

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

ANA PAULA REMOR SEBOLT

***Dirofilaria immitis*: PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO EM CÃES NO MUNICÍPIO DE
LAGUNA, SC, BRASIL**

LAGES

2020

ANA PAULA REMOR SEBOLT

***Dirofilaria immitis*: PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO EM CÃES NO MUNICÍPIO DE
LAGUNA, SC, BRASIL.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV, da Universidade do Estado de Santa Catarina – Udesc.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Barbosa de Moura

LAGES

2020

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

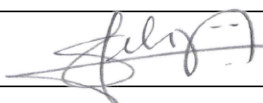
Sebolt, Ana Paula Remor
Dirofilaria immitis: prevalência da infecção em cães no
município de Laguna, SC, Brasil / Ana Paula Remor Sebolt. --
2020.
48 p.

Orientador: Anderson Barbosa de Moura
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,
Programa de Pós-Graduação , Lages, 2020.

1. Dirofilariose. 2. Cães. 3. Microfilárias. 4. Diagnóstico. 5.
Santa Catarina. I. Moura, Anderson Barbosa de. II.
Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de
Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação . III.
Título.

ATA DE BANCA DE AVALIAÇÃO DE MESTRADO

Aos vinte e quatro de julho de dois mil e vinte, às 09h00 horas, reuniu-se nas dependências do Centro de Ciências Agroveterinárias a Banca de Avaliação da Dissertação de Mestrado em Ciência Animal da mestranda **ANA PAULA REMOR SEBOLT**, intitulada "***Dirofilaria immitis*: Prevalência da infecção em cães no município de Laguna, SC, Brasil**", sendo a banca composta pelo professor Dr. Anderson Barbosa de Moura na qualidade de Presidente, Dra. Silvia Cristina Osaki e Dr. Andreas Lazaros Chryssafidis na qualidade de membros. Sendo membros suplentes a professora Dra. Rosiléia Marinho de Quadros e a professora Dra. Márcia Sangaletti Lavina. Após defesa pública da referida dissertação pela mestranda perante a Banca e o público presente, a Banca de Avaliação atribuiu à mesma a seguinte avaliação:

Membro da Banca	Assinatura
Dr. Anderson Barbosa de Moura - UDESC/Lages-SC (presidente)	
Dra. Silvia Cristina Osaki - UFPR/Palotina-PR (membro externo)	
Dr. Andreas Lazaros Chryssafidis - UDESC/Lages-SC (membro)	
Dra. Rosiléia Marinho de Quadros - UDESC/Laguna-SC (suplente)	
Dra. Márcia Sangaletti Lavina - UNIBAVE/Orleans-SC (suplente)	

Avaliação Final - Parecer da Banca:

- () Aprovação
 () Aprovação mediante correções
 () Reprovação

Observações: **Defesa realizada via remota (TEAMS)**

Lages, 24 de julho de 2020.

Visto do Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Despacho para Secretaria em:

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais, Álvaro e Vera, por sempre incentivarem a leitura e o estudo e pelo apoio em todos os momentos.

Aos meus amigos, por aceitarem as aventuras das coletas em Laguna, SC, que renderam bons momentos e ótimas risadas.

Aos amigos do laboratório, Alessandra, Felipe, Giulia e Manuela por toda ajuda durante as análises.

Às Dras. Norma Vollmer Labarthe e Celeste da Silva Freitas de Souza do Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Rio de Janeiro/RJ por fornecerem exemplares adultos de *Dirofilaria immitis*.

A todos os proprietários e organizações de proteção animal do município que colaboraram na pesquisa permitindo a coleta de sangue de seus animais.

Ao professor Anderson, pela oportunidade e todo o conhecimento adquirido durante estes dois anos.

Ao Laboratório de Bioquímica e CEDIMA, por permitirem a utilização de suas estruturas para a realização de análises.

À Alere S/A por fornecerem gentilmente os testes utilizados neste trabalho.

RESUMO

Dirofilaria immitis é o agente causador da dirofilariose, doença que afeta o sistema cardiovascular, principalmente de canídeos. É um nematódeo da família Onchocercidae de distribuição mundial. Tem como hospedeiros definitivos cães, canídeos selvagens, podendo ainda infectar felinos e o ser humano de forma acidental. Para o diagnóstico em animais há diversas técnicas disponíveis, como o esfregaço direto e teste Knott modificado, para detectar as microfíliarias circulantes, e testes de antígeno, como o imunoensaio cromatográfico, e a PCR, normalmente utilizada como forma confirmatória. Os testes que detectam as microfíliarias, podem apresentar resultados falso-negativo quando a infecção se dá somente por machos ou fêmeas adultos. Resultados falso-negativos podem ocorrer nos testes imunocromatográficos, pois apenas antígenos de fêmeas adultas são passíveis de detecção por essa técnica. Portanto, faz-se necessária a utilização de diferentes técnicas para o diagnóstico efetivo dessa infecção em animais. O objetivo do presente trabalho foi determinar a prevalência da infecção por *D. immitis* em cães no município de Laguna, Santa Catarina, Brasil. Foram colhidas amostras de sangue de 238 cães, provenientes de clínicas veterinárias e de organizações de proteção animal do município. Os animais foram submetidos à anamnese e cada amostra foi avaliada pelas técnicas de imunoensaio cromatográfico, PCR, esfregaço direto e teste de Knott modificado. Também foi aplicado um questionário epidemiológico para identificar possíveis fatores de risco para a infecção. Os resultados foram tabulados e analisados estatisticamente pelos testes exato de Fischer e de concordância Kappa para comparação dos resultados das diferentes técnicas diagnósticas empregadas e identificação dos possíveis fatores de risco para a infecção. A prevalência geral foi de 4,62% (11/238). O teste que possibilitou uma maior identificação de amostras positivas foi a PCR (11 amostras), seguido pelo teste imunocromatográfico (oito) e o teste Knott modificado (uma). Pelo esfregaço direto nenhuma amostra foi detectada como positiva. Não foram encontrados fatores de risco estatisticamente significativos. Apenas um dos animais positivos apresentou sinais clínicos compatíveis com a dirofilariose. Dentre as técnicas empregadas, a PCR apresentou os melhores resultados. Embora a dirofilariose canina normalmente tenha alta prevalência em áreas litorâneas do Brasil, não foi observada essa característica no município analisado, sugerindo que novos estudos sejam realizados.

Palavras-chave: Dirofilariose. Cães. Microfilária. Diagnóstico. Santa Catarina.

ABSTRACT

Dirofilaria immitis is the agent of heartworm disease, which affects the cardiovascular system, mainly in dogs. It is a nematode of the Onchocercidae family of worldwide distribution. Its definitive hosts are dogs and wild canids, but it also infects humans and cats. Several tests are available for diagnosis, such as direct smear and modified Knott test, for circulating microfilariae, antigen tests (chromatographic immunoassay) and PCR, usually applied as a confirmatory test. Techniques that detect microfilariae can present false-negative results when the infection occurs only by adult males or females. False-negative results can also occur in antigen tests, because only adult female antigens are detectable by this assay. Thus, it might be necessary to use different techniques for the effective diagnosis of this infection in animals. The aim of this study was to determine the prevalence of infection by *D. immitis* in dogs from the municipality of Laguna, Santa Catarina, Brazil. Blood samples were collected from 238 dogs, from veterinary clinics and animal protection organizations in the municipality. The animals were submitted to anamnesis and each sample was evaluated by chromatographic immunoassay, PCR, direct smear and modified Knott test. An epidemiological questionnaire was also applied to identify possible risk factors for infection. The results were tabulated and analyzed statistically by Fischer's exact test to compare the results of the different diagnostic techniques employed and identify possible risk factors for infection. The overall prevalence was 4.62% (11/238). The test that enabled a greater identification of positive samples was PCR (11 samples), followed by the immunochromatographic test (eight) and modified Knott test (one). By direct smear, no sample was detected as positive. No statistically significant risk factors were found. Only one of the positive animals showed clinical signs compatible with heartworm disease. Among the techniques employed, PCR presented the best results ($p < 0.01$). Even though the canine heartworm disease usually has a high prevalence in coastal areas of Brazil, this characteristic was not observed in the analyzed municipality, suggesting that further studies should be carried out.

Keywords: Dirofilariasis. Dogs. Microfilariae. Diagnostic. Santa Catarina.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 (A) - Imagem de tomografia computadorizada indicando a presença de nódulos de *D. immitis* em parênquima pulmonar humano22
- Figura 2 (B) – Radiografia de tórax humano com a presença de nódulo isolado de *D. immitis* na forma de coin lesion.....22
- Figura 3 – Teste imunocromatográfico de fluxo lateral utilizado no estudo com resultado positivo (C= Controle; T= Positivo)28

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Classificação dos sinais clínicos em relação à manifestação da doença de acordo com a American Heartworm Society.....	20
Tabela 2 - Distribuição das características dos animais amostrados em relação aos resultados encontrados.....	30
Tabela 3 – Resultados obtidos distribuídos de acordo com as diferentes técnicas realizadas.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius

Ag – Antígeno

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilendiaminotetracético

mL – mililitro

µL - microlitro

Taq – DNA polimerase

UV – Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

™ - Trade Mark

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 HISTÓRICO	15
2.2 CLASSIFICAÇÃO E CICLO BIOLÓGICO	16
2.3 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....	17
2.4 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS	19
2.5 A DOENÇA NO SER HUMANO	21
2.6 DIAGNÓSTICO	23
2.7 TRATAMENTO E CONTROLE	24
3 OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 LOCAL DO ESTUDO	26
4.2 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS.....	26
4.3 TESTES DIAGNÓSTICOS.....	27
4.3.1 Extensão Sanguínea	27
4.3.2 Teste de Knott Modificado	27
4.3.3 Imunoensaio cromatográfico.....	27
4.3.4 Reação em Cadeia da Polimerase	28
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
6 RESULTADOS	29
7 DISCUSSÃO	32
8 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

APÊNDICE A – Mapa do Complexo Lagunar Sul.....	45
APÊNDICE B – Mapa dos bairros.....	46
APÊNDICE C – Questionário aplicado aos tutores	47

1 INTRODUÇÃO

Os agentes transmitidos por vetores impactam a saúde humana e animal ao longo dos séculos, sendo de grande importância nas regiões de clima tropical e subtropical, principalmente na América do Sul, África, sudoeste da Ásia e Austrália (SHAW; CATTERUCCIA, 2019).

Grande parte desses agentes transmitidos por vetores é de caráter zoonótico e os caninos, os principais reservatórios de *Dirofilaria immitis*, *Leishmania* spp., entre outros agentes causadores de doenças de importância à saúde pública (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2016; MAGGI; KRÄMER, 2019). A ocorrência pode ser influenciada por diversos fatores como a ecologia e a distribuição dos artrópodes vetores (JÁNOVÁ, 2019).

Tem sido observado um aumento da incidência e ampliação da distribuição geográfica dessas doenças, exemplificando a Dirofilariose e Leishmaniose na Itália, tendo em vista a distribuição de vetores, movimentação dos cães, aprimoramento de técnicas diagnósticas associados a maior conscientização de pesquisadores e profissionais (OTRANTO; CAPELLI; GENCHI, 2009).

A dirofilariose, conhecida como “doença do verme do coração”, é uma doença parasitária ocasionada pela *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856), nematódeo de distribuição cosmopolita, que ocorre, principalmente, em regiões quentes e úmidas (BENDAS et al., 2017). Sua transmissão depende de alguns critérios, tais como a presença de um vetor competente que tenha acesso a uma população de canídeos susceptível, assim como condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento do ciclo (WATTS; COURTNEY; REDDY, 1999).

No Brasil, a prevalência da *D. immitis* em cães varia de 0 a 62,2% (BENDAS et al., 2017). No estado de Santa Catarina, em um estudo realizado nos municípios de Florianópolis e Araquari, cidades litorâneas, foram obtidos valores de prevalência de 2,1% e 7,3%, respectivamente (LABARTHE et al., 2014). Outro estudo em Florianópolis/SC, relatou a prevalência de 15% na região da Lagoa da Conceição (ARAUJO et al., 2003). Na região do Planalto Serrano catarinense, não foi relatado nenhum animal positivo (SARTOR, 2004).

Em humanos, no município de Joinville, Santa Catarina, foi realizado um estudo retrospectivo clinicopatológico de casos no período entre 1995 a 2009, onde encontraram oito casos de dirofilariose, dentre eles um em globo ocular e sete no

pulmão, concluindo que ocorre a infecção do ser humano no município e entorno (BUBLITZ et al., 2012)

Os maiores valores de prevalência estão intimamente relacionados às áreas litorâneas, banhadas por rios e lagoas, sendo potenciais locais de desenvolvimento de artrópodes competentes para a transmissão dessa parasitose (SILVA; LANGONI, 2009).

O município de Laguna, localizado no litoral sul de Santa Catarina, apresenta condições ideais para o desenvolvimento do nematoide *D. immitis*, uma vez que três microbacias hidrográficas banham a região, associado ao fato de apresentar uma grande população canina, indicando a necessidade de estudos epidemiológicos nessa região.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRICO

Segundo Dantas-Torres e Otranto (2020), o primeiro relato da dirofilariose canina ocorreu em 1626 pelo italiano F. Birago, o qual informou a presença de “vermes do coração” em um de seus cães de caça.

O primeiro relato em cães no Alabama, EUA, foi realizado T. C. Osborne, no ano de 1847, no *The Western Journal of Medicine and Surgery* (OSBORNE, 1847). Posteriormente, foi descrita nos Estados Unidos no ano de 1856 por Leydi e classificada como *Fillaria immitis* (LEIDY, 1856).

No ano de 1911 os pesquisadores franceses Railliet e Henry fizeram sua reclassificação como *Dirofilaria immitis*, nome atualmente conhecido (RAILLIET; HENRY, 1911).

Segundo Pinto e Luz (1936), o primeiro relato de *D. immitis* no Brasil foi feito por Silva Araújo em 1878, com a descrição de quatro adultos machos presentes na artéria pulmonar, átrio e ventrículo direitos em canino, encontrados durante uma necropsia. Já em gatos, a enfermidade no Brasil foi relatada por Travassos (1921), sendo o primeiro relato no mundo para a espécie.

Em 1974 foi criada a American Heartworm Society (AHS), para discutir pesquisas relacionadas à Dirofilariose. Esse grupo realiza um simpósio acerca desse tema a cada três anos nos EUA (AHS, 2018).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1979, reconheceu a dirofilariose não só como um problema exclusivo a animais, mas também comum à população de seres humanos, sendo considerada uma zoonose (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS), 1979).

Em humanos há poucos relatos, principalmente em decorrência de seu difícil diagnóstico e por ser similar a neoplasia pulmonar. No Rio de Janeiro foi feito o primeiro relato de dirofilariose humana no Brasil por Magalhães (1887).

2.2 CLASSIFICAÇÃO E CICLO BIOLÓGICO

D. immitis pertence à ordem Spirurida, subordem Spirurina, superfamília Filarioidea e família Onchocercidae (BOWMAN, 2014).

São nematoides de coloração esbranquiçada, branca ou acinzentada medindo aproximadamente 15 a 30 centímetros de comprimento e uma cutícula dura. O macho adulto pode atingir de 12 a 20 centímetros de comprimento e a fêmea adulta de 25 a 31 centímetros (BOWMAN, 2014; TAYLOR; COOP; WALL, 2016).

Segundo Lok; Walker; Scoles (2000) e Foster; Walker (2019), foram listadas 26 espécies de artrópodes vetores de *D. immitis* nos EUA entre os gêneros *Culex* spp., *Aedes* spp., *Mansonia* spp., *Anopheles* spp. e *Ocherotatus* spp. No Brasil, em estudo realizado por Ahid; Vasconcelos; Lourenço-de-Oliveira, (2000), foi confirmada a competência da espécie *Culex quinquefasciatus* na transmissão de *D. immitis*.

Para a transmissão de *D. immitis* é necessária a presença de um mosquito como hospedeiro intermediário, que se torna infectado mediante a ingestão do sangue do hospedeiro definitivo em microfilaremia. No mosquito, nos túbulos de malpighi, ocorre a primeira muda de larvas em primeiro estágio (L1) para larvas de segundo estágio (L2) e, posteriormente, para terceiro estágio (L3), a forma infectante para vertebrados (AHS, 2018).

Essas larvas de terceiro estágio migram pela cavidade celomática até atingirem o aparelho bucal dos vetores. Para que ocorra de forma adequada o desenvolvimento da forma infectante, é preciso de uma temperatura de cerca de 27°C e 80% de umidade relativa do ar, que irá durar, aproximadamente, de 10 a 14 dias. Contudo, caso ocorram temperaturas inferiores, o período de maturação pode se prolongar (BOWMAN, 2014).

Alguns autores afirmam que para o desenvolvimento das larvas de *D. immitis* até o estágio infectante (L3) é necessária a temperatura mínima de 14°C (CHRISTENSEN; HOLLANDER., 1978; FORTIN; SLOCOMBE, 1981). Todavia, com o fenômeno climático denominado “ilhas de calor”, decorrente, principalmente, da elevada urbanização das cidades, ocasionando uma temperatura média mais elevada se comparada a áreas rurais, torna viável o desenvolvimento das larvas de *D. immitis* mesmo em locais com temperaturas médias mais baixas (AHS, 2018).

Após o repasto sanguíneo, as larvas L3, penetram através da abertura realizada pelo mosquito durante hematofagia. De três a nove dias as larvas sofrem outra muda, para quarto estágio (L4). Uma última muda ocorre, transformando L4 em L5 (adultos jovens) por volta de 50 a 70 dias após a inoculação, quando estão migrando pelo corpo do hospedeiro até atingirem coração e pulmão. Os adultos jovens chegam aos vasos pulmonares por volta de 50 a 70 dias, podendo levar até 120 dias. A maturidade sexual dos adultos se dá por volta dos 120 dias após a infecção dos cães, que então apresentarão microfírias no sangue circulante (BOWMAN, 2014; TAYLOR, 2016).

2.3 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A dirofilariose é considerada uma doença endêmica nos continentes americano africano, europeu e Oceania, além de alguns países da Ásia, como o Japão. Tem sido observado um comportamento progressivo nos últimos anos, com a identificação de novos vetores competentes, capazes da transmissão dos parasitas em locais que anteriormente não eram observados, como citam Bowman et al. (2009), nos Estados Unidos; Genchi et al. (2009), na Europa; Vezzani; Carbajo (2006) na Argentina; Ahid; Da Silva Vasconcelos; Lourenço-de-Oliveira (2000), no Brasil.

De acordo com Genchi et al. (2009, 2011), mudanças climáticas associadas ao aumento da temperatura, em conjunto com as migrações de cães e pessoas pela Europa e a identificação de novos vetores competentes, são responsáveis pela maior abrangência geográfica das infecções por *D. immitis* nesta região do mundo. Características semelhantes foram observadas nos Estados Unidos, onde, nos últimos 30 anos, observou-se aumento da prevalência em diversas regiões (TERREL e COURTNEY, 1998).

A transmissão da dirofilariose através de mosquitos, é estritamente dependente de um ambiente com clima adequado, para que seja possível o desenvolvimento das larvas do helminto. Sendo assim, temperatura e umidade adequadas são fatores significativos para o favorecimento do ciclo desse parasita (GENCHI et al., 2011).

Os maiores índices de prevalência estão, normalmente, relacionados às áreas litorâneas, banhadas por rios e lagoas, sendo potenciais locais de desenvolvimento de artrópodes competentes para a transmissão dessa parasitose (SILVA; LANGONI, 2009).

O continente americano tem uma grande diversidade em relação às características de topografia, hidrografia e clima. Deste modo, o conhecimento dos padrões de transmissão e prevalência pode variar de acordo com a região estudada (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2013).

Dentre os países da América do Sul, o Brasil é o país com maior número de publicações sobre a dirofilariose (VEZZANI; EIRAS; WISNIVESKY 2006). Estudos de prevalência realizados na região Sul do país, apontam, no estado de Santa Catarina uma prevalência de 2,1 a 15% no município de Florianópolis e 7,3% em Araquari (ARAUJO et al., 2003; LABARTHE et al., 2014). Na Lagoa da Conceição, região de Florianópolis, Santa Catarina, foi reportada uma prevalência de 15% (ARAUJO et al., 2003). Em outro estudo, também em Santa Catarina, na região de Balneário Camboriú entre os anos de 2005 e 2006, não foram detectados animais positivos através da pesquisa de antígenos para *D. immitis* na área estudada (SARTOR et al., 2006). A pesquisa de antígenos também foi utilizada para avaliar cães na região do Planalto Serrano, no município de Lages, a qual também não apresentou nenhum caso positivo (SARTOR, 2004). Com exceção desses, não foram encontrados estudos mais recentes acerca da prevalência dessa parasitose em outras regiões do estado de Santa Catarina.

No estado do Rio Grande do Sul, 0,3% foi a prevalência observada no teste de antígeno por Labarthe (2003). Já no Paraná, verificou-se uma prevalência maior nos testes de esfregaço, Knott modificado, filtração e pesquisa de antígeno, de 5,5% em alguns municípios avaliados por Reifur; Thomaz-Soccol; Montiani-Ferreira (2004), enquanto nos municípios de Guaratuba, Guaraqueçaba e Pontal do Paraná, todos no litoral, foram identificadas prevalências de 24,5%, 31,8% e 26,3%, respectivamente por meio do teste de antígeno (LABARTHE et al., 2014).

Alguns trabalhos realizados na região norte do país, no estado do Amazonas, nos municípios de Coari e Lábrea, relatam prevalências de 12,5% e 44,4%, obtidas pelas técnicas de esfregaço e PCR, respectivamente (SILVA et al., 2008; SOARES et al., 2014). No Pará, em estudos realizados na Ilha de Marajó, utilizando os testes de esfregaço, Knott modificado e pesquisa de antígenos, foram observadas prevalências altas, de 53,5% e 32,45% (FURTADO et al., 2009; GARCEZ et al., 2006).

Labarthe et al. (2003), em pesquisa de antígenos realizada na região sudeste, verificaram prevalência de 2,7% em São Paulo, 3,8% no Rio de Janeiro e 0% em Minas gerais. Em outro estudo realizado pela mesma autora, em 2014, também com a pesquisa de antígenos, foram observados valores diferentes do estudo de 2003. Rio de Janeiro apresentou, em Mangaratiba, 16,3%; Niterói, 58,6%; Cabo Frio, 27,5% e Armação de Búzios, 62,2%. Em São Paulo, os valores permaneceram semelhantes com 2,8% em Guarujá e 7,6% em Bertioga (LABARTHE et al., 2014). Em Pernambuco, Ramos et al. (2016) verificaram uma prevalência de 11,54% na capital, Recife. Labarthe et al. (2014), também em Pernambuco, observaram 36,7%, em Recife, e 49,5% em Itamaracá.

Com relação a infecção do ser humano, mais de 100 casos foram detectados nos EUA desde 1971, a maioria proveniente da região sudeste, onde há alta prevalência em cães (THEIS, 2005). Também na Costa Rica (BRENES et al., 1985), Venezuela e Colômbia (BEAVER; ORIHIEL; LEONARD, 1990) e Argentina (VEZZANI; EIRAS; WISNIVESKY, 2006) foram registradas infecção no ser humano, com menor frequência.

No Brasil foram descritos casos de dirofilariose pulmonar em humanos. No município de Florianópolis, SC, já foram relatados sete casos humanos (CAVALLAZZI et al., 2002). Também em Santa Catarina, em estudo retrospectivo, foram registrados oito casos no município de Joinville (BUBLITZ et al., 2012).

2.4 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

A maioria dos animais infectados não manifesta sinais clínicos ou alterações laboratoriais. Entretanto, alguns podem desenvolver a doença clínica, que, em condições sistêmicas, ameaçam a sua vida (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2013). A *American Heartworm Society* classifica o grau da doença com base nos sinais clínicos observados, presentes na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação dos sinais clínicos em relação à manifestação da doença de acordo com a American Heartworm Society

Gravidade	Sinais clínicos
Leve	Assintomático ou tosse
Moderado	Tosse, intolerância ao exercício, sons pulmonares anormais
Severo	Tosse, intolerância ao exercício, dispnéia, sons cardíacos e pulmonares anormais, hepatomegalia, síncope, ascite, morte
Síndrome da veia cava	Letargia e fraqueza, associada à hemoglobinemia e hemoglobinúria

Fonte: Adaptada de AHS (2018).

A gravidade das lesões, bem como seus respectivos sinais clínicos, está relacionada ao número de parasitos adultos (variando de 1 até >250), a duração da infecção e a relação parasito-hospedeiro (ATKINS, 2017). Embora uma alta carga parasitária esteja associada à doença grave, a relação parasito-hospedeiro pode ter uma maior importância no desenvolvimento de sinais clínicos cardiovasculares do que o número de vermes de forma isolada (NELSON; COUTO, 2014).

Em cães, o dano primário nas artérias pulmonares por meio da ação mecânica dos parasitos adultos, inicia cerca de três meses pós-infecção. As alterações se manifestam por inflamação vascular, lesão endotelial e descamação, ativação e atração de leucócitos e plaquetas, desencadeantes de uma proliferação de células de músculo liso, com posterior acúmulo de colágeno e fibrose (CARRETÓN; MORCHÓN; MONTOYA-ALONSO, 2017).

Os adultos de *D. immitis* que morrem de forma natural ou por ação de medicamentos adulticidas, provocam uma reação severa, favorecendo a ocorrência de trombose, inflamação granulomatosa, obstrução arterial e vasoconstrição. As artérias pulmonares tornam-se aumentadas e espessas, com a superfície endotelial rugosa (ETTINGER; FELDMAN; CÔTÉ, 2017). Além disso, secundário ao tromboembolismo pulmonar e liberação de substâncias vasoativas pelo endotélio vascular, a hipóxia causada por alterações na ventilação-perfusão resulta em uma

vasoconstricção prolongada. Esses fatores contribuem para o desenvolvimento da hipertensão pulmonar com aumento da pós-carga do ventrículo direito, culminando em insuficiência cardíaca congestiva (POLIZOPOULOU et al., 2000).

O débito cardíaco é reduzido quando ocorre falha do ventrículo direito. Quando o débito cardíaco se torna inadequado durante o exercício, pode ser observada dispneia, fadiga e síncope (NELSON; COUTO, 2014).

Ocasionalmente, a oclusão mecânica da via de saída do Ventrículo Direito (VD), da válvula tricúspide, das veias cavas ou das artérias pulmonares ocorre quando há muitos vermes (síndrome da veia cava). Essa obstrução de influxo combinada com a consequente insuficiência tricúspide causa sinais de insuficiência cardíaca direita e déficit cardíaco esquerdo (WARE, 2011).

O exame físico pode não apresentar alterações em casos precoces ou leves. Todavia, com doença grave, taquipneia ou dispneia, distensão ou pulsação da veia jugular, ascite ou outras evidências de insuficiência cardíaca direita frequentemente se desenvolvem. Sons pulmonares anormais (sibilos e crepitações), sopro na base esquerda, um sopro de insuficiência tricúspide ou arritmias cardíacas são variavelmente ouvidos durante auscultação (WARE, 2011).

A infecção por *D. immitis* também pode estar relacionada às lesões glomerulares e proteinúria. Imunocomplexos circulantes resultam em glomerulonefrite. Em um estudo, onde foi realizada a infecção experimental em cães, foi observada glomerulonefrite membranoproliferativa em todos os 12 cães de 13 a 19 meses pós-infecção (ATKINS et al., 2011).

2.5 A DOENÇA NO SER HUMANO

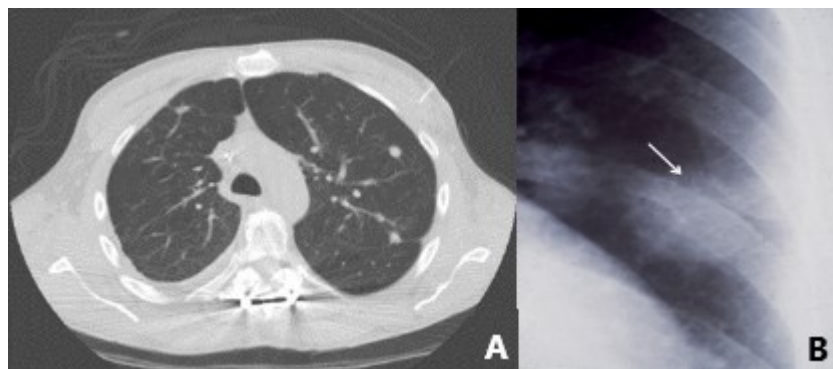
As pessoas que habitam áreas endêmicas correm um maior risco de contrair a doença através do repasto sanguíneo do vetor infectado. (MCCALL et al., 2008).

O ciclo tem início no tecido subcutâneo após a picada pelo vetor, onde a larva é transportada via corrente sanguínea até o coração e, posteriormente ao pulmão. (ACHA; SZYFRES, 2003). Após a morte e desintegração, são liberados antígenos pela larva, ocasionando vasculite local com formação de granuloma e infarto pulmonar (DOLTRÁRIO et al., 2019).

Por meio de imagens radiográficas do tórax, é possível observar um nódulo pulmonar, solitário, que mimetiza uma neoplasia. Esse nódulo tem como

características o formato esférico, bem delimitado e não calcificado, podendo atingir de 1 a 3 cm, denominado “coin lesion” (Figura B). Ocasionalmente, pode haver múltiplos nódulos, semelhantes a uma metástase, infecções por fungos e bactérias (Figura A) (MALIK et al., 2016; DOLTRÁRIO et al., 2019; FIORENTINI et al., 2020).

Figura 1 (A) - Imagem de tomografia computadorizada indicando a presença de nódulos de *D. immitis* em parênquima pulmonar; Figura 2 (B) – Radiografia de tórax humano com a presença de nódulo isolado de *D. immitis* na forma de “coin lesion”



Fonte: (MALIK et al., 2016) (SIMÓN et al., 2012)

Apenas uma pequena parcela de pessoas infectadas chega a apresentar sinais clínicos. Nesses quadros sintomáticos, podem ser relatados febre, tosse, hemoptise, dispneia e dor no peito. Entretanto, a dirofilariose raramente é a primeira suspeita em humanos em casos de sintomas e nódulos pulmonares (ACHA; SZYFRES, 2003; DOLTRÁRIO et al., 2019; FIORENTINI et al., 2020; SIMÓN et al., 2012).

Embora o quadro clássico seja o nódulo pulmonar, já foram relatados casos onde *D. immitis* foi encontrada em locais incomuns como encéfalo, fígado e olhos e tecido adiposo mesentérico, artérias testiculares e tecido conjuntivo (AVELLIS et al., 2011; BUBLITZ et al., 2012; THEIS, 2005).

O diagnóstico é complicado, tendo em vista a necessidade de descartar as demais causas. Há alguns métodos não invasivos disponíveis, como o teste de ELISA, porém de difícil acesso. O mais comum a ser utilizado é a toracotomia e ressecção cirúrgica, de custos bastante elevados, associada à histopatologia do nódulo, na maioria das vezes apresentando um núcleo central de necrose cercada por uma área granulomatosa (MALIK et al., 2016; MCCALL et al., 2008).

O controle é realizado combatendo os vetores por meio de inseticidas, assim como a administração de medicação preventiva aos animais de forma a combater as microfilárias circulantes (ACHA; SZYFRES, 2003).

2.6 DIAGNÓSTICO

Apesar de diversos tipos de testes diagnósticos estarem disponíveis, na rotina clínica, o teste de antígeno é bastante utilizado (ZAJAC; CONBOY, 2012).

Esse teste tem como base a detecção de antígenos secretados por fêmeas adultas de *D. immitis* e possuem 100% de especificidade, podendo atingir números próximos a 100% de sensibilidade. O valor da sensibilidade varia conforme o número de fêmeas adultas, fêmeas imaturas ou apenas exemplares machos presentes no animal, assim como baixa antigenemia (LITTLE et al., 2018; TRANCOSO et al., 2020; VENCO et al., 2017).

Embora seja um teste bastante específico e sensível, a formação de imunocomplexos pode prejudicar o diagnóstico e, de acordo com estudos recentes, o aquecimento em bloco (103°C a 104°C; 10 minutos) e posterior centrifugação das amostras de plasma e/ou soro a 16.000g resultou em um aumento de resultados positivos nos testes de antígeno (STARKEY et al., 2017; VENCO et al., 2017).

Sendo assim, a “American Heartworm Society” recomenda que para o diagnóstico, além do teste de antígeno, também sejam realizados testes para pesquisa de microfilárias circulantes (LITTLE et al., 2018; AHS, 2018).

Dentre os testes para detecção das microfilárias, há o teste de Knott modificado, mais comumente utilizado para este fim e considerado de alta especificidade e sensibilidade. Entretanto, caso a infecção seja apenas por um sexo, não será possível realizar essa observação. (MARCOS et al., 2016; MYLONAKIS et al., 2004).

Além do teste de Knott modificado, há o esfregaço direto utilizado com o mesmo objetivo, pesquisa de microfilárias. É um teste barato, rápido e bastante acessível na rotina clínica. Assim como o Knott, também não detecta microfilárias nos casos de infecção por vermes adultos de apenas um sexo. No entanto, para sua realização é utilizada uma quantidade muito pequena de sangue, podendo não ser representativa para a visualização de microfilárias (AHS, 2018; FURTADO et al., 2009).

A pesquisa de microfilárias pode não ser tão sensível quanto os testes de antígeno. Contudo, é de importância para validação de alguns testes sorológicos, assim como identificar animais reservatórios e, principalmente, auxiliar na escolha do tratamento mais adequado para cada animal (MARCOS et al., 2016).

Como forma confirmatória há a PCR. Utilizada, principalmente, para a diferenciação das espécies de microfilárias encontradas, visto que são morfologicamente semelhantes. É um teste espécie-específico, tornando-o muito confiável (WATTS; COURTNEY; REDDY, 1999).

2.7 TRATAMENTO E CONTROLE

O tratamento e diagnóstico estão relacionados a altas despesas e, em países subdesenvolvidos, como o Brasil, onde há alta incidência da doença, tutores em situação de vulnerabilidade social tem pouco acesso aos serviços veterinários. Sendo assim, a prevenção da doença torna-se mais importante levando-se em consideração as consequências da doença, alto custo e efeitos adversos durante e após o tratamento, assim como o potencial reservatório, inclusive para a infecção humana (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2016; MCCALL et al., 2017)

O objetivo final do tratamento é fornecer uma melhor condição clínica, assim como a eliminar as diferentes fases de *D. immitis* no hospedeiro, dentre eles vermes adultos presentes na artéria pulmonar e ventrículo direito do coração, microfilárias circulantes e larvas em migração pelo hospedeiro com destino final o coração, com o mínimo de complicação após o tratamento (BOWMAN, 2014; AHS, 2018).

Antes de iniciar o protocolo, deve-se realizar exame físico, avaliação das funções cardíaca, pulmonar, hepática e renal. Caso o animal apresente sinais clínicos da doença, será necessário entrar com uma terapia de suporte para sua estabilização, principalmente antes de ser aplicado o medicamento adulticida (AHS, 2018; TAYLOR; COOP; WALL, 2016). Também é necessário classificar a gravidade da doença (Tabela 1) para que o melhor protocolo seja ajustado (ESDA, 2017; ETTINGER; FELDMAN; CÔTÉ, 2017).

Dicloridrato de melarsomina tem sido o medicamento de escolha para o tratamento adulticida. O protocolo de três doses é recomendado para todos os animais, exceto aqueles que apresentem a doença mais severa, como a síndrome da veia cava (AHS, 2018; ESDA, 2017; NELSON; COUTO, 2014). Também pode ser

utilizada a doxiciclina para eliminar a *Wolbachia*, bactéria endossimbionte, além de reduzir os problemas ocasionados pela morte de parasitas adulto (AHS, 2018).

É essencial que alguns cuidados sejam tomados após a aplicação de melarsomina, dentre eles a restrição de exercício (do diagnóstico a até pelo menos um mês após a última aplicação) para evitar problemas associados ao tromboembolismo (ESDA, 2017; ETTINGER; FELDMAN; CÔTÉ, 2017; NELSON; COUTO, 2014; AHS, 2018).

Posteriormente ao tratamento adulticida, tem-se o início do tratamento microfilaricida, que pode ser realizado com a aplicação de lactonas macrocíclicas, com muita cautela em animais com alta contagem de microfilárias circulantes, (BOWMAN, 2014; NELSON; COUTO, 2014; AHS, 2018).

Nessas condições, torna-se essencial o uso de anti-histamínicos como forma de prevenir futuras reações alérgicas tendo em vista que as microfilárias são alergogênicas, assim como a observação do animal no dia seguinte à aplicação do microfilaricida (BOWMAN; ATKINS, 2009; ETTINGER; FELDMAN; CÔTÉ, 2017; AHS, 2018).

Como forma de prevenção, em áreas endêmicas, recomenda-se o uso de lactonas macrocíclicas de forma oral ou tópica associado a um repelente, para minimizar o risco de infecção (AHS, 2018; BOWMAN, 2014). Essa classe de medicamento tem se mostrado segura em sua utilização, eficaz, de fácil administração e valor acessível quando comparada ao custo significativo do tratamento (MCCALL et al., 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a prevalência da infecção por *D. immitis* em cães no município de Laguna, Santa Catarina

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a prevalência da infecção por *D. immitis*, por meio das técnicas de PCR de sangue total, Knott modificada, esfregaço sanguíneo corado e da pesquisa de antígenos através do imunoensaio cromatográfico.
- Comparar os resultados das diferentes técnicas diagnósticas empregadas
- Identificar fatores associados para a infecção por *D. immitis* em cães no município de Laguna, Santa Catarina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UEDESC) no dia 18/07/2019 sob o protocolo nº 5001130319.

4.1 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado no município de Laguna, localizado no litoral sul do estado de Santa Catarina (Latitude 28°28'57" e longitude 48°46'51"), com uma unidade territorial de 333,986 km² e população estimada de 45.814 pessoas (IBGE, 2017; PML, 2017).

O município apresenta temperatura média de 19,7°C, com ventos predominantes: sul, sudeste e nordeste. Além disso, possui uma vegetação diversa, composta predominantemente por mata atlântica e áreas de restinga e mangue (PML, 2017b).

Em relação à hidrografia, é banhado por três bacias hidrográficas, sendo a de Itapirubá, na porção oeste do município, a bacia do Rio Jaguaruna, Rio da Madre e Rio Congonhas na porção oeste e na divisa com o município de Capivari de baixo, rio Sambaqui Pequeno e Córrego do Matuto conforme ilustrado no Apêndice A (PML, 2017b).

4.2 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

Segundo censo realizado pela gerência de bem-estar animal da Prefeitura Municipal de Laguna, Santa Catarina, há um total aproximado de 7.000 cães domiciliados (Dados não publicados) na cidade.

Considerando-se prevalência esperada de 20%, erro de 5% e intervalo de confiança de 95%, calculada através do software Epiinfo 7.0 (2018), 238 animais foram selecionados de forma aleatória. Os animais eram de ambos os sexos, de idades e raças variadas, provenientes de clínicas veterinárias, organizações de proteção animal do município e domicílios.

Foram colhidas amostras de sangue das veias jugular e/ou céfalica dos cães, com seringa de 3 mL que foram acondicionadas em tubos contendo EDTA e ativador de coágulo, mantidos sob refrigeração até o processamento.

Os tutores responderam a um questionário acerca dos dados de identificação de cada animal e seus hábitos, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visando identificar possíveis fatores de risco para a infecção (apêndice c).

4.3 TESTES DIAGNÓSTICOS

4.3.1 Extensão Sanguínea

O esfregaço sanguíneo foi realizado utilizando 20 µL de sangue total em lâmina de vidro seguido de coloração Romanowsky modificada.

As lâminas foram analisadas em microscopia óptica com aumento de 100x para observação e contagem de microfilárias.

4.3.2 Teste de Knott Modificado

Esse teste foi realizado conforme descrito por Foreyt (2001), utilizando 1 mL de sangue com EDTA acrescido de 9 mL de formalina 2% em um tubo de fundo cônico de 15 mL e, na sequência, agitado levemente durante três minutos para a lise dos eritrócitos e fixação das microfilárias, seguido de centrifugação a 1500 rotações por minuto (rpm) durante cinco minutos e posterior adição de uma gota de azul de metileno 0,1% à amostra.

Uma lâmina com o material sedimentado foi confeccionada para observação em microscopia óptica (400X), identificação e contagem de microfilárias.

4.3.3 Imunoensaio cromatográfico

Testes rápidos do tipo imunocromatográficos (Alere Dirofilariose Ag Test Kit) foram utilizados para a detecção de antígeno de *D. immitis* no soro, plasma ou sangue total canino. Os kits foram gentilmente cedidos pela Alere TM.

Para a realização do teste, foram acrescentadas, com pipeta, duas gotas de amostra de soro na cavidade para amostra e o resultado interpretado entre 10 a 15 minutos.

Como interpretação dos resultados, a presença somente da linha C (controle) indica um resultado não reagente, ou seja, negativo; e a presença das linhas C e T simultaneamente, indica um resultado reagente, considerado positivo, podendo variar a intensidade da coloração (Figura 3).

Figura 3 - Teste imunocromatográfico de fluxo lateral utilizado para detecção de antígenos de *D. immitis* com resultado positivo (C= Controle; T= Positivo).



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

4.3.4 Reação em Cadeia da Polimerase

Alíquotas de sangue total com EDTA foram utilizadas para a extração de DNA, modificado do descrito por Rishniw et al. (2006). Foram utilizados 250µL de sangue com EDTA, com adição de 400 µL de solução tampão de lise (50mM Tris, pH 8.0; 100mM EDTA, 100mM NaCl, 1% SDS). Na sequência, adicionados 10µL de proteinase K (10mg/mL) e então mantidos em estufa *overnight* a 55°C, seguido da aplicação do método de extração utilizando fenol/clorofórmio, padronizado por Sambrook e Russel (2001).

A detecção de DNA *D. immitis* em sangue foi realizada utilizando primers espécie-específicos: para a “forward Diro” (5'ACGTATCTGAGCTGGCTCAC-3') e “reverse Diro” para um gene de antígeno de superfície da cutícula do parasito (5'ATGATCATTCCGCTTACGCC-3'), conforme descrito por Watts, Courtney e Reddy (1999).

Como controles negativo e positivo foram utilizados água ultrapura autoclavada e DNA extraído de exemplares adultos de *D. immitis* (cedidos pelas Dras. Norma Vollmer Labarthe e Celeste da Silva Freitas de Souza, do Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz. Rio de Janeiro/RJ), respectivamente.

Para a reação de PCR utilizou-se o kit GoTaq® G2 Hot Start Taq Polymerase, em um volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada em termociclador com desnaturação inicial de 95°C por 4 minutos, ligação dos iniciadores a 55° por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos de 25 ciclos e um ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos (SCOLES; KAMBHAMPATI, 1995).

Após amplificação, foram utilizados 5 µL de cada reação, adicionados 2 µL de corante GelRed e depositados em gel de agarose 1,5% para realização da eletroforese (112V) em tampão de corrida TAE 50x (Tris base, Ácido acético e EDTA 0,5M). Ao final da eletroforese, o gel foi observado em transiluminador UV.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram tabulados e analisados estatisticamente pelo Teste Exato de Fischer, nos softwares Excel e RStudio (R CORE TEAM, 2020), respectivamente, para comparação dos resultados das diferentes técnicas diagnósticas empregadas e para a determinação de correlação da infecção com os possíveis fatores de risco analisados.

Além disso, também foi realizado o cálculo de prevalência (animais positivos / total da população avaliada x100).

6 RESULTADOS

Do total de cães amostrados, segundo tutores e/ou responsáveis, 88,65% (211/238) foram adotados, 5,04% (12/238) comprados e 6,30% (15/238) em condição de rua.

Todos os animais em condição de rua não possuíam raça definida (SRD). Dos adotados, 90,99% (192/211) eram SRD e 9% (19/211) eram de raça, dentre elas Beagle (1), Boxer (2), Collie (1), Labrador (1), Yorkshire (3), Shih-tzu (2), Pug (1), Poodle (3), Pinscher (3), Pit bull (2). Quanto aos comprados, Pinscher (1), Yorkshire terrier (2), Schnauzer (1), Chihuahua (1), Shih-tzu (2), Golden Retriever (1), Lhasa- apso (1), Pit bull (1), Poodle (1).

Em relação ao sexo, a amostra foi composta por 62,60% de fêmeas e 37,40% de machos. O teste Exato de Fisher para essa característica não resultou em significância ($p=0,3384$). As demais características dos animais estão presentes na tabela 2.

Das 238 amostras de sangue coletadas, considerando todas as técnicas realizadas, 11 apresentaram resultado positivo, representando uma prevalência de 4,62% para dirofilariose canina no município de Laguna, Santa Catarina. A distribuição dos animais positivos em relação às técnicas utilizadas está presente na tabela 3.

No imunoensaio cromatográfico, oito animais apresentaram resultado positivo e, em nenhum deles foram observadas microfilárias, tanto no teste de Knott modificado como no esfregaço sanguíneo. Também não foram relatados sinais clínicos característicos da doença em nenhum dos oito animais positivos no imunoensaio cromatográfico.

Na PCR, 11 amostras contendo DNA de *D. immitis* foram identificadas, sendo sete delas também positivas em imunoensaio cromatográfico, uma no teste de Knott modificado e três apenas na PCR.

Os testes imunocromatográfico e Knott modificado conseguiram detectar 72,7% (8/11) e 9,1% (1/11) dos positivos identificados pela PCR, respectivamente.

Tabela 2 - Características dos animais amostrados em relação aos resultados da pesquisa de *Dirofilaria immitis* em cães de Laguna, SC. 2000.

Categorias	Pesquisa <i>D. immitis</i>	
	Positivo	Negativo
Coloração da pelagem		
Branco	5 (2,10%)	48 (20,17%)
Preto	2 (0,84%)	67 (28,15%)
Bege	2 (0,84%)	55(23,11%)
Marrom	2(0,84%)	46 (19,32%)
Cinza	0	11 (4,62%)
Estilo de vida		
Intradomiciliar	3 (1,26%)	18 (7,56%)
Quintal	8 (3,36%)	209 (87,81%)
Idade		
6m-1	5 (2,10%)	51 (21,42%)
>2-4	1 (0,42%)	49 (20,58%)
>4-6	3 (1,26%)	43 (18,06%)
>6	2 (0,84%)	83 (34,87%)
S.I	0	1 (0,42%)
Viagem		
Sim	2 (0,84%)	27 (11,34%)
Não	9 (3,78%)	200 (84,03%)
Vermifugação		
Sim	9 (3,78%)	172(72,27%)
Não	2 (0,84%)	55 (23,10%)
Uso de ectoparasiticida		
Sim	4 (1,68%)	67 (28,15%)
Não	7 (2,94%)	160 (67,22%)
Medicação preventiva		
Sim	0	0
Não	11 (4,62%)	227 (95,37%)
Controle de insetos		
Sim	0	2 (0,84%)
Não	11 (4,62%)	225 (94,53%)

Tabela 3 - Resultados da pesquisa de dirofilariose em cães de Laguna, SC, obtidos de acordo com as diferentes técnicas empregadas.

Resultado	IEC*	Knott	Esfregaço	PCR
Positivo	8 (3,36%)	1 (0,42%)	0 (0%)	11 (4,62%)
Negativo	230 (96,63%)	237 (99,57%)	238 (100%)	227 (95,37%)

*Imunoensaio cromatográfico

Quanto à locomoção dos animais, dois dos positivos, segundo tutores, já viajaram para outras cidades, dentre elas Criciúma e Joinville, ambas no Estado de Santa Catarina. A locomoção do animal entre cidades não apresentou diferença estatística significativa ($p=0,6286$).

Dentre os 11 animais positivos, apenas um canino da raça Boxer, macho, nove anos, apresentou sinais clínicos comuns à doença, como fadiga, tosse e intolerância ao exercício. Esse animal resultou positivo em duas das técnicas utilizadas, teste Knott modificado e PCR.

Os demais animais positivos não apresentaram nenhum sinal clínico. Contudo, alguns animais negativos apresentaram sinais como tosse e fadiga.

O tipo de moradia dos animais amostrados está descrito na tabela 2. Essa característica, de acordo com o Teste Exato de Fisher, não resultou em significância estatística ($p=0,752$).

De acordo com os tutores, 76,05% dos animais receberam a vermifugação, enquanto apenas 29,83% receberam ectoparasiticidas. Essas características também não demonstraram significância ($p=1$ e $p=0,737$, respectivamente). Ainda segundo eles, 65,03% (93/143) desconheciam a doença e o fato de ser uma zoonose.

O mapa presente no Apêndice B representa o município, identificando os bairros visitados, número de cães amostrados em cada bairro e o número de animais positivos por localidade. É possível observar uma maior quantidade de animais positivos nos bairros Bananal e Progresso, com quatro e três animais positivos, respectivamente. Nos demais bairros foram encontrados apenas um animal positivo em cada.

7 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos indicam a presença de *D. immitis* em cães no município de Laguna, Santa Catarina. A prevalência observada foi baixa, quando comparada a localidades em outros países, como Austrália, e demais estados brasileiros, como Rio de Janeiro (ANVARI et al., 2020). Essa prevalência obtida foi abaixo da esperada, visto que o município oferece condições favoráveis para a sua ocorrência, além do fato de que a maioria dos animais amostrados não receber medicação profilática, e não haver controle ambiental dos vetores (Tabela 2). Segundo Dantas-Torres e Otranto (2020), cães que permanecem em áreas externas de suas casas têm uma maior exposição aos mosquitos e, associado ao fato da não utilização de medicação preventiva, fazem com que a prevalência nessas áreas seja maior.

De acordo com a Vigilância de Endemias de Laguna, já foram identificados, no laboratório de entomologia, a presença de mosquitos *Culex* spp. e *Aedes albopictus* no município (dados não publicados). Nos EUA, *Aedes albopictus* é conhecido por ser um potencial vetor para a *D. immitis*, já tendo sido encontradas larvas L3 nesse artrópode (SPENCE BEAULIEU; FEDERICO; REISKIND, 2020; SPENCE BEAULIEU; REISKIND, 2019; TODOROVIC; MCKAY, 2020).

O município de Laguna já foi considerado endêmico, com transmissão autóctone, para *Wuchereria bancrofti*, em inquérito epidemiológico realizado entre os anos de 1951 e 1958, com prevalência estimada de 9,4% (ROCHA; FONTES, 1998). A filariose linfática tem como vetor, mosquitos do gênero *Culex*, assim como a dirofilariose.

No entanto, alguns fatores extrínsecos podem influenciar diretamente na ocorrência do parasito, como, vetores não competentes, sazonalidade das espécies e métodos preventivos (WATIER-GRILLOT; MARIÉ; CABRE; DAVOUST, 2011).

Labarthe et al. (2014) afirmam que a maior densidade humana em determinado ambiente pode torná-lo inóspito para as espécies vetores da doença, dificultando sua transmissão. Os autores observaram alta prevalência em municípios do Paraná com a economia baseada no turismo e pesca artesanal, baixa densidade demográfica e com temperaturas médias de 14°C a 21°C.

Sendo assim, Laguna, por ser um local urbanizado, com uma população de 45 mil habitantes, mas ainda dependente de atividades como turismo e pesca artesanal, e que mantém 23,08% da mata atlântica original do município, além de diversos tipos de vegetação ainda preservados, deveria apresentar maior prevalência para a doença (INPE, 2018).

Ao contrário, de acordo com estudo realizado nos EUA, em áreas urbanizadas há uma redução da diversidade de vetores que, por consequência, apresentam um menor risco de ocorrência para a dirofilariose canina (SPENCE BEAULIEU; FEDERICO; REISKIND, 2020).

Em Santa Catarina há poucos estudos de prevalência realizados. Na capital Florianópolis, região litorânea, Araujo et al. (2003) avaliaram 40 cães provenientes do canil da polícia militar por meio das técnicas de esfregaço e teste de Knott modificado, onde foram observadas prevalências de 15%, sendo 6,25% positivos apenas no teste de Knott modificado e 2,5% exclusivamente no esfregaço. Labarthe et al. (2014) utilizaram o imunoenensaio cromatográfico para verificar a prevalência de *D. immitis* nos municípios de Florianópolis e Araquari e obtiveram valores de 2,1 e 7,3%, respectivamente. Já no município de Joinville, Kannenberg et al., (2019) avaliaram 459 cães por meio do teste Knott modificado e imunoenensaio cromatográfico, as quais resultaram em uma prevalência de 0,7%. No município de Lages, Serra Catarinense, foram testados 44 cães da raça Shih-Tzu, pela técnica de PCR, e nenhum animal foi identificado como positivo (PISSETI, 2019).

No presente estudo, os testes imunocromatográfico e a PCR foram as técnicas que apresentaram melhor sensibilidade, detectando um maior número de amostras positivas. Os testes imunocromatográficos são cada vez mais empregados na rotina clínica veterinária (visto que infecções amicrofilarêmicas ou “ocultas” e a ação microfilaricida de medicamentos preventivos fizeram com que a pesquisa de microfilárias tivesse um valor limitado) e possuem alta sensibilidade. Ele é baseado em antígenos secretados por fêmeas adultas, sendo o resultado independente da presença de microfilárias circulantes. Mesmo assim, ainda é recomendada a realização de testes para pesquisa de microfilárias como uma forma para complementar e validar o diagnóstico, além de definir o melhor protocolo para tratamento (AHS, 2018; LITTLE et al., 2018).

Desta forma, tem sido crescente a preocupação em relação aos resultados falsos-positivos em virtude de possíveis reações cruzadas com outras espécies, tais como *Angiostrongylus vasorum*, *Spirocerca lupi* e *Dirofilaria repens*. A ocorrência desse tipo de reação pode levar a um tratamento inadequado para o parasito ou até mesmo desnecessário (DE OLIVEIRA et al., 2020; VENCO et al., 2017).

Dos municípios visitados por dois dos animais positivos, Joinville apresentou prevalência de 0,4% em cães provenientes de abrigos e sete casos relatados em

humanos (BUBLITZ et al., 2012; KANNENBERG et al., 2019). Já em Criciúma, não há dados publicados acerca dessa parasitose. Embora o deslocamento dos animais não tenha apresentado significância estatística, Schäfer et al. (2019) afirmam que cães que acompanham seus tutores em viagens com destino a regiões consideradas endêmicas para doenças transmissíveis por vetores, sofrem um risco maior de contrair a doença. Nesses casos, o diagnóstico e triagem desses animais tem suas limitações, tendo em vista que a doença possui um longo período de incubação (até cerca de oito meses), sinais clínicos inespecíficos, bem como a coinfeção com outros patógenos. Para Dantas-Torres et al. (2020), os dados de prevalência obtidos não devem ser utilizados isoladamente para inferir incidência, visto que a soroconversão pode demorar a ser percebida, assim como os anticorpos produzidos pelo animal contra determinado patógeno podem durar meses.

A técnica de PCR detectou três amostras, além de confirmar as amostras positivas pelo teste imunocromatográfico. Latrofa et al. (2012) afirmam que o uso dessa técnica tem crescido com o passar do tempo pela sua rapidez, sensibilidade e ser espécie-específico para a detecção de *D. immitis*. Resultados semelhantes foram encontrados por Ogawa et al. (2013), onde essa técnica confirmou 73 de 93 amostras positivas no teste imunocromatográfico. Diferente do presente estudo, não foram detectadas amostras além das detectadas pelo outro teste.

Em relação ao esfregaço (aumento 100x), Ogawa et al. (2013) também não encontraram microfilárias circulantes. Esse fato pode ter ocorrido pela pequena quantidade de sangue utilizada para tal técnica e, em casos em que há infecção por exemplares de apenas um sexo de *D. immitis*, não seria possível encontrar microfilárias.

O cão positivo que apresentou sinais clínicos característicos, da raça Boxer, macho, nove anos, vivia no quintal da residência e não recebia medicação para a prevenção da dirofilariose canina, assim como seus tutores desconheciam a doença. Embora Nelson; Couto (2014) afirmem que a doença não possui predileção para sexo ou raça, observaram que os cães mais acometidos são de grande porte, vivem no exterior da residência e machos são infectados de duas a quatro vezes mais que fêmeas.

O fato da maioria dos tutores no presente estudo desconhecerem a doença faz com que não sejam utilizados métodos de controle e prevenção, podendo elevar à

transmissão entre os animais e humanos e, principalmente, aumentar a prevalência no município.

Os bairros com maior número de positivos possuem características em comum. O bairro Bananal possui uma grande área de vegetação nativa ainda preservada, além de ser cercado pela Lagoa Santo Antônio dos Anjos. Assim como o bairro Progresso possui muitos terrenos abandonados com acúmulo de água parada. Essas condições podem favorecer o desenvolvimento das espécies vetores para a doença (FOSTER; WALKER, 2019).

8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam a ocorrência da dirofilariose canina no município de Laguna, SC que, embora baixa (4,62%), demanda a necessidade de adoção de medidas profiláticas, dentre elas, utilização de telas em janelas associado ao uso de repelentes, assim como a utilização de medicação preventiva, considerando o intenso turismo na região, principalmente nos meses de verão. Como a *Dirofilaria immitis* possui potencial zoonótico, as medidas preventivas tornam-se essenciais para a promoção da saúde única.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN HEARTWORM SOCIETY. **Current Canine Guidelines for the Prevention, Diagnosis, and Management of Heartworm (*Dirofilaria immitis*) Infection in Dogs**: Revised 2018. [s.i]: 2018.(IBGE), I. B. DE G. E E. **Laguna: Panorama**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sc/laguna/panorama>>. Acesso em: 30 mar. 2020.

(PML), P. M. DE L. **Dados Gerais**. Disponível em: <<https://www.laguna.sc.gov.br/cms/pagina/ver/codMapaltem/100433>>. Acesso em: 30 mar. 2020a.

(PML), P. M. DE L. **Aspectos Físicos**. Disponível em: <<https://www.laguna.sc.gov.br/cms/pagina/ver/codMapaltem/100436>>. Acesso em: 30 mar. 2020b.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonoses and Communicable Diseases**

Common to Man and Animals. 3. ed. Washington: Pan American Health Organization, v. 3, 2003.

AHID, S. M. M.; DA SILVA VASCONCELOS, P. S.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Vector Competence of *Culex quinquefasciatus* Say from Different Regions of Brazil to *Dirofilaria immitis*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 6, p. 769–775, 2000.

AHS. Prevention , Diagnosis , and Management of Infection in Dogs. 2018

ANVARI, D. et al. The global status of *Dirofilaria immitis* in dogs: a systematic review and meta-analysis based on published articles. **Research in Veterinary Science**, v. 131, n. March 2019, p. 104–116, 2020.

ARAUJO, R. T. et al. Canine dirofilariasis in the region of Conceição Lagoon, Florianópolis, and in the Military Police kennel, São José, State of Santa Catarina, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 113, n. 3–4, p. 239–242, 2003.

ATKINS, C. Canine and Feline Heartworm Disease. *In*: ETTINGER, S. J. F. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 8. ed. Elsevier, 2017. p. 3166–3236.

ATKINS, C. E. et al. Renal effects of *Dirofilaria immitis* in experimentally and naturally infected cats. **Veterinary Parasitology**, v. 176, n. 4, p. 317–323, 2011.

AVELLIS, F. O. et al. A Case of Human Conjunctival *Dirofilariosis* by *Dirofilaria immitis* in Italy. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 4, p. 451–452, abr. 2011.

BEAVER, P.; ORIHHEL, T.; LEONARD, G. Pulmonary dirofilariasis: restudy of worms reported gravid. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 43, p. 167–169, 1990.

BENDAS, A. J. R. et al. Atualização sobre a epidemiologia de dirofilaria immitis na América do sul e no México: Revisão de literatura. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 54, n. 4, p. 319–329, 2017.

BOWMAN, D. et al. Prevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in the United States: Results of a national clinic-based serologic survey. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1–2, p. 138–148, 2009.

BOWMAN, D. D. **Georgis' Parasitology for Veterinarians**. 10. ed. Maryland Heights: Elsevier, 2014.

BOWMAN, D. D.; ATKINS, C. E. Heartworm Biology, Treatment, and Control. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 39, n. 6, p. 1127–1158, nov. 2009.

BRENES, R. et al. Pulmonary dirofilariasis in a Costa Rica man. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 34, p. 1142–1143, 1985.

BUBLITZ, G. S. et al. Dirofilariose humana em Joinville-SC: avaliação clinicopatológica dos primeiros casos relatados na região Sul. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 5, p. 383–389, out. 2012.

CARRETÓN, E.; MORCHÓN, R.; MONTOYA-ALONSO, J. A. Cardiopulmonary and inflammatory biomarkers in heartworm disease. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. Suppl 2, 2017.

CAVALLAZZI, R. S. et al. Dirofilariose pulmonar humana: relato de sete casos. **Jornal de Pneumologia**, v. 28, n. 2, p. 100–102, abr. 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Epi Info**, 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/epiinfo/por/pt_index.html>

CHRISTENSEN, B. M.; ANDREW L. HOLLANDER. Effect of temperature on vector-parasite relationships of *Aedes trivittatus* and *Dirofilaria immitis*. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 45, n. 1, p. 115–119, 1978.

DANTAS-TORRES, F. et al. Prevalence and incidence of vector-borne pathogens in unprotected dogs in two Brazilian regions. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 195, 21 dez. 2020.

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

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Best Practices for Preventing Vector-Borne Diseases in Dogs and Humans. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 1, p. 43–55, 2016.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Overview on *Dirofilaria immitis* in the

Americas, with notes on other filarial worms infecting dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 282, n. February, p. 109113, jun. 2020.

DE OLIVEIRA, C. S. et al. Assessing the potential cross-reactivity using a commercial heartworm ELISA kits of serum from dogs naturally infected with *Onchocerca lupi*. **Veterinary Parasitology**, v. 280, n. December 2019, p. 109070, abr. 2020.

DOLTRÁRIO, A. B. et al. Human pulmonary dirofilariasis with secondary myocarditis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, n. March, p. 0–2, 2019.

ESDA. **Guidelines for Clinical Management Canine Heartworm Disease**. 2017

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C.; CÔTÉ, E. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 8. ed. Elsevier, v. 59, 2017.

FIORENTINI, L. F. et al. Pictorial Review of Thoracic Parasitic Diseases. In: **Chest**. [s.l.] Elsevier Inc, 2020. v. 157p. 1100–1113.

FOREYT, W. J. **Veterinary Parasitology: Reference Manual**. 5th. ed. [s.l.] Blackwell Publishing, 2001.

FORTIN, J. F.; SLOCOMBE, J. O. D. Temperature requirements for the development of *Dirofilaria immitis* in *Aedes triseriatus* and *Ae. vexans*. **Mosquito news**, n. 41, p. 625–633, 1981.

FOSTER, W. A.; WALKER, E. D. **Mosquitoes (Culicidae)**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

FURTADO, A. P. et al. Detection of dog filariasis in Marajo Island, Brazil by classical and molecular methods. **Parasitology Research**, v. 105, n. 6, p. 1509–1515, 20 nov. 2009.

GARCEZ, L. M. et al. Focos de dirofilariose canina na Ilha do Marajó: um fator de risco para a saúde humana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 333–336, ago. 2006.

GENCHI, C. et al. Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. **Veterinary**

Parasitology, v. 163, n. 4, p. 286–292, ago. 2009.

GENCHI, C. et al. Changing climate and changing vector-borne disease distribution: The example of *Dirofilaria* in Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 176, n. 4, p. 295–299, 2011.

INPE. **Laguna, Santa Catarina**. Disponível em: <[https://www.aquitemmata.org.br/#/busca/sc/Santa Catarina/Laguna](https://www.aquitemmata.org.br/#/busca/sc/Santa_Catarina/Laguna)>. Acesso em: 10 abr. 2020.

JÁNOVÁ, E. Emerging and threatening vector-borne zoonoses in the world and in Europe: a brief update. **Pathogens and Global Health**, v. 113, n. 2, p. 49–57, 2019.

KANNENBERG, A. K. et al. OCCURRENCE OF FILARID PARASITES IN HOUSEHOLD AND SHELTERED DOGS IN THE CITY OF JOINVILLE – SANTA CATARINA, BRAZIL. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, p. 1–11, 2019.

LABARTHE, NORMA; PEREIRA, MARCELO DE CAMPOS PEREIRA; BARBARINI, OCLYDES; MCKEE, WILLIAM; COIMBRA, CARLOS ALBERTO; HOSKINS, J. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* Infections in Brazil. **Veterinary Therapeutics**, v. 4, n. 1, p. 67–73, 2003.

LABARTHE, N. V. et al. 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, n. 1, p. 493, 7 dez. 2014.

LATROFA, M. S. et al. Molecular xenomonitoring of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in mosquitoes from north-eastern Italy by real-time PCR coupled with melting curve analysis. **Parasites and Vectors**, v. 5, n. 1, p. 1–8, 2012.

LEE, A. C. Y.; ATKINS, C. E. Understanding Feline Heartworm Infection: Disease, Diagnosis, and Treatment. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 25, n. 4, p. 224–230, nov. 2010.

LEIDY, J. Worms in heart of a dog. **Proc. Acad. Nat. Sci. Phila.**, v. 8, n. 2, 1856.

LITTLE, S. et al. Prime detection of *Dirofilaria immitis*: Understanding the influence of blocked antigen on heartworm test performance. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2018.

LOK, J. B.; WALKER, E. D.; SCOLES, G. A. Filariasis. In: ELDRIDGE, B. F.; EDMAN, J. D. (Eds.). **Medical Entomology**. [s.l.] Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 299–375.

MAGALHÃES, P. S. Descrição de uma espécie de filarias encontradas no coração humano. **Revista de Cursos Práticos e Teóricos da Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro**, v. 3, p. 129–215, 1887.

MAGGI, R. G.; KRÄMER, F. A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1–37, 2019.

MALIK, D. et al. Man's best friend: How humans can develop *Dirofilaria immitis* infections. **IDCases**, v. 4, p. 43–45, 2016.

MARCOS, R. et al. Buffy coat smear or Knott's test: Which to choose for canine microfilaria screening in field studies? **Veterinary Clinical Pathology**, v. 45, n. 1, p. 201–205, 2016.

MCCALL, J. W. et al. Chapter 4 Heartworm Disease in Animals and Humans. **Advances in Parasitology**, v. 66, n. 08, p. 193–285, 2008.

MCCALL, J. W. et al. Shifting the paradigm in *Dirofilaria immitis* prevention: blocking transmission from mosquitoes to dogs using repellents/insecticides and macrocyclic lactone prevention as part of a multimodal approach. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. S2, p. 525, 9 nov. 2017.

MYLONAKIS, M. E. et al. Comparative methodology for the detection and differentiation of circulating microfilariae of *Dirofilaria immitis* in the dog. p. 137–140, 2004.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Small Animal Internal Medicine**. 5. ed. Maryland Heights: Elsevier, 2014.

OGAWA, G. M. et al. Canine heartworm disease in Porto Velho: first record, distribution map and occurrence of positive mosquitoes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 4, p. 559–564, dez. 2013.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). **Zoonosis parasitarias**, 1979. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/41290>>

OSBORNE, T. C. Worms found in the heart and bloodvessels of a dog; symptoms of hydrophobia. **The Western Journal of medicine and Surgery**, 1847.

OTRANTO, D.; CAPELLI, G.; GENCHI, C. Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniosis vs. dirofilariosis. **Parasites & Vectors**, v. 2, n. Suppl 1, p. S2, 2009.

PINTO, C.; LUZ, A. *Dirofilaria immitis* na vesícula biliar de *Canis familiaris*. **O campo**, v. 7, p. 36–37, 1936.

PISSETI, H. M. C. **Capítulo I - ECOCARDIOGRAFIA EM CÃES DA RAÇA SHIH-TZU - Efeitos do peso corporal, índice de massa corporal (IMC), condição corporal, idade e gênero no estabelecimento de valores de referência; Capítulo II – Ocorrência de dirofilariose em cães do município.** [s.l.] Universidade do Estado de Santa Catarina, 2019.

POLIZOPOULOU, Z. S. et al. dogs infected with *Dirofilaria immitis* in northern Greece. [s.d.].

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing** Vienna, Austria, 2020. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>

RAILLIET, A.; HENRY, A. Sur une filaire péritonéale des porcin. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 4, p. 386–389, 1911.

RAMOS, R. A. N. et al. Filarioids infecting dogs in northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 226, p. 26–29, ago. 2016.

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

RISHNIW, M. et al. Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 3–4, p. 303–314, fev. 2006.

ROCHA, E. M. M.; FONTES, G. Filariose bancroftiana no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, n. 1, p. 98–105, fev. 1998.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. [s.l.] Cold Spring Harbor, 2001.

SCHÄFER, I. et al. Retrospective analysis of vector-borne infections in dogs after travelling to endemic areas (2007–2018). **Veterinary Parasitology: X**, v. 2, n. February, p. 100015, nov. 2019.

SCOLES, G. A.; KAMBHAMPATI, S. Polymerase Chain Reaction-Based Method for the Detection of Canine Heartworm (Filarioidea: Onchocercidae) in Mosquitoes (Diptera: Culicidae) and Vertebrate Hosts. **Journal of Medical Entomology**, v. 32, n. 6, p. 864–869, 1 nov. 1995.

SHAW, W. R.; CATTERUCCIA, F. Vector biology meets disease control: using basic research to fight vector-borne diseases. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 20–34, 27 jan. 2019.

SILVA, A. M. A. et al. DIROFILARIOSE CANINA NO MUNICÍPIO DE COARI, ESTADO DO AMAZONAS, BRASIL. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 2, p. 1–30, 4 dez. 2008.

SILVA, R. C. DA; LANGONI, H. Dirofilariose: zoonose emergente negligenciada. **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, p. 1615–1624, 3 abr. 2009.

SIMÓN, F. et al. Human and animal dirofilariasis: The emergence of a zoonotic mosaic. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 3, p. 507–544, 2012.

SOARES, H. S. et al. Survey of canine tick-borne diseases in Lábrea, Brazilian Amazon: ‘accidental’ findings of *Dirofilaria immitis* infection. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 4, p. 473–480, dez. 2014.

SPENCE BEAULIEU, M. R.; FEDERICO, J. L.; REISKIND, M. H. Mosquito diversity and dog heartworm prevalence in suburban areas. **Journal of Medical Entomology**, v. 13, n. 1, p. 608–614, 2020.

SPENCE BEAULIEU, M. R.; REISKIND, M. H. Comparative Vector Efficiency of Two Prevalent Mosquito Species for Dog Heartworm in North Carolina. **Journal of Medical Entomology**, v. 57, n. 2, p. 608–614, 2019.

STARKEY, L. A. et al. Comparative evaluation of commercially available point-of-care heartworm antigen tests using well-characterized canine plasma samples.

Parasites and Vectors, v. 10, n. Suppl 2, 2017.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Veterinary parasitology**. 4. ed. Wiley Blackell, 2016.

THEIS, J. H. Public health aspects of dirofilariasis in the United States. **Veterinary Parasitology**, v. 133, n. 2–3, p. 157–180, out. 2005.

TODOROVIC, S.; MCKAY, T. Potential mosquito (Diptera: Culicidae) vectors of *Dirofilaria immitis* from residential entryways in Northeast Arkansas. **Veterinary Parasitology**, v. 282, n. October 2019, p. 109105, jun. 2020.

TRANCOSO, T. A. L. et al. Detection of *Dirofilaria immitis* using microscopic, serological and molecular techniques among dogs in Cabo Frio, RJ, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, n. 1, p. 1–12, 2020.

TRAVASSOS, L. P. Notas Helmintológicas. **Brazil-Medico**, v. 35, n. 2–6, p. 67, 1921.

VENCO, L. et al. Heat treatment and false-positive heartworm antigen testing in ex vivo parasites and dogs naturally infected by *Dirofilaria repens* and *Angiostrongylus vasorum*. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. Suppl 2, 2017.

VEZZANI, D.; CARBAJO, A. E. Spatial and temporal transmission risk of *Dirofilaria immitis* in Argentina. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 14, p. 1463–1472, 2006.

VEZZANI, D.; EIRAS, D. F.; WISNIVESKY, C. *Dirofilariasis* in Argentina: Historical review and first report of *Dirofilaria immitis* in a natural mosquito population. **Veterinary Parasitology**, v. 136, n. 3–4, p. 259–273, 2006.

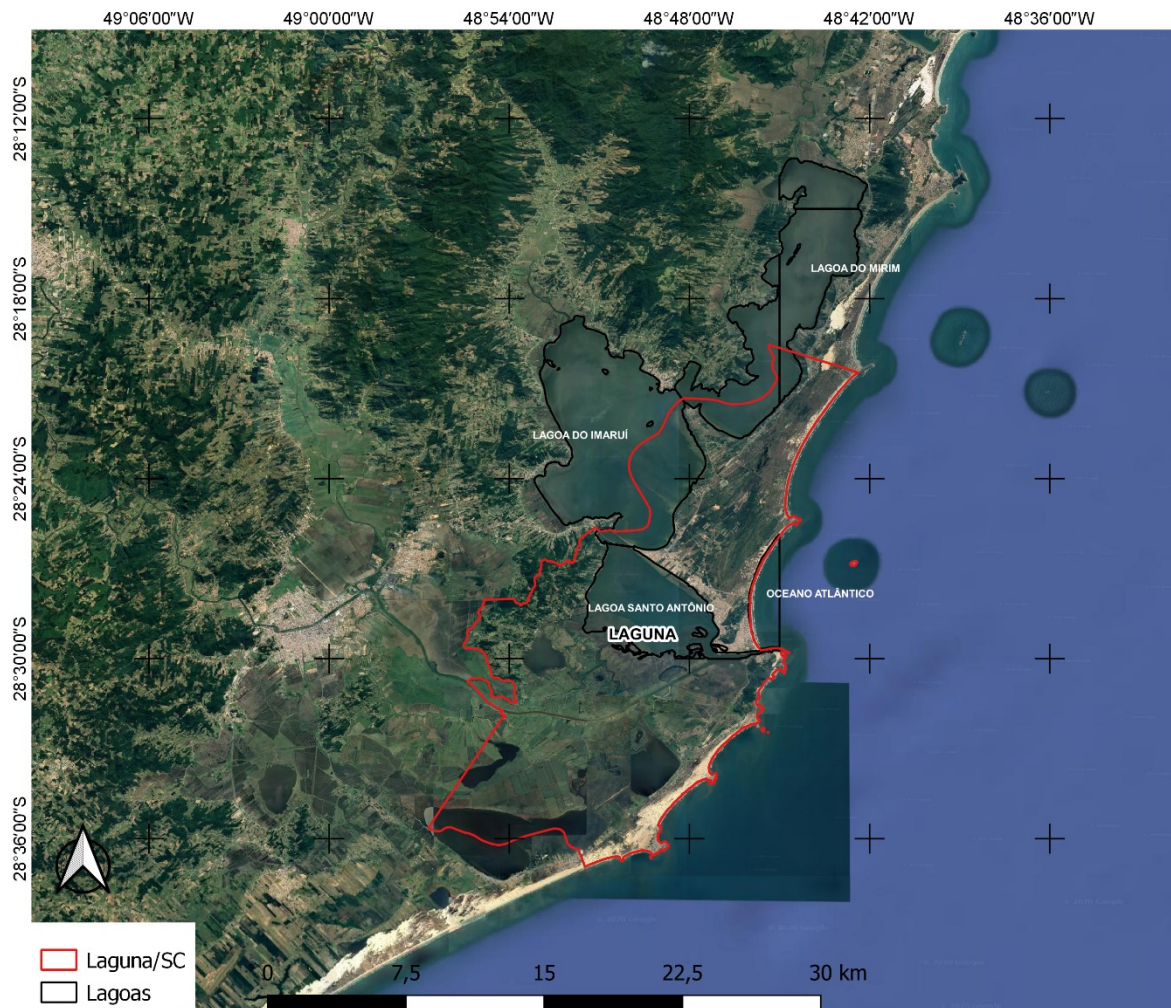
WARE, W. A. **Cardiovascular Disease in Small Animal Medicine**. 2. ed. [s.l.] Manson Publishing/The Veterinary Press, 2011.

WATTS, K. J.; COURTNEY, C. H.; REDDY, G. R. Development of a PCR- and probe-based test for the sensitive and specific detection of the dog heartworm, *Dirofilaria immitis*, in its mosquito intermediate host. **Molecular and Cellular Probes**, v. 13, n. 6, p. 425–430, 1999.

ZAJAC, A. M.; CONBOY, G. A. **Veterinary Clinical Parasitology**. 8. ed. [s.l.] Wiley Blackell, 2012. v. 53

APÊNDICE A – Mapa do Complexo Lagunar Sul

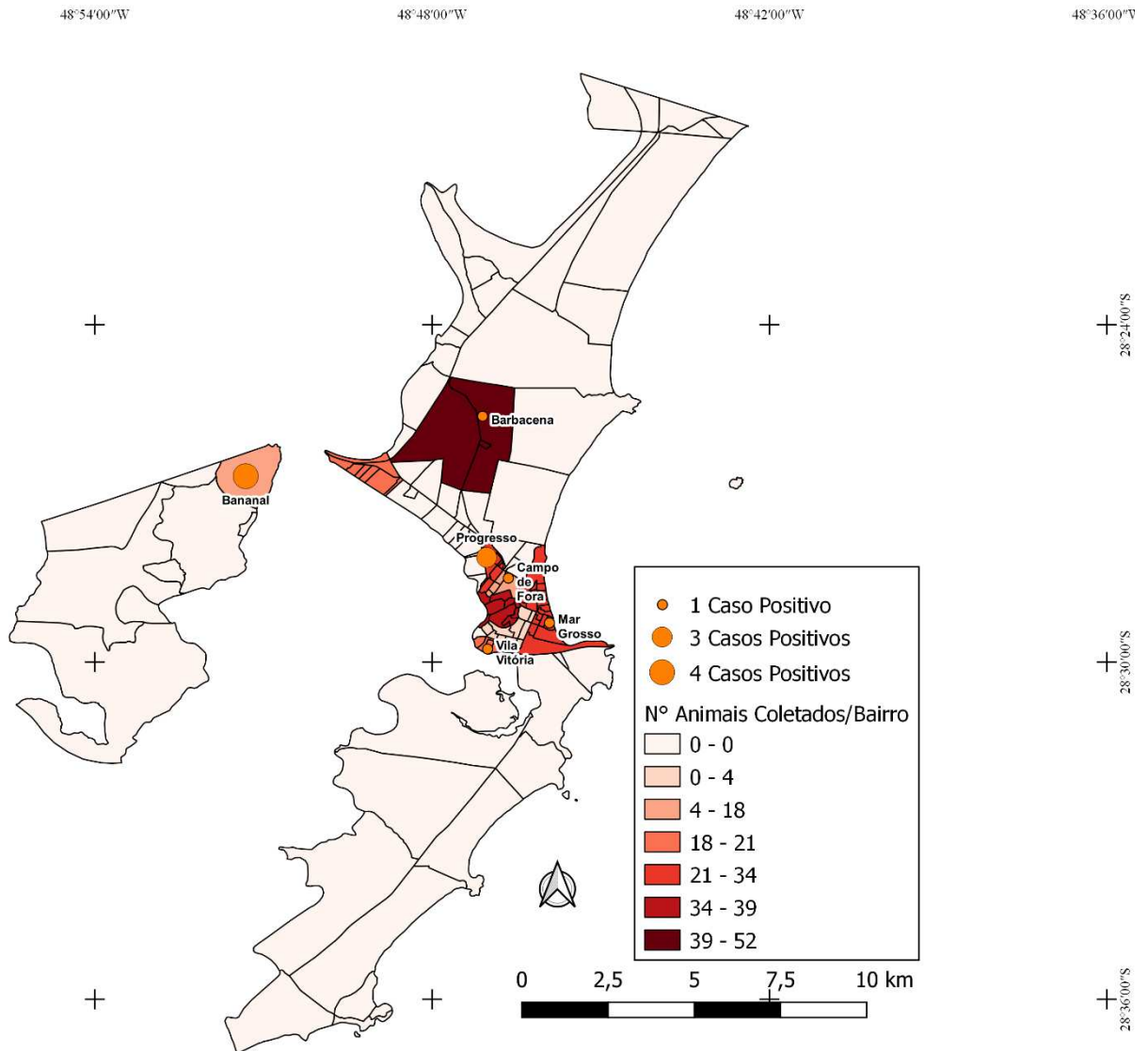
O mapa abaixo representa a inserção do município de Laguna, Santa Catarina no complexo Lagunar Sul, composto pela Lagoa do Mirim, Lagoa do Imaruí e Lagoa Santo Antônio.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

APÊNDICE B – Mapa dos bairros

O mapa indica o número de amostras coletadas em cada bairro representado por uma escala de cor, sendo a mais escura com maior amostragem. O número de animais positivos está representado através do círculo laranja, com o tamanho correspondente ao número de casos.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

APÊNDICE C – Questionário aplicado aos tutores

ANEXO I



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Nº DA AMOSTRA:

DATA: / /

1. IDENTIFICAÇÃO DO PROPRIETÁRIO

NOME:
ENDEREÇO:
TELEFONE:

2. IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL

NOME:	SEXO: ()M ()F
RAÇA:	PELAGEM:
IDADE:	CASTRADO(A): ()SIM ()NÃO

3. HISTÓRIA CLÍNICA

PROCEDÊNCIA: () ADOTADO () COMPRADO
VACINAÇÃO: () SIM () NÃO
DATA DA ÚLTIMA DOSE: _____ NOME E LABORATÓRIO: _____
VERMIFUGAÇÃO: INTERNO: () SIM () NÃO NOME: _____
ECTOPARASITICIDA: () SIM () NÃO NOME: _____
POSSUI CONTATO COM OUTROS ANIMAIS: () SIM () NÃO
ANIMAIS COM DOENÇA? () SIM () NÃO QUAL? _____
JÁ APRESENTOU DOENÇA? () SIM () NÃO

4. TIPO DE HABITAÇÃO

AMBIENTE EM QUE O ANIMAL VIVE:
() APARTAMENTO () CASA () ANIMAL DE RUA
() CANIL/CRIAOURO () ABRIGO DE ANIMAIS

HÁBITOS DO ANIMAL:
<input type="checkbox"/> VIVE APENAS NO INTERIOR DA RESIDÊNCIA <input type="checkbox"/> ANIMAL DE RUA
<input type="checkbox"/> QUINTAL
POSSUI ACESSO À RUA? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO

5. ALIMENTAÇÃO

TIPO DE ALIMENTO: <input type="checkbox"/> RAÇÃO SECA <input type="checkbox"/> RAÇÃO ÚMIDA <input type="checkbox"/> COMIDA CASEIRA
<input type="checkbox"/> RAÇÃO + COMIDA CASEIRA

6. LOCOMOÇÃO

JÁ VIAJOU COM O ANIMAL? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> INTERNACIONAL <input type="checkbox"/> NACIONAL
LOCAL:

7. PRESENÇA DE SINAIS CLÍNICOS

<input type="checkbox"/> TOSSE	<input type="checkbox"/> FADIGA	<input type="checkbox"/> INTOLERÂNCIA AO EXERCÍCIO
<input type="checkbox"/> DISPNEIA	<input type="checkbox"/> PERDA DE PESO	<input type="checkbox"/> SÍNCOPE
<input type="checkbox"/> OUTROS	QUAL?	

8. HISTÓRICO E PREVENÇÃO DE DIROFILARIOSE CANINA

TEM CONHECIMENTO DA DOENÇA? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO		
FORAM REALIZADOS EXAMES? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO		
<input type="checkbox"/> ESFREGAÇO MODIFICADO	<input type="checkbox"/> GOTA ESPESSA	<input type="checkbox"/> KNOTT
<input type="checkbox"/> TESTE RÁPIDO	<input type="checkbox"/> OUTRO	<input type="checkbox"/> NÃO SABE
QUAL O RESULTADO? <input type="checkbox"/> POSITIVO <input type="checkbox"/> NEGATIVO		
UTILIZA MÉTODO PREVENTIVO? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO		
QUAL?		
UTILIZA ALGUM MÉTODO PARA CONTROLE DE INSETOS NO AMBIENTE? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO QUAL?		