiria

Foram realizados inquéritos aos tutores dos animais participantes do estudo no concelho de Leiria, unicamente para fins de identificação dos animais. Do total de amostras colhidas (n=92), 53 amostras foram de animais com tutor colhidas em ambiente hospitalar e clínica e 39 foram colhidas em ambiente de canil e associação protetora de animais. Do total dos animais do estudo, 47 foram fêmeas e 45 machos, distribuídos por três grupos etários: 19 cães com idade inferior a 2 anos, 53 entre os 3-9 anos e 20 com idade superior a 10 anos.

Relativamente ao estado reprodutivo dos animais com tutor, 28 eram esterilizados/ castrados, sendo que 15 eram fêmeas e 13 eram machos. Dos animais inteiros, 9 eram fêmeas e 16 era machos.

Relativamente à pelagem dos animais com tutor presentes no estudo, 4 deles apresentavam uma pelagem comprida, 18 uma pelagem média e 31 uma pelagem de pelo curto (Tabela 5).

Não foi possível realizar a caracterização relativa ao estado reprodutivo e ao tipo de pelagem dos animais com a colheita feito em ambiente de canil e associação protetora de animais.

Tabela 5 – Caracterização dos animais do estudo.

		Percentagem:
Idade:		
< 2 anos		20,65%
3 - 9 Anos		57,61%
+ 10 Anos		21,74%
Sexo:		
Fêmea		51,09%
Macho		48,91%
Estado (animais com tutor):		
Esterilizado/castrado		52,83%
	Fêmeas	53,57%
	Machos	46,43%
Inteiro		47,17%
	Fêmeas	36%
	Machos	64%
Pelagem (animais com tutor):		
Curta		58,49%
Média		33,96%
Comprida		7,55%

3.3. Inquérito *online*

Foram recebidos 700 inquéritos *online* considerados válidos, ou seja, apresentavam respostas completas. O inquérito foi constituído por 13 perguntas de escolha múltipla e de resposta fechada e foi dividido em 2 partes. A primeira parte estava relacionada às informações sobre o animal e os hábitos de rotina diária, e uma segunda parte constituída por 4 perguntas sobre o conhecimento dos tutores quanto à doença e os hábitos de prevenção da dirofilariose.

3.3.1. Género, idade, raça e estado reprodutivo

Do total de 700 inquéritos *online* respondidos (n=700), relativamente ao sexo dos animais, 360 (51,43%) eram fêmeas e 340 (48,57%) eram machos (Gráfico 6). Quanto ao estado reprodutivo dos animais 290 fêmeas e 188 machos eram esterilizadas, respetivamente (Gráfico 7).

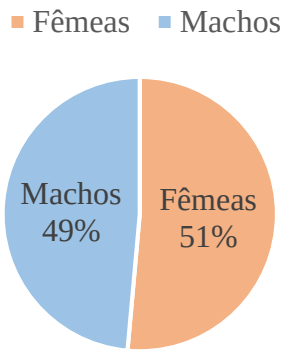


Gráfico 6 – Representação percentual do género da população de cães a nível nacional.

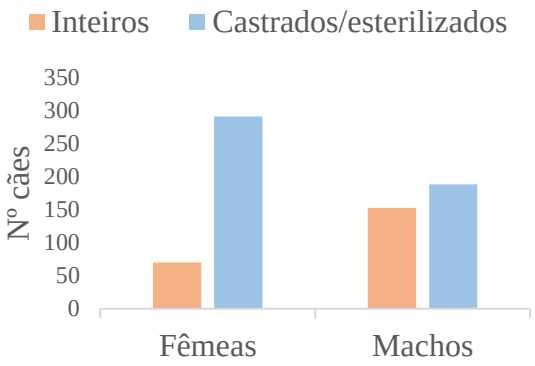


Gráfico 7 – Representação do estado reprodutivo da população de cães a nível nacional.

De acordo com a faixa etária, os animais foram divididos nas seguintes faixas etárias: 105 cães encontravam-se entre os 4 meses até aos 2 anos (15%); 421 entre os 3 aos 9 anos (60,14%); e 174 com uma idade superior a 10 anos (24,86%) (Gráfico 8).

Quanto à raça, foram identificas várias raças, tendo sido categorizados dois grupos, um composto por 321 cães sem raça definida (45,86%) e outro por 379 cães com raça definida (54,14%) (Gráfico 9).

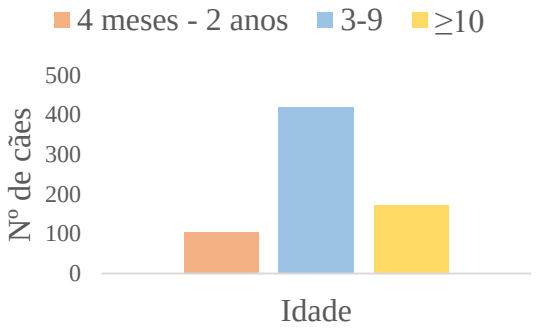


Gráfico 8 – Distribuição da população de cães consoante a categoria de idade.

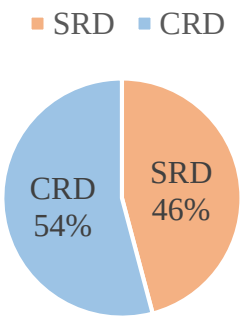


Gráfico 9 – Distribuição da população de cães consoante raça. CRD - com raça definida; SRD - em raça definida.

3.3.2. Distribuição geográfica e movimentação dos animais

Através do inquérito *online*, foi obtida informação de todos os 20 concelhos do território nacional. Os concelhos com uma maior representação foram os concelhos de Lisboa (45,14%), Setúbal (14,43%) e Porto (14,29%) e os concelhos menos representados foram Açores, Bragança e Vila Real com 0,14% cada um deles (Figura 12).

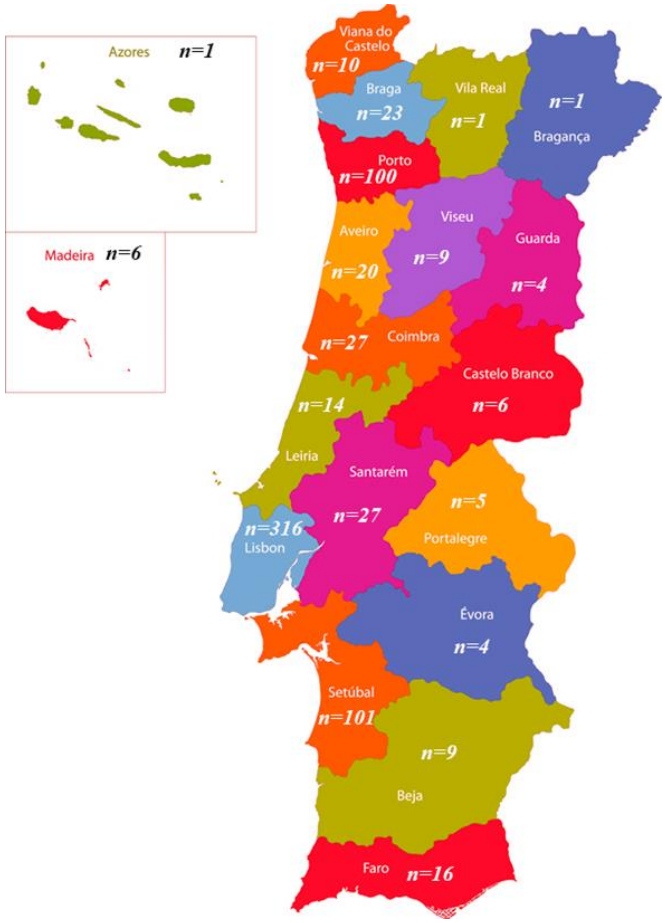


Figura 12 – Distribuição da origem dos questionários de cães pelo território nacional.

A informação obtida de cada concelho foi dividida em 6 regiões (Porto e Norte, Centro, Lisboa e Vale do Tejo, Alentejo, Algarve e Ilhas) para uma análise mais representativa e conclusiva. A região do Porto e Norte era constituída pelos concelhos de Braga, Bragança, Porto, Viana do Castelo e Vila Real, a região do Centro pelos concelhos de Aveiro, Castelo Branco, Coimbra, Guarda, Leiria e Viseu, a região de Lisboa e Vale do Tejo pelos concelhos de Lisboa, Santarém e Setúbal, a região do Alentejo pelos concelhos de Beja, Évora e Portalegre, a região do Algarve pelo concelho de Faro, e por último, a região das Ilhas era constituída pelas ilhas dos Açores e Madeira.

Do total de inquéritos respondidos, 19,29% (135/700) foram do Porto e Norte, 11,43% (80/700) do Centro, 63,43% (444/700) de Lisboa e Vale do Tejo, 2,57% (18/700) do Alentejo, 2,29% (16/700) do Algarve e 1% (7/700) das Ilhas.

Quanto à deslocação dos tutores com os seus animais, 55,29% (387/700) afirmaram realizar deslocações pelo território nacional ou para o estrangeiro, sendo as regiões do Algarve e Lisboa e Vale do Tejo aquelas que apresentaram uma maior percentagem de respostas com 62,50% e 61,49%, respetivamente. A região das ilhas foi a que menos apresentou deslocações dos animais, com 28,57% de respostas.

3.3.3. Tipo de habitação e caracterização do passeio diário

Das 700 respostas dos inquéritos *online* em relação ao tipo de habitação, somente 54 (7,7%) foram categorizados como habitação exclusiva *outdoor*, 355 (50,7%) como habitação *indoor* e 291 (41,58%) como habitação categorizada como mista.

Nas regiões do Porto e Norte, Lisboa e Vale do Tejo e Algarve houve uma maior percentagem de cães com habitação *indoor* com 46,67% (63/135), 54,50% (242/444) e 75% (12/16), respetivamente. Já as restantes regiões, do Centro, Alentejo e Ilhas apresentaram maior percentagem de cães com habitação mista com 47,50% (38/80), 55,56% (10/18) e 57,14% (4/7), respetivamente (Gráfico 10).

Em relação aos passeios, 70,71% (495/700) realizava passeio com o uso de trela, 13,86% (97/700) sem o uso de trela e 15,43% (108/700) não realiza um passeio diário.

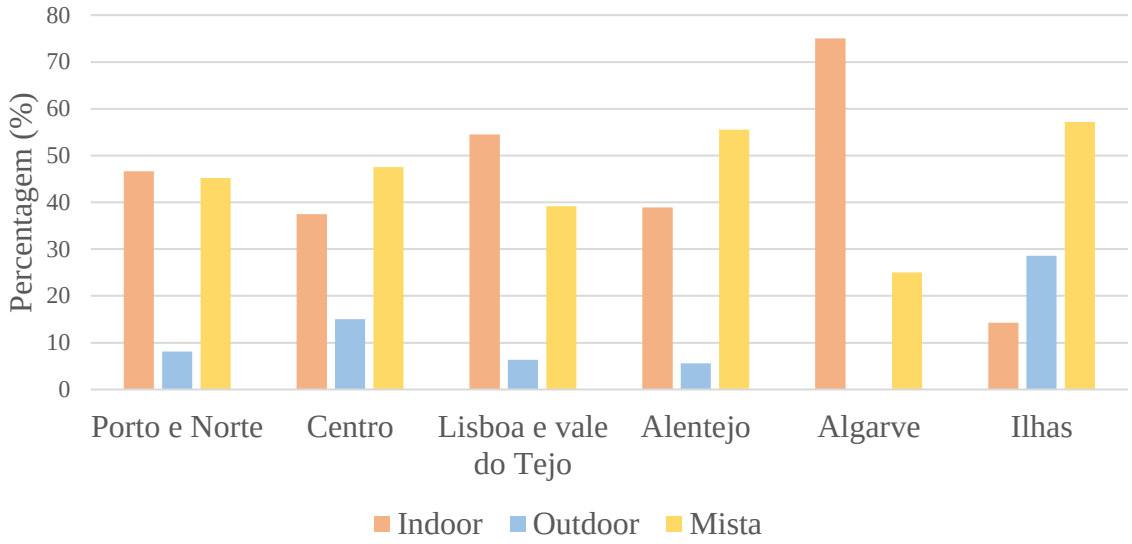


Gráfico 10 – Distribuição percentual de tipo de habitação pelas diferentes regiões.

3.3.4. Tratamentos profiláticos de desparasitação

Relativamente à desparasitação interna: 96,14% (673/700) dos tutores questionados através do inquérito *online*, afirmavam realizá-la. Do total de tutores que realizavam a desparasitação interna foram inquiridos quanto à periodicidade do tratamento, sendo que 8,02% (54/673) dos tutores afirmaram que realizavam desparasitação mensalmente, 54,83% (369/673) a cada três meses, 30,16% (203/673) a cada seis meses e 6,98% (47/673) anual.

Quanto à desparasitação externa: 95,57% (669/700) dos tutores questionados através do inquérito *online*, afirmavam realizá-la. Do total de tutores que realizavam a desparasitação externa foram inquiridos quanto à periodicidade do tratamento, sendo que 32,88% (220/669) dos tutores afirmaram que realizavam desparasitação mensalmente, 36,02% (241/669) a cada três meses, 23,32% (156/669) a cada seis meses e 7,77% (52/669) anual. (Gráfico 11).

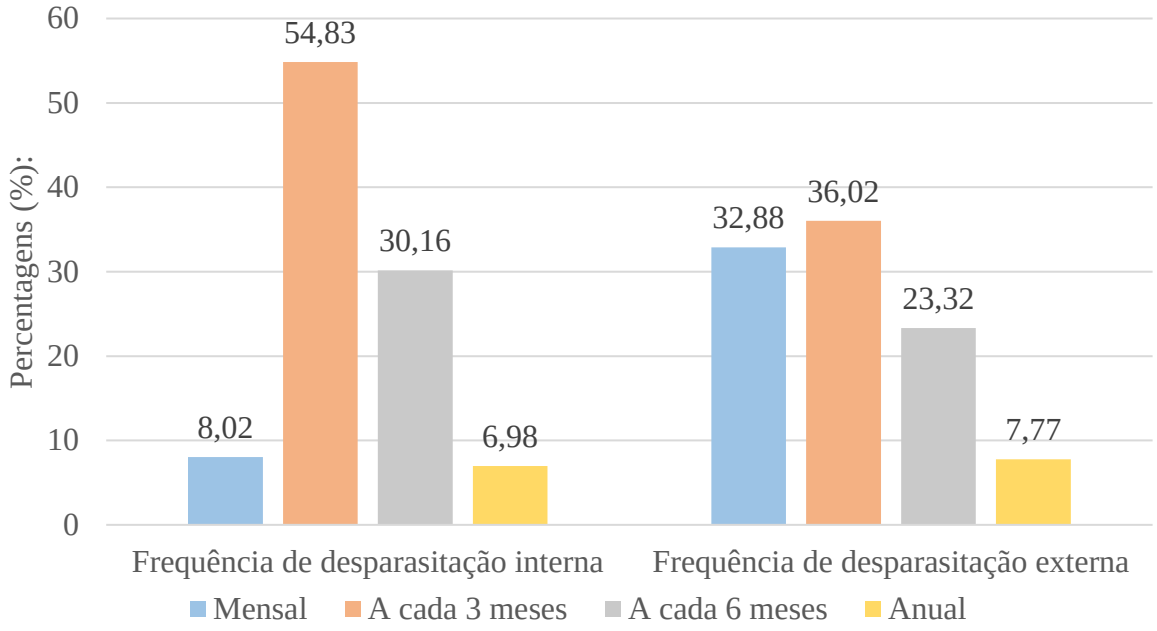


Gráfico 11 – Frequência de desparasitação dos cães.

3.3.5. Conhecimento dos tutores sobre a dirofilariose

Do total de inquéritos *online* respondidos pelos tutores, 393 (56,14%) afirmaram ter conhecimento da doença, enquanto os restantes 43,86% afirmaram não ter (Gráfico 12).

Dos 393 tutores que afirmaram ter conhecimento sobre a doença, 73,54% adquiriram o conhecimento através de um médico veterinário, 24,43% através da internet, 10,69% através de redes sociais (Instagram, Facebook, Youtube, etc.), 9,16% através de outros tutores de cães, 4,33% através de criadores, canis ou instituições de adoção e 29,01% de outros meios informativos, sendo que alguns tutores adquiriram conhecimento através de mais do que uma via (Gráfico 13).

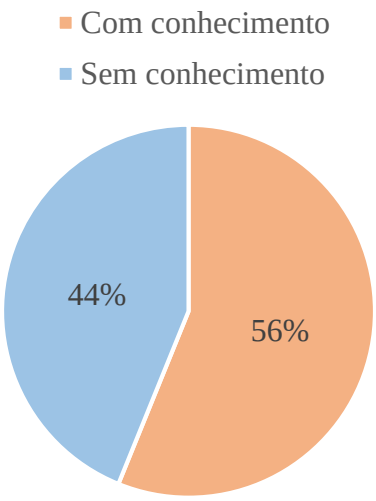


Gráfico 12 – Distribuição percentual de tutores de cães com e sem conhecimento sobre dirofilariose.

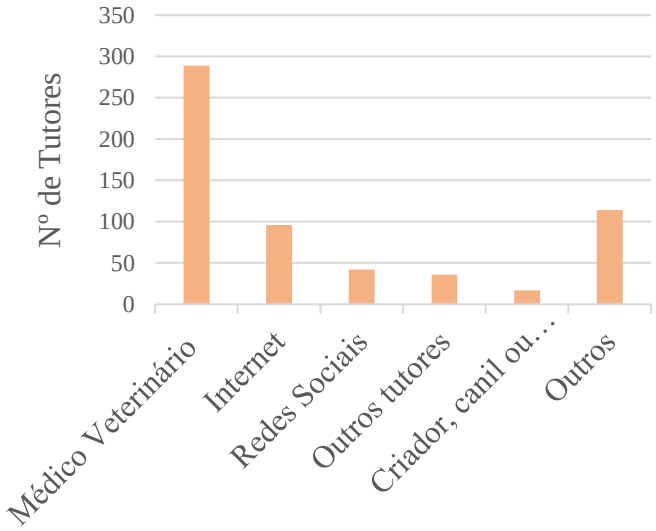


Gráfico 13 – Representação da origem do conhecimento da doença.

Relativamente ao conhecimento da doença por região, o Alentejo, Algarve e Ilhas foram as regiões com maior conhecimento sobre a doença (Gráfico 14).

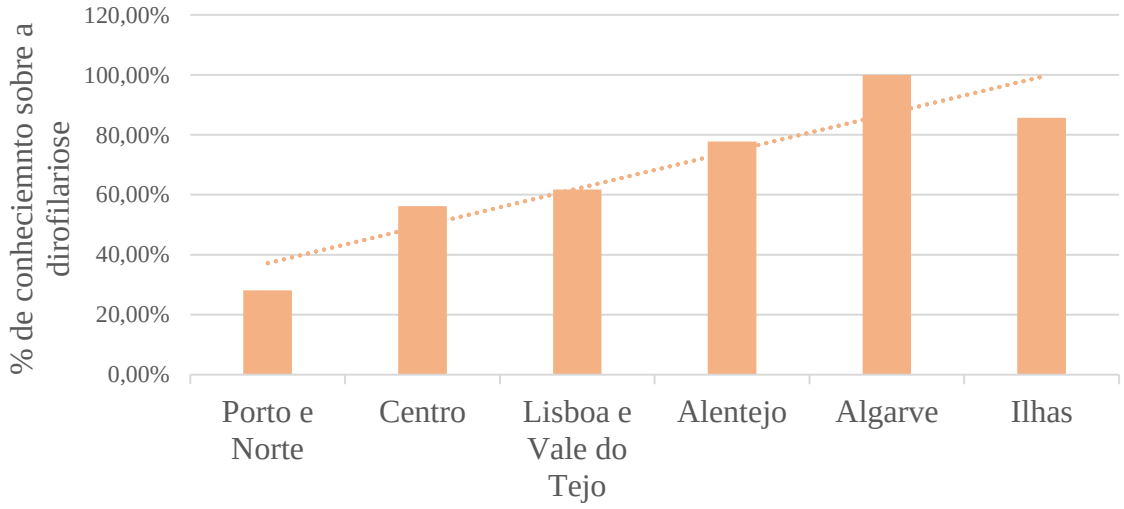


Gráfico 14 – Conhecimento sobre a dirofilariose por região.

A principal fonte de adquisição do conhecimento sobre a doença em todas as regiões foi o médico veterinário.

3.3.6. Realização de prevenção e teste para a deteção da dirofilariose

Do total de respostas aos inquéritos *online* realizados aos tutores, 31,71% (222/700) afirmaram realizar tratamentos profiláticos periódicos contra a dirofilariose, enquanto os restantes 68,29% (478/700) afirmaram não os realizar.

Quanto à realização de prevenção específica para a dirofilariose por região, as regiões que apresentam maior percentagem foram o Alentejo, o Algarve e Ilhas com 50%, 75% e 71,43%, respetivamente (Gráfico 15).

Quanto à realização de exames para o diagnóstico da doença, 17,57% (123/700) afirmaram ter realizado exame de diagnóstico específico para a dirofilariose, enquanto os restantes 82,43% (577/700) afirmaram não terem realizado.

Em relação às regiões do país em que os tutores realizaram exames de diagnóstico específicos para a dirofilariose, foi o Alentejo, Algarve e Ilhas que apresentaram maior percentagem com 38,89%, 62,5% e 57,14%, respetivamente (Gráfico 16).

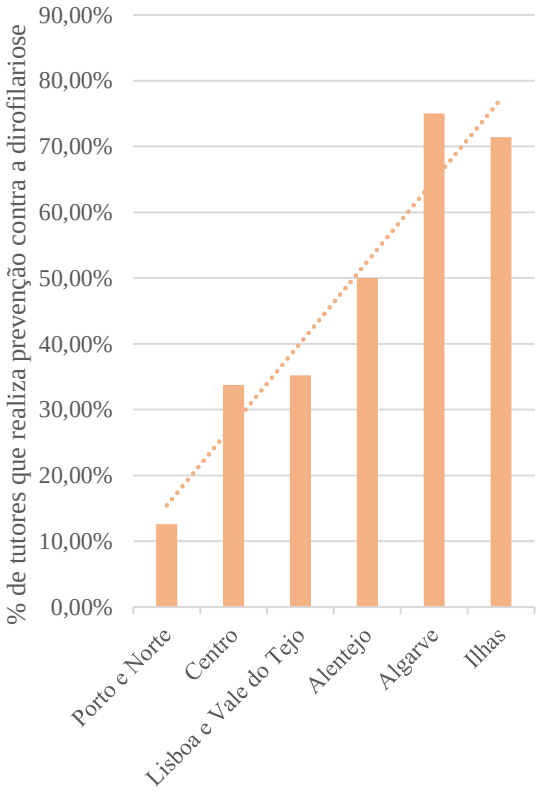


Gráfico 15 – Representação percentual de proprietários que realizam tratamentos preventivos específicos contra a dirofilariose por região.

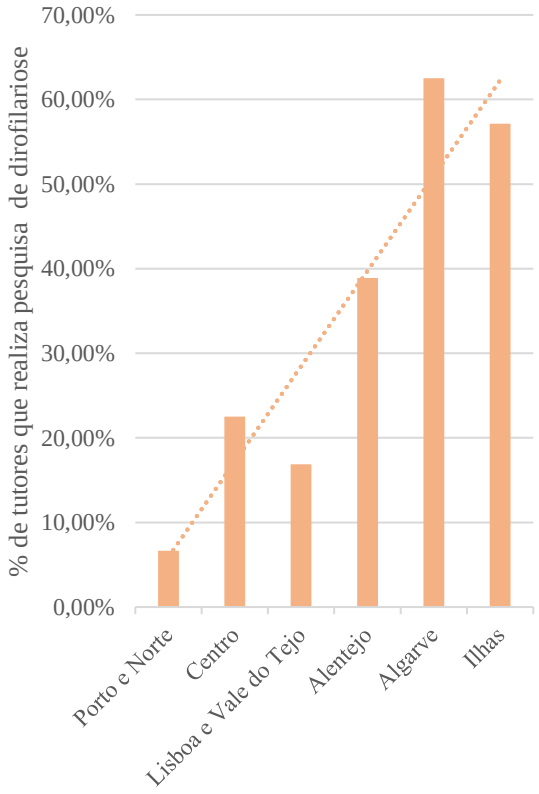


Gráfico 16 – Representação percentual de proprietários que realizam testes de diagnóstico específicos para deteção da dirofilariose por região.

4. Discussão

4.1. Diagnóstico da dirofilariose e inquérito aos tutores de cães do concelho de Leiria

A expansão da dirofilariose canina para zonas consideradas não endémicas tem sido registada por todo o mundo e fornece evidências claras de que esta doença zoonótica está a gerar uma maior preocupação na comunidade, relativamente à saúde pública (Morchón, Montoya-Alonso, Rodríguez-Escolar & Carretón, 2022). Embora tenham sido realizados vários estudos, nomeadamente por Alho e colaboradores (2014), em Portugal sobre a prevalência da dirofilariose canina, algumas regiões ainda carecem de informação. Com o objetivo de obter informação sobre a ocorrência da doença no concelho de Leiria, este estudo visou determinar o estado epidemiológico de dirofilariose canina neste concelho, bem como avaliar os hábitos, cuidados profiláticos e grau de conhecimento dos tutores sobre a doença.

Muitos fatores podem contribuir para a disseminação da doença e destes, pode ser a falta de campanhas educativas que visam informar os tutores, a subestimação dos riscos, falhas no diagnóstico, falta de prevenção por desconhecimento ou por motivo económico, animais sem tutores ou abandonados e hospedeiros silvestres reservatórios (Genchi & Kramer, 2020).

Portugal é caraterizado como endémico, embora nem todas as regiões do país tenham sido estudadas (Genchi & Kramer, 2020), sendo este o caso do concelho de Leiria. Vários estudos epidemiológicos foram realizados no país, nomeadamente por Cardoso e colaboradores (2012) no qual determinaram uma prevalência geral de 3,6% e obtendo uma prevalência de 0,9% no centro do país. De acordo com Vieira e colaboradores (2014), a prevalência no norte e centro do país foi de 2,1%. Outros estudos foram realizados no território nacional sendo que de acordo com Landum e colaboradores (2014) e Vieira e colaboradores (2014) foram relatados valores de prevalência entre 8,8 a 27,3% no centro do país, e de acordo com Alho e colaboradores (2014) foram relatados valores de 15,1% na região costeira central do país.

Quanto ao resultado obtido neste estudo, através dos testes para o diagnóstico de dirofilariose, a prevalência foi de 2,17% para a amostra de cães estudada do concelho de Leiria, sendo que houve dois animais positivos somente pelo teste de Knott modificado onde se observou microfilárias, tendo sido o teste antigénico negativo em ambas amostras. A dimensão da amostra para a obtenção da prevalência foi de 92 animais testados, tendo sido incorporados animais com diferentes origens, nomeadamente animais de canil e animais com tutor. Todos os animais do estudo eram residentes do concelho de Leiria. Os critérios de inclusão no presente

estudo foram levados a cabo para a incorporação de animais com mais de 6 meses de idade que não estivessem sido sujeitos a tratamentos profiláticos prévios contra a dirofilariose e que tivessem habitação no concelho de Leiria. Juntamente, os tutores preencheram uma autorização para o diagnóstico e um inquérito sobre os animais que tinha como objetivo recolher e interpretar possíveis fatores de risco para a transmissão da dirofilariose. Contudo, os inquéritos realizados aos tutores participantes do estudo no concelho de Leiria foram usados exclusivamente para identificação da amostra. Não foram retirados resultados deste inquérito.

Dos 92 animais testados, 53 tinham tutores e 39 eram animais de canil. O resultado dos testes rápidos não revelou nenhum animal positivo, porém, no teste de Knott modificado, houve um animal positivo em cada grupo. Isto demonstra que independentemente de um animal se encontrar ao cuidado de um tutor ou ao cuidado de uma associação, existe sempre a presença de risco de infeção. Para minimizar este risco, os proprietários podem adquirir informação juntamente ao médico veterinário, realizar tratamentos profiláticos específicos para a dirofilariose como a desparasitação com uso de MLs ou realizar rastreios para a deteção do agente infecioso. Relativamente às associações, as condições de higiene, maior densidade populacional, ausência de tratamentos profiláticos regulares e frequentes, acesso ao exterior por longos períodos de tempo, entre outros, fazem parte dos fatores de risco, tornando assim os animais mais suscetíveis à infeção.

Outra questão que merece menção foi a presença de resultados negativos no teste de imunocromatografia em ambos os animais positivos na deteção de microfilárias, o que vem a salientar a importância do seguimento das *guidelines* propostas pelas associações como a AHS e ESDA para um diagnóstico correto da dirofilariose, conjugando os dois métodos preferenciais de diagnóstico (teste de imunocromatografia e teste modificado de Knott) e interpretando-os em conjunto. Esta questão também levanta dúvidas sobre o possível comprometimento do grau de confiança dos testes rápidos de deteção de antigénio usados, que pode ter surgido pela utilização de sangue total, em vez do uso preferencial de soro sanguíneo (descrito nas recomendações do DFV® test Dirofilaria – Heartworm), por armazenamento incorreto dos testes ou por alguma anomalia presente nos próprios. Juntamente com o teste modificado de Knott, sendo este dependente do operador, e pelo uso de quantidades inferiores de amostra (0,5 ml, sendo a recomendada pelas *guidelines* de 1 ml) usada para observação, os resultados de prevalência de dirofilariose no concelho podem ser superiores aos obtidos.

A razão para o uso de 0,5 ml em vez da quantidade recomendada pelas diferentes *guidelines*, de 1 ml no teste modificado de Knott deveu-se à colheita. A colheita foi realizada

em condições de campo e nem sempre sobre as melhores condições de contenção e de segurança para os operadores, o que se traduziu numa colheita muitas vezes difícil de realizar. Foi sempre feita a colheita de 1 ml de sangue por animal, mas subtraindo a quantidade usada para o teste de imunocromatografia e presença de coágulos na amostra, a quantidade mínima usada que sobrou foi de 0,5 ml, tendo sido protocolada esta quantidade para uniformizar todas as amostras.

4.2. Inquérito *online*

Estudos que utilizam o auxílio de ferramentas como inquéritos *online* são de extrema importância para avaliar o grau de conhecimento tanto dos tutores como dos médicos veterinários. Um exemplo do uso desta ferramenta pode ser revista no estudo de Genchi e colaboradores (2019), onde questionaram médicos veterinários por toda Itália sobre a dirofilariose com o objetivo de compreender melhor a prática atual nas clínicas e hospitais veterinários de animais de companhia. Concluindo que o diagnóstico nem sempre é realizado de acordo com as recomendações propostas pelas *guidelines* atuais, fazendo deste estudo, um ótimo ponto de partida para o desenvolvimento de diretrizes mais claras propostas pelas sociedades científicas.

Dos animais avaliados através dos inquéritos *online* pelo território nacional neste estudo, 52% apresenta pelagem curta, sendo esta caraterizada como a mais suscetível em infeções através de vetores. Estando a dirofilariose caracterizada como uma doença transmitida por vetores, esta percentagem elevada pode ser um fator de risco para uma maior suscetibilidade da população de cães à infeção no território nacional.

Relativamente à movimentação dos animais, 55,29% dos tutores afirmaram realizar deslocações com os seus animais pelo território nacional ou internacional para além do seu concelho. Este valor representa mais de metade da população, levando assim a um maior risco de transmissão da doença. Cuidados na prática de transporte e realojamento devem ser implementados (Anexo 2).

Outro fator que também eleva o risco de infeção é o tipo de habitação que o animal tem. Uma habitação *outdoor* proporciona ao animal mais tempo de exposição aos vetores, aumentando assim a probabilidade de infeção. No inquérito realizado, 7,71% dos cães foram caracterizados com uma habitação *outdoor* e 41,57% mista, perfazendo assim uma percentagem total de 49,29%. As implicações que estes valores indicam são que praticamente metade dos

animais tem uma habitação no exterior, o que lhes proporciona um risco acrescido para infeção através de vetores.

Onde algo similar se verifica é no modo de passeio dos cães. Animais que passeiam com o auxílio de uma trela não se afastam tanto da zona onde o tutor se encontra; já o contrário se verifica em cães que não usam uma trela no passeio diário. Um animal que se afasta mais do tutor acaba por cobrir mais área percorrida, tornando-o mais suscetível ao risco de infeção. No inquérito 13,86% dos animais não passeavam com trela indicando o risco eminente desta população à infeção.

Do total da amostra, 15,43% dos animais não realizam passeios diários; deste grupo fazem parte os animais que têm habitação *outdoor, indoor* ou ambos. Tanto habitação mista como *outdoor* representam riscos de infeção superiores face à habitação exclusivamente *indoor*, sendo que neste último caso o animal não tem contacto com o exterior e portanto a probabilidade de contacto com um vetor infetante é menor.

Os tratamentos profiláticos são o pilar para a prevenção contra todas as doenças infeciosas, nomeadamente a dirofilariose. Nos inquéritos feitos não foram abordados questões sobre tratamentos profiláticos vacinais, foram exclusivamente abordadas questões sobre tratamentos profiláticos de desparasitação. Relativamente à desparasitação interna e externa, 96,14% dos tutores e 95,57%, respetivamente, afirmam realizá-la, sendo que a maioria em ambos casos a realiza com uma frequência de 3 em 3 meses. As elevadas percentagem obtidas de desparasitação são um bom sinal não só para a prevenção contra a dirofilariose como também para outras doenças parasitárias.

No final do inquérito foram abordadas questões específicas sobre dirofilariose nomeadamente o conhecimento da doença sendo que 56,14% dos inquiridos afirmou o ter. Embora existam variações sobre o grau de conhecimento nas diferentes regiões, existe uma crescente percentagem de conhecimento à medida que se progride em direção ao sul do país continental. Esta tendência faz sentido quando comparada com os valores de prevalências nas diferentes regiões, estando o sul com maiores prevalências que o norte do país. Foi também questionada a proveniência do conhecimento sobre a doença, estando o médico veterinário categorizado como a origem de conhecimento mais representativa sobre a doença, demonstrando desta forma a importância dos profissionais da área na comunicação e divulgação de informação sobre a dirofilariose. Outra questão apresentada foi o cumprimento de algum tratamento preventivo e pesquisa específica contra a dirofilariose, sendo que 31,71% dos tutores realizam algum tratamento preventivo e 17,57% efetuaram exames de diagnóstico específicos

para dirofilariose. Em ambas estas questões podemos mais uma vez afirmar que existe uma tendência crescente nas percentagens de tratamentos preventivos e pesquisa à medida que vamos descendo em direção ao sul do país, confirmando mais uma vez a relação que estes valores têm com os valores de prevalências nas diferentes regiões do país. Conclui-se deste modo a existência de uma maior preocupação por parte dos tutores de cães consoante os valores de prevalência da dirofilariose específicos de cada região.

Embora estes resultados possam ser extrapolados para a população nacional, é necessário uma interpretação com algum grau de cuidado. Existe uma sub-representação de algumas regiões do país, nomeadamente do Alentejo, Algarve e ilhas, comparativamente com as outras. A sub-representação destas regiões, consideradas como endémicas para a dirofilariose em Portugal, pode alterar significativamente alguns dos valores obtidos pelo inquérito. Outro tópico que pode gerar algum erro na interpretação dos resultados é o facto de o inquérito ser dirigido a apenas um só animal, sendo assim possível a realização de vários inquéritos por um só tutor.

5. Conclusão

Embora Portugal esteja caracterizado como território endémico para a dirofilariose segundo vários estudo recentes, de acordo com Alho e colaboradores (2014) e Vieira e colaboradores (2015), comparativamente aos resultados obtidos neste estudo, é possível afirmar que embora não possamos classificar o concelho de Leiria como livre de dirofilariose, também não está correto caracterizar esta região como endémica.

Como afirma Alho e colaboradores (2014), estudos epidemiológicos como este são de extrema relevância não apenas para determinar a prevalência de infeção em determinada região, mas também para monitorização, estabelecimento de medidas de orientação aos tutores e de profilaxia da doença. A elaboração de bases de dados com fundamento nas informações retiradas destes estudos são importantes para a criação de mapas de risco associado e análise de tendências da doença, tornando-se assim uma mais-valia tanto para a área de saúde humana como veterinária.

Em estudos futuros, seria interessante aumentar o número da amostra para a determinação de fatores de risco na região, impossibilitado neste estudo pelo baixo número de animais positivos diagnosticados para a dirofilariose. Outra questão pertinente, não tida em consideração neste estudo, seria a caracterização climática do concelho de Leiria e estudo da

distribuição de vetores competentes, tendo sido o clima identificado segundo Morchón e colaboradores (2022) como um dos fatores de risco mais importantes na distribuição de vetores competentes pela Europa.

Dado o risco de dirofilariose e a complexidade da interação entre os seus intervenientes, é de extrema importância a implementação de medidas preventivas, divulgação de conhecimento e educação, tanto da população como dos profissionais de saúde veterinária que devem manter-se atualizados. Este sistema encontra-se em conformidade com o conceito de One Health, sendo abordado no estudo de Pupić-Bakrač e colaboradores (2021), que visa atingir resultados ótimos na saúde tendo em conta as interações entre o Homem, animais, plantas e o meio-ambiente.

Adicionalmente com a informação colhida através dos inquéritos *online*, foi possível determinar a importância do médico veterinário na comunicação e divulgação de informação sobre a dirofilariose, tornando-o assim no pilar principal para a sua prevenção, indo em concordância com as afirmações feitas segundo Noack e colaboradores (2021), onde salienta a importância do médico veterinário no cumprimento do tratamento profilático dos animais contra a dirofilariose, retardando deste modo o aparecimento de populações de *D. immitis* resistentes aos fármacos.

6. Referências bibliográficas

Alho, A. M., Landum, M., Ferreira, C., Meireles, J., Goncalves, L., de Carvalho, L. M., & Belo, S. (2014). Prevalence and seasonal variations of canine dirofilariosis in Portugal. Veterinary Parasitology, 206(1-2), 99-105.

Alho, A. M., Meireles, J., Belo, S., & Carvalho, L. D. (2014). Dirofilariose canina e felina, uma parasitose em evolução (I)–etiologia, biologia e epidemiologia. Clínica Animal, 2(1), 20-25.

American Heartworm Society (AHS). (2018). Current canine guidelines for the prevention, diagnosis and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs (Revised 2018). Acedido em 1 Maio 2022 em: https://d3ft8sckhnqim2.cloudfront.net/images/pdf/AHS_Canine_Guidelines_11_13_20.pdf?1605556516

Ames, M. K., & Atkins, C. E. (2020). Treatment of dogs with severe heartworm disease. Veterinary Parasitology, 283, 109131.

Anvari, D., Narouei, E., Daryani, A., Sarvi, S., Moosazadeh, M., Hezarjaribi, H. Z., ... & Gholami, S. (2020). The global status of *Dirofilaria immitis* in dogs: a systematic review and meta-analysis based on published articles. Research in veterinary science, 131, 104-116.

Araujo, A. M. (1996). Canine and human *Dirofilaria immitis* infections in Portugal. A review. Parassitologia, 38(Suppl. 1–2), 366.

Ballesteros, C., Pulaski, C. N., Bourguinat, C., Keller, K., Prichard, R. K., & Geary, T. G. (2018). Clinical validation of molecular markers of macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, 8(3), 596-606.

Bourguinat, C., Lee, A. C., Lizundia, R., Blagburn, B. L., Liotta, J. L., Kraus, M. S., ... & Prichard, R. K. (2015). Macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*: failure of

heartworm preventives and investigation of genetic markers for resistance. Veterinary parasitology, 210(3-4), 167-178.

Burton, K. W., Liu, J., Drexel, J. P., Pulaski, C., Heartsill, S., & Dupuy, C. (2020). Comparative evaluation of field samples using 2 in-clinic assays for heartworm antigen detection in dogs. Veterinary Parasitology, 283, 109163.

Capelli, G., Genchi, C., Baneth, G., Bourdeau, P., Brianti, E., Cardoso, L., ... & Silaghi, C. (2018). Recent advances on *Dirofilaria repens* in dogs and humans in Europe. Parasites & Vectors, 11(1), 1-21.

Cardoso, L., Mendão, C., & Madeira de Carvalho, L. (2012). Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal-a national serological study. Parasites & vectors, 5(1), 1-9.

Carretón Gomez, E., Montoya Alonso, J. A., Falcón Cordón, Y., Falcón Cordón, S., Diosdado, A., Gómez, P. J., ... & Morchon Garcia, R. (2017). Sintomatología, diagnóstico, tratamiento y control de la dirofilariosis cardiopulmonar. Argos (Zaragoza).

Carretón, E., Costa-Rodríguez, N., Falcón-Cordón, Y., Morchón, R., Montoya-Alonso, J.A. (2022). New biomarkers in heartworm disease. Comunicação oral apresentada na 7th European Dirofilaria and Angiostrongylus days, Madrid, Espanha.

Carretón, E., Morchón, R., Falcón-Cordón, Y., Falcón-Cordón, S., Matos, J. I., & Montoya-Alonso, J. A. (2020). Evaluation of different dosages of doxycycline during the adulticide treatment of heartworm (*Dirofilaria immitis*) in dogs. Veterinary Parasitology, 283, 109141.

Catcott, E.J. (1979). Dirofilariasis. In: Canine Medicine. Catcott, E.J. (Ed.) America Veterinary Publication, Inc.

Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Dirofilariasis (revisto Junho 27 de 2019). Acedido em 16 Julho 2022 em: https://www.cdc.gov/parasites/dirofilariasis/biology.html

Companion Animal Parasite Council (CAPC). Guidelines Heartworm (revisto Julho 28 de 2020). Acedido em 3 Outubro 2022 em: https://capcvet.org/guidelines/heartworm/

Costa-Rodríguez, N., Matos, J.I., Falcón-Cordón Y., Morchón, R., García-Rodríguez S.N., Montoya-Alonso, J.A., Carretón E. (2022). Measurement of cortisol ind dogs infected by *Dirofilaria immitis*. Comunicação oral apresentada na 7th European Dirofilaria and Angiostrongylus days, Madrid, Espanha.

Diakou, A., & Prichard, R. K. (2021). Concern for *Dirofilaria immitis* and macrocyclic lactone loss of efficacy: current situation in the USA and Europe, and future scenarios. Pathogens, 10(10), 1323.

Dumitrache, M. O., D'Amico, G., Voiniţchi, E., Maximenco, S., Mircean, V., & Ionică, A. M. (2021). An epidemiological survey of *Dirofilaria* spp. and *Acanthocheilonema* spp. in dogs from the Republic of Moldova. Parasites & Vectors, 14(1), 1-7.

European Scientific Counsel Companion Animal Parasites (ESCCAP). Controlo f vetor-borne diseases in dogs and cats (revised 2019). Acedido 6 Julho 2022 em: https://www.esccap.org/uploads/docs/yhwdhifq_0775_ESCCAP_Guideline_GL5_v10_1p.pdf

European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis (ESDA). Guidelines for clinical management human Dirofilaria infections (revised 2017 a). Acedido em 6 Julho 2022 em: https://www.esda.vet/media/attachments/2021/08/19/human-dirofilaria-infections.pdf

European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis (ESDA). Guidelines for clinical management of canine heartworm disease (revised 2017 b). Acedido em 6 Julho 2022 em: https://www.esda.vet/media/attachments/2021/08/19/canine-heartworm-disease.pdf

European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis (ESDA). Guidelines for clinical management of feline heartworm disease (revised 2017 c). Acedido em 6 Julho 2022 em: https://www.esda.vet/media/attachments/2021/08/19/feline-heartworm-disease.pdf

European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis (ESDA). Guidelines for clinical management of subcutaneous dirofilariosis in dogs and cats (revised 2017 d). Acedido em 6 Julho 2022 em: https://www.esda.vet/media/attachments/2021/08/19/subcutaneous-dirofilariosis-dogs-cats.pdf

Fontes-Sousa, A. P., Silvestre-Ferreira, A. C., Carretón, E., Esteves-Guimarães, J., Maia-Rocha, C., Oliveira, P., ... & Montoya-Alonso, J. A. (2019). Exposure of humans to the zoonotic nematode *Dirofilaria immitis* in Northern Portugal. Epidemiology & Infection, 147.

Fuehrer, H. P., Auer, H., Leschnik, M., Silbermayr, K., Duscher, G., & Joachim, A. (2016). Dirofilaria in humans, dogs, and vectors in Austria (1978–2014)—From imported pathogens to the endemicity of *Dirofilaria repens*. PLoS neglected tropical diseases, 10(5), e0004547.

Genchi, C., & Kramer, L. (2017). Subcutaneous dirofilariosis (*Dirofilaria repens*): an infection spreading throughout the old world. Parasites & Vectors, 10(2), 1-6.

Genchi, M., Rinaldi, L., Venco, L., Cringoli, G., Vismarra, A., & Kramer, L. (2019). *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat: a questionnaire study in Italy. Veterinary parasitology, 267, 26-31.

Genchi, C., & Kramer, L. H. (2020). The prevalence of *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in the Old World. Veterinary parasitology, 280, 108995.

Genchi, M., Ciuca, L., Vismarra, A., Ciccone, E., Cringoli, G., Kramer, L., & Rinaldi, L. (2021). Evaluation of alternative reagents on the performance of the modified Knott's test. Veterinary Parasitology, 298, 109555.

Grieve, R. B., & Lauria, S. (1983). Periodicity of *Dirofilaria immitis* microfilariae in canine and murine hosts. Acta tropica, 40(2), 121-127.

Ionică, A. M., Matei, I. A., D'Amico, G., Bel, L. V., Dumitrache, M. O., Modrý, D., & Mihalca, A. D. (2017). *Dirofilaria immitis* and *D. repens* show circadian co-periodicity in naturally co-infected dogs. Parasites & vectors, 10(1), 1-6.

Jacobson, L. S., Ward, K. A., Lacaden, A. B., & Hornak, T. A. (2020). Prevalence of heartworm in relocated, local and outreach clinic dogs: A Canadian sheltering perspective. Veterinary Parasitology, 283, 109081.

Landum, M., Ferreira, C. C., Calado, M., Alho, A. M., Maurício, I. L., Meireles, J. S., ... & Belo, S. (2014). Detection of *Wolbachia* in Dirofilaria infected dogs in Portugal. Veterinary parasitology, 204(3-4), 407-410.

Latrofa, M. S., Dantas-Torres, F., Annoscia, G., Genchi, M., Traversa, D., & Otranto, D. (2012). A duplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection of and differentiation between *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in dogs and mosquitoes. Veterinary parasitology, 185(2-4), 181-185.

Maerz, I. (2020). Clinical and diagnostic imaging findings in 37 rescued dogs with heartworm disease in Germany. Veterinary Parasitology, 283, 109156.

Manzocchi, S., Lendner, M., Piseddu, E., Sebastiani, V., Morabito, S., Daugschies, A., & Pantchev, N. (2017). Nodular presentation of *Dirofilaria repens* infection in a cat mimicking a fibrosarcoma. Veterinary clinical pathology, 46(1), 158-163.

Matos Rivero, J. I., Carretón Gómez, E., Costa Rodríguez, N., Montoya Alonso, J. A., Falcón Cordón, Y., & Falcón Cordón, S. (2020). Influence of feline cardiopulmonary dirofilariasis in the development of human atopic diseases.

Meireles, J., Paulos, F., & Serrão, I. (2014). Dirofilariose canina e felina. Revista portuguesa de ciências veterinárias, 109, 70-78.

Montoya-Alonso, J. A., Carretón, E., Morchón, R., Silveira-Viera, L., Falcón, Y., & Simón, F. (2016). The impact of the climate on the epidemiology of *Dirofilaria immitis* in the pet population of the Canary Islands. Veterinary Parasitology, 216, 66-71.

Montoya-Alonso, J. A., Morchón, R., Costa-Rodríguez, N., Matos, J. I., Falcón-Cordón, Y., & Carretón, E. (2020 a). Current distribution of selected vector-borne diseases in dogs in Spain. Frontiers in Veterinary Science, 840.

Montoya-Alonso, J. A., Morchón, R., Falcón-Cordón, Y., Falcón-Cordón, S., Simón, F., & Carretón, E. (2017). Prevalence of heartworm in dogs and cats of Madrid, Spain. Parasites & Vectors, 10(1), 1-6.

Montoya-Alonso, J. A., Morchón, R., Matos, J. I., Falcón-Cordón, Y., Costa-Rodriguez, N., & Carretón, E. (2020 b). *Dirofilaria immitis* could be a risk factor for the development of allergic diseases in humans. Animals, 10(10), 1847.

Morchón, R., Carretón, E., González-Miguel, J., & Mellado-Hernández, I. (2012). Heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) and their vectors in Europe–new distribution trends. Frontiers in physiology, 3, 196.

Morchón, R., Montoya-Alonso, J. A., Rodríguez-Escolar, I., & Carretón, E. (2022). What Has Happened to Heartworm Disease in Europe in the Last 10 Years?. Pathogens, 11(9), 1042.

Noack, S., Harrington, J., Carithers, D. S., Kaminsky, R., & Selzer, P. M. (2021). Heartworm disease–Overview, intervention, and industry perspective. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, 16, 65-89.

Paes-de-Almeida, E. C., Ferreira, A. M. R., Labarthe, N. V., Caldas, M. L. R., & McCall, J. W. (2003). Kidney ultrastructural lesions in dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). Veterinary parasitology, 113(2), 157-168.

Park, D., Bowles, J., McKenzie, B., Narayanan, H. V., Prakash, M., Blagburn, B., ... & Zohdy, S. (2020). An investigation of *Dirofilaria immitis* infection and its effects on mosquito wingbeat frequencies. Veterinary Parasitology, 283, 109112.

Pennisi, M. G., Tasker, S., Hartmann, K., Belák, S., Addie, D., Boucraut-Baralon, C., ... & Möstl, K. (2020). Dirofilarioses in cats: European guidelines from the ABCD on prevention and management. Journal of feline medicine and surgery, 22(5), 442-451.

Pupić-Bakrač, A., Pupić-Bakrač, J., Beck, A., Jurković, D., Polkinghorne, A., & Beck, R. (2021). *Dirofilaria repens* microfilaremia in humans: Case description and literature review. One Health, 13, 100306.

Sanchez, J., Dharmarajan, G., George, M. M., Pulaski, C., Wolstenholme, A. J., Gilleard, J. S., & Kaplan, R. M. (2020). Using population genetics to examine relationships of *Dirofilaria immitis* based on both macrocyclic lactone-resistance status and geography. Veterinary Parasitology, 283, 109125.

Silva, R. C. D., & Langoni, H. (2009). Dirofilariose: zoonose emergente negligenciada. Ciência Rural, 39, 1615-1624.

Simón, F., Siles-Lucas, M., Morchón, R., González-Miguel, J., Mellado, I., Carretón, E., & Montoya-Alonso, J. A. (2012). Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. Clinical microbiology reviews, 25(3), 507-544.

Slocombe, J. O. D. (1990). Heartworm in dogs in Canada in 1989. The Canadian Veterinary Journal, 31(7), 499.

Sonnberger, K., Fuehrer, H. P., Sonnberger, B. W., & Leschnik, M. (2021). The incidence of *Dirofilaria immitis* in shelter dogs and mosquitoes in Austria. Pathogens, 10(5), 550.

Tarello, W. (2011). Clinical aspects of dermatitis associated with *Dirofilaria repens* in pets: a review of 100 canine and 31 feline cases (1990–2010) and a report of a new clinic case imported from Italy to Dubai. Journal of Parasitology Research, 2011.

Tomazatos, A., Cadar, D., Török, E., Maranda, I., Horváth, C., Keresztes, L., ... & Lühken, R. (2018). Circulation of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in the Danube Delta Biosphere Reserve, Romania. Parasites & vectors, 11(1), 1-8.

Traversa, D., Di Cesare, A., & Conboy, G. (2010). Canine and feline cardiopulmonary parasitic nematodes in Europe: emerging and underestimated. Parasites & vectors, 3(1), 1-22.

Varloud, M., Chassain C., El Ouatik Y., Dupuis S., Crippa A. (2022). MyVBDmap, the real time way to map canine vector borne diseases. Comunicação oral apresentada na 7th European Dirofilaria and Angiostrongylus days, Madrid, Espanha.

Velasquez, L., Blagburn, B. L., Duncan-Decoq, R., Johnson, E. M., Allen, K. E., Meinkoth, J., ... & Little, S. E. (2014). Increased prevalence of *Dirofilaria immitis* antigen in canine samples after heat treatment. Veterinary Parasitology, 206(1-2), 67-70.

Venco, L., Genchi, C., & Simón, F. (2011). La filariosis cardiopulmonar (Dirofilaria immitis) en el perro. La filariosis en las especies domésticas y en el hombre. Barcelona, Spain: Merial Laboratorios, 19-60.

Vieira, A. L., Vieira, M. J., Oliveira, J. M., Simoes, A. R., Diez-Banos, P., & Gestal, J. (2014). Prevalence of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs of central Portugal. Parasite, 21.

Vieira, L., Silvestre-Ferreira, A. C., Fontes-Sousa, A. P., Balreira, A. C., Morchón, R., Carretón, E., ... & Montoya-Alonso, J. A. (2015). Seroprevalence of heartworm (*Dirofilaria immitis*) in feline and canine hosts from central and northern Portugal. Journal of helminthology, 89(5), 625-629.

Worsley-Tonks, K. E., Gehrt, S. D., Anchor, C., Escobar, L. E., & Craft, M. E. (2021). Infection risk varies within urbanized landscapes: the case of coyotes and heartworm. Parasites & vectors, 14(1), 1-13.

7. Anexos e apêndices

faculdade de medicina veterinária

UNIVERSIDADE LUSÓFONA

Apêndice 2

Formulário de Consentimento

· Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona ·

Eu,_____,
detentor do animal de nome _____, espécie _____, raça _____, sexo _____, de idade (anos) ____, com o número de identificação eletrónica _____, aceito que o animal participe no projeto entitulado:_____
_____, sob a supervisão do médico veterinário _____.

Declaro ter sido informado dos seguintes pontos:

- Que a participação é voluntária podendo o animal ser retirado a qualquer momento.
- Fui elucidado sobre os procedimentos.
- Os resultados do projeto e material audiovisual podem ser divulgados e publicados sem menção do nome do detentor do animal, do animal e do seu número de identficação eletrónica.

Por estar de acordo, assino o presente consentimento informado.

_____, ____ de _____ de 20___

Assinatura do detentor:

_____

BI/CC n.º_____

Apêndice 1 – Formulário de consentimento.

Inquérito aos tutores:

Data _____/_____/_____ Amostra nº_____

Dados do Tutor(a) – facultativo

1. Nome: _____

2. Contacto telefónico: _____

3. Email: _____

Dados do animal:

1. Nome: _____

2. Idade: _____

3. Concelho: _____

4. Sexo:

M ( ) F ( )

5. Esterilizado / Castrado:

Sim ( ) Não( )

6. Raça: _____

7. Pelagem:

Curta ( ) Média ( ) Comprida ( ) Cor: _____

8. Presença de doença atual:

Sim ( ) Não ( ) Se sim, qual? : _____

9. Habitação:

Indoor ( ) Outdoor ( ) ( ) Ambas

10. Contacto com outros animais:

Sim ( ) Não ( ) Se sim, que animais? _____

12. Tipo de alimentação:

Caseira ( ) Comercial seca ( ) Comercial Húmida ( ) Carne ou vísceras cruas ou mal cozinhadas. De que animal? _____

13. Passeios diários:

Com trela ( ) Sem trela ( )

Zona urbana ( ) Parque canino ( ) Zona florestal ( ) Zonas de praias ( ) Zona de rios/lagos ( )

14. Deslocações do animal (viagens ou passeios):

Nenhuma ( )

Dentro do país ( ) Onde e Quando? _____

Fora do país ( ) Onde e Quando? _____

15. Desparasitação:

Interna: Sim ( ) Não ( )

Frequência: Mensal ( ) A cada 3 meses ( ) A cada 6 meses ( ) Anual ( )

Produto: _____

Externa: Sim ( ) Não ( )

Frequência: Mensal ( ) A cada 3 meses ( ) A cada 6 meses ( ) Anual ( )

Produto: _____

15. Prevenção contra dirofilariose: Sim ( ) Não ( )

16. O animal já foi sujeito à pesquisa de infeção de *Dirofilaria immitis*? Sim ( ) Não ( )

Apêndice 2 – Inquérito aos proprietários de cães pertencentes ao estudo de prevalência de Leiria.

Inquérito online

Este inquérito destina-se a qualquer tutor(a) de cão/cães para a realização de um estudo epidemiológico e de fatores de risco da Dirofilariose canina no território nacional.

A conclusão do questionário não requer o fornecimento de dados pessoais.

O questionário tem uma duração de 2 minutos.

Só as questões marcadas com "*" são obrigatórias para a conclusão do questionário.

Inquérito:

Data _____/_____/_____

Dados do Tutor(a):

1. Nome (Opcional): _____

2. Contacto telefónico (Opcional): _____

3. Email (Opcional):

_____

4. Concelho de Habitação *:

_____

Dados do animal:

1. Nome: _____

2. Idade *: _____

3. Sexo *:

M ( ) F ( )

4. Esterilizado / Castrado *:

Sim ( ) Não( )

5. Raça *: _____

6. Pelagem *:

Curta ( ) Média ( ) Comprida ( ) Cor *: _____

8. Habitação *:

Indoor ( ) Outdoor ( ) ( ) Ambas

9. Passeios diários *:

Com trela ( ) Sem trela ( ) Não realiza passeios ( )

10. Zona do passeio diário *:

Zona urbana ( ) Parque canino ( ) Zona florestal ( ) Zonas de praias ( ) Zona de rios/lagos ( ) Não realiza passeios ( )

11. Contacto com outros animais *:

Sim ( ) Não ( ) Se sim, que animais? _____

12. Deslocações do animal (viagens/passeios dentro e/ou fora do país) *:

Sim ( ) Não ( ) Se sim, indique onde e quando: _____

7. Presença de doença atual *:

Sim ( ) Não ( ) Se sim, qual? : _____

8. Desparasitação*:

Interna: Não ( ) Mensal ( ) A cada 3 meses ( ) A cada 6 meses ( ) Anual ( )

Externa: Não ( ) Mensal ( ) A cada 3 meses ( ) A cada 6 meses ( ) Anual ( )

9. Com que produto(s) realiza a desparasitação: _____

Dirofilariose é uma parasitose transmitida pelo "verme do coração" (*Dirofilaria immitis*) que afeta maioritariamente o cão, sendo que o gato e o humano também podem ser infetados.

10. Tinha conhecimento desta doença?* Sim ( ) Não ( )

11. Se sim, de onde o adquiriu?

Veterinário ( ) Internet ( ) Redes sociais (Instagram, Facebook, Youtube, etc) ( ) Outros tutores ( ) Junto ao criador, canil ou instituição de adoção ( ) Outros ( )

12. Realiza alguma prevenção contra a dirofilariose:* Sim ( ) Não ( )

13. O animal já foi sujeito à pesquisa de infeção de *Dirofilaria immitis*?* Sim ( ) Não ( )

Apêndice 3 – Inquérito *online* realizado através de Google Forms.

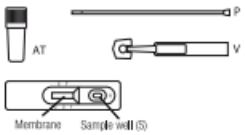
DFV® Test

Dirofilaria · Heartworm

EN

Immunochromatographic assay to detect specific antigens of *Dirofilaria immitis* in dog serum, plasma or whole blood samples.

Kit contents:
AT: Anticoagulant tube (EDTA)
P: Plastic pipette
V: Vial with buffer solution
Usage instructions
Test device inside an envelope

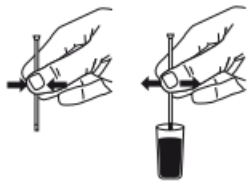


Storage of the kit:
Store kit at room temperature below 30 °C. No refrigeration needed. Do not freeze. Protect it from direct sunlight.
Store all components in the box. Do not open test device envelope until use.
Stored properly, the kit is stable at least until the expiration date.
Do not use the product if the envelope is torn or the membrane is stained or broken.

Sample collection and storage:
- Serum samples are recommended.
- Plasma or whole blood samples collected in the kit's AT tube or in an anticoagulant tube (citrate, heparin or EDTA) can also be used. Immediately after the sample is obtained, invert the tube 8-10 times without shaking to help the blood mix well with the anticoagulant.
- IMPORTANT NOTICE: Do not use blood without anticoagulant even if it is analyzed immediately after extraction. Do not use clotted or very hemolyzed samples. The presence of clots or hemolysis can interfere in the migration of the sample along the membrane or in the reading of the result.
- Serum, plasma and whole blood samples are stable for 4 hours at room temperature and for 2 days at 2-8 °C.
- Frozen serum and plasma can be stored for several months.

Sample and kit preparation:
- It is recommended to perform the test immediately after extraction.
- If the samples have been refrigerated or frozen, wait until they reach room temperature before performing the test.
- It is important for the kit and the sample to be at room temperature when performing the test.
- To start the test, open the envelope and place the device on a flat surface. Start the procedure immediately.
- **Do not move the device until test is completed.**

Procedure:
1. Press the central part of the pipette P, introduce it into the sample and take sample to the marked line (20 µl) by relieving the pressure.

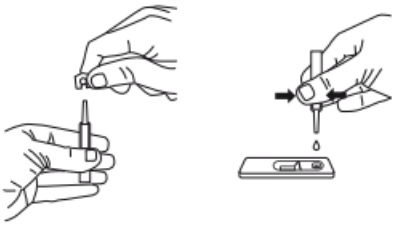


2. With the pipette in a vertical position, press again the central part of the pipette to drop its content into the sample well (S) and confirm that the membrane has absorbed the entire sample. Some samples may take longer to be absorbed depending on their viscosity.



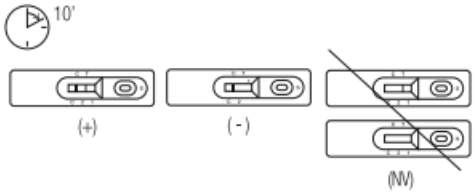


3. **Once the sample is absorbed,** drop all the content of the buffer solution vial into the sample well (S).



4. Read the results 10 minutes after the progress along the membrane is visible. **Test should be read only at 10 minutes. Earlier or later readings are not valid.**

Results reading
Positive (+): One pink band in test zone T and another in the control zone C. It is positive even if the colour bands are faint.
Negative (-): Only one pink band in control zone C.
Not Valid (NV): If there is no pink band in control zone C, the result is not valid and the test must be repeated with a new device.



Interpretation of the results
Although the DFV® Test Dirofilaria · Heartworm has high sensitivity and specificity, and the probability of false positive and false negative is very low, it should not be dismissed.
Dogs infested with the parasite usually have detectable levels of specific antigens.
The result of the test should be interpreted along with the clinical history of the dog, its epidemiology and other complementary assays according to the veterinarian's criteria.

Special precautions for the disposal of unused product or waste materials, if any:
Any unused product or waste materials should be disposed of in accordance with local requirements.

Divasa-Farmavic, S.A. (DFV®)
Ctra. Sant Hipòlit, km.71
08503 Gurb (Vic) Barcelona
Tel. 938 860 100
www.divasa-farmavic.com
e-mail: dfvatenciondiente@divasa-farmavic.com

Anexo 1 – Teste de ICT, DFV® test Dirofilaria – Heartworm



Minimizing Heartworm Transmission in Relocated Dogs

Transporting and relocating dogs is an increasingly common practice. Whether the situation is an owned pet accompanying emigrating or traveling caretakers, the relocation of homeless animals for adoption, or the movement of dogs for competition, exhibition, research or sale, this process carries the risk of spreading infectious diseases. This includes the transmission of Dirofilaria immitis when infected dogs have become microfilaremic.

The following practices will minimize the risk of heartworm transmission associated with the transportation and relocation of dogs:

1. Test all dogs greater than 6 months of age for microfilariae and heartworm antigen.

a. Testing should occur as close to the day of transport as possible but no longer than 30 days prior to relocation unless there is evidence of a negative antigen test along with continuous administration of a preventive leading up to the transport date.

b. If testing is not possible, assume transmission is possible and treat according to one of the options presented in Step 3bi. In keeping with antimicrobial stewardship practices, it is not recommended to administer doxycycline without confirmation of microfilaremia or antigenemia.

c. When transportation and relocation involve a change in ownership, all diagnostic test results (along with preventives and treatments administered where applicable) should be made available at the time of such transfer.

2. If dogs test positive for microfilariae or antigen, reconsider relocation at this time and begin treatment in accordance with the American Heartworm Society (AHS) Guidelines.

a. Dogs with clinical signs attributed to heartworm infection should not be transported.

b. Dogs that have been treated with melarsomine dihydrochloride should not be transported until at least a 4-week recovery period has elapsed so as not to exacerbate complications that may arise as a result of stress and physical exertion that may accompany the relocation process.

c. The AHS recognizes that large-scale animal relocation for adoption plays a critical role in non-lethal population control of companion animals in the United States and postponing or treating heartworm positive dogs may not be feasible for many source organizations. In these circumstances, responsible relocation (see Step 3) of heartworm positive dogs is encouraged to decrease reservoirs for community transmission and enhance individual animal welfare through appropriate management at the destination.

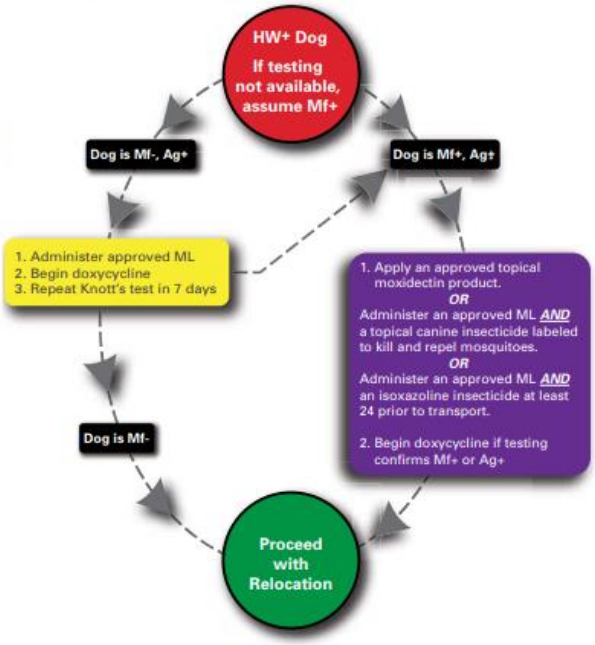
3. If dogs test positive and relocation cannot be postponed, clinical decisions should be based on the dog's heartworm status.

a. If Mf-, Ag+:

i. Administer an approved macrocyclic lactone product. *This should prevent the pre-patent dog from becoming microfilaria positive.*[1]

ii. Begin doxycycline therapy. *A 4-week course of doxycycline should prevent the pre-patent dog from becoming microfilaria positive.*[2, 3]

Note: *It is not recommended to give the first dose of doxycycline the day of transport in order to monitor for adverse effects and distinguish those from transport-related nausea and/or stress.*



Mf = Microfiliaria; Ag = Antigen; ML = Macrocyclic Lactone

iii. Repeat Knott's testing in 7 days; if negative, proceed with relocation. If positive, repeat Knott's testing in 7 days or proceed to Step 3.b.
Two negative tests 7 days apart can provide reasonable assurance of a lack of circulating microfilariae and reduced risk of transmission.

b. If Mf+, Ag- OR Mf+, Ag+:
i. Apply an approved moxidectin topical product, proceed with relocation.
A single dose of topical moxidectin prior to transport will eliminate most microfilariae.[4-6]

OR

i. Administer an approved macrocyclic lactone product along with a topical canine insecticide that is labelled to kill and repel mosquitoes.
This will prevent infection of mosquitoes and subsequent transmission of infective larvae during transportation and for 1 month thereafter.[7]

OR

i. Administer an approved macrocyclic lactone product along with a dose of an isoxazoline insecticidal product at least 24 hours prior to transport.
The isoxazoline will kill mosquitoes after they feed, preventing larval development to the infective stage; the duration of insecticidal activity varies based on specific product.[8-10]

ii. Begin doxycycline therapy.
Administration of a 4-week course of doxycycline will render microfilariae incapable of normal development to infective larvae in mosquitoes and subsequent development of these larvae in dogs.[11, 12]

Once heartworm-positive dogs have been safely transported, heartworm treatment should be completed according to AHS Guidelines as soon as possible.

4. If dogs test negative for microfilariae and antigen, proceed with relocation.

a. Administer macrocyclic lactone preventive drugs to dogs greater than 6 weeks of age prior to relocation.[1]

b. Repeat microfilariae and antigen testing in 6 months. If a history of preventive administration is well-documented, repeat testing in 12 months.[1]

Caring for dogs that undergo relocation is an everyday challenge veterinarians face in today's mobile society, and one that necessitates the adoption of approaches to mitigate heartworm transmission. Along with considering the recommendations in this document, veterinarians should ensure that transportation of animals is carried out in accordance with state and/or federal transportation regulations, as well as professional guidelines.[13, 14] In the case of organized homeless animal relocation programs, veterinarians should work with both source and destination organizations to establish protocols for minimizing transmission of infectious diseases, including heartworm disease.

ASSOCIATION OF SHELTER VETERINARIANS™

AMERICAN HEARTWORM SOCIETY™ EST. 1974

Resources

Heartworm Prevention Product Chart

Heartworm Disease Management (Association of Shelter Veterinarians Position Statement)

References

1. American Heartworm Society. Current Canine Guidelines for the Prevention, Management, and Diagnosis of Heartworm Infection in Dogs. Available online at: https://heartwormsociety.org/images/pdf/2014-AHS-Canine-Guidelines.pdf

2. Hoerauf A, Mand S, Fischer K, et al. Doxycycline as a novel strategy against bancroftian filariasis-depletion of *Wolbachia* endosymbionts from Wuchereria bancrofti and stop of microfilaria production. *Med Microbiol Immunol.* 2003; 192:211-216.

3. Rossi MID, Paiva J, Bendas A, et al. Effects of doxycycline on the endosymbiont Wolbachia in Dirofilaria immitis (Leidy, 1856)—Naturally infected dogs. *Vet Parasitol.* 2010; 174:119-123.

4. Bayer Healthcare LLC. Advantage Multi® Product Label. Available online at: https://bayer.naccvp.com/product/view/basic/1040052?u=bayer&p=dvm

5. Blagburn BL, Dillon AR, Arther RG, et al. Comparative efficacy of four commercially available heartworm preventive products against the MP3 laboratory strain of *Dirofilaria immitis*. *Vet Parasitol.* 2011; 176:189-194.

6. McCall JW, Arther R, Davis W, Settje T. Safety and efficacy of 10% imidacloprid + 2.5% moxidectin for the treatment of *Dirofilaria immitis* circulating microfilariae in experimentally infected dogs. *Vet Parasitol.* 2014; 206; 5-13.

7. McCall JW, Hodgkins E, Varloud M, et al. Blocking transmission from dogs to mosquitoes and from mosquitoes to dogs. In Proceedings, 2016 Triennial Symposium, American Heartworm Society.

8. Leibenberg J, Fourie J, Lebon W, et al. Assessment of the insecticidal activity of afoxolaner against Aedes aegypti in dogs treated with NexGard®. *Parasite.* 2017; 24: 39.

9. Jiang S, Tsikolia M, Bernier UR, et al. Mosquitocidal activity and mode of action of the isoxazoline fluralaner. *Int J Environ Res Public Health.* 2017; 14(2): 154.

10. Miglianico M, Eldering M, Slater, H, et al. Repurposing isoxazoline veterinary drugs for control of vector-borne human disease. *Proc Natl Acad Sci.* 2018; 115(2): E6920-26.

11. McCall JW, Genchi C, Kramer L, et al. Heartworm and Wolbachia: therapeutic implications. *Vet Parasitol.* 2008; 158:204-244.

12. McCall JW, Kramer L, Genchi C, et al. Effects of doxycycline on heartworm embryogenesis, transmission, circulating microfilaria, and adult worms in microfilaremic dogs. *Vet Parasitol.* 2014; 206(1-2):5-13.

13. American Veterinary Medical Association. Relocation of Dogs and Cats for Adoption: Best Practices. Available online at: https://www.avma.org/KB/Resources/Reference/AnimalWelfare/Documents/AVMA_BestPracticesAdoption_Brochure.pdf

14. Association of Shelter Veterinarians. Guidelines for Standards of Care in Animal Shelters. Available online at: http://www.sheltervet.org/assets/docs/shelter-standards-oct2011-wforward.pdf

Anexo 2 - Cuidados na prática de transporte e realojamento.