

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TESE

Aspectos epidemiológicos e análise geoespacial de *Dirofilaria immitis* e *Acanthocheilonema reconditum* em cães de municípios do Estado do Rio de Janeiro.

Thamires Rezende Araújo

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E ANÁLISE GEOESPACIAL DE *Dirofilaria immitis* E *Acanthocheilonema reconditum* EM CÃES DE MUNICÍPIOS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.

THAMIRES REZENDE ARAÚJO

Sob a Orientação do Professor

Dr. Carlos Luiz Massard

Coorientação dos Professores

Dr. Huarrisson Azevedo Santos

Dr.^a Patrícia Gonzaga Paulino

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora em Ciências** no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ

Agosto de 2024

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

AA658i
a Araujo , Thamires Rezende, 1992-
Aspectos epidemiológicos e análise geoespacial de
Dirofilaria immitis e Acanthocheilonema reconditum em
cães de municípios do Estado do Rio de Janeiro /
Thamires Rezende Araujo . - Valença, 2024.
67 f.: il.

Orientador: Carlos Luiz Massard.
Coorientador: Huarrisson Azevedo Santos .
Coorientadora: Patrícia Gonzaga Paulino.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Pós Graduação em Ciências Veterinárias
, 2024.

1. nematoides . 2. diagnóstico molecular. 3.
microfilaria . 4. Onchocercidae. I. Massard, Carlos
Luiz, 1947-, orient. II. Santos , Huarrisson Azevedo,
1980-, coorient. III. Paulino, Patrícia Gonzaga, 1990
, coorient. IV Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Pós Graduação em Ciências Veterinárias . V.
Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA N° 3487/2024 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

N° do Protocolo: 23083.043409/2024-29

Seropédica-RJ, 19 de agosto de 2024.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

THAMIRES REZENDE ARAÚJO

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora** em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM 19/08/2024

(Assinado digitalmente em 20/08/2024 11:19)

ANDRESA GUIMARAES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptMCV (12.28.01.00.00.00.53)
Matrícula: ###244#9

(Assinado digitalmente em 27/08/2024 11:39)

CARLOS LUIZ MASSARD
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matrícula: ###61#3

(Assinado digitalmente em 21/08/2024 00:02)

CLAUDIA BEZERRA DA SILVA
CHEFE DE DEPARTAMENTO
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matrícula: ###035#8

(Assinado digitalmente em 22/08/2024 12:47)

NATHALIE COSTA DA CUNHA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.207-##

(Assinado digitalmente em 20/08/2024 10:36)

WENDELL MARCELO DE SOUZA PERINOTTO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.188-##

*Hoje eu só vim agradecer por tudo que Deus me fez, quem me conhece sabe o que vivi e o que
passei, o tanto que ralei pra chegar até aqui, e cheguei, cheguei.
(Fé – Iza)*

Este trabalho é dedicado à minha avó, que mesmo em outro plano, está presente em meus pensamentos e em meu coração. Ela foi a força que eu precisava nos momentos em que fraquejei e cheguei a duvidar de que chegaria até aqui. Dedico também aos meus pais, minha força e minha base.

AGRADECIMENTOS

Não há como começar os agradecimentos senão agradecendo à Deus. Força suprema que nos guia, nos rege e nos faz ter forças para encarar as adversidades do caminho. Sem Ele e toda a espiritualidade amiga eu não estaria aqui, conquistando espaços e sendo melhor a cada dia.

Agradeço a minha família, em especial meus pais. Me deram a vida, a melhor educação, foram e sempre serão meus maiores exemplos e inspiração. Tenho orgulho de dizer que a filha dos “tios da van” agora se torna doutora.

Ao meu noivo, que me conheceu no meio da loucura da rotina do doutorado e resolveu entrar nesse barco e me ajudar a remar. Ter o seu apoio, incentivo e ouvir diariamente que eu iria conseguir foi fonte de muita motivação, ainda que ele nem saiba disso.

A minha amiga Nathália Senne, que nessa rotina foi mais do que uma amizade. Foi força, parceria de vida e de rotina do laboratório e, ainda a distância, foi ajuda, orientação, incentivo e escuta. Obrigada por tudo amiga! Acho que eu nunca conseguirei expressar em palavras o meu sentimento de gratidão.

Aos meus amigos Nelson, Pamella, Laís Feliciano, Laís Raphael, Carla e Karina. O dia a dia no laboratório, a rotina exaustiva, os problemas... Nada disso teria passado de forma leve se não fossem vocês para dividir o fardo. Obrigada por cada palavra de incentivo, por cada ajuda e/ou apenas companhia na hora de fazer uma extração, PCR, um gel ou apenas comer um bolinho e tomar um belo café. Vocês fizeram valer o “ninguém solta a mão de ninguém” até o fim. Vocês são para toda a vida.

A minha amiga Thassi, minha irmãzinha mais nova, que também segurou a minha mão, foi escuta e incentivo. Momentos de luta e de conquistas compartilhados com um bom lanchinho! Amo você.

Agradeço a minha coorientadora e amiga Patrícia Paulino, que além de coorientação também foi escuta. Obrigada por todo o auxílio nesses anos de Lasave, por me ensinar muito do que eu sei hoje.

Agradeço aos professores Carlos Massard e Huarrisson Azevedo, meus orientadores, por toda a oportunidade e ensinamentos ao longo desses anos de doutorado.

À Rural, minha casa por 12 anos. Um lugar que é mais do que uma universidade, que ao mesmo tempo em que vivemos o caos do dia a dia e da rotina também encontramos belas paisagens que nos trazem momentos de paz e alívio. Obrigada por tanto.

Por último e não menos importante, agradeço a Thamires de 2012, que ao pegar o resultado do SISU resolveu encarar os desafios de sair do interior e vir desbravar o desconhecido. A graduação não foi fácil, encarar um mestrado sem bolsa muito menos. Para completar, o doutorado durante uma pandemia. Resiliência, capacidade de se reinventar e seguir em frente. Uma construção diária ao longo de 12 anos distante de casa. Obrigada Thamires por todas as vezes que você quis desistir, mas chegou até aqui. Você conseguiu, nós conseguimos! A vitória é nossa! Ser cientista no Brasil não é fácil, mas ser mulher, cientista e doutora é vencer a muitas adversidades. É um orgulho enorme que vou carregar para sempre.

Agradeço ao Laboratório de Sanidade Avícola, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária, ao Instituto de Veterinária e a todos os professores e funcionários que fizeram parte da minha formação acadêmica.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

ARAÚJO, Thamires Rezende. **Aspectos epidemiológicos e análise geoespacial de *Dirofilaria immitis* e *Acanthocheilonema reconditum* em cães de municípios do Estado do Rio de Janeiro**. 73p. Tese (Doutor em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

RESUMO

Os nematódeos pertencentes às espécies *Dirofilaria immitis* e *Acanthocheilonema reconditum* são parasitos transmitidos por artrópodes, sendo os mosquitos da família Culicidae responsáveis por transmitir *D. immitis*, enquanto pulgas dos gêneros *Ctenocephalides* e *Pulex*, são os principais responsáveis por transmitir *A. reconditum*. Os principais hospedeiros acometidos por infecções causadas por estes parasitos são os cães. Os métodos de diagnóstico destes filarídeos baseiam-se na detecção das microfilárias no sangue periférico; porém a semelhança deste estágio evolutivo entre as duas espécies dificulta o diagnóstico preciso. Pelo fato de *D. immitis* ser relatado principalmente em regiões costeiras e apresentar relevância em saúde pública pelo caráter zoonótico, a detecção e análise epidemiológica diferencial entre *D. immitis* e *A. reconditum* auxiliam no entendimento da distribuição destes filarídeos e fornece subsídios para diagnósticos precisos e adequadas condutas clínicas. Sendo assim, este estudo teve por objetivo determinar a frequência, a distribuição espacial e os fatores epidemiológicos associados com a presença do DNA de *D. immitis* e *A. reconditum* em cães dos municípios do estado do Rio de Janeiro utilizando métodos moleculares. Para isso, foram coletadas 378 amostras de sangue de cães domiciliados nos municípios de Barra do Piraí, Paracambi, Petrópolis e Teresópolis, durante o período de novembro de 2018 a outubro de 2019. O DNA das amostras foi extraído com kit comercial e a detecção dos patógenos foi realizada através da técnica espécie-específica de PCR em tempo real (qPCR). Do total de amostras coletadas, cinco foram positivas para *D. immitis* e 40 para *A. reconditum*, obtendo-se uma prevalência geral de 1,32% (5/378) e 10,58% (40/378), respectivamente. Em Barra do Piraí, a frequência de *A. reconditum* foi de 7,4% (8/108) não sendo detectado *D. immitis*. Em Paracambi, a frequência obtida foi de 16,66% (15/90) para *A. reconditum* e 3,33% (3/90) para *D. immitis*, sendo detectado um caso de coinfeção entre as duas espécies. Em Petrópolis, a frequência obtida foi de 5,75% (5/87) para *A. reconditum* e 1,15% (1/87) para *D. immitis*. Já em Teresópolis, a frequência de *A. reconditum* foi de 8,60% (12/93), não sendo detectado *D. immitis*. Análises epidemiológicas foram realizadas a partir dos achados positivos para *A. reconditum* não sendo possível realizar para os achados de *D. immitis*, pois a frequência foi baixa. As análises epidemiológicas demonstraram correlação significativa com as variáveis presença de animais silvestres, sexo, presença de vegetação no peridomicílio e acesso ao pasto. A partir destes resultados observa-se então, que apesar da maior ocorrência destes patógenos serem descritas em regiões litorâneas, há presença destes também em regiões não endêmicas, possivelmente devido ao trânsito de animais e a presença do vetor nessas regiões. Ademais, a frequência de *A. reconditum* encontrada destaca a importância do diagnóstico diferencial a fim de evitar condutas clínicas equivocadas. Portanto, este estudo demonstra a ocorrência de *D. immitis* e *A. reconditum* em áreas consideradas não endêmicas, sendo necessário maiores investigações a respeito da diferenciação e distribuição destes filarídeos no Brasil.

Palavras-chave: nematódeos, diagnóstico molecular, microfilária, Onchocercidae.

ARAÚJO, Thamires Rezende. **Epidemiological aspects and Geospatial Analysis of *Dirofilaria immitis* and *Acanthocheilonema reconditum* in dog in municipalities of the State of Rio de Janeiro**. 73p. Thesis (Doctor of Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

ABSTRACT

Nematodes belonging to the species *Dirofilaria immitis* and *Acanthocheilonema reconditum* are arthropod-transmitted parasites, with mosquitoes from the Culicidae family responsible for transmitting *D. immitis*, while fleas of the genus *Ctenocephalides* and *Pulex*, along with the lice *Trichodectes canis* and *Heterodoxus spiniger*, are the main vectors for *A. reconditum*. Dogs are the primary hosts affected by infections caused by these parasites. Diagnostic methods for these filarioids are based on the detection of microfilariae in peripheral blood. However, the similarity of this evolutionary stage between the two species complicates accurate diagnosis. Due to the fact that *D. immitis* is mainly reported in coastal regions and holds public health significance due to its zoonotic nature, the detection and differential epidemiological analysis between *D. immitis* and *A. reconditum* contribute to understanding the distribution of these filarioids and provide insights for precise diagnostics and appropriate clinical management. Thus, this study aimed to determine the frequency, spatial distribution, and epidemiological factors associated with the presence of *D. immitis* and *A. reconditum* DNA in dogs in the municipalities of the state of Rio de Janeiro using molecular methods. For this purpose, 378 blood samples were collected from domiciled dogs in the municipalities of Barra do Piraí, Paracambi, Petrópolis, and Teresópolis, during the period from November 2018 to October 2019. DNA from the samples was extracted using a commercial kit, and pathogen detection was performed using species-specific qPCR. From the total of samples collected, five were positive for *D. immitis* and 40 were for *A. reconditum*, resulting in an overall prevalence of 1.32% (5/378) and 10.58% (40/378), respectively. In Barra do Piraí, the frequency of *A. reconditum* was 7.4% (8/108), with no detection of *D. immitis*. In Paracambi, the obtained frequency was 16.66% (15/90) for *A. reconditum* and 3.33% (3/90) for *D. immitis*, with one case of co-infection between the two species. In Petrópolis, the frequency was 5.75% (5/87) for *A. reconditum* and 1.15% (1/87) for *D. immitis*. In Teresópolis, the frequency of *A. reconditum* was 8.60% (12/93), with no detection of *D. immitis*. Epidemiological analyses were conducted based on positive findings for *A. reconditum*, as it was not possible to perform them for *D. immitis* due to the low frequency. The epidemiological analyses demonstrated a significant correlation with variables such as the presence of wild animals, gender, presence of vegetation in the peridomicile, and access to pasture. These results indicate that despite the higher occurrence of these pathogens being described in coastal regions, their presence is also noted in non-endemic areas, possibly due to the movement of animals and the presence of vectors in these regions. Furthermore, the

frequency of *A. reconditum* emphasizes the importance of differential diagnosis to avoid misguided clinical interventions. Therefore, this study demonstrates the occurrence of *Dirofilaria immitis* and *Acanthocheilonema reconditum* in areas considered non-endemic, warranting further investigations regarding the differentiation and distribution of these filarioids in Brazil.

Keywords: nematodes, molecular biology, microfilaria, Onchocercidae.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Análise bivariada de fatores intrínsecos e extrínsecos relacionados à positividade das amostras para o DNA de *Acanthocheilonema reconditum* nos municípios de Petrópolis, Teresópolis, Paracambi e Barra do Piraí no estado do Rio de Janeiro, Brasil..... 27
- Tabela 2.** Modelo de regressão logística dos fatores associados à positividade das amostras para *Acanthocheilonema reconditum* nos municípios do estado do Rio de Janeiro, Brasil..... 31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Distribuição geográfica de diferentes espécies <i>Dirofilaria immitis</i> e <i>Dirofilaria repens</i> em animais no mundo.....	3
Figura 2.	Representação esquemática do ciclo de <i>Dirofilaria immitis</i> e <i>Dirofilaria repens</i>	4
Figura 3.	Representação esquemática do ciclo de vida de <i>Acanthocheilonema reconditum</i>	5
Figura 4.	Representação clínica de granuloma causado por <i>Acanthocheilonema</i> spp. A: paciente. B: Imagem da massa subcutânea.....	6
Figura 5.	Tríade epidemiológica da dirofilariose.....	9
Figura 6.	Tríade epidemiológica da infecção por <i>Acanthocheilonema reconditum</i>	10
Figura 7.	Artéria pulmonar e ventrículo direito de um cão com helmintos adultos de <i>Dirofilaria immitis</i>	11
Figura 8.	Cortes histológicos mostrando área de comprometimento pulmonar causado por <i>Dirofilaria immitis</i> . A: Giemsa (100 X); B: Hematoxilina-eosina (160X); C: Tricômico de Masson, (200X).....	11
Figura 9.	Microfilaria de <i>Dirofilaria immitis</i> detectado pelo teste de Knott modificado. Objetiva de 40X em microscópio óptico.....	13
Figura 10.	Microfilaria de <i>Acanthocheilonema reconditum</i> (1) e <i>Dirofilaria immitis</i> (2) demonstrando a semelhança e a necessidade da perícia do observador.....	13
Figura 11.	Amplificação de DNA por PCR multiplex de amostras sanguíneas de cães positivos para <i>Dirofilaria</i> com diferentes cargas parasitárias. Faixa 1, carga alta de <i>D. immitis</i> (100.000 mf/ml); faixa 2, carga baixa de <i>D. immitis</i> (4 mf/ml); faixa 3, carga alta de <i>D. repens</i> (32.250 mf/ml); faixa 4, carga baixa de <i>D. repens</i> (4 mf/ml); faixa 5: infecção mista natural; faixa 6: controle positivo para <i>D. immitis</i> ; faixa 7: controle positivo para <i>D. repens</i> ; faixa 8: controle negativo.....	15
Figura 12.	Mapa de localização dos pontos de coletas. Canto esquerdo superior: mapa do Brasil; canto esquerdo inferior: mapa do estado do Rio de Janeiro. A direita: mapa dos municípios e os pontos de coleta.....	17

Figura 13.	Áreas rurais dos municípios e interior de domicílio de coleta: A – Paracambi; B – Barra do Pirai; C – Teresópolis; D – Petrópolis.....	18
Figura 14.	Áreas urbanas dos municípios e interior de domicílio de coleta: A – Barra do Pirai; B – Teresópolis; C – Paracambi; D – Petrópolis.....	19
Figura 15.	Curva padrão da reação de PCR para detecção de <i>Dirofilaria immitis</i> a partir de diluições seriadas de <i>amplicons</i> de PCR purificados.....	24
Figura 16.	Curva padrão da reação de PCR para detecção de <i>Acanthocheilonema reconditum</i> a partir de diluições seriadas de <i>amplicons</i> de PCR purificados.....	24
Figura 17.	Mapa do município de Paracambi evidenciando um ponto de coleta em que foi encontrado um cão co-positivo para <i>Dirofilaria immitis</i> e <i>Acanthocheilonema reconditum</i>	25
Figura 18.	Mapa de densidade Kernel demonstrando a distribuição de cães positivos na detecção do gene <i>Cox1</i> de <i>Dirofilaria immitis</i>	26
Figura 19.	Mapa de densidade Kernel demonstrando a distribuição de cães positivos na detecção do gene <i>Cox1</i> de <i>Acanthocheilonema reconditum</i>	26
Figura 20.	Representação gráfica do Receptor Operacional de Análises de curvas características (<i>Receiver Operating Characteristic - ROC</i>).....	32

LISTA DE ABREVIACÕES

UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
OMS	Organização Mundial da Saúde
DNA	Dexoyrubonucleic <i>acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
PCR	<i>Polymerase chain reacton</i> (Reação em cadeia da polimerase)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
PIB	Produto Interno Bruto
EDTA	<i>Ethylediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
<i>coxI</i>	Subunidade I do citocromo oxidase
MgCl₂	Cloreto de magnésio
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
TAE	Tris Acetate-EDTA
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Taxonomia de <i>Dirofilaria immitis</i> e <i>Acanthocheilonema reconditum</i>.....	3
2.2. Morfologia e ciclo de vida.....	4
2.2.1. <i>Dirofilaria immitis</i>	4
2.2.2. <i>Acanthocheilonema reconditum</i>	5
2.3. Hospedeiros.....	6
2.4. Vetores.....	6
2.4.1. Vetores de <i>Dirofilaria immitis</i>	7
2.4.2. Vetores de <i>Acanthocheilonema reconditum</i>	7
2.5. Epidemiologia.....	7
2.5.1. Dados epidemiológicos de <i>D. immitis</i>	7
2.5.2. Dados epidemiológicos de <i>A. reconditum</i>	9
2.6. Sinais clínicos.....	10
2.7. Métodos diagnósticos.....	12
2.7.1. <i>Biologia molecular aplicada ao diagnóstico das filariose</i> s.....	14
2.8. Tratamento.....	16
3. METODOLOGIA.....	17
3.1. Área de estudo.....	17
3.2. Amostragem.....	19
3.3. Questionário epidemiológico.....	20
3.4. Extração de DNA.....	20
3.5. Determinação do controle positivo e negativo.....	20
3.6. Detecção molecular de <i>Dirofilaria immitis</i> e <i>Acanthocheilonema reconditum</i>.....	20

3.7. Curva padrão e limite de detecção.....	21
3.7.1. <i>Dirofilaria immitis</i>	21
3.7.2. <i>Acanthocheilonema reconditum</i>	22
3.8. Análise estatística.....	22
3.9. Análise geospacial.....	23
3.10. Ética em pesquisa.....	23
4. RESULTADOS.....	24
4.1. Análise descritiva e espacial.....	24
4.2. Análise estatística.....	27
5. DISCUSSÃO.....	27
6. CONCLUSÃO.....	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
ANEXOS.....	44

1. INTRODUÇÃO

Cães podem ser infectados por diversos parasitos, sendo alguns deles transmitidos por artrópodes e se alojando na corrente sanguínea desses hospedeiros, onde ocorre parte do seu ciclo de vida. Além da corrente sanguínea, estes parasitos podem se instalar em diversos órgãos, principalmente no sistema gastrointestinal e cardiovascular (HAHN, 1999; ROCHA et al., 2018). Algumas filárias de importância médica veterinária acometem cães domésticos e podem ocorrer em diversas regiões do mundo, incluindo o Brasil (LABARTHE et al., 2014). São causadas por nematódeos pertencentes a família Onchocercidae, sendo as espécies *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* e *Acanthocheilonema reconditum* responsáveis pelo maior número de infecções nestes animais (RANI et al., 2010). Além destes, o nematódeo do gênero *Cercopithifilaria*, espécie *Cercopithifilaria baina* também pode infectar cães (SANTOS et al., 2018).

Dirofilaria immitis é uma filária transmitida por fêmeas de mosquitos dos gêneros *Culex*, *Aedes*, *Ochlerotatus* e *Anopheles* (SIMÓN et al., 2017). A manutenção de sua transmissão pode estar associada a diversos aspectos, dentre eles condições geográficas, climáticas, ação antrópica, densidade de cães e vetores (DE ANDRADE VIEIRA et al., 2022). As espécies do gênero *Acanthocheilonema* podem ser transmitidas por carrapatos, piolhos e pulgas. A espécie *A. reconditum* tem como principais vetores as pulgas das espécies *Ctenocephalides canis*, *Ctenocephalides felis felis* e *Pulex irritans* (NAPOLI et al., 2014).

As doenças causadas por microfilárias além de acometer cães, podem ocorrer em outros animais, como gatos, cavalos, animais silvestres e até mesmo humanos (RANI et al., 2010). Algumas microfilárias apresentam aspectos morfológicos semelhantes, diferenciados apenas por algumas características específicas (ROCHA et al., 2018). A semelhança morfológica é o que torna o diagnóstico diferencial das espécies ainda mais difícil (PEROBA et al., 2022). Os diagnósticos mais utilizados nas clínicas são esfregaços sanguíneos, que levam em consideração a habilidade do observador, o teste de Knott modificado, que detecta as microfilárias em amostra de sangue periférico dos animais e o teste imunológico 4Dx. O teste ELISA que detecta a presença de antígenos circulante das fêmeas adultas de *D. immitis* utilizando soro, plasma e sangue total e é comumente utilizado em laboratórios, em situações em que são realizados testes em lotes, por exemplo. Porém há uma problemática na utilização destes testes quanto à identificação das espécies, destacando então a necessidade de métodos diagnósticos espécie-específico, como a qPCR utilizando sondas, que permite um diagnóstico com uma menor quantidade de amostra, menos tempo e maior eficácia (NEGRON et al., 2022).

Infecções caninas, felinas e humanas por *D. immitis* são prevalentes em diversas regiões do mundo. Estudos relatam a presença de cães infectados em todos os países das Américas, sendo a única exceção o Chile (MAGGI; KRÄMER, 2019). A prevalência nesses países pode variar amplamente, principalmente em áreas com clima mais frio. Regiões de clima mais quente e regiões consideradas endêmicas podem apresentar prevalências altas, chegando à 70% (LEE et al., 2010; DANTAS-TORRES, 2008; LABARTHE; GUERRERO, 2005). Diversos estudos já demonstraram que a prevalência da infecção pode sofrer variações de acordo com fatores como clima, característica das populações estudadas, dentre outros fatores. No Brasil, considera-se que a prevalência seja de moderada à alta, principalmente em regiões quentes e úmidas (LABARTHE et al., 2003; FIGUEREDO et al., 2017). As infecções por *A. reconditum* são relatadas em diversos países da Europa e este nematódeo é considerado a principal filária que acomete cães no Mediterrâneo. Informações sobre a prevalência deste parasito são escassas,

sendo a maioria dos casos relatados associados a achados secundários em estudos epidemiológicos cujo alvo da pesquisa eram outros parasitos, como *D. immitis* e *D. repens* (PACIFICO et al., 2021).

A ocorrência e a epidemiologia de alguns filarídeos ainda é uma realidade pouco conhecida e, por isso, é importante que seja feita a identificação da espécie do agente etiológico, principalmente nas infecções que acometem os cães, levando a um diagnóstico assertivo (KANNEBERG et al., 2019). Dada a significativa relevância das filarioses como desencadeadoras de doenças em cães, esta pesquisa buscou determinar a prevalência e as características epidemiológicas em cães naturalmente infectados por *Dirofilaria immitis* e *Acanthocheilonema reconditum* nos municípios de Petrópolis, Teresópolis, Barra do Piraí e Paracambi, no estado do Rio de Janeiro. Para tanto, empregaram-se métodos moleculares como a qPCR na detecção desses agentes ou desses parasitos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Taxonomia de *Dirofilaria immitis* e *Acanthocheilonema reconditum*

A classificação sistemática atual do agente etiológico da espécie *Dirofilaria immitis*, causador da doença do verme coração nos cães, segundo Anderson (1992), é a seguinte: subclasse Secernentea, ordem Spirurida, subordem Spirurina, superfamília Filarioidea, família Onchocercidae, subfamília Dirofilarinae e gênero *Dirofilaria* (Leidy, 1856). As espécies desse gênero estão distribuídas em todo o mundo (Figura 1).

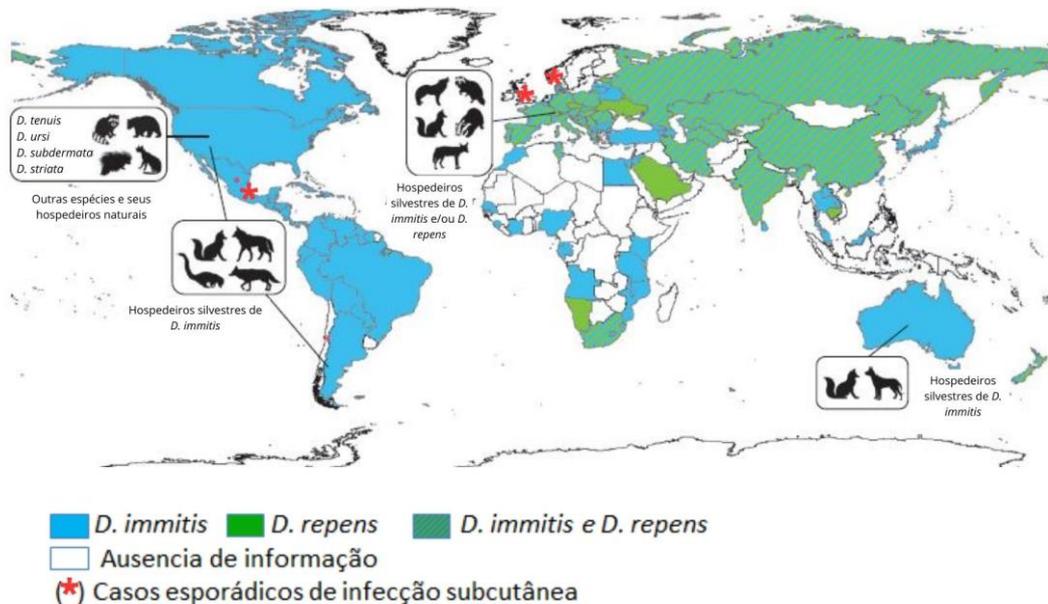


Figura 1. Distribuição geográfica das espécies *Dirofilaria immitis* e *Dirofilaria repens* em animais no mundo. Fonte: Simón et al. (2017) adaptado.

O primeiro caso conhecido de infecção de cães por vermes do coração é datado de 1626, quando o italiano F. Birago descreveu, em seu tratado sobre a caça, a presença de vermes do coração em um de seus cães. No entanto, apenas em 1847 que o veterinário do Alabama, T.C. Osborne, descreveu a presença de vermes do coração nos Estados Unidos, sendo considerado o primeiro relato deste parasito no continente americano. Três anos depois, o parasitologista J. Leidy descreveu os vermes do coração como *Filaria cordis canis* (Leidy, 1850). Ainda mais tarde, o mesmo pesquisador renomeou a espécie como *Filaria immitis* (Leidy, 1856). No Brasil, a espécie do parasito que acomete cães vem sendo estudada desde 1878, já as espécies que infectam seres humanos e felinos começaram a ser estudadas em 1887 e 1921, respectivamente. (DANTAS-TORRES & OTRANTO, 2020).

A espécie *Acanthocheilonema reconditum* é um helminto pertencente à classe Nematoda, ordem Spirurida, superfamília Filarioidea, família Onchocercidae, subfamília Onchocercinae, gênero *Acanthocheilonema* (MONTEIRO, 2011). *Acanthocheilonema reconditum* (syn. *Dipetalonema*) foi descrito pela primeira vez por Grassi em 1889. Em 1890, Grassi e Calandruccio definiram suas diferenças morfológicas com *D. immitis*, relatando detalhes sobre uma fêmea do verme; estes autores provaram que *A. reconditum* se desenvolve em pulgas (PACIFICO et al., 2021).

O gênero *Onchocerca* é atribuído à subfamília Onchocercinae, que também engloba os gêneros *Brugia*, *Wuchereria*, *Litomosoides* e *Acanthocheilonema*. O gênero *Dirofilaria* é classificado na subfamília Dirofilarinae (CASIRAGHI, 2001). A reconstrução filogenética de Xie et al., (1994) classifica o gênero *Onchocerca* como o grupo irmão do gênero *Dirofilaria*.

2.2. Morfologia e ciclo de vida

2.2.1. *Dirofilaria immitis*

Os parasitos machos adultos podem possuir 23cm de comprimento, enquanto as fêmeas adultas podem medir 30cm de comprimento. As microfírias medem 298 µm de comprimento e 7,3 µm de largura e possuem a extremidade anterior ovalada e a posterior reta (BRITO et al., 2001).

Estudos têm demonstrado que a bactéria *Wolbachia* realiza simbiose com *D. immitis* e desempenha um papel importante na patogenia na relação parasito hospedeiro (entre helmintos e cães) em infecções por *D. immitis*, bem como a sua importância como alvo no tratamento, devido a localização das bactérias em todos os estágios nos helmintos, podendo causar infertilidade em fêmeas e inibição nas mudas de L4 para L5 quando na ausência de *Wolbachia* (BANDI et al., 2001; MCHAFFIE, 2012).

O ciclo do parasito (Figura 2) pode ser dividido em quatro etapas: a infecção do mosquito vetor (I), o desenvolvimento do parasito no vetor (II), a transmissão do parasito para um hospedeiro vertebrado (III) e o desenvolvimento do parasito neste hospedeiro (IV) (ALMOSNY, 2002).

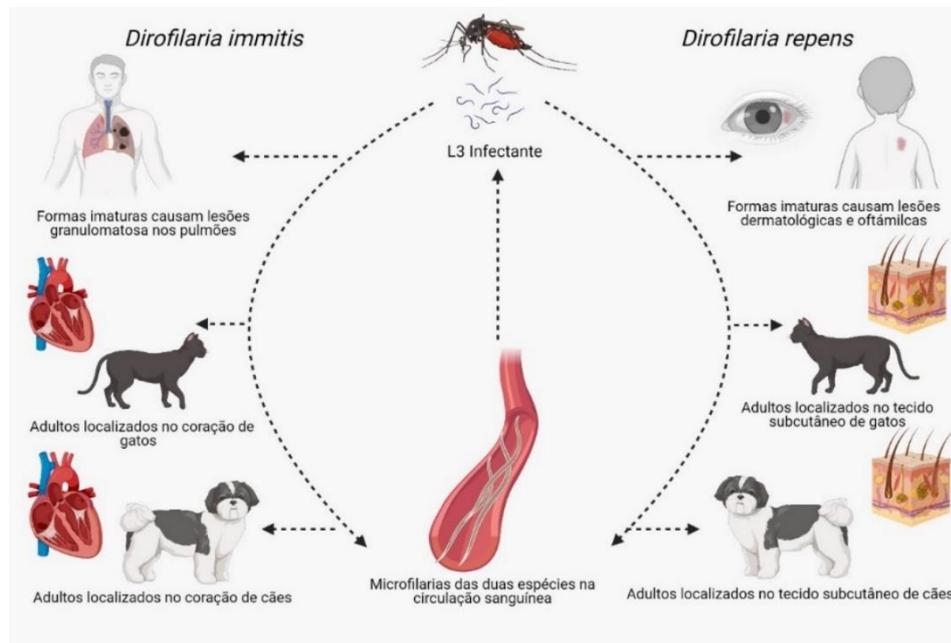


Figura 2. Representação esquemática do ciclo de vida de *Dirofilaria immitis* e *Dirofilaria repens*. Fonte: elaborado por Patrícia Paulino no BioRender.

Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do mosquito da família Culicidae se alimenta em um hospedeiro previamente infectado, ingerindo larvas de primeiro estágio (L1), conhecidas de microfírias. O mosquito atua como hospedeiro intermediário, em que as larvas L1 irão se

desenvolver, migrando do tórax para o aparelho bucal do inseto, passando por dois estádios (L2 e L3), em um período de duas a três semanas (ALMOSNY, 2002). Quando o mosquito infectado realiza um novo repasto sanguíneo, em um hospedeiro vertebrado susceptível, as larvas em estágio infectante (L3) são inoculadas junto com a saliva do mosquito, na corrente sanguínea do hospedeiro. As larvas migram da corrente sanguínea do hospedeiro para o tecido subcutâneo e muscular, onde realizam muda para o estágio L4, passando a serem denominadas jovens adultos. Este processo de muda leva em torno de três a quatro dias e em seguida invadem o sistema vascular. Cerca de 100 dias após a infecção, as larvas chegam ao coração, alojando-se no ventrículo direito e nas artérias pulmonares, realizando a última muda, para o estágio L5, atingindo maturidade sexual, para o acasalamento. O ciclo se completa com a liberação de novas microfilárias na corrente sanguínea do hospedeiro (NELSON; COUTO, 2006).

As microfilárias podem sobreviver até dois anos na corrente sanguínea do hospedeiro, o que geralmente garante uma microfilaremia elevada. No entanto, o número de microfilárias na circulação não tem correlação direta com o número de parasitos adultos que um mamífero pode albergar (ALMOSNY, 2002).

2.2.2. *Acanthocheilonema reconditum*

As microfilárias de *A. reconditum* possuem 249,2µm, mais ou menos 8,7 µm de comprimento e 4,4mm, mais ou menos 1,2 µm de largura. Além disso, apresentam extremidade anterior achatada e posterior em forma de gancho.

As microfilárias ingeridas durante o repasto sanguíneo dos hospedeiros intermediários se desenvolvem até larvas de terceiro estágio (L3) em um período de 7 a 14 dias. Quando inoculadas em um hospedeiro definitivo susceptível, se desenvolvem até o estágio adulto em dois a três meses (LINDEMAN et al., 1983) (Figura 3).

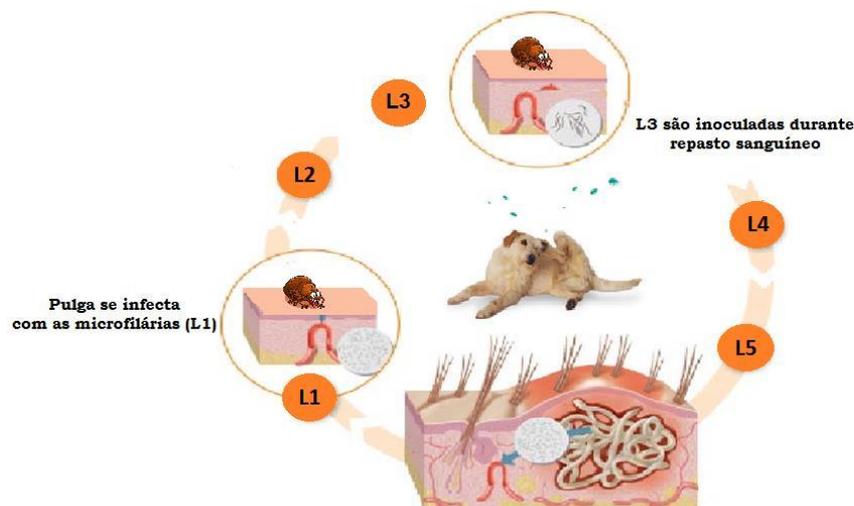


Figura 3. Representação esquemática do ciclo de vida de *Acanthocheilonema reconditum*. Fonte: Manual de identificação para Filariose Canina, 2020.

A invasão da pele por *A. reconditum* pode manifestar-se como pequenos nódulos subcutâneos (Figura 4). Essas manifestações raramente são dolorosas ou apresentam prurido e, no interior, ficam alojados os adultos e microfilárias do parasito (DAY, 2016).



Figura 4. Representação clínica de granuloma causado por *Acanthocheilonema* spp. A: paciente. B: Imagem da massa subcutânea (seta branca). Fonte: Palacios et al. (2022).

2.3. Hospedeiros

As doenças causadas por microfilárias acometem cães, mas podem ocorrer em outros animais, como gatos, cavalos, animais silvestres e até mesmo humanos (RANI et al., 2010).

Cães domésticos atuam como fonte de alimentação preferencial para muitos artrópodes vetores de agentes patogênicos, alguns dos quais podem apresentar potencial zoonótico (OTRANTO AND EBERHARD, 2011).

Dirofilaria immitis e *A. reconditum* são causadores de filarioses em cães e gatos, produzindo microfilárias que circulam no sangue de seus hospedeiros naturais. No Brasil, o percentual de cães microfilarêmicos e/ou portadores de formas adultas de *A. reconditum* é subestimado. Esse fato ocorre devido à escassa quantidade de publicações existentes a respeito do assunto, principalmente pelas infecções por esta microfilária serem pouco evidenciadas pelos médicos veterinários do país (LEITE et al., 2012).

Os caninos também são os hospedeiros definitivos de *Acanthocheilonema* spp. Os parasitos adultos dessa espécie se alojam no tecido subcutâneo e na fáscia, enquanto a espécie *Acanthocheilonema dracunculoides* tem predileção pela cavidade abdominal do animal (PALACIOS et al., 2022).

A importância clínica da infecção de cães por *A. reconditum* e *A. dracunculoides* reside no fato de ser diagnóstico diferencial para infecções por *D. immitis*. Os achados clínicos relacionados à infecção por esses parasitos no hospedeiro definitivo ainda são escassos, embora possa ser observado prurido em animais infectados por *A. reconditum* (BOBADE E OJEBUOBAH, 1981). Há relatos de que infecções causadas por *Acanthocheilonema* spp. apresentam algumas manifestações dermatológicas como eritema, pápulas, alopecia focal ou multifocal (LÓPEZ et al., 2012).

As infecções de cães por *D. immitis* são apresentadas em diversos relatos na literatura, principalmente sobre seu caráter patogênico e sua importância epidemiológica, podendo causar nos cães a doença conhecida dirofilariose (GOMES et al., 2012).

2.4. Vetores

2.4.1. Vetores de *Dirofilaria immitis*

Dirofilaria immitis é uma filária transmitida por mosquitos (Nematocera: Culicidae). A manutenção de sua transmissão pode estar associada às condições geográficas e climáticas, ação antrópica, densidade de cães susceptíveis e densidade de vetores (SIMÓN et al., 2017).

Uma grande quantidade de espécies de mosquitos é considerada hospedeiro intermediário e vetor competente para *D. immitis* em laboratório (McCALL et al., 2008). Os principais transmissores já estudados são culicídeos dos gêneros *Culex*, *Aedes*, *Ochlerotatus* e *Anopheles*. Espécies de mosquitos predominantemente silvestres já foram identificados como vetores de *D. immitis* em regiões costeiras do Estado do Rio de Janeiro (DE ANDRADE VIEIRA et al., 2022).

Mais de 70 espécies de mosquitos demonstraram ser capazes de desenvolver microfilárias de estágio L3 em condições experimentais, mas acredita-se que menos de uma dúzia dessas espécies sejam importantes vetores na natureza (SILAGHI et al., 2017; SPENCE BEAULIEU, 2020). No Brasil, infecções naturais com L3 foram detectadas em algumas espécies, dentre elas *Aedes scapularis*, *Aedes taeniorhynchus* e *Culex quinquefasciatus* (LABARTHE et al., 1998; SIMÓN et al., 2017).

Alguns critérios para a identificação de vetores foram propostos em estudo realizado por Ledesma e Harrington (2011), como: a detecção da forma L3 em mosquitos capturados na natureza; distribuição dos vetores em sobreposição às áreas de alta prevalência ou incidência da doença, a alimentação destes vetores na natureza, se eles se alimentavam de hospedeiros susceptíveis ou microfilarêmicos e até mesmo sua predileção alimentar, pois algumas espécies poderiam não se alimentar de cães, preferindo roedores e pássaros, sendo assim, considerados vetores ineficientes.

2.4.2. Vetores de *Acanthocheilonema reconditum*

Diferentes espécies de artrópodes foram sugeridas como vetores competentes para esta filária. Diversas espécies do gênero *Acanthocheilonema* são transmitidas por carrapatos, piolhos e pulgas. Entretanto a espécie *Acanthocheilonema reconditum* tem como principal vetores e hospedeiros intermediários as pulgas das espécies *Ctenocephalides canis*, *Ctenocephalides felis felis* e *Pulex irritans* e os piolhos malófagos (mastigadores) das espécies *Trichodectes canis* e *Heterodoxus spiniger* (BRIANTI et al., 2012; NAPOLI et al., 2014).

2.5. Epidemiologia

2.5.1. Dados epidemiológicos de *Dirofilaria immitis*

Dirofilaria immitis é um parasito zoonótico conhecido nas Américas por causar dirofilariose pulmonar nos seres humanos, com a maioria dos casos relatados nos Estados Unidos e no Brasil (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2013). As infecções em humanos, geralmente, são assintomáticas, mas, em alguns casos, pode ocorrer tosse, dor torácica, dispneia e problemas oculares em pessoas acometidas pelo parasito (OTRANTO; EBERHARD, 2011). No Brasil, já foi notificado um caso de dirofilariose pulmonar em um homem de 67 anos e outro de dirofilariose ocular em um jovem de 16 anos (DOLTRÁRIO et al., 2019; OTRANTO et al., 2011). O real impacto zoonótico deste parasito em humanos é subestimado, sendo a maioria dos casos de infecções por *D. immitis* diagnosticados ao acaso, em radiografias

computadorizadas do tórax, que normalmente são solicitados por outras razões (DANTAS-TORRES & OTRANTO, 2020).

Infecções caninas, felinas e humanas por *D. immitis* são prevalentes em toda a região do Mediterrâneo (CANCRINI et al., 2006), sendo endêmicas em países do extremo sul europeu, como Itália e Grécia, e do Sul como França, Espanha e Portugal. No entanto, nos últimos anos a ocorrência da doença migrou do Mediterrâneo para as áreas centrais da Europa, sendo encontrado em países como Alemanha, Áustria, República Tcheca, Eslováquia, Hungria, Polônia, Eslovênia e Suíça (FUEHRER et al., 2016; OTRANTO et al., 2013; GENCHI et al., 2009).

Esse parasito também está espalhado pela América do Sul, Central, Caribe e América do Norte. Pesquisas epidemiológicas relatam sua presença em cães de todos os países das Américas, com exceção do Chile e Uruguai (SIMÓN et al., 2012; MAGGI; KRÄMER., 2019). A prevalência da infecção nas Américas varia amplamente. Em áreas com clima mais frio, como Canadá, a prevalência é muito baixa, mas pode atingir 8,4% em cidades do sul do país. Nos Estados Unidos a prevalência pode variar de 1% a 12% em áreas consideradas não endêmicas, mas pode chegar a mais de 40% em áreas consideradas endêmicas (KLOTINS et al., 2000; LEE et al., 2010). No México a América do Sul a prevalência é extremamente alta, como 42% na Costa do Golfo México, 63,2% no Caribe e 74% na Argentina (DANTAS-TORRES, 2008; SIMÓN et al., 2012; LABARTHE; GUERRERO, 2005).

Muitos estudos indicam que a prevalência pode variar de acordo com fatores como clima e características das populações de cães estudados. No Brasil, a prevalência pode ser considerada de moderada à alta em regiões quentes e úmidas (LABARTHE et al., 2003; FIGUEREDO et al., 2017). Em um estudo realizado no estado do Amazonas, em que foram considerados dados obtidos a partir da detecção do DNA de *D. immitis*, a prevalência do parasito foi de 44% (SOARES et al., 2014). Um estudo realizado por Labarthe et al. (2014), em sequência ao estudo de Soares et al. (2014), sugere que a prevalência no Brasil é maior no nordeste (29,7%) quando comparada às regiões sudeste (26,3%) e sul (13,2%).

Diversos *hotspots* de transmissão de *D. immitis* já foram identificados nas regiões costeiras do Brasil. A prevalência nestas áreas apresenta uma tendência a ser mais alta, principalmente quando é considerado o local onde os cães dormem, como áreas abertas e fora das residências, onde os animais ficam mais expostos aos mosquitos e, em muitos casos, não são utilizados produtos que repelem o mosquito ou medicamentos que previnem o desenvolvimento do parasito (DANTAS-TORRES et al., 2020; LABARTHE et al., 2014). Um estudo realizado na área costeira de Pernambuco demonstrou que a incidência anual da infecção por *D. immitis* pode ser de 39,8%, o que significa que, a cada 100 cães que vivem nesta região, 40 deles serão infectados por *D. immitis* no período de um ano (DANTAS-TORRES et al., 2020; DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2020).

A prevalência da dirofilariose canina varia de acordo com sua tríade epidemiológica (Figura 5), que inclui a localização geográfica, a população de mosquitos, a população de cães sem tratamento e o número de animais microfilarêmicos. Além disso, outros fatores que contribuem para detecção de casos da doença são as técnicas de diagnóstico utilizadas, a idade, o estilo de vida e manejo dos animais. Alguns autores já relataram também uma correlação entre a idade mais elevada dos cães e a infecção (LABARTHE et al., 2014).

Sobre a incidência dos animais infectados, foram registrados muitos casos em áreas costeiras, devido à abundância de vetores. No Brasil, a doença já foi descrita em 15 focos hiperendêmicos e está presente em todas as regiões do país (LABARTHE et al., 2014).

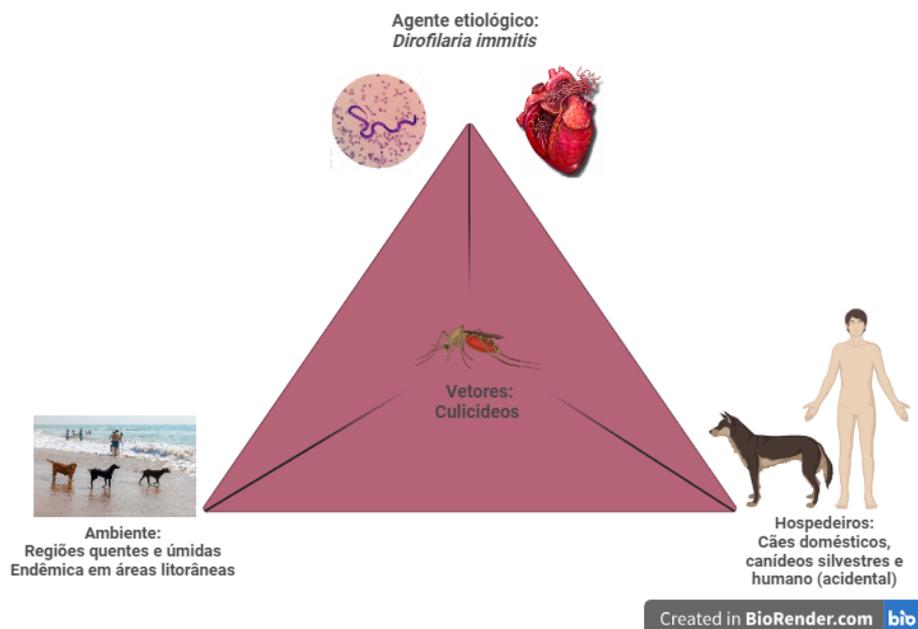


Figura 5. Tríade epidemiológica da dirofilariose. Fonte: elaborado no BioRender.

2.5.2. Dados epidemiológicos de *Acanthocheilonema reconditum*

Infecções por *Acanthocheilonema reconditum* são relatadas em vários países da Europa, e este nematódeo é considerado a principal espécie de filária que acomete cães na bacia do Mediterrâneo (PACIFICO et al., 2021). Otranto et al. (2013) relataram a presença deste parasito na Itália, Espanha, Alemanha, Áustria e Grécia. Tahir et al. (2019) descreveram infecções por *A. reconditum* e *A. dracunculoides* em cães e raposas no Oriente Médio e norte da África.

Informações sobre a prevalência deste parasito em cães na Europa são escassas; na maioria dos casos, sua ocorrência está relacionada a achados secundários em estudos epidemiológicos em que o objeto são outros parasitos, como *D. immitis* e *D. repens* (PACIFICO et al., 2021).

Na Itália a presença desse parasito foi confirmada por diferentes estudos em áreas do sul do país, registrando uma prevalência média de 7,7%. Nas áreas das regiões norte e central do país a prevalência reportada é baixa em torno de 0,8% (POTKONJAK et al., 2020). Em países do Mediterrâneo a presença do parasito foi descrita na Grécia, Chipre, Turquia, Espanha, Portugal e França. Diversos estudos realizados na Grécia apresentaram uma prevalência em torno de 2,5% do parasito no norte do país (DIAKOU et al., 2016). Na Espanha, focos de incidência foram registrados em uma zona no centro-norte do país, na província de Soria (15,8%) e nas Ilhas Canárias (20%) (PACIFICO et al., 2021).

Países da Europa Central, Suíça, Bélgica e Países Baixos não apresentam registros de *A. reconditum*, apesar de registros comprovados de outras espécies de filárias (DE BOSSCHERE; KINDERMANS, 2019). Na Europa Ocidental, *A. reconditum* foi notificado na Romênia (2,05%) (IONICA et al., 2015). Este parasito tem sido frequentemente relatado em cães e outros canídeos selvagens nas Américas, com estudos realizados nos Estados Unidos, Brasil, Chile e Costa Rica (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2020).

No Brasil, ainda é subestimado o percentual de cães portadores de formas adultas de *A. reconditum*, mesmo sendo o principal hospedeiro mamífero alocado na tríade epidemiológica da doença (Figura 6). No estado da Bahia, Barros et al. (1993) obtiveram positividade em 8 animais (1,6%) para microfilária, dentre as 500 amostras de sangue de cães avaliadas e

Fernandes et al. (1999) observaram positividade de apenas três animais (0,6%). Em estudo desenvolvido por Alves et al. (1999) em Recife, amostras sanguíneas de 611 cães foram avaliadas pelo teste de ELISA e pelo teste de Knott, identificando 42 amostras positivas (6,9%) de animais microfilarêmicos, sendo os machos os que apresentaram uma maior frequência de infecção. Neste estudo foram encontrados também, 14 cães que nos testes foram negativos, com presença de filárias no coração após realização de necrópsia. No estado do Paraná, Reifur et al. (2004) avaliaram 256 amostras de sangue de cães distribuídos na área litorânea deste estado. Os autores combinaram três técnicas neste estudo: a visualização direta (gota espessa), teste de Knott modificado e ELISA, evidenciando a presença de microfílarias de *A. reconditum* em 58 (22,6%) animais. Eles perceberam que o teste mais eficaz para a diferenciação das microfílarias dentre os estudados foi o Knott modificado. Ainda neste mesmo estado e com as mesmas técnicas de identificação, um estudo realizado por Leite et al. (2012), que avaliaram amostras de 422 cães, demonstrou presença de *A. reconditum* em 30 cães (7,10%).

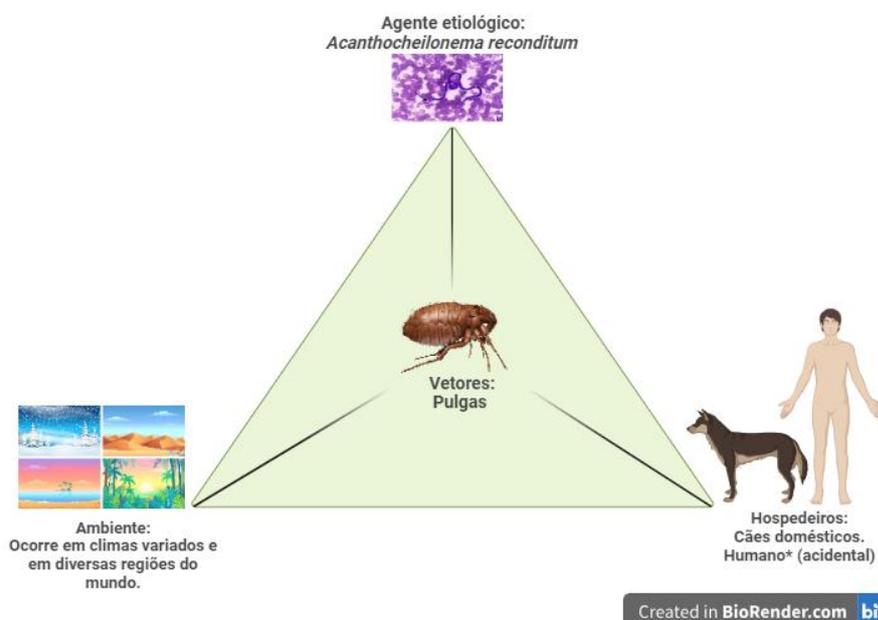


Figura 6. Tríade epidemiológica da infecção por *Acantocheilonema reconditum*. Fonte: elaborado no BioRender.

2.6. Sinais clínicos

Dirofilaria immitis se destaca como um dos endoparasitos mais significativos na saúde de cães, tanto do ponto de vista patológico quanto econômico, conhecida popularmente como verme do coração (NOACK, 2024). Nos cães, a doença é causada por parasitos adultos, que provocam patologia nas artérias pulmonares. Os canídeos atuam como hospedeiros definitivos, permitindo que a reprodução sexual ocorra nas artérias pulmonares e as microfílarias sejam liberadas no sistema circulatório (MCCALL et al., 2008b; BOWMAN & ATKINS, 2009; SELZER & EPE, 2021). A manifestação clinicopatológica da infecção por *D. immitis* nas artérias pulmonares, do lado direito do coração e veia cava pode incluir pneumonite, endarterite pulmonar, hipertensão pulmonar, tromboembolismo pulmonar, insuficiência cardíaca congestiva do lado direito e cor pulmonale (ABDULKADIR et al, 2024).

À medida que estas lesões se tornam graves, o ventrículo direito aumenta o tamanho fazendo com que o sistema circulatório perca sua capacidade de compensação, desencadeando uma

insuficiência cardíaca direita (Figura 7). Os animais infectados podem apresentar tosse crônica, dispneia, intolerância ao exercício e perda de peso (TRANCOSO et al., 2020). Essas alterações, eventualmente, culminam em um distúrbio multissistêmico que afeta o coração, pulmões, fígado e rins (KRAMER et al., 2005).

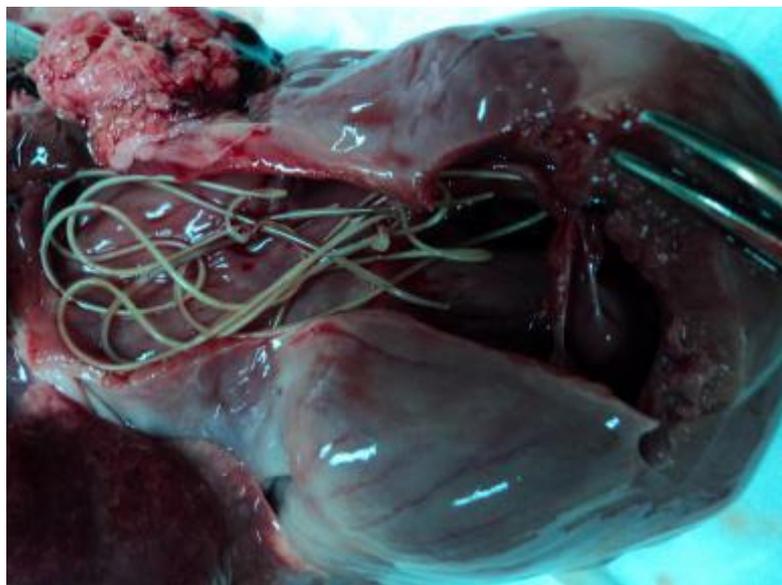


Figura 7. Artéria pulmonar e ventrículo direito de um cão com adultos de *Dirofilaria immitis*. Fonte: Vieira, 2016.

Em humanos, a infecção por *D. immitis* pode causar comprometimento do parênquima pulmonar. O parasito não completa o seu ciclo de vida e as formas imaturas do helminto morrem nos ramos das artérias pulmonares, formando lesões pulmonares (Figura 8) que, na maioria das vezes, são diagnosticadas de forma incorreta em radiografias, sendo confundidos com tumores pulmonares primários ou metastáticos (TRANCOSO et al., 2020).

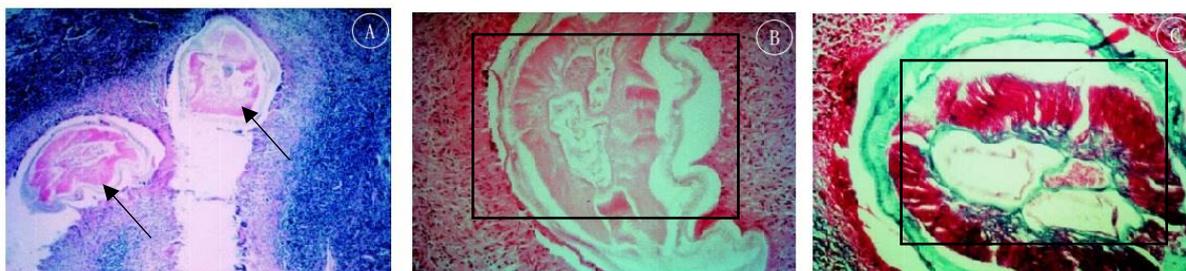


Figura 8. Cortes histológicos mostrando área de comprometimento pulmonar em humano causado por *Dirofilaria immitis*. A: Giemsa (100 X); B: Hematoxilina-eosina (160X); C: Tricômico de Masson, (200X). Fonte: Rodrigues-Silva et al., 2004.

Desde 1979, devido à importância desta parasitose, não apenas pelos danos que causa nos animais, mas também à população humana, e a íntima relação dos animais domésticos com o ser humano, a enfermidade passou a ser considerada uma zoonose pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (SILVA & LANGONI, 2009).

A patogenicidade de *A. reconditum* é um tema de interesse na medicina veterinária. A maioria dos autores classifica *A. reconditum* como um parasito apatogênico, ou seja, que não

causa danos significativos ao seu hospedeiro (MARTINS, 2019; ESPINOSA, 2022). No entanto, estudos recentes mostraram que *A. reconditum* pode causar a formação de nódulos cutâneos, os quais foram erroneamente associados à migração errática de *D. immitis* (ESPINOSA, 2022). Um estudo conduzido na Colômbia demonstrou que *A. reconditum* foi a espécie causadora mais frequente de surtos de filariose canina em Cali (Colômbia) durante 2018 e 2019, com uma alta frequência de associação com sinais hematológicos de anemia (ESPINOSA, 2022). Embora *A. reconditum* não seja conhecido por sua alta patogenicidade em cães, este estudo sugere uma associação significativa entre a presença deste parasito e anemia em cães, o que não é comumente relatado. O estudo também revelou que alguns cães com resultados positivos nos testes para a detecção do antígeno de *D. immitis* também testaram positivo para *A. reconditum* conforme o teste PCR-RFLP (ESPINOSA, 2022). O sequenciamento de Sanger foi realizado para esses casos, identificando-os como *A. reconditum* com alta percentagem de identidade. No entanto, mais pesquisas são necessárias para compreender completamente a patogenicidade deste parasita e suas implicações clínicas.

2.7. Métodos diagnósticos

São diversos os métodos clássicos utilizados para diagnóstico de microfilárias em cães. Em primeiro lugar, utiliza-se o teste Knott (NEWTON; WRIGHT, 1956), que detecta e identifica as microfilárias em amostra de sangue periférico dos animais, com o auxílio de um microscópio, baseado nas características e critérios morfológicos que estão sendo observados (Figura 9). Outros testes utilizados para a detecção de antígeno de filárias são os métodos imunológicos para detecção de antígenos, como o ensaio imunoenzimático (ELISA), que detecta a presença de antígenos circulantes das fêmeas adultas de *D. immitis* por meio da utilização de diferentes kits comerciais para soro, plasma e sangue total dos cães e a imunocromatografia, que são considerados altamente específicos e não apresentam reatividade cruzada com outros parasitos como *D. repens* e *Acanthocheilonema* spp. (MCCALL et al., 2008). É importante destacar que, ainda que o baixo número de anticorpos no início da infecção torna-se um fator desafiador, logo um diagnóstico negativo no teste ELISA não descarta a possibilidade do animal estar infectado (GENCHI et al., 2007). Há também a problemática de que, mesmo com alta sensibilidade, esses testes podem apresentar resultados falsos negativos (MCCALL et al., 2008).

Considerado padrão ouro por Ogawa (2013), a pesquisa de antígenos é considerada indispensável, específica e sensível no diagnóstico da parasitose pois permite um diagnóstico mais eficiente do que aqueles obtidos pela técnica de Knott modificada.



Figura 9. Microfilária de *Dirofilaria immitis* detectado pelo teste de Knott modificado. Objetiva de 40X em microscópio óptico. Fonte: LADPAR/BIOMOL.

A exatidão da identificação morfológica das microfilárias depende da perícia do observador (Figura 10). Outros testes diagnósticos, como a radiografia, ultrassonografia e a ecocardiografia, podem auxiliar os veterinários a chegarem em um diagnóstico mais assertivo, confirmando a infecção por nematoides do coração, para a determinação do prognóstico do paciente (ROJAS et al., 2015). Além destes métodos, também é possível a utilização da técnica de gota espessa e filtração em membrana de policarbonato. Técnicas de imuno-histoquímica também foram desenvolvidas com o objetivo de detectar formas ocultas da infecção por microfilárias (BROOKS, 2001). O imunodiagnóstico permite aos médicos veterinários diagnosticarem infecções amicrofilarêmicas, em decorrência do uso medicamentos microfilaricidas, que eliminam as microfilárias do sangue, ou por reações imunomediadas (LABERTHE et al., 1997).

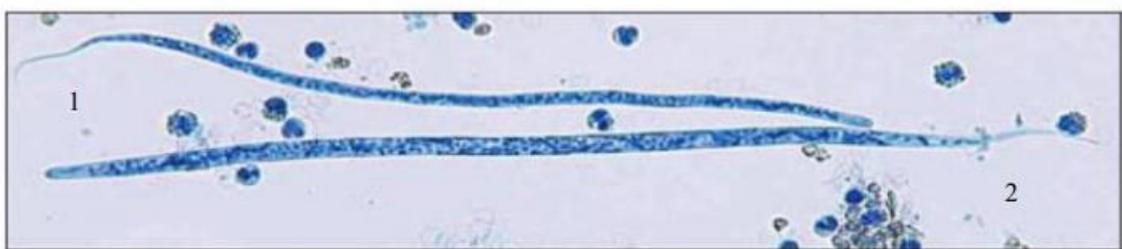


Figura 10. Microfilária de *Acanthocheilonema reconditum* (1) e *Dirofilaria immitis* (2) demonstrando a semelhança e a necessidade da perícia do observador. Fonte: Trancoso, 2017.

Os quadros de dirofilariose oculta podem resultar em uma resposta imune do hospedeiro, com baixa carga parasitária e infertilidade, ou incidentalmente, o efeito microfilaricida observado em cães que recebem lactona macrocíclica como tratamento profilático, tornando o diagnóstico mais desafiador, principalmente em casos de coinfeção com outra filária (LAIDOUDI et al., 2020). A ausência de microfilárias pode estar relacionada a vários fatores como período pré-patente, terapia microfilaricida com macrolídeos que atuam por 3 a 7 meses, que além de eliminar as microfilárias podem influenciar na potência sexual de filarídeos machos adultos, podendo por vezes resultar em estado oculto de infecção (GOODWIN et al., 1998);

parasitismo somente por adultos do mesmo sexo ou de ambos os sexos, mas estereis (FERNANDES et al., 1999); infecções com poucos parasitos adultos; presença de fêmeas ainda imaturas ou destruição das microfilárias por resposta imune do hospedeiro (SILVA; LAGONI et al., 2009).

Alguns problemas relacionados aos métodos diagnósticos já foram relatados na literatura, como, por exemplo, a semelhança morfológica entre as microfilárias de *D. immitis*, *A. reconditum* e *D. repens*. Os kits comerciais de diagnóstico disponíveis para detecção de antígenos de *D. immitis* também podem apresentar reação cruzada com nematoides como *D. repens*, *A. reconditum* e *Onchocerca* spp. (LITTLE et al., 2018).

Quando estes parasitos alcançam a maturidade sexual, produzem filarias que são encontradas na corrente sanguínea do hospedeiro. Este estágio larval (L1) é alvo de diagnóstico por detecção microscópica ou pela detecção de seu material genético (DNA) em amostras de sangue do animal infectado (LUCA; LUIGI, 2016).

2.7.1 *Biologia molecular aplicada ao diagnóstico das filarioses*

Métodos de diagnósticos moleculares apresentaram nas últimas décadas uma crescente importância na parasitologia veterinária, uma vez que o uso de estudos baseados em material genético são aplicáveis em estudos de parasitos e seus hospedeiros. A técnica de PCR vem sendo utilizada para identificação e diagnóstico dos parasitos, permitindo que o conhecimento sobre o material genético dos parasitos possa ser utilizado para identificação, diagnóstico, epidemiologia molecular, desenvolvimento de vacinas e estudos de evolução e fisiologia dos parasitos do ponto de vista da relação parasito-hospedeiro (PRICHARD, 1997).

A necessidade de métodos diagnósticos mais específicos tornou-se evidente na detecção e confirmação precisa da presença de microfilárias, especialmente em relação à espécie *D. immitis*. A aplicação de métodos diagnósticos mais modernos visa eliminar a subjetividade associada à observação manual, resultando em aprimoramentos significativos nos diagnósticos (NEGRON et al., 2022). Por estes motivos, diferentes protocolos moleculares têm sido desenvolvidos e estudados nos últimos anos, incluindo a identificação de uma única espécie, com a utilização da PCR espécie-específico ou detecções simultâneas de diferentes espécies do gênero *Dirofilaria*, como uso de PCR multiplex (Figura 11) ou PCR-RFLP (ALBONICO et al., 2014).

Estudos recentes compararam o desempenho da qPCR utilizando sondas e a técnica de Knott modificada, associada ao teste de antígeno DiroCHEK®, com o objetivo de verificar qual o método seria mais sensível e com maior potencial de eficiência quando aplicada em laboratórios de diagnóstico e investigação. Os resultados obtidos mostraram uma alta especificidade da técnica de qPCR com o uso de sonda para a detecção de filarioses, quando comparada aos outros métodos diagnósticos. Além disso, esse método diagnóstico pode ser realizado com menor quantidade de amostra e menos tempo, executando análises mais rápidas e de alta eficácia, em comparação as outras técnicas (NEGRON et al., 2022).

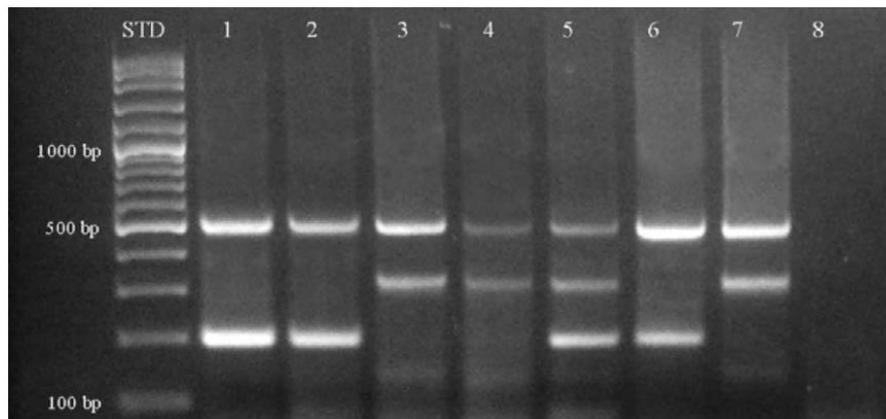


Figura 11. Amplificação de DNA por PCR multiplex de amostras de sangue positivas para *Dirofilaria* com diferentes cargas parasitárias. Faixa 1, carga alta de *D. immitis* (100.000 mf/ml); faixa 2, carga baixa de *D. immitis* (4 mf/ml); faixa 3, carga alta de *D. repens* (32.250 mf/ml); faixa 4, carga baixa de *D. repens* (4 mf/ml); faixa 5: infecção mista natural; faixa 6: controle positivo para *D. immitis*; faixa 7: controle positivo para *D. repens*; faixa 8: controle negativo. Fonte: Gioia et al. (2010). Legenda: mf= microfilaria

Lugo-Vargas et al. (2023) demonstram em seu trabalho a necessidade e aplicabilidade das técnicas de biologia molecular na diferenciação de espécies de microfíliaras, destacando que animais infectados por *A. reconditum* geralmente não precisarem de tratamento, sendo o diagnóstico diferencial das espécies de *D. immitis* e *A. reconditum*, a solução para a prevenção de um tratamento médico inadequado. Além disso a detecção de *A. reconditum* em animais de companhia pode justificar tratamentos para evitar o risco de infecções acidentais em humanos (OTRANTO et al., 2011).

Rishniw et al. (2006) propuseram um método de identificação de filarídeos utilizando uma técnica de PCR com *primers* específicos para validação genotípica das espécies. Também utilizaram um *primer* desenhado a partir do gene COI para validação genotípica independente da espécie. Neste estudo os autores concluíram que a PCR desenvolvida com os genes panfilariais é uma ferramenta adequada para a genotipagem de todos os membros da família Onchocercidae. Os autores também descrevem que, se necessária a confirmação, podem ser utilizados PCR espécie específicos ou sequenciamento dos amplicons. Em contrapartida, outros estudos demonstraram que reações baseadas na região ITS2 do rDNA dos filarídeos apresentam uma prevalência inferior à demonstradas em testes como ELISA (SnapTM 4Dx®). Neste caso os autores suspeitaram de uma possível falha na extração de DNA e concluíram que mesmo com a diferença a PCR se confirmou válida para identificação de filarídeos em cães (TRANCOSO et al., 2020).

Ferri et al. (2009) realizaram um estudo onde verificaram coerência entre os resultados obtidos por análise morfológica e DNA *barcoding*. Estes autores verificaram que tanto o gene COI quando o 12S rDNA foram marcadores moleculares apropriados para identificação de filarídeos de espécie pelo DNA *barcoding*, sendo o gene COI o que demonstrou maior consistência. O gene COI apresenta, com exceção dos cnidários, divergência para garantir um diagnóstico específico, apresentando variações inferiores a 1%, sendo raras as maiores que 2% e quando apresentam variações maiores geralmente está relacionado a indivíduos que habitam regiões geográficas diferentes (HEBERT et al., 2003). A citocromo oxidase mitocondrial subunidade 1 é capaz de maximizar a sensibilidade de protocolos de PCR e está presente em

um número elevado de cópias em cada organismo, permitindo a detecção do DNA de filarídeos mesmo em amostras com baixa microfilarémia (MISHRA et al., 2007).

Estudos realizados na Romênia utilizaram os genes 12S rDNA e COI para a identificação das espécies de filárias presente em 8 dos 188 cães do estudo que haviam sido positivos por meio de técnicas parasitológicas (exame direto e Knott modificada) e imunológicas. A utilização da PCR permitiu o diagnóstico da espécie *D. repens* em todos os animais positivos. Estes autores concluíram então que a técnica de PCR permitiu o diagnóstico fácil e com elevada especificidade, permitindo a diferenciação de um dos principais filarídeos que infectam cães na Europa (CIOCAN et al., 2010).

Um outro estudo, desta vez utilizando uma PCR multiplex, com alvo no gene 12S rDNA, realizaram o diagnóstico simultâneo de *D. immitis* e *D. repens* em amostras de sangue de cães. Neste estudo a técnica de PCR demonstrou sensibilidade similar a técnica de Knott. Os autores, no entanto, ressaltaram que o diagnóstico diferencial desses filarídeos em áreas de co-infecção é por vezes difícil, necessitando de profissionais experientes. Com a utilização da PCR multiplex reduz o custo com reagentes, tempo de processamento, risco de contaminação e a necessidade do profissional experiente em diferenciar as espécies, pois possibilita a detecção das duas espécies, de forma simultânea, sendo importante em estudos epidemiológicos e para o diagnóstico em áreas com relatos de co-infecção (GOIA et al., 2010).

2.8 Tratamento

De acordo com a American Heartworm Society (AHS), o objetivo do tratamento da dirofilariose é otimizar as condições clínicas do animal e erradicar todos os estágios da infecção (incluindo microfílias e estágios larvais), minimizando complicações. Em cães que exibem sinais clínicos significativos, a terapia não deve ser iniciada até que os sintomas estejam estabilizados. Isso pode requerer a administração de glicocorticoides, diuréticos, vasodilatadores, agentes inotrópicos positivos e terapia de fluidos (NELSON, C. T., et al., 2024). Sendo assim, para que seja empregado o protocolo correto para o tratamento, é necessário fazer o estadiamento dos animais de acordo com os sinais clínicos apresentados.

O tratamento recomendado pela *American Heartworm Society* é composto de diversos fármacos, abrangendo adulticidas, larvicidas e tratamento profilático continuado (NELSON, C. T., et al., 2024) e cabe ao médico veterinário avaliar a necessidade terapêutica de cada animal.

O tratamento para *A. reconditum* em cães varia de acordo com a gravidade da infecção e as condições clínicas do animal. Em estudo realizado por SAARI (2018), não há necessidade de tratamento para *A. reconditum*. Embora *A. reconditum* seja considerado um parasito de baixa patogenicidade em comparação com outros filarídeos, como *D. immitis*, em casos sintomáticos ou com complicações, é necessário um tratamento adequado para limitar sua disseminação (OTRANTO et al. 2013). É fundamental procurar a orientação de um médico veterinário para avaliar a condição do animal, determinar o tratamento mais apropriado e fornecer diretrizes específicas para o manejo da infestação por *A. reconditum*.

3. METODOLOGIA

3.1. Área de estudo

As coletas das amostras de sangue foram realizadas em cães domiciliados, no período de outubro de 2018 a outubro de 2019 em quatro municípios do estado do Rio de Janeiro: Paracambi, Barra do Piraí, Petrópolis e Teresópolis (Figura 12) nas zonas rurais e urbanas de cada município. Paracambi está localizado na região metropolitana, com média de 100m de altitude. Barra do Piraí é um município interiorano, localizado no Vale do Paraíba, com média de 363m de altitude. Os municípios de região serrana, Petrópolis e Teresópolis apresentam altitude média de 838m e 875m, respectivamente.

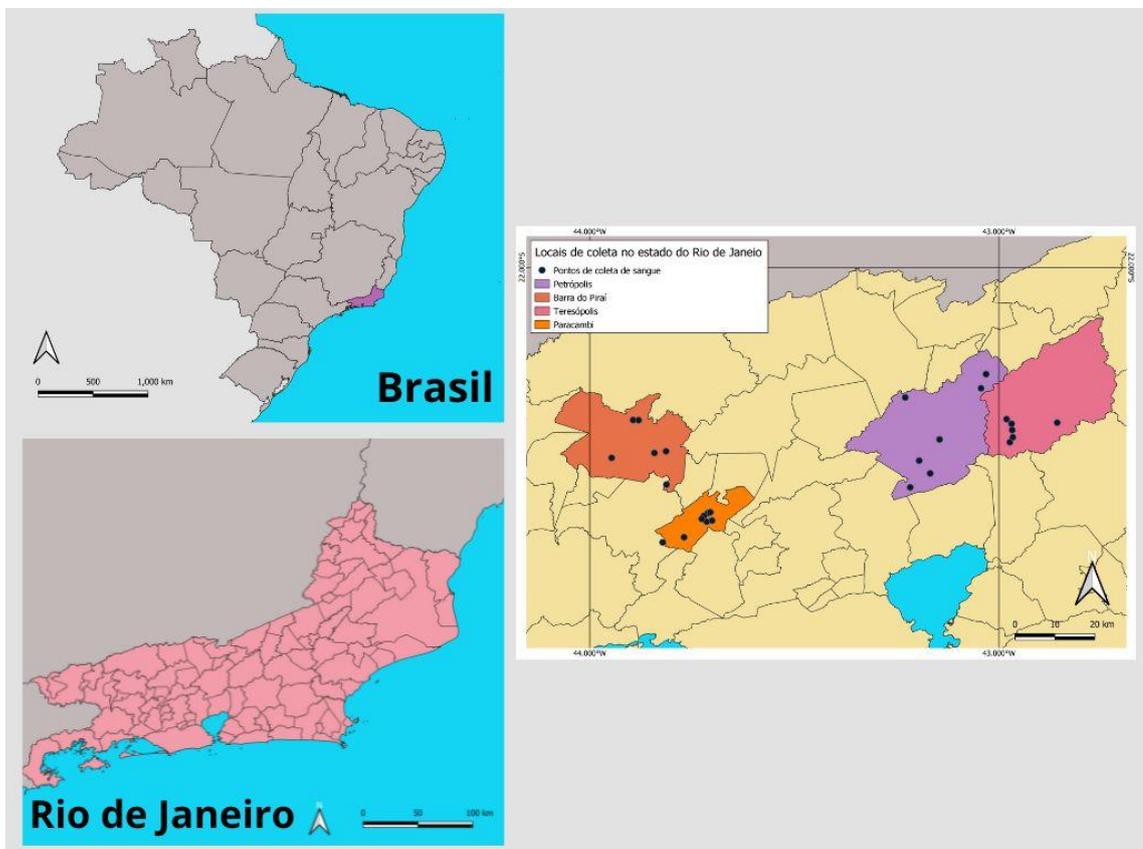


Figura 12. Mapa de localização dos pontos de coletas. Canto esquerdo superior: mapa do Brasil; canto esquerdo inferior: mapa do estado do Rio de Janeiro. A direita: mapa dos municípios e os pontos de coleta. Fonte: Arquivo pessoal elaborado no *software* QGIS.

A escolha das áreas rurais (Figura 13) e urbanas (Figura 14) seguiram características das regiões que de acordo com as determinações do IBGE (2017) e são classificadas da seguinte forma: critérios administrativos, morfológicos (identificação da dispersão e aglomeração das edificações) e funcionais (presença de comércios, serviços e atividades agropecuárias). Seguindo então estas classificações, foram utilizados como critérios neste estudo: rua asfaltada, proximidade com comércios, presença de agricultura e estradas de terra. Em relação às condições de desenvolvimento dos locais que foram visitados, foram seguidos os dados do censo, realizado em 2010. Nessas informações, a cidade de Paracambi apresentava uma população de 47.124 pessoas, uma área de 190 949 km², densidade demográfica de 262,27

hab/km² e o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) de 0,720. É um município classificado como industrial com ampla área urbana. No ano de 2010, o produto interno bruto (PIB) do município ocupava o 74º lugar no estado. A cidade de Barra do Pirai apresentou um total de 94.778 habitantes, uma área de 584 610 km² e densidade demográfica de 169,70 hab/km². O município tem como atividades a pecuária, agricultura e a indústria. O IDH foi de 0,733, com PIB *per capita* de R\$ 20.789,95, ocupando o 58º lugar no estado.

O município de Petrópolis apresenta uma variação nas atividades comerciais, tendo uma parte industrial, turismo e agricultura. Em 2010, apresentou uma população de 295.917 habitantes, um território de 791 144 km², densidade demográfica de 317,85 hab/km² e um IDH de 0,745, com PIB *per capita* de R\$ 42.958,85, ocupando 20º lugar no estado. E o município de Teresópolis também apresentou atividades como indústria, agricultura e turismo, com uma população de 163.746 habitantes, densidade demográfica de 212,49 hab/km² e um território de 773.338 km². No período avaliado, o município apresentou o maior IDH do estado (0,79) e PIB *per capita* de R\$ 28.882,28, ocupando o 30º lugar.



Figura 13. Áreas rurais dos municípios e interior de domicílio de coleta: A – Paracambi; B – Barra do Pirai; C – Teresópolis; D – Petrópolis. Fonte: Débora Martins dos Santos, 2021 (Tese de doutorado).

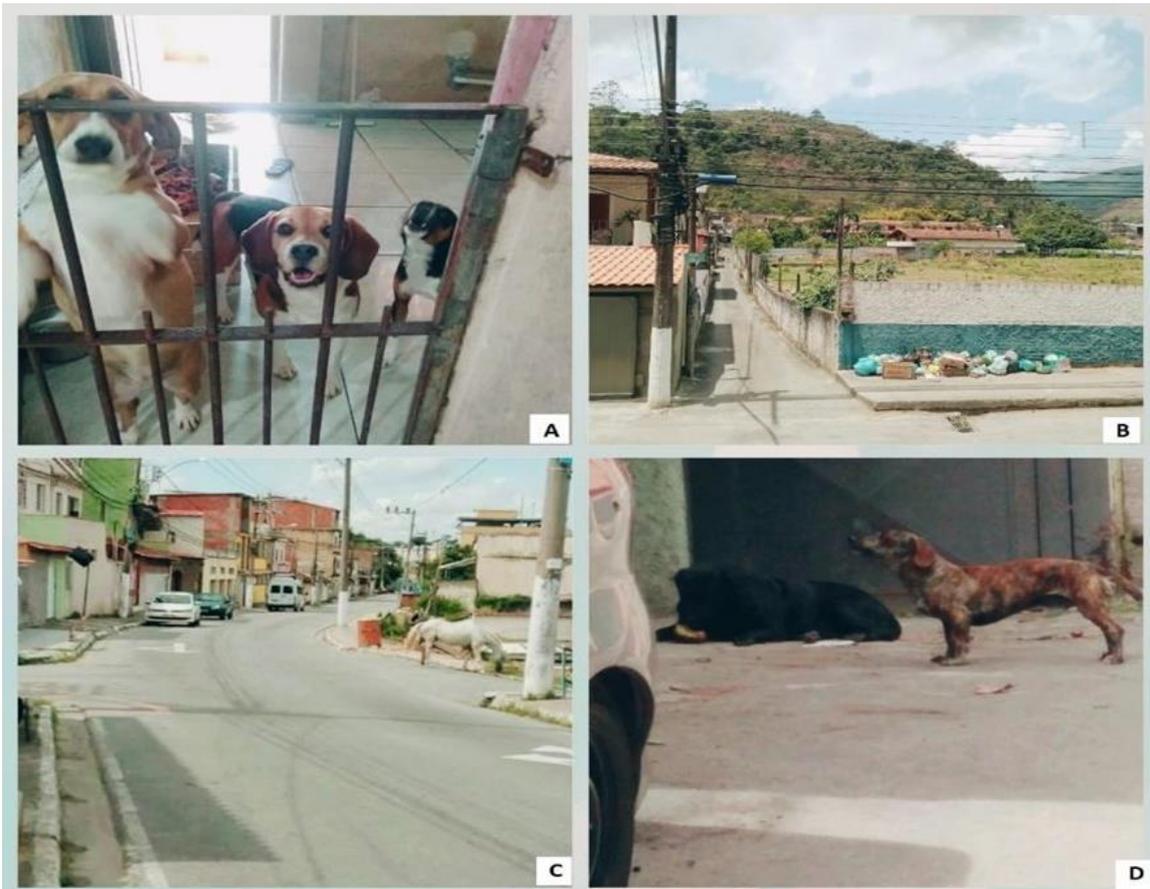


Figura 14. Áreas urbanas dos municípios e interior de domicílio de coleta: A – Barra do Piraí; B –Teresópolis; C – Paracambi; D – Petrópolis. Fonte: Débora Martins dos Santos, 2021 (Tese de doutorado).

3.2. Amostragem

Para determinar o n amostral do estudo foi estipulado uma prevalência de 50% para a seleção, estabelecendo um grau de confiança de 95% e 6% de precisão (Thrusfield, 2007). O cálculo foi feito a partir da fórmula:

$$N = \frac{1,962 \times Pesp (1 - pesp)}{d^2}$$

As amostras foram coletadas de forma randomizada, esperando-se obter um total de 267 cães, divididos entre os quatro municípios estudados ao longo de 12 meses. O número final de amostras coletadas foi 378, tendo sido amostrados 108 cães no município de Barra do Piraí, 90 no município de Paracambi, 87 no município de Petrópolis e 93 no município de Teresópolis. Todos os cães que avaliados eram domiciliados e seus tutores aceitaram participar da pesquisa voluntariamente, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo I). Os cães foram selecionados ao acaso, sem combinação prévia e, ao final das coletas, os proprietários foram convidados a responder o questionário epidemiológico (Anexo II).

O sangue dos cães foi coletado por meio de punção venosa e armazenado em tubo contendo EDTA. As amostras de sangue foram alíquotadas em microtubos com volume de 200µL e armazenados no freezer a -20 °C.

3.3. Questionário epidemiológico

Durante as coletas, foi aplicado um questionário epidemiológico semiestruturado, de acordo com a metodologia empregada por Santos et al. (2013). As variáveis exploradas foram: município de coleta (Barra do Pirai, Paracambi, Petrópolis ou Teresópolis), região de residência (baixada ou serrana), zona (rural ou urbana), estação do ano (inverno, outono, primavera ou verão), período (chuvoso ou seco), temperatura (maior ou menor que 25°C), número de animais na propriedade (um ou mais), presença de animais domésticos (sim ou não), presença de gatos (sim ou não), presença de animais silvestres (sim ou não), presença de gambá (sim ou não), presença de roedor (sim ou não), presença de ouriço (sim ou não), assistência veterinária (sim ou não), sexo (macho ou fêmea), idade (< 5 ou ≥ 5 anos), presença de algum tipo de vegetação no domicílio (sim ou não), acesso a ambientes fora da propriedade (sim ou não), presença de pulgas (sim ou não), uso de ectoparasiticidas (sim ou não e qual), se o animal tinha abrigo (sim ou não) e se era castrado (sim ou não).

3.4. Extração de DNA

As extrações foram realizadas no Laboratório de Sanidade Avícola do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Para extração foi utilizado o protocolo do kit comercial PureLink Genomic DNA Mini Kit® (Invitrogen – Thermo Fisher Scientific), conforme as instruções do fabricante.

Após a extração o DNA foi quantificado no Espectrofotômetro NanoDrop 2000© (Thermo Scientific) e as amostras foram padronizadas na concentração de 100ng/μL. Para visualizar a integridade do DNA extraído, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%.

3.5. Determinação do controle positivo e negativo

O controle positivo de *D. immitis* foi obtido a partir da extração de DNA de 25 miligramas de um parasito adulto cedido pela pesquisadora da ENSP/Fiocruz, Norma Labarthe. A amostra foi extraída com a utilização do kit comercial PureLink Genomic DNA Mini Kit® (Invitrogen – Thermo Fisher Scientific), conforme as instruções do fabricante.

O controle positivo de *A. reconditum* foi obtido pelo sangue de um cão infectado com o parasito, inicialmente diagnosticado pela visualização de microfilaria em microscopia óptica (e confirmado através da associação do diagnóstico molecular e do sequenciamento da amostra utilizada). A extração de DNA foi realizada com o kit comercial PureLink Genomic DNA Mini Kit® (Invitrogen – Thermo Fisher Scientific), conforme as instruções do fabricante. Foi confirmada a espécie através do sequenciamento de DNA por eletroforese capilar, utilizando a reação de Sanger realizado pela Rede de Plataformas Tecnológicas Fiocruz. De acordo com os resultados obtidos por meio do sequenciamento a amostra obteve 100% identidade para *A. reconditum* de acordo com o Blast/NCBI.

Como controle negativo, foi utilizada água ultrapura para PCR, DNases e RNases livres.

3.6. Detecção molecular de *Dirofilaria immitis* e *Acanthocheilonema reconditum*

Para a detecção do DNA dos parasitos nas amostras de sangue, foi realizada a qPCR em um sistema TaqMan com base no gene que codifica o gene da subunidade 1 do citocromo c oxidase (*cox1*), escolhido para a análise das amostras coletadas. O gene *cox1* é reconhecido por sua alta

sensibilidade, com elevado número de cópias em relação ao gene nuclear em cada célula, sendo considerado um barcoding para os nematoides filariais (FERRI et al., 2009).

Os *primers* utilizados neste estudo foram Fil.COI.749 (-5' CATCCTGAGGTTTAT GTTATTATTTT -3') e dg.Fil.COI.914 (-5' CWGTATACATATGATGRCCYCA -3') que amplificam 166 pares de base (pb) para os membros da família Onchocercidae. A especificidade do sistema foi estabelecida pelas sondas TaqMan, nomeadas P.imm.COI.777 (6FAM-CGGT GTTTGGGATTGTTAGTG-MGB) específica para *D. immitis* e P.rec.COI866 (VIC-TGAATTGCTGTACTGGGAACT-MGB) específica para *A. reconditum*, de acordo com o protocolo adaptado de Laidoudi et al. (2020).

As reações de qPCR foram realizadas separadamente para cada uma das espécies. As amostras foram avaliadas em duplicatas em placas de 96 poços. As reações de qPCR foram preparadas com volume final de 12 µL, contendo: 1X de TaqMan™ Universal Master Mix (*Applied Biosystems*™), a concentração de *primer* utilizada foi 0,8 µM, a concentração das sondas 0,25 µM, 0,5 µL de água e 3 µL de amostra em cada reação. As condições de termociclagem foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos para a sonda P.imm.COI.777 e 52°C por 30 segundos para a sonda P.rec.COI866 e 72°C por 30 segundos, momento em que a fluorescência era coletada. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram valor de Cq inferior a 40 ciclos.

3.7. Curva padrão e limite de detecção

3.7.1. *Dirofilaria immitis*

Para a determinação do limite de detecção, foi utilizado o DNA do controle positivo, obtido da amostra extraída a partir de um exemplar de um espécime adulto conforme descrito no item 3.5. Para esta reação foi desenhado um *primer D. immitis* CP-F (-5' CCTGTTTTGGCTGGTTCTTT -3') e *D. immitis* CP-R (-5' CCGAACCCAACGAAGAAATA -3') com base em sequência do gene *Cox 1* disponível no GenBank. Este DNA foi submetido a uma reação de PCR convencional (cPCR) nas seguintes condições: o master mix foi preparado com volume final de 25µL, contendo: 1X PCR buffer, 3mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTP, 0,6 µM de cada *primer*, 1U de Platinum Taq DNA Polimerase (ThermoFisher®, DE, EUA) e 3µL de DNA. As condições de termociclagem foram: 95°C por 10 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 54°C por 60 segundos, 72°C por 60 segundos e 72°C por 7 minutos. Após a reação as amostras foram aplicadas em gel de agarose 2%, imerso em tampão de corrida 1x TAE (Tris Acetate-EDTA) para eletroforese.

A eletroforese foi conduzida em cuba a 100 volts por 45 minutos. Após a corrida, o gel foi corado em brometo de etídio e os produtos foram visualizados em transiluminador UV (E-gel imager System (*Applied Biosystems*, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA)). Após a confirmação de amplificação das amostras foi realizado a purificação dos produtos da reação de cPCR utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up (*Promega*) seguindo as instruções do fabricante.

O produto purificado foi quantificado em Espectofortômetro NanoDrop 2000© (*Thermo Scientific*), e a partir desta quantificação, foi realizado o cálculo para determinação de um ponto inicial com 10⁶ cópias de DNA. A equação utilizada para determinar o número de cópias de um fragmento de DNA foi a seguinte; Número de cópias = [X g/µL DNA/ (tamanho do fragmento em pares de base x 649)] x 6,022 10²³. Partindo do ponto com 10⁶ cópias foram realizadas diluições seriadas de 1:10 até o ponto com 10⁻¹ cópias. Esses pontos foram avaliados na qPCR em triplicatas, para a realização da curva padrão, com o objetivo de avaliar a eficiência da

reação. O mix utilizado na reação foi o mesmo citado no tópico 3.6. O limite de detecção foi determinado pelo ponto de diluição com menor concentração amplificável. Para a determinação da curva padrão, associou-se 4 pontos de diluição com número de cópias na escala logarítmica aos seus respectivos ciclos de quantificação.

3.7.2. *Acanthocheilonema reconditum*

Para a determinação do limite de detecção foi utilizado o DNA do controle obtido a partir do sangue de um cão positivo. Nesta reação foi utilizado o mesmo par de *primers* descrito no tópico 3.6, porém, pelo método de PCR convencional, nas seguintes condições: as reações foram preparadas com volume final de 25µL, contendo: 1X PCR buffer, 3mM de MgCl₂, 0,2 µM de dNTP, 0,5 mM de cada primer, 1U de Platinum Taq DNA Polimerase (Thermofisher®, DE, EUA) e 3µL de DNA. As condições de termociclagem foram: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e 72°C por 7 minutos. Após a reação as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1%, imerso em tampão de corrida 1x TAE (Tris Acetate-EDTA) para eletroforese, sendo conduzida conforme descrito no tópico 3.7.1.

O produto purificado foi quantificado, e a partir desta quantificação, foi realizado o cálculo para determinação de um ponto inicial com 10⁶ cópias de DNA, conforme descrito anteriormente. Partindo deste ponto foram realizadas diluições seriadas de 1:10 até o ponto com 10⁻¹ cópias. Esses pontos foram avaliados na qPCR em triplicatas, para a realização da curva padrão, com o objetivo de avaliar a eficiência da reação. O mix utilizado na reação foi o mesmo citado no tópico 3.6. O limite de detecção foi determinado pelo ponto de diluição com menor concentração amplificável. Para a determinação da curva padrão, associou-se 7 pontos de diluição com número de cópias na escala logarítmica aos seus respectivos ciclos de quantificação.

3.8. Análise estatística

Os dados obtidos no questionário epidemiológico foram organizados em planilha do Microsoft Excel e posteriormente importados para o *software* R versão 3.6.1. A análise estatística teve por objetivo investigar a possível relação entre os fatores preditores e a positividade para *D. immitis* e *A. reconditum* na análise do DNA extraído do sangue de cão por qPCR. No primeiro momento as variáveis foram submetidas a análise bivariada, por meio do teste Qui-quadrado (χ^2). Cada variável foi testada em função da positividade de *D. immitis* e *A. reconditum* admitindo um nível de significância de 95% (p-valor > 0,05).

As variáveis obtidas no questionário também foram examinadas para verificar os níveis de correlação aplicando o coeficiente *Phi* (ϕ). Os critérios seletivos para a entrada na análise multivariada foram variáveis que apresentaram valores de $\phi < 0,6$ e valor de $p < 0,15$ no teste χ^2 . Uma análise combinatória entre as variáveis foi realizada para encontrar as variáveis que possuíam alta colinearidade, neste caso aquele que possui maior plausibilidade biológica foi mantida na análise multivariada. Os modelos foram submetidos à regressão logística empregando o pacote “rms” (HARRELL, 2020).

O fator de inflação de variância foi aplicado para confirmar a ausência de multicolinearidade em cada modelo preditivo. Os modelos foram validados aplicando o método de reamostragem *bootstrap*, realizado com 1000 pseudoréplicas. A calibração do modelo foi avaliada visualmente através de representação gráfica das probabilidades previstas *versus* observadas. O modelo final foi escolhido de acordo com as curvas de calibração e o menor erro absoluto na

análise *bootstrap*. O teste de Hosmer e Lemeshow também foi realizado para avaliar o ajuste geral, considerando o modelo ajustado quando apresentou valores próximos de 1. Por fim, foram empregadas análises de curvas Característica de Operação do Receptor (“Receiver Operating Characteristic ROC”) para estimar as áreas sob as curvas ROC (AUC, estatística c) para avaliar a capacidade geral dos modelos em prever as infecções por *Acanthocheilonema reconditum* corretamente.

3.9. Análise espacial

As coordenadas geográficas para o geoprocessamento dos dados deste estudo foram obtidas com o auxílio do Google Earth, de acordo com os endereços das residências onde as amostras foram coletadas. Os dados foram planilhados e associados à positividade para *D. immitis* e *A. reconditum* com o objetivo de analisar a ocorrência destes parasitos nos municípios de coleta. Todos os dados foram tabulados em arquivos com formato CSV. A interpolação dos dados para a construção dos mapas temáticos e do mapa de Kernel foi realizada no software QGIS versão 3.16.0 (2019).

3.10. Ética em pesquisa

A realização desta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética de Uso Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) sob número 3915240616.

4. RESULTADOS

4.1. Análise descritiva e espacial

Do total de 378 amostras analisados foi observada uma prevalência de 1,32% ($n = 5/378$) de amostras positivas para DNA de *D. immitis* e 10,58% ($n = 40/378$) de amostras positivas para o DNA de *A. reconditum*. Destas amostras, 51,58% ($n = 195/378$) foram coletadas em áreas urbanas e 48,41% ($n = 183/378$) foram coletadas em áreas rurais. A reação utilizada para detecção do DNA de *D. immitis* apresentou eficiência de 104% e R^2 0,996 (Figura 15), e a reação de *A. reconditum* apresentou eficiência 94% e R^2 0,992 (Figura 16).

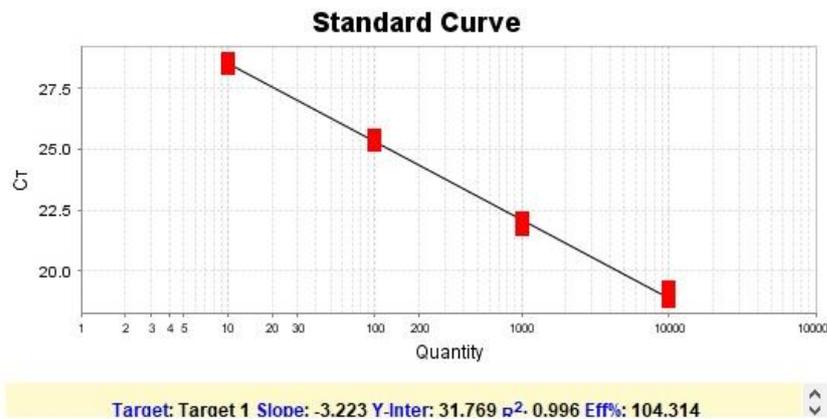


Figura 15. Curva padrão da reação de qPCR para detecção de *Dirofilaria immitis* a partir de diluições decimais seriadas de amplicons de PCR purificados. Fonte: Arquivo pessoal elaborado no *software* StepOnePlus.

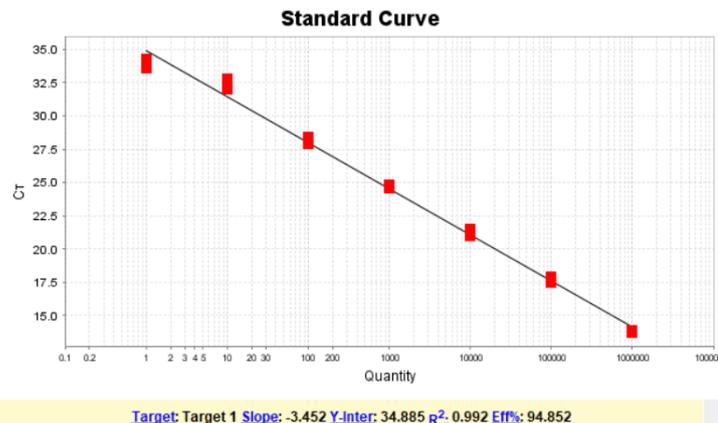


Figura 16. Curva padrão da reação de qPCR para detecção de *Acanthocheilonema reconditum* construída a partir de diluições decimais seriadas de amplicons de PCR purificados. Fonte: Arquivo pessoal elaborado no *software* StepOnePlus.

Do total de amostras, 28,5% ($n = 108/378$) foram coletadas no município de Barra do Piraí. Foi observada uma frequência de 7,4% ($n = 8/108$) de amostras positivas para *A. reconditum* em Barra do Piraí. Neste município não foram encontradas amostras positivas para *D. immitis*.

No município de Paracambi foi observada uma frequência de 16,7% ($n = 15/90$) de amostras positivas para *A. reconditum* e de 3,3% ($n = 3/90$) de amostras positivas para *D.*

immitis. Na zona rural deste município foi observada uma frequência de 23,25% ($n = 10/43$) de cães positivos para *A. reconditum* e 4,65% ($n = 2/43$) de cães positivos para *D. immitis*. Na zona urbana foi observada uma frequência 22,7% ($n = 5/47$) cães positivos para *A. reconditum* e 2,12% ($n = 1/47$) de positivos para *D. immitis*. Neste município foi observado um caso de co-positividade (Figura 17), em que o cão do bairro Km9 pertencente à zona rural, foi positivo na qPCR para as duas espécies.

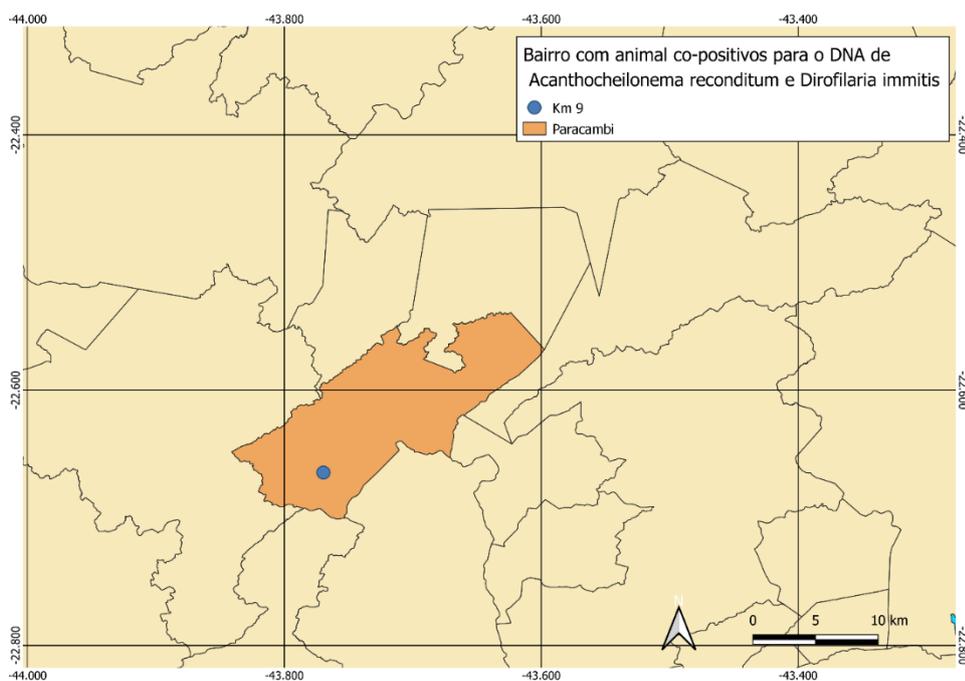


Figura 17. Mapa do município de Paracambi evidenciando um ponto de coleta em que foi encontrado um cão co-positivo para *Dirofilaria immitis* e *Acanthocheilonema reconditum*. Fonte: Arquivo pessoal elaborado no software QGIS.

Em Petrópolis foi observado uma frequência de 5,7% ($n = 5/87$) de amostras positivas para *A. reconditum* e 1,1% ($n = 1/87$) de amostras positivas para *D. immitis*. Na zona rural foi encontrada uma frequência de 2,94% ($n = 1/34$) amostras positivas para *D. immitis* e nenhuma amostra positiva para *A. reconditum*. Na zona urbana não foi encontrada amostra positiva para *D. immitis* e a frequência de amostras positivas para *A. reconditum* foi de 9,43% ($n = 5/53$).

Por fim, no município de Teresópolis foi observado uma frequência de 12,9% ($n = 12/93$) de amostras positivas para *A. reconditum* e 1,1% ($n = 1/93$) de amostras positivas para *D. immitis*. Uma frequência de 16,32% ($n = 8/49$) amostras positivas para *A. reconditum* foi observada na zona rural, não sendo observadas amostras positivas para *D. immitis*. Na zona urbana foi observada uma frequência de 8,16% ($n = 4/49$) amostras positivas para *A. reconditum* e 2,04% ($n = 1/49$) amostras positivas para *D. immitis*.

A distribuição geoespacial de amostras positivas em relação às áreas de estudo pode ser observada nos mapas de calor (Figuras 18 e 19), em que a distribuição dos casos positivos é observada por área de concentração. Os pontos mais quentes dos mapas foram observados na cidade de Paracambi, com uma concentração de 3 amostras positivas para *D. immitis* das 5 encontradas neste estudo e 15 amostras positivas para *A. reconditum* das 40 encontradas neste estudo. É importante destacar também a positividade de amostras oriundas de Teresópolis, onde

foram encontradas presença de DNA de *A. reconditum* em 12 amostras das 40 positivas para presença de DNA deste patógeno.

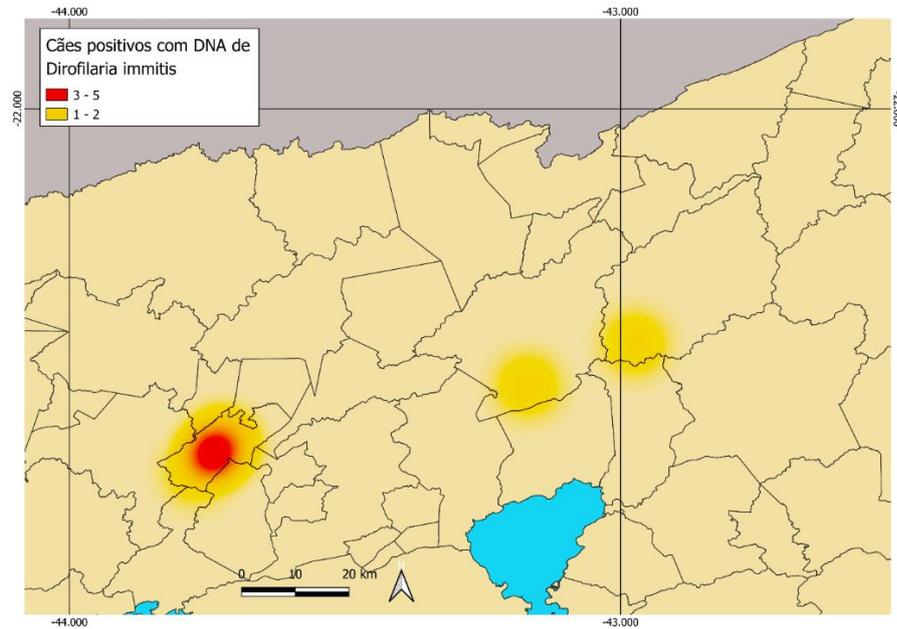


Figura 18. Mapa de densidade Kernel demonstrando a distribuição de cães positivos na detecção do gene *Cox1* por qPCR de *Dirofilaria immitis*. Fonte: Arquivo pessoal elaborado no software QGIS.

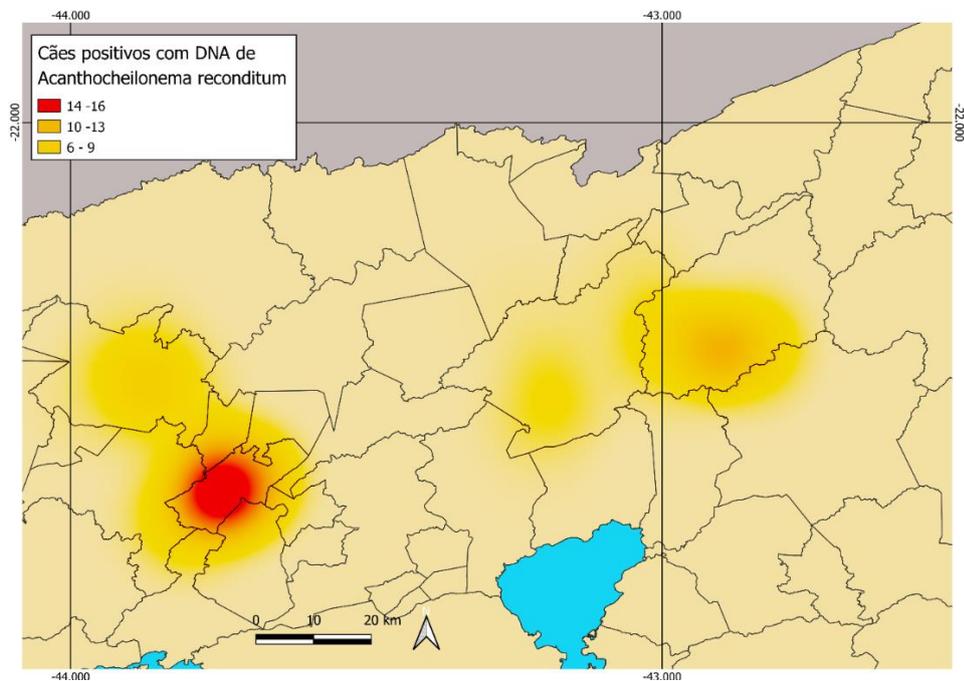


Figura 19. Mapa de densidade Kernel demonstrando a distribuição de cães positivos na detecção do gene *Cox1* de *Acanthocheilonema reconditum* nos municípios de Paracambi, Barra do Piraí, Petrópolis e Teresópolis-RJ. Fonte: Arquivo pessoal elaborado no software QGIS.

4.2. Análise estatística

Devido ao baixo número de amostras positivas para *D. immitis* as análises estatísticas deste trabalho foram realizadas apenas para os achados positivos para *A. reconditum*.

Em relação à análise bivariada, foi observado uma correlação significativa entre a presença de animais silvestres e a positividade das amostras avaliadas no estudo (p-valor = 0,03; Razão de prevalência = 4,34; IC = 1,07-38,13) demonstrando que um cão que vive em propriedades em contato com animais silvestres apresenta aproximadamente quatro vezes mais chances de se infectar com *A. reconditum*. Entre a variável sexo e a positividade das amostras também foi observada correlação significativa (p-valor = 0,005; Razão de prevalência = 2,72; IC = 1,27-6,25) em que os animais do sexo masculino apresentam maior predisposição à infecção.

A variável presença de vegetação no peridomicílio apresentou uma associação significativa com a positividade das amostras para *A. reconditum* (p-valor = 0,03; Razão de prevalência = 2,51; IC = 1,00-7,55) demonstrando que, ambientes com mais vegetação aumentam as chances de os cães serem infectados, uma vez que os vetores do parasito encontram condições favoráveis de desenvolvimento nesses ambientes. O acesso ao pasto foi uma variável associada com a presença de cães positivos para *A. reconditum* (p-valor = 0,03; Razão de prevalência = 2,00; IC = 0,98-4,11), podendo estar relacionada à presença dos vetores.

A não utilização de produtos ectoparasiticidas apresentou uma associação significativa com a positividade dos cães na qPCR para *A. reconditum* neste estudo (p-valor = 1,11-0,05; Razão de prevalência = 4,34; IC = 2,07-9,55).

As demais análises não apresentaram correlação significativa e podem ser observadas na tabela 1.

Tabela 1. Análise bivariada de fatores intrínsecos e extrínsecos relacionados à positividade das amostras para o DNA de *Acanthocheilonema reconditum* nos municípios de Petrópolis, Teresópolis, Paracambi e Barra do Piraí no estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Variáveis do questionário	N total	(% de animais positivos)	Análise Bivariada			
			p-valor	X ²	Razão de prevalência	IC 95%
Região						
Baixada	201	11,44	0,56	0,33	1,21	0,59 - 2,51
Serrana	177	9,60				
Período						
Seco	215	12,09	0,27	1,20	0,68	0,31-1,41
Chuvoso	163	8,58				
Zona						
Rural	183	12,56	0,22	1,47	0,66	0,32-1,35

Urbana	195	8,71				
Temperatura						
< 25°C	157	12,73	0,25	1,32	0,68	0,33-1,39
≥ 25°C	221	9,04				
Número de cães						
1	153	10,45	0,94	0,004	1,02	0,49-2,14
>1	225	10,66				
Outros animais domésticos						
Sim	217	12,44	0,17	1,86	1,61	0,77-3,53
Não	161	8,07				
Presença de Gatos						
Sim	172	13,37	0,10	2,59	1,71	0,84-3,55
Não	206	8,25				
Presença de animais silvestres						
Sim	313	12,14	0,03	4,67	4,34	1,07-38,13
Não	65	3,07				
Presença de gambá						
Sim	251	11,95	0,22	1,48	1,58	0,72-3,76
Não	127	7,87				
Presença de roedor						
Sim	202	10,89	0,83	0,04	1,07	0,52-2,20
Não	176	10,22				
Presença de ouriço						
Sim	87	8,04	0,38	0,76	0,68	0,24-1,65

Não	291	11,34				
Assistência veterinária						
Sim	182	8,79	0,27	1,18	1,44	0,70-3,02
Não	196	12,24				
Sexo						
Fêmea	183	6,01	0,005	7,83	2,72	1,27-6,25
Macho	195	14,87				
Idade						
< 5 anos	234	9,82	0,54	0,36	0,81	0,39-1,69
> 5 anos	144	11,80				
Presença de vegetação na casa						
Sim	268	12,68	0,03	4,31	2,51	1,00-7,55
Não	110	5,45				
Acesso a ambiente urbano						
Sim	219	7,30	0,77	0,07	0,90	0,43-1,85
Não	159	15,09				
Acesso a pasto						
Sim	237	8,86	0,03	4,41	2,00	0,98-4,11
Não	141	13,47				
Acesso a córrego						
Sim	249	6,82	0,23	1,39	1,48	0,71-3,04
Não	129	17,82				
Acesso a mata						
Sim	211	9,95	0,26	1,25	1,45	0,71-2,97
Não	167	11,37				

Presença de pulga						
Sim	118	11,01	0,85	0,03	1,06	0,48-2,24
Não	260	10,38				
Uso de ectoparasiticida						
Sim	244	5,78	0,05	19,29	4,34	2,07-9,55
Não	134	19,40				
Saúde						
Boa	276	11,59	0,29	1,10	0,64	0,24-1,50
Ruim	102	7,84				
Limpeza						
Ruim	124	14,51	0,08	3,01	1,78	0,86-3,65
Boa	254	8,66				
Raça						
Puro	252	13,09	0,02	5,04	2,55	1,06-7,05
Misto	126	5,55				
Pelo						
Curto	215	12,09	0,27	1,20	0,68	0,31-1,41
Longo	163	8,58				
Abrigo						
Sim	225	9,33	0,33	0,91	1,37	0,67-2,80
Não	153	12,41				
Castrado						
Sim	93	8,60	0,47	0,51	1,34	0,57-3,50
Não	285	11,22				

Previamente à análise multivariada, foi realizado o teste de correlação de Phi (ϕ), validando todas as variáveis a serem integradas no modelo de regressão logística, considerando as variáveis que apresentaram valores de $\phi < 0,6$. De acordo com a análise de regressão logística,

o modelo final (total = 18) exibiu resultado satisfatório de calibração, apresentando os menores valores de erro médio absoluto. Neste modelo as variáveis consideradas foram sexo, onde há uma maior incidência de animais positivos quando o sexo é masculino, presença de vegetação na casa, presença de animais silvestres e uso de ectoparasiticidas, onde foi observado que o não uso está relacionado à positividade encontrada neste trabalho. O modelo “sexo masculino + presença de vegetação na casa + presença de animais silvestres + não uso de ectoparasiticida” (tabela 2) apresenta área sob a curva (AUC) de 0,75 (IC = 95%: 0,68-0,82), sugerindo um valor explicativo moderado. Esta análise é realizada para medir e especificar problemas no desempenho de diagnósticos, pois através do gráfico podemos analisar as variações de sensibilidade e especificidade do modelo (Figura 20).

As variáveis incluídas no modelo escolhido que mostrou valores significativos de associação com a positividade para *A. reconditum* foram: sexo (p-valor = 0,007) e a ausência de ectoparasiticida (p-valor = 0,0002). As variáveis vegetação e animais silvestres não foram significativas neste modelo.

Tabela 2. Modelo de regressão logística dos fatores associados à positividade das amostras para *Acanthocheilonema reconditum* nos municípios do estado do Rio de Janeiro, Brasil.

	C (β)	E.P.	Wald Z	p-valor
Sexo	1.02	0.38	2.68	0.0074
Vegetação	0.49	0.48	1.02	0.30
Silvestre	1.22	0.76	1.61	0.10
Ectoparasiticida	1.38	0.36	3.78	0.0002

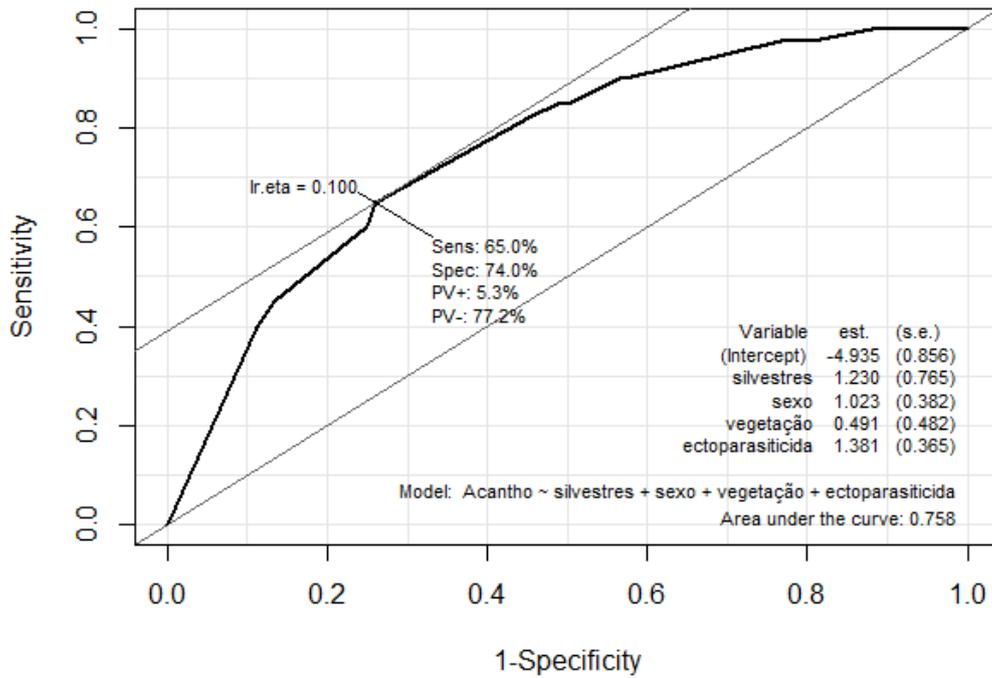


Figura 20. Representação gráfica do Receptor Operacional de Análises de curvas características (*Receiver Operating Characteristic* - ROC). Fonte: arquivo pessoal elaborado no *software* R versão 3.6.1.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo detectou o DNA de espécies de microfilárias em sangue de cães domiciliados no estado do Rio de Janeiro e identificou uma prevalência de 1,32% para *D. immitis* e 10,58% para *A. reconditum* nos municípios estudados. Segundo a literatura, a prevalência de *D. immitis* nas Américas pode apresentar grandes variações de um local para outro, apresentando prevalências menores que 8,4% em países mais frios e podendo chegar a 40% em focos altamente endêmicos (LEE et al., 2010). A prevalência dessa enfermidade no Brasil apresenta grandes variações, desde números próximos de zero (DAGNONE et al., 2012; LABARTHE et al., 2003) até registros de 21% e 34% de animais positivos, principalmente no estado do Rio de Janeiro (LABARTHE et al., 1997). Essa variação apresenta correlação direta com a adaptação e abundância dos vetores à determinadas regiões. Os culicídeos apresentam melhores condições de desenvolvimento em áreas tropicais, quentes e úmidas, mas, quando são submetidos a condições de frio e baixa umidade acabam se proliferando em menor quantidade, desacelerando a taxa de transmissão de diversos patógenos, incluindo os causadores da dirofilariose (SIMÓN et al., 2007). Quando comparamos o clima de alguns países que apresentam uma ampla diferença climática, é possível observar uma variação direta nas taxas de prevalência da dirofilariose, como é o caso do Canadá, que é considerado um país de clima frio e suas taxas de prevalência para a doença são de 0,16%, diferente da Espanha que apresenta estações do ano bem definidas, favorecendo a proliferação dos vetores em períodos mais quentes, com taxas de prevalência da doença que podem chegar a 58% (KLOTINS et al., 2000).

O Rio de Janeiro está localizado em uma área de clima tropical e, dessa forma, a prevalência para *D. immitis*, observada no presente estudo, foi considerada baixa, se considerarmos a região. No entanto, é importante destacar que um dos principais diagnósticos utilizados em clínicas são os esfregaços sanguíneos e, dependendo da habilidade do observador, as microfilárias de *D. immitis* podem ser confundidas com as de *A. reconditum* (LITTE et al., 2018). Deve-se manter em mente que este parasito depende de um ciclo complexo, estando susceptível a fatores diferentes. Por isso pode-se encontrar focos de alta prevalência vizinhos de locais com prevalência baixa. É importante destacar também que a movimentação dos cães, principalmente em relação a viagens para áreas litorâneas, as alterações no ambiente, urbanização, controle dos vetores podem proporcionar uma mudança no local onde há o foco da doença, fazendo com que um local onde foi realizado um estudo em um determinado tempo não apresente a mesma realidade anos depois (ALMOSNY, 2002).

A utilização de técnicas moleculares para a detecção e identificação do DNA de espécies de microfilárias apresentam alta especificidade para o diagnóstico dos animais. Diversos estudos moleculares têm se baseado no gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade 1 (*coxI*) e no gene 12S rDNA para a detecção de microfilárias, principalmente de *D. immitis* (FERRI et al., 2009). Estudos moleculares podem permitir a diferenciação de espécies de nematoides, análise da circulação do parasito e investigar se os casos podem ser autóctones (DE ANDRADE VIEIRA et al., 2022). Nosso estudo propôs diferenciar as espécies *D. immitis* e *A. reconditum* em sangue de cães em diferentes altitudes, trazendo aspectos epidemiológicos da infecção por *A. reconditum*. A identificação e diferenciação das espécies foi realizada através da qPCR espécie-específica com alvo no gene mitocondrial (*coxI*), sendo observadas eficiências de 104% na qPCR para detecção do DNA de *D. immitis* e de 94% para detecção do DNA de *A. reconditum*, demonstrando que a reação traz resultados fidedignos em comparação à outras técnicas que podem identificar microfilárias. É importante ressaltar que a maioria dos

estudos realizados no Brasil baseiam-se apenas em diagnósticos microscópio ou imunológico (LABARTHE et al., 2014).

Trabalhos mais recentes, como o de Negron et al. (2022) trazem comparações de técnicas comumente utilizadas na clínica como o teste de Knott modificado e testes de detecção de antígenos antes e depois de tratamento térmico em comparação as ferramentas moleculares espécie-específica. Estes autores destacam a importância da utilização da qPCR com sonda específica para o verme do coração, demonstrando que com o uso desse método, é possível eliminar a necessidade de análises adicionais para uma correção de identificações inequívocas de espécies de microfilária, uma vez que a especificidade da sonda identifica corretamente as espécies já que age em conjunto com os *primers*, anelando à um alvo específico dentro do DNA que está sendo utilizado, diferente da análise realizada na técnica de Knott modificado. Nosso trabalho conseguiu demonstrar essa especificidade, das 378 amostras de DNA de cão analisadas, 5 foram positivas para *D. immitis* e 40 foram positivas para *A. reconditum*, tendo dentre elas uma amostra co-positiva, o que nos faz perceber que o diagnóstico molecular é capaz de diferenciar as espécies e auxiliar na conduta que o médico veterinário poderá seguir na clínica.

Com relação aos dados epidemiológicos foi identificada uma prevalência de 10,58% de animais positivos para *A. reconditum*, sendo o local com a maior frequência o município de Paracambi, 16,7%. Infecções por esta microfilária não são comumente descritas na literatura, pois ela não causa danos significativos ao animal se comparada à infecção por *D. immitis*. Porém é importante destacar que o diagnóstico diferencial destas microfilárias pode evitar que os animais sejam submetidos a tratamentos prolongados e que podem causar efeitos colaterais exacerbados, uma vez que o diagnóstico mais comum é através de observações em lâminas de esfregaço sanguíneo em microscopia óptica, o que pode causar conflitos, a depender da experiência do observador, levando a um diagnóstico errôneo como já falado anteriormente.

Neste trabalho foi observada uma significância na variável uso de ectoparasiticida (p-valor = 0,05), onde os animais que apresentaram maior positividade para o parasito *A. reconditum* estão no grupo de animais que não recebiam nenhum tipo de tratamento, demonstrando que aqueles cujos tutores realizavam medidas preventivas para ectoparasitos apresentaram uma menor taxa de positividade. Labarthe et al. (2014) fizeram observações com relação ao aumento do uso de medicamentos quimioprofiláticos, ivermectina e tetraciclina relacionados à diminuição de animais positivos para dirofilariose. Neste estudo ainda relataram que o aumento da preocupação em controlar outras doenças, como a erliquiose, e por estes fármacos afetarem o endossimbionte de *D. immitis*, *Wolbachia* sp., explicaria a diminuição de animais positivos para dirofilariose, uma vez que estaria afetando a sobrevivência e reprodução dos helmintos. Como estudos sobre *A. reconditum* são escassos, e este parasito pertence à mesma família que *D. immitis*, podemos inferir que o tratamento dos animais pode ser sim um fator de prevenção à infecção por *A. reconditum* ainda que o parasito em questão não seja o motivo pelo qual os tutores estão realizando estas medidas de prevenção. A utilização de coleiras repelentes preventivas para leishmaniose, por exemplo, também pode auxiliar na prevenção, fazendo com que mosquitos, pulgas e carrapatos não cheguem próximo e ou permaneçam nestes animais.

A ocupação humana, levando a modificação ou até mesmo a perda do habitat natural dos animais silvestres pode favorecer a propagação de doenças entre os animais silvestres, domésticos e até mesmo nos seres humanos (ARTOIS et al., 2001). Estudos para determinar a prevalência do parasito e o contato com o patógeno, tanto em animais silvestres quando domésticos, que compartilham habitats, são de grande importância para minimizar possíveis efeitos da ocorrência da doença com relação à conservação da fauna (DEEM; EMMONS,

2005). A prevalência de *A. reconditum* em cães nas regiões estudadas sugere uma relação significativa com fatores ambientais e ecológicos. Um dos aspectos identificados foi a presença de animais silvestres no peridomicílio, que parece estar correlacionada com a maior ocorrência de animais infectados por *A. reconditum*. Essa relação pode ser explicada por fatores como animais silvestres podendo ser reservatório natural deste patógeno, a presença de vetores, como as pulgas, além da presença de vegetação, que pode criar microambientes específicos para a sobrevivência dos vetores de *A. reconditum*. Compreender os fatores ecológicos e comportamentais que facilitam a transmissão deste parasito pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle, protegendo não somente a população de animais como das comunidades humanas.

Variações na escala espacial, características da paisagem, composição e riqueza de parasitos em populações de hospedeiros podem moldar suas relações com parasitos ao longo de diferentes ambientes (GONZÁLES et al., 2006; CARDOSO et al., 2020). Um estudo realizado por Graciano e colaboradores em 2022, demonstrou que espécies de helmintos estão ligadas a ocorrência de seus hospedeiros tanto na mata quando no peridomicílio. Nas amostras analisadas em nosso estudo observamos uma correlação significativa entre a presença do DNA de *A. reconditum* em cães com a vegetação no peridomicílio, sendo esse achado mais uma demonstração de que os fatores ambientais podem desempenhar um papel crucial na epidemiologia da infecção causada por esse parasito. Para melhores e maiores esclarecimentos sobre a importância desses fatores, presença de animais silvestres e de vegetação no peridomicílio, é necessário a realização de estudos mais detalhados da densidade de vetores em diferentes vegetações, variáveis climáticas específicas que também podem influenciar na densidade dos vetores, além de como o manejo das vegetações também podem influenciar no controle de vetores, auxiliando em práticas de políticas de saúde pública.

Estudos a respeito do parasito *A. reconditum* são escassos ao passo que trabalhos sobre *D. immitis* acontecem com maior frequência. Em um trabalho realizado em Portugal, foi verificado que a prevalência de dirofilariose canina estava associada ao gênero do animal e a pelagem, verificando que o número de animais do gênero masculino foi 2,3 mais vezes infectado pelo parasito do que as fêmeas. Nosso estudo também traz essa realidade para as localidades estudadas, mostrando que o número de animais machos com a presença do DNA do parasito foi maior do que o número de fêmeas.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, a região estudada apresenta um número maior de animais com a presença do DNA de *A. reconditum* em comparação ao DNA de *D. immitis*. Este achado ressalta a importância de considerar múltiplas espécies de microfilárias em estudos epidemiológicos, especialmente em áreas tropicais onde as condições ambientais podem influenciar na distribuição dos vetores e, conseqüentemente, na prevalência das infecções. É crucial alertar para a necessidade de um diagnóstico diferencial preciso, permitindo que médicos veterinários adotem uma conduta assertiva ao detectarem a presença de microfilárias no sangue de cães por meio de métodos parasitológicos clássicos. Tal abordagem é essencial para promover uma melhor conduta terapêutica, o que impacta diretamente a qualidade de vida dos pacientes caninos.

Os achados epidemiológicos também enfatizam a importância da realização de tratamento preventivos contra ectoparasitos, dado que a maior prevalência do DNA de *A. reconditum* foi observada em animais que não receberam nenhum tipo de tratamento. O modelo epidemiológico mais eficaz para prever infecções naturais por *A. reconditum* inclui as variáveis: sexo masculino, presença de vegetação e animais silvestres no peridomicílio, e ausência de tratamentos para ectoparasitos. Esses achados destacam a necessidade de considerar tantos fatores intrínsecos quanto extrínsecos na avaliação do risco de infecção por microfilárias em cães.

A compreensão da epidemiologia das infecções por microfilárias é fundamental para orientar políticas de controle e prevenção, além de melhorar os protocolos de diagnóstico e tratamento em clínicas veterinárias. Adicionalmente, a identificação de fatores associados à infecção pode auxiliar na implementação de medidas preventivas eficazes, visando reduzir a prevalência dessas infecções tanto em cães quanto em humanos, considerando o potencial zoonótico de algumas espécies.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULKADIR, Mohammed; KEBEDE, Isayas Asefa. A Review of Canine Dirofilariasis and Its Zoonotic Importance. **World Journal of Health Medicine**, v. 2, n. 1, p. 1018, 2024.
- ALBONICO, F.; LOIACONO, M.; GIOIA, G.; GENCHI, C.; GENCHI, M.; MORTARINO, M. Rapid differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood by real-time PCR coupled to high-resolution melting analysis. **Veterinary Parasitology**, v. 200, n. 1-2, p. 128-132, 2014.
- ALMOSNY, NADIA R.P. Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses. Rio de Janeiro: **L.F. Livros de Veterinária Ltda.** 2002.
- ALVES, L. C., SILVA, L. V. D. A., FAUSTINO, M. A. D. G., MCCALL, J. W., SUPAKONDERJ, P., LABARTHE, N. W., ... & CAIRES, O. Survey of canine heartworm in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 587-590, 1999.
- ANDRADE VIEIRA, V. M.; MARTINIANO, N. O. M.; SILVA, P. P. da; PAULINO, É. T.; AMARAL FERNANDES, P. do; LABARTHE, N.; ... & MORAES NETO, A. H. A. de. Molecular characterization of canine filarioids in a previously non-endemic area of Rio de Janeiro State, Brazil. **Parasitology Research**, v. 121, n. 3, p. 925-932, 2022.
- ARTOIS, M., DELAHAY, R., GUBERTI, V. AND CHEESEMAN, C. Control of infectious diseases of wildlife in Europe. **Veterinary Journal**. Vol. 162:141 – 152, 2001.
- BOBADE, P. A.; OJEBUOBOH, P. B.; AKINBOADE, O. A case of canine filariasis due to *Dipetalonema reconditum* (Grassi 1889) in Nigeria. **Journal of Small Animal Practice**, v. 22, n. 4, p. 201-206, 1981.
- BRIANTI, E., GAGLIO, G., NAPOLI, E., GIANNETTO, S., DANTAS-TORRES, F., BAIN, O., & OTRANTO, D. New insights into the ecology and biology of *Acanthocheilonema reconditum* (Grassi, 1889) causing canine subcutaneous filariasis. **Parasitology**, v. 139, n. 4, p. 530-536, 2012.
- BRITO, A. C., Vila-Nova, M. C., Rocha, D. A. M., Costa, L. G., Almeida, W. A. P. D., Viana, L. D. S., ... & Regis, L. Prevalência da filariose canina causada por *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum* em Maceió, Alagoas, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 6, p. 1497-1504, 2001.
- BROOKS, W. C. Diagnosis of heartworm disease, 2001.
- CARDOSO, T. S. et al. Helminth metacommunity of small mammals in a Brazilian reserve: the contribution of environmental variables, host attributes and spatial variables in parasite species abundance. **Community Ecology**, v. 21, n. 2, p. 159–170, 1 jul. 2020.
- CARLOS, R. S., MUNIZ NETA, E. S., SPAGNOL, F. H., OLIVEIRA, L. L., DE BRITO, R. L., ALBUQUERQUE, G. R., & ALMOSNY, N. R. Frequência de anticorpos anti-*Erhlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* e antígenos de *Dirofilaria immitis* em cães na microrregião Ilhéus-

Itabuna, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, p. 117-120, 2007.

CASIRAGHI, M., ANDERSON, T. J. C., BANDI, C., BAZZOCCHI, C., & GENCHI, C. A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. **Parasitology**, 122(1), 93-103, 2001.

CIOCAN, R.; DARABUS, G.; JACSO, O.; FOK, E. Detection of *Dirofilaria* spp. In dogs by PCR. **Bulletin UASVM, Veterinary Medicine**. v. 67. n. 2, 2010.

DAGNONE, A. S., TRAPP, S. M., JOJIMA, F. S., AMUDE, A. M., MORAIS, H. A. S., FREIRE, R. L., & VIDOTTO, O. Avaliação Soroepidemiológica da infecção por *Ehrlichia canis*, *Dirofilaria immitis* e *Borrelia burgdorferi* em cães de uma população hospitalar. In **XII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro. Vol. 191, 2002.

DAY, MICHAEL J. (Ed.). Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat. **CRC Press**, 2016.

DE BOSSCHERE, H., & KINDERMANS, E. Accidental diagnosis of *Dirofilaria repens* in a hematoma in a dog in Belgium. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, 88(1), 39–43, 2019.

DEEM, S. L. & EMMONS, L. H. Exposure of free-ranging maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) to infectious and parasitic disease agents in the Noël Kempff Mercado Nacional Park, Bolivia. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. Vol.36: 192-197, 2005.

DELFINO, N. S. D. C. Diagnóstico de hemoparasitos e filarídeos em cães do sertão sergipano, 2020.

ESPINOSA, Nathaly et al. First report of *Acanthocheilonema reconditum* outbreak in canines with clinical signs of Anemia from southwestern Colombia. **Pathogens**, v. 11, n. 12, p. 1434, 2022.

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

FERRI, E., BARBUTO, M., BAIN, O., GALIMBERTI, A., UNI, S., GUERRERO, R., ... & CASIRAGHI, M. Integrated taxonomy: traditional approach and DNA *barcoding* for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). **Frontiers in zoology**, v.6, p.1-12, 2009.

GENCHI, C.; VENCO, L.; GENCHI, M. Guideline for the laboratory diagnosis of canine and feline *Dirofilaria* infections. **Veterinary Parasitology**, v. 8, p. 137-144, 2007.

GIOIA, G., LECOVÁ, L., GENCHI, M., FERRI, E., GENCHI, C., & MORTARINO, M. Highly sensitive multiplex PCR for simultaneous detection and discrimination of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood. **Veterinary parasitology**, v. 172, n. 1-2, p. 160-163, 2010.

GOMES, L. R.; RODRIGUES, R. D.; SOUZA, R. R.; RODRIGUES, G. G.; MUNDIM, A. V.; BARBOSA, F. C. Identificação morfológica de *Acanthocheilonema reconditum* em um cão no município de Uberlândia – MG: relato de caso. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 18, n. 2, p. 126-130, jul./dez. 2012.

GONZÁLEZ, M. T.; BARRIENTOS, C.; MORENO, C. A. Biogeographical patterns in endoparasite communities of a marine fish (*Sebastes capensis* Gmelin) with extended range in the Southern Hemisphere. **Journal of Biogeography**, v. 33, n. 6, p. 1086–1095, jun. 2006.

GOODWIN, J.K. The Serologic diagnosis of heartworm Infection in dogs and cats. **Clinical Techniques Small Animal Practice**. v.13, n. 2, p. 83-87, 1998.

GRACIANO, J. M. Diversidade de helmintos de pequenos mamíferos em três ambientes adjacentes na Mata Atlântica. 2022.

HAHN, N. E. Parasitas do sangue. In: SLOSS, M. W.; ZAJAC, A. M.; KEMP, R. L. **Parasitologia Clínica Veterinária. 6ª edição**. São Paulo: Manole, p. 101-120, 1999.

HARRELL Jr., F.E. rms: Regression Modeling Strategies. 2020. R package version 6.0-1. **Disponível em:** <URL <https://CRAN.R-project.org/package=rms>>. Acesso em: 28 de agosto de 2023.

HEBERT, P.D.N.; RATNASINGHAN, S.; DE WAARD, R.J. *Barcoding* animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society London**, v. 270, p.96–99, 2003.

IONICĂ, A. M., MATEI, I. A., D'AMICO, G., ABABII, J., DASKALAKI, A. A., SÁNDOR, A. D., ENACHE, D. V., GHERMAN, C. M., & MIHALCA, A. D. Filarioid infections in wild carnivores: a multispecies survey in Romania. **Parasite & Vectors**, v. 10, p. 1-6, 2017.

KANNENBERG, A. K.; FRONDANA, L.; MARTINS, I. H. R.; LONGHI, C. E.; FIALKOWSKI, M. M.; MILCZEWSKI, V. Ocorrência de filariídeos parasitos em cães domiciliados e provenientes de abrigo animal de Joinville - Santa Catarina. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 20, p.1-11, 2019.

KLOTINS, K. C., MARTIN, S. W., BONNETT, B. N., & PEREGRINE, A. S. Canine heartworm testing in Canada: are we being effective? **The Canadian Veterinary Journal**, v. 41, n. 12, p. 929, 2000.

KRAMER, L., et al. Is *Wolbachia* complicating the pathological effects of *Dirofilaria immitis* infections? **Veterinary parasitology**, v. 133, n. 2-3, p. 133–136.

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

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

LABARTHE, N., DE CAMPOS PEREIRA, M., BARBARINI, O., MCKEE, W., COIMBRA, C. A., & HOSKINS, J. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. **Veterinary therapeutics: research in applied veterinary medicine**, v. 4, p. 67-75, 2003.

LAIODOUDI, Y., DAVOUST, B., VARLOUD, M., NIANG, E. H. A., FENOLLAR, F., & MEDIANNIKOV, O. Development of a multiplex qPCR-based approach for the diagnosis of *Dirofilaria immitis*, *D. repens* and *Acanthocheilonema reconditum*. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1-15, 2020.

LEITE, L.C., LUZ, E., CIRIO, S. M., LEITE, M. C., DE PAULA MOLINARI, H., ZADOROSNEI, A. C. B., ... & LEITE, S. C. Infecção de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*, Linnaeus, 1758) da região metropolitana de Guaratuba, Paraná, Brasil por microfilárias circulantes de *Acanthocheilonema reconditum* (Grassi, 1899). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 3, p. 1149-1155, 2012.

LITTLE, S.; SALEH, M.; WOHLTJEN, M.; NAGAMORI, Y. Prime detection of *Dirofilaria immitis*: understanding the influence of blocked antigen on heartworm test performance. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 186, 2018.

LÓPEZ, J., VALIENTE-ECHEVERRIA, F., CARRASCO, M., MERCADO, R., & ABARCA, K. Identificación morfológica y molecular de filarias caninas en una comuna semi-rural de la Región Metropolitana, Chile. **Revista chilena de infectología**, v. 29, n. 3, p. 248-289, 2012.

LUCA, F.; LUIGI, V. Filarial infections. In: DAY, M. J. (Ed.). Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat. 2. ed. **Boca Raton: CRC Press**, 2016.

Manual de Identificação para Filariose Canina. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 2020. Acesso em 02 de dez 2023. <https://famez.ufms.br/files/2020/06/Cartilha-Filarídeos-completa.pdf>

MARTINS, I. V. F. **Parasitologia veterinária**. 2^a. ed. Vitória: EDUFES, p. 170, 2019.

MCCALL, J.W; GENCHI, C.; KRAMER, L.H; Heartworm disease in animals and humans. **Advances Parasitology**. v.66, p.193–285, 2008.

MCHAFFIE, Jake. *Dirofilaria immitis* and *Wolbachia pipientis*: a thorough investigation of the symbiosis responsible for canine heartworm disease. **Parasitology research**, v. 110, p. 499-502, 2012.

MISHRA, K., RAJ, D.K., HAZRA, R.K., DASH, A.P., SUPAKAR, P.C. The development and evaluation of a single step multiplex PCR method for simultaneous detection of *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 21, p.355–362, 2007.

MONTEIRO, SILVIA GONZALEZ. Parasitologia na medicina veterinária. São Paulo: **Roca**, v. 1, 2011.

NAPOLI, E., BRIANTI, E., FALSONE, L., GAGLIO, G., FOIT, S., ABRAMO, F., ... & OTRANTO, D. Development of *Acanthocheilonema reconditum* (Spirurida, Onchocercidae) in

the cat flea *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera, Pulicidae). **Parasitology**, v. 141, n. 13, p. 1718-1725, 2014.

NEGRON, V., SALEH, M. N., SOBOTYK, C., LUKSOVSKY, J. L., HARVEY, T. V., & VEROCAI, G. G. Probe-based qPCR as an alternative to modified Knott's test when screening dogs for heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in combination with antigen detection tests. **Parasites & Vectors**, 15(1), 1-7, 2022.

NELSON, C. T., et al. Current canine guidelines for the prevention, diagnosis, and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. **Am. Hear. Soc**, 2024, 46p. Disponível em: <https://www.heartwormsociety.org/veterinary-resources/american-heartworm-society-guidelines>. Acesso em fevereiro de 2024.

NEWTON, Walter L.; WRIGHT, Willard H. The occurrence of a dog filariid other than *Dirofilaria immitis* in the United States. **The Journal of parasitology**, v. 42, n. 3, p. 246-258, 1956.

OTRANTO, D., BRIANTI, E., DANTAS-TORRES, F., WEIGL, S., LATROFA, M. S., GAGLIO, G., ... & BAIN, O. Morphological and molecular data on the dermal microfilariae of a species of *Cercopithifilaria* from a dog in Sicily. **Veterinary Parasitology**, v. 182(2-4), p. 221-229, 2011.

OTRANTO, D., DANTAS-TORRES, F., BRIANTI, E., TRAVERSA, D., PETRI, D., GENCHI, C., & CAPELLI, G. Vector-borne helminthes of dogs and humans in Europe. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 16, 2013.

OTRANTO, DOMENICO; EBERHARD, MARK L. Zoonotic helminths affecting the human eye. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 1-21, 2011.

PACIFICO, L., FERRARI, N., ROMEO, C., BUONO, F., VARUZZA, P., SGROI, G., ... & PIANTEDOSI, D. Haematological and biochemical abnormalities in hunting dogs infected with *Acanthocheilonema reconditum*, associated risk factors, and a European overview. **Parasitology Research**, v. 120, p. 2109-2124, 2021.

PALACIOS, A. R. O., CAMACHO, H. R. D. R., RODRIGUEZ, J. L. G., AGUILHERA, D. A. D., GALVIS, R. J. L., BRITO, M. P. M., ... & CUNHA, F. R. Granuloma caused by *Acanthocheilonema* spp. in a canine-case report. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 74, p. 351-358, 2022.

PEROBA, S. C., SPERANDIO, N. C., & MARTINS, I. V. F. Identificação e diferenciação morfológica de microfilárias no sangue de cães do Espírito Santo. **Pubvet**, v. 16, n. 3, p. 1-6, 2022.

POTKONJAK, A., ROJAS, A., GUTIÉRREZ, R., NACHUM-BIALA, Y., KLEINERMAN, G., SAVIĆ, S., POLAČEK, V., PUŠIĆ, I., HARRUS, S., & BANETH, G. Molecular survey of *Dirofilaria* species in stray dogs, red foxes and golden jackals from Vojvodina, Serbia. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 68, p. 101409, 2020.

- RANI, P. A. M. A.; IRWIN, P. J.; GATNE, M.; COLEMAN, G. T.; TRAUB, R. J. Canine vectorborne diseases in India: a review of the literature and identification of existing knowledge gaps. **Parasites & Vectors**, London, U.K., v. 3, n. 28, p. 1-7, 2010.
- REIFUR, L., THOMAZ-SOCCOL, V., MONTIANI-FERREIRA, F. Epidemiological aspects of filariasis in dogs on the coast of Paraná state, Brazil: with emphasis on *Dirofilaria immitis*. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 4, p. 273-286, 2004.
- RISHNIW, M.; BARR, S. C.; SIMPSON, K.W.; FRONGILLO, M.F.; FRANZ, M.; ALPIZAR, J.L.D. Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**. v.135, p.303-3014, 2006.
- ROCHA, J. S. M. D. Diferenciação histoquímica em microfilárias de *Dipetalonema reconditum* e *Dirofilaria immitis* em cães (*Canis familiaris*), 2006.
- RODRIGUES-SILVA, R., GUERRA, R. J. D. A., ALMEIRA, F. B. D., MACHADO-SILVA, J. R., & PAIVA, D. D. D. Dirofilariose pulmonar humana no Estado do Rio de Janeiro, Brasil: relato de um caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 56-59, 2004.
- ROJAS, A.; ROJAS, D.; MONTENEGRO, V. M.; BANETH, G. Detection of *Dirofilaria immitis* and other arthropod-borne filarioids by an HRM real-time qPCR, blood-concentrating techniques and a serological assay in dogs from Costa Rica. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2015.
- SANTOS, H. A., THOMÉ, S. M., BALDANI, C. D., SILVA, C. B., PEIXOTO, M. P., PIRES, M. S., ... & MASSARD, C. L. Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 348, 2013.
- SANTOS, M. A. B., MACEDO, L. O. D., OTRANTO, D., RAMOS, C. A. D. N., RÊGO, A. G. D. O. D., GIANNELLI, A., ... & RAMOS, R. A. N. Screening of *Cercopithifilaria binae* and *Hepatozoon canis* in ticks collected from dogs of Northeastern Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 63, n. 3, p. 605-608, 2018.
- SEPPO SAARI; ANU NÄREAHO; SVEN NIKANDER. Canine parasites and parasitic diseases. **London, United Kingdom: Academic Press, An Imprint of Elsevier**, 2019.
- SILVA, R.C.; LANGONI, H. Dirofilariose: Zoonose emergente negligenciada. **Ciência Rural**, Santa Maria. v.39, n.5, p.1614-1623, 2009.
- SIMÓN, F., KRAMER, L. H., ROMÁN, A., BLASINI, W., MORCHÓN, R., MARCOS-ATXUTEGI, C., ... & GENCHI, C. Immunopathology of *Dirofilaria immitis* infection. **Veterinary research communications**, v. 31, p. 161-171, 2007.
- SIMÓN, F.; GONZÁLEZ-MIGUEL, J.; DIOSDADO, A.; GÓMEZ, P. J.; MORCHÓN, R.; KARTASHEV, V. The complexity of zoonotic filariasis episytem and its consequences: a multidisciplinary view. **BioMed Research International**, v. 2017, n. 1, p. 6436130, 2017.

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

THRUSFIELD, M. Veterinary Epidemiology, 3ª edição. **Blackwell Science Ltd**, Reino Unido, 2007.

TRANCOSO, T. A. L. Comparação de técnicas para o diagnóstico de filarioses caninas. 2017.

TRANCOSO, T. A. L., LIMA, N. D. C., BARBOSA, A. S., LELES, D., FONSECA, A. B. M., LABARTHE, N. V., ... & UCHÔA, C. M. A. Detection of *Dirofilaria immitis* using microscopic, serological and molecular techniques among dogs in Cabo Frio, RJ, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 29, 2020.

VIEIRA, Ana. Dirofilariose humana: zoonose negligenciada ou desconhecida? **Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto**, Porto, 35 f. 2016.

YOUNES, L., BARRÉ-CARDI, H., BEDJAOU, S., AYHAN, N., VARLOUD, M., MEDIANNIKOV, O., ... & DAVOUST, B. *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in mosquitoes from Corsica Island, France. **Parasites & Vectors**, 14(1), 427, 2021

ANEXOS

ANEXO I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____ CPF/RG: _____
endereço: _____,

telefone: _____ recebi explicações sobre o projeto do curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, visando estudos epidemiomoleculares de hemoparasitos em cães, autorizo a coleta de material biológico em meus cães, estando ciente que minha identidade será preservada, que não haverá danos nos animais decorrentes da coleta do material e ausência de custos na realização dos exames.

Em ___/___/___

Assinatura: _____

ANEXO II – Questionário epidemiológico aplicado aos proprietários de cães domiciliados.

Ficha de Propriedade e Proprietário

Data: ___/___/___ Propriedade Nº _____ Zona: () Rural () Urbana

Localidade: _____ Altitude: _____

Coord. Geográf.: _____

Proprietário: _____

Endereço: _____

Pt de referência: _____

Temperatura ambiente: _____

Tel: _____

e-mail: _____

1) Tipo de residência: () pau a pique () alvenaria () madeira () outros:

2) Há parasitismo por carrapatos em pessoas: () sim () não () já ocorreu

3) Tipo de vegetação predominante: _____

4) Quantos cães possui em casa? _____

5) Pratica alguma ação para controle de carrapato? sim () não () Qual? _____

6) Leva o cão ao veterinário? sim () não () Qual a 7) Periodicidade? _____

8) Presença de outras espécies domésticas:

() gatos

() bovinos

() equinos

() outros: Quais?.....

9) Presença de animais silvestres:

() gambá

() roedores

() outros: Quais? _____

10) Proprietário informado sobre os riscos das doenças Transmitidas por Carrapatos?

11) O proprietário conhece alguma doença transmitida por carrapatos? Qual?

12) Nunca ouviu falar () Já ouviu falar () Sabe da relação com o cão () Sabe da relação com o carrapato ()

13) Conhece algum sintoma () sim () não. Se sim, qual?

14) Proprietário informado sobre os riscos dos carrapatos? () sim () não

Conhece o nome do vetor ()

Conhece a forma de transmissão ()

15) Conhece algum caso na localidade de “doença do carrapato” em humanos?

() sim () não

Condição econômica (observacional): () baixa () média () alta

16) Escolaridade:

Nunca frequentou a escola primária

1º grau incompleto

1º grau completo

2º grau incompleto

2º grau completo

superior

17) Que produtos de limpeza utiliza no ambiente? _____

18) Utiliza produtos inseticidas no ambiente? sim não

19) Quais? _____ Intervalos? _____

20) Utiliza mat. físicos de limpeza no ambiente (Ex: Vassoura de fogo)?

sim não

21) Quais? _____ Intervalos? _____

Outras obs relevantes:

FICHA INDIVIDUAL ANIMAL N° _____

Data: __/__/__ Propriedade N° _____ Zona: Rur Urb Localidade: _____

Proprietário: _____

Nome do animal: _____ Sexo: Macho Fêmea Raça: _____

Cor: _____ Idade: _____ Peso estimado: _____

1)Animal Castrado? Sim Não

2)Animal nascido na propriedade? sim não Se não, de onde veio o animal? _____

3)Há qt tempo está com o animal? _____

4) Histórico de carrapatos antes: sim não

5)Histórico de carrapatos na vizinhança: sim não

6)Pêlo: curto médio longo

7)Escore: caquético magro normal obeso

8)Comportamento: triste ativo/normal agitado

9)Idade: <6 meses 6 meses a 2 anos 2 a 5 anos 5 a 10 anos > 10 anos

10) Histórico de epistaxe, rinorragia, gengivorragia: () sim () não

Apresenta algum sintoma atualmente?
Qual? _____

11) Animal vive dentro da residência: () sim () não () às vezes

12) Locais de acesso do animal: () pastagens () córregos () matas () ambiente urbano

13) Contato direto com outras sp animais: () sim () não Quais? _____

Histórico de patologias anteriores: _____

14) Animal teve “doença do carrapato” ? () sim () não qual? _____

15) Como diagnosticou? () clinicamente () laboratorialmente () outras

16) Foi tratado? () sim () não

17) Lembra do tratamento? se sim, qual? _____

18) Fez uso de algum medicamento recente? Qual?

19) Tipo de alimentação: () comida () ração () ambos

Marca da ração _____

20) Tipo de comidas e petiscos que come:

21) Possui água e comida à disposição o tempo todo? () sim () não

Se não, come quantas vezes ao dia: _____

22) Vermifugação: () sim () não Há qto tempo? _____

23) Qual produto? _____

24) Critério para escolha: () indicação () balconista () veterinário () propaganda

25) Possui ectoparasitos? () sim () não

26) Quais e quantidade? (+)

() pulgas _____

() piolhos _____

() sarnas _____

() carrapatos _____ Fases: _____ espécies: _____

27) Faz tratamento? () sim () não Qual produto? _____

28)Se não trata, qual motivo? _____

29)Critério para escolha do produto:

- indicação
- balconista
- veterinário
- propaganda

30)Hábito do animal?

- sempre preso
- preso de dia e solto à noite
- solto
- outros __

31)Apresenta abrigo? sim não Tipo: _____

32)Tipo de ambiente do animal:

- cimentado
- de terra
- gramado
- outros

33)Freq de recolhimento e limpeza das fezes:

- diariamente 2 a 3 x por sem
- 1 x por semana

Exame físico:

Temperatura: ____ Pulso: ____ FR: ____ FC: ____ TPC: ____ Turgor: _____ Linfonodos:

Mucosa ocular: hipocorada normocorada ictérica congesta

Mucosa oral: hipocorada normocorada ictérica congesta

Outras alterações sanitárias atuais: _____

Secreção ocular: _____

Distúrbios atuais de coagulação na pele: petéquias equimoses outros: _____

Observações sobre a saúde do animal ao exame físico:

Dermatopatias? () sim () não

Sinais de otite? () sim () não

Outros tipos de lesões: _____

() não faz

Tem assistência Veterinária? () sim () não

Frequência? () a cada 6 meses () 1 x por ano () só qd fica doente

Animal é vacinado? () sim () não Quais vacinas? _____

Banho: () semanal () quinzenal () mensal () outros

Usa produtos parasiticidas? () sim () não Quais? _____

Outras obs relevantes: _____

Condição de limpeza do ambiente do animal:

() ruim () moderada () satisfatório