



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Dissertação

**Contribuição para o Estudo de Filarídeos em Cães de Abrigo
no Distrito de Setúbal: Prevalência de Microfilarémia e
Comparação de Métodos Parasitológicos**

Luana Contrera de Ricci

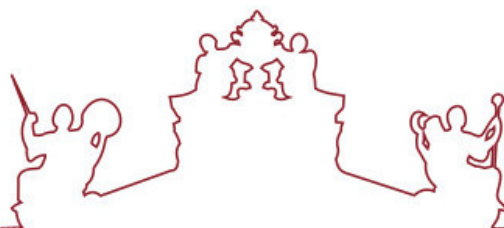
Orientador(es) | Elsa Leclerc Duarte

Catarina Lavrador

Cristina Maria Goulartt de Medeiros de Lemos Costa

Évora 2025





Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Dissertação

**Contribuição para o Estudo de Filarídeos em Cães de Abrigo
no Distrito de Setúbal: Prevalência de Microfilarémia e
Comparação de Métodos Parasitológicos**

Luana Contrera de Ricci

Orientador(es) | Elsa Leclerc Duarte
Catarina Lavrador
Cristina Maria Goulartt de Medeiros de Lemos Costa

Évora 2025





A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Ricardo Jorge Romão (Universidade de Évora)

Vogais | Elsa Leclerc Duarte (Universidade de Évora) (Orientador)
Ludovina Neto Padre (Universidade de Évora) (Arguente)

Agradecimentos

A conclusão deste trabalho marca o término de uma importante etapa da minha vida que exigiu tempo, esforço e dedicação pessoal, mas também contou com a colaboração, o incentivo e o apoio de diversas pessoas ao longo do percurso. Agradeço por me terem ajudado a concretizar este sonho. Esta conquista é tanto minha como vossa.

À minha orientadora, professora Catarina Lavrador, pela disponibilidade constante e conhecimentos transmitidos. A sua experiência e apoio foram essenciais para a concretização deste trabalho. Como professora, soube motivar-me para ambicionar mais durante esta jornada académica.

À minha orientadora externa, doutora Cristina Costa, pela paciência e vontade de ensinar. Espero que se orgulhe da médica veterinária que me esforço para tornar e que eu consiga refletir os ensinamentos e valores que me transmitiu ao longo deste processo.

À minha família: mãe, pai e mana, que me moldaram na pessoa que sou hoje. O vosso apoio incondicional e constante foi a força que me impulsionou a chegar até aqui. Sou profundamente grata por tudo o que me deram. À minha mãe, que me carregou durante 9 meses e continua, com amor, a carregar-me pela vida fora. Agradeço por todas as lágrimas que me secaste, por toda a tua preocupação e por todas as marmitas de viagem preparadas com carinho. Ao meu pai, por ter sempre acreditado em mim, mesmo quando eu não acreditava. És o meu exemplo de força e proteção, a minha referência de homem. Pais, a vossa dedicação para connosco impulsiona-me todos os dias. À minha mana, a minha inspiração e motivação. Tudo o que faço na minha vida tem como objetivo deixar-te orgulhosa. Foste a minha primeira amiga e continuas a ser a mais preciosa.

Ao Pedro, a minha melhor escolha. Todas as minhas memórias favoritas são contigo e mal posso esperar por criar mais. Sem ti, a minha vida não teria cor. És o meu porto seguro e onde encontro a minha calma. O quão sortudos somos por nos termos conhecido novos e podermos experienciar o resto da vida juntos.

Ao meu cunhado Flávio, que se tornou no irmão mais velho que nunca tive. Agradeço-te pela tua proteção e acima de tudo, pelo cuidado e amor dedicados à minha irmã.

Aos meus tios, Vicente e Mara, por terem sido os meus segundos pais, mas sempre os meus apoiantes número 1. Vocês são uma fonte inesgotável de incentivo e amor.

Ao Guga, um irmão mais novo para mim. O meu menino de ouro. Agradeço por me mostrares que devemos encarar a vida com leveza e felicidade.

À minha família no Brasil, para quem a distância de um oceano jamais diminui o carinho, o apoio e presença no meu coração.

Aos meus melhores amigos, Fred, Inés e Leonor, pela vossa compreensão, companhia e amizade incondicional. Vocês trazem alegria à minha vida.

Às minhas meninas de Évora, Bia, Júlia, Mafalda e Marta, por terem tornado o Alentejo um verdadeiro lar longe de casa. Sem vocês certamente não teria chegado ao fim.

À Zezinha, a minha avó emprestada de Évora, que me acolheu como sua família durante tantos anos.

À equipa do Vetset, que me inspiram a crescer e a ser uma profissional melhor a cada dia. Agradeço todas as valiosas lições transmitidas e pausas de almoço animadas. Em especial, agradeço à Bia e à Natalina, que além de colegas se tornaram verdadeiras amigas. Sem o vosso apoio, este trabalho não teria sido possível.

À dona Maria João, pela sua bondade e disponibilidade. É realmente uma pessoa que entrega tudo de si, tanto aos animais como às pessoas.

Finalmente, às minhas filhas de quatro patas, Nala e Mingau, os motivos disto tudo. A ti também, meu Fox.

Resumo

A dirofilariose é uma doença parasitária vetorial causada pelo Nematelminte *Dirofilaria immitis*, conhecido como “Larva do coração” e transmitida por vetores da família *Culicidae*. Os hospedeiros definitivos são canídeos domésticos e selvagens, onde os parasitas adultos se instalam no sistema cardiovascular, com consequências multissistêmicas. O ciclo de vida inicia-se com uma refeição de sangue do vetor num hospedeiro com microfilarémia. O diagnóstico é feito através de métodos parasitológicos, imunológicos ou moleculares. Em Setúbal, distrito com prevalência estimada 8,7%, a elevada densidade de cães e vetores potencia a transmissão de filarioses, entre as quais a dirofilariose, com relevante impacto em contexto de abrigo. A medicina de abrigo atua na gestão integrada individual e coletiva dos animais acolhidos. Este estudo avaliou a prevalência de microfilarémia num abrigo de cães em Setúbal, aplicando-se três métodos parasitológicos: gota fresca revelou 50% (31/62) de positivos; esfregaço sanguíneo 40,3% (25/62); método de Knott 53,2% (33/62).

Palavras-chaves: *Dirofilaria immitis*; dirofilariose; cães de abrigo; microfilarémia

Abstract

Contribution to the Study of Filarids in Shelter Dogs in the Setúbal District: Prevalence of Microfilaremia and Comparison of Parasitological Methods

Heartworm disease is a vector-borne parasitic infection caused by the nematode *Dirofilaria immitis*, referred to as “Heartworm” and transmitted by mosquitoes of the *Culicidae* family. Domestic and wild canids serve as definitive hosts, where adult worms lodge in the cardiovascular system, leading to multisystemic damage. The life cycle begins when a mosquito takes a blood meal from a microfilaremic host. Diagnosis relies on parasitological, immunological and molecular methods. In Setúbal, district where the estimated prevalence is 8,7%, the high density of dogs and vectors enhances the transmission of filariosis, among which dirofilariosis with a particularly significant impact in shelter settings. Shelter medicine manages both individual and populational health of sheltered animals. This study aimed to assess the prevalence of microfilaremia in a dog shelter based in Setúbal, using three parasitological methods were applied: wet mount detected 50% (31/62) positivity; blood smear 40,3% (25/62); modified Knott’s test 53,2% (33/62).

Key-words: *Dirofilaria immitis*; dirofilariosis; microfilaremia; shelter dogs

Índice Geral

Agradecimentos	I
Resumo	III
Abstract.....	IV
Índice Geral	V
Índice de Figuras	VII
Índice de Gráficos.....	VIII
Índice de Tabelas	IX
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	X
Prefácio	1
I. Revisão Bibliográfica	2
1. Dirofilariose canina.....	2
1.1 Agente etiológico	2
1.2 Vetores	3
1.3 Relação de endossimbiose com a bactéria <i>Wolbachia pipientis</i>	5
1.4 Ciclo biológico.....	6
1.5 Principais fatores envolvidos na disseminação de <i>Dirofilaria immitis</i>	8
1.6 Distribuição geográfica.....	9
1.7 Fisiopatologia e apresentação clínica da dirofilariose	12
1.8 Métodos de diagnóstico	14
1.8.1 Métodos diretos.....	14
1.8.1.1 Testes parasitológicos.....	14
1.8.2 Métodos indiretos	17
1.8.2.1 Testes serológicos	17
1.8.2.2 Testes moleculares	17
1.8.3 Testes complementares de diagnóstico	18
i. Radiografia	18
ii. Ecografia.....	19
iii. Ecocardiografia	19

1.9	Abordagem terapêutica	20
1.9.1	Protocolo de tratamento para <i>D. immitis</i> , adaptado de AHS (2024).....	22
1.9.2	Tratamento cirúrgico.....	25
1.9.3	Complicações.....	25
1.10	Prevenção e o seu papel na saúde pública	25
1.11	Prognóstico	28
2.	Medicina de abrigo	28
II.	ESTUDO	30
3.	Objetivos.....	30
4.	Material e métodos.....	31
4.1	Área de estudo	31
4.2	População em estudo	33
4.3	Colheita e análise sanguínea	34
4.4	Técnicas laboratoriais.....	35
4.5	Análise de dados.....	37
5.	Resultados.....	38
6.	Discussão	42
7.	Conclusão.....	51
	Bibliografia.....	54
	Anexo 1 – Registo de dados	I
	Anexo 2 – Formulário de consentimento	IV
	Anexo 3 – Autorização da utilização do espaço laboratorial.....	V

Índice de Figuras

Figura 1 - Distribuição geográfica de <i>Culex theileri</i> e de <i>Aedes albopictus</i> , respetivamente (Cambournac, 2025).	4
Figura 2 - Ciclo de vida de <i>Dirofilaria immitis</i> adaptado de <i>Centers for disease control and prevention</i> (CDC) (2012) por Meireles (2014).....	7
Figura 3 - Distribuição mundial de <i>D. immitis</i> (Dantas-Torres et al., 2023)	10
Figura 4 - Mapa da prevalência de <i>D. immitis</i> nos distritos de Portugal e ilhas da Madeira e Açores. (Esteves-Guimarães et al., 2024).....	11
Figura 5 - (A) Zona da entrada do abrigo; (B) Zona do terreno superior e início da zona do telheiro do abrigo. (Originais)	31
Figura 6 - Esboço da área do abrigo (Original).....	32
Figura 7 - (A), (B), (C) Espaços montados para recolha das amostras no abrigo. (Originais)	32
Figura 8 - Análise laboratorial no OneVet - Hospital Veterinário Vetset. (Original).....	34
Figura 9 - Microfilária (seta) encontrada ao realizar a técnica de gota fresca objetiva 40x. (Original)	35
Figura 10 - (A), (B) e (C) Microfilárias observadas em esfregaços sanguíneos na objetiva de imersão x100 (Original).....	36
Figura 11 - Microfilárias (*) observadas pelo método de Knott na objetiva de 10x (Original)	37
Figura 12 - Microfilárias (*) observadas pelo método de Knott na objetiva de 40x (Original)	37

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Distribuição percentual dos indivíduos por sexo e estado de castração	38
Gráfico 2 - Distribuição percentual dos indivíduos por faixa etária.....	38
Gráfico 3 - Distribuição percentual dos indivíduos por faixas de peso	39
Gráfico 4 - Comparação de resultados entre os diferentes métodos parasitológicos	40

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Parâmetros morfológicos dos diferentes filarídeos do sangue de cães (adaptado de ESCCAP, 2021)	16
Tabela 2 - Distribuição percentual e numérica de diversas variáveis associadas a cada indivíduo.....	39
Tabela 3 - Prevalência de infecção por setor	40
Tabela 4 - Concordância entre os diferentes testes de observação de microfilárias.....	42

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

AHS	<i>American Heartworm Society</i>
ALP	<i>alkaline phosphatase/ fosfatase alcalina</i>
ALT	alanina aminotransferase
BID	<i>bis in die</i> , duas vezes ao dia
e.g.	<i>exempli gratia/ por exemplo</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay/ ensaio de imunoabsorção enzimático</i>
ESCCAP	<i>European Scientific Counsel Companion Animal Parasites</i>
ESDA	<i>European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IgG	imunoglobulina G
IM	via intramuscular
G	gauges
GGT	gamma-glutamil transferase
Gold Standard	método de referência
Kg	Quilogramas
LM	lactonas macrocíclicas
L1	primeiro estadio de desenvolvimento larvar
L2	segundo estadio de desenvolvimento larvar
L3	terceiro estadio de desenvolvimento larvar
L4	quarto estadio de desenvolvimento larvar
L5	quinto estadio de desenvolvimento larvar
mg	miligramas
ml	mililitro

mm	milímetros
ONG	Organização Não Governamental
PCR	<i>polimerase chain reaction</i> / reação em cadeia da polimerase
POCUS	<i>Point Of Care Ultrassound</i>
RPDA Index	Índice de Distensibilidade da Artéria Pulmonar Direita
Rpm	rotações por minuto
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real
SID	<i>semel in die</i> , uma vez ao dia
spp	espécie
SRD	sem raça definida
SVC	síndrome da veia cava
TropCCAP	<i>Tropical Counsel Companion Animal Parasites</i>
WSP	<i>Wolbachia Surface Proteins</i>
x	vezes
®	símbolo de marca registada
™	símbolo marca não registada
°C	Celsius
%	percentagem
µm	micrómetros

Prefácio

A presente dissertação foi desenvolvida após a realização do estágio curricular no OneVet – Hospital Veterinário VetSet, em Palmela, no período de 1 de outubro de 2024 a 1 de março de 2025. O estágio curricular teve a duração de 22 semanas, onde foram realizados turnos de 8 horas diárias e 40 horas semanais, perfazendo um total de 880 horas, sob orientação externa da Dra. Cristina Lemos Costa, Diretora Clínica do referido Hospital Veterinário.

Durante o referido estágio, a aluna teve oportunidade de contatar com diferentes áreas clínicas da medicina de animais de companhia, como medicina interna, nomeadamente cardiologia, pneumologia, gastroenterologia, oftalmologia, neurologia, oncologia, endocrinologia, nefrologia, urologia e dermatologia. Adicionalmente, teve contato com áreas complementares como citologia, parasitologia, hematologia e imagiologia. Com alguma frequência, as especialidades de cirurgia de tecidos moles e cirurgia ortopédica também estiveram presentes na sua prática.

Dada a situação endémica da dirofilariose em Portugal e considerando que o distrito de Setúbal representa uma área de alto risco de transmissão e propagação da parasitose, não só devido às condições climáticas da região, mas também devido à falta de conscientização da população, surgiu a motivação para conduzir o presente estudo. Em adição, o contacto próximo com o abrigo “101 Rafeiros” e a sua escassez de recursos para implementação de testes de diagnóstico e de protocolos de prevenção na totalidade dos animais acresceu um fator determinante para a prevalência da doença e, consequentemente, o desenvolvimento deste trabalho.

I. Revisão Bibliográfica

1. Dirofilariose canina

1.1 Agente etiológico

A dirofilariose é uma parasitose causada por Nematelmintes da Ordem *Spirurida*, superfamília *Filaroidea*, família *Onchocercidae*, género *Dirofilaria*. Dentro deste género, destacam-se as espécies *Dirofilaria immitis*, agente causador da dirofilariose cardiopulmonar, também conhecida como a “Larva do coração”, e *Dirofilaria repens*, agente responsável pela dirofilariose subcutânea e ocular (Simón et al., 2012). O agente *Dirofilaria immitis* é transmitido por vetores biológicos artrópodes da classe *Insecta*, ordem *Diptera*, família *Culicidae*, principalmente do género *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*, onde o parasita necessita realizar parte do seu ciclo de vida (Gomes-de-Sá et al., 2023). Os mosquitos do género *Culex* são considerados os vetores mais eficientes de filarídeos, enquanto as espécies do género *Aedes* destacam-se na transmissão de diversos vírus e, as espécies do género *Anopheles*, na transmissão de protozoários. Em outros diversos géneros de mosquitos, as larvas de *D. immitis* não são capazes de se desenvolver, sendo atacadas pelo sistema imune do hospedeiro, encapsuladas e mortas através de mecanismos de defesa de resposta imune inata, como fagocitose e lise (Shaikevich et al., 2019).

O filarídeo *Dirofilaria immitis* possui uma morfologia cilíndrica e alongada, similar a um fio longo, sendo revestido por uma cutícula estriada de coloração cinzento-esbranquiçada (Khanmohammadi et al., 2020). Os adultos machos medem cerca de 18cm de comprimento e as fêmeas 30cm (Prichard, 2021). A distinção dos dois sexos é realizada pela observação da porção posterior, apresentando-se espiralada nos machos e reta nas fêmeas. A porção anterior é semelhante em ambos os sexos, mostrando-se arredondada e com estruturas bocais especializadas providas de papilas cefálicas (Khanmohammadi et al., 2020). Estes parasitas exibem reprodução vivípara, ocorrendo a libertação para a corrente sanguínea do hospedeiro das formas larvares L1, as microfilárias, pelas fêmeas adultas. As microfilárias possuem cerca de 300µm, uma extremidade anterior afilada e uma extremidade posterior longa e fina (Western College of Veterinary Medicine, 2021). As formas larvares podem sobreviver até dois anos e meio

no sistema circulatório do hospedeiro após a remoção dos adultos (Prichard, 2021) e, inclusive, um cão infetado pode vir a servir de reservatório de microfilárias durante sete anos (AHS, 2024). A concentração de microfilárias na corrente sanguínea periférica altera-se conforme o período do dia, evidenciando-se mais elevada no início da manhã e final da tarde, uma vez que coincide com o período de maior atividade do vetor culicídeo (Alho, 2017).

Estes parasitas alojam-se no sistema cardiovascular, nomeadamente na veia cava, na veia hepática, na artéria pulmonar e nas suas ramificações. Em infeções graves, podem ser encontrados no ventrículo direito do hospedeiro (Prichard, 2021). Os adultos podem sobreviver cinco ou mais anos no organismo de um hospedeiro (AHS, 2024).

Os hospedeiros definitivos destes nemátodes são os canídeos domésticos e selvagens. Gatos e outros mamíferos podem tornar-se hospedeiros, mas não exibem microfilarémia tão alta e duradoura quanto os hospedeiros definitivos, limitando a sua capacidade como reservatório (AHS, 2024).

A dirofilariose afeta sobretudo as regiões de zonas temperadas, subtropicais e tropicais (Ying et al., 2023), onde os parâmetros de temperatura e humidade relativa são os ideais para o desenvolvimento do parasita e dos seus vetores, sendo a presença de água uma condição determinante para que os vetores completem o seu ciclo de vida. As alterações climáticas têm vindo a afetar a distribuição desta zoonose, causando flutuações na disseminação dos mosquitos vetores e prolongando o seu tempo de atividade. Consequentemente, estas alterações favorecem a disseminação deste nemátode para novas regiões e incrementam a prevalência da dirofilariose mundial (Alho, 2017).

1.2 Vetores

Os culicídeos medem três a seis mm e possuem patas longas e finas e um corpo delgado dividido em cabeça, tórax e abdómen. Apresentam um proboscis longo e flexível, adaptado nas fêmeas para a realização da refeição de sangue (Almeida, 2011). Estes mosquitos sofrem metamorfose completa com quatro estádios: ovo, larva, pupa e adulto. O seu ciclo de vida ocorre em dois meios distintos, possuindo uma fase aérea e uma fase aquática. A duração do ciclo de vida desde o ovo ao adulto é variável conforme a

temperatura e humidade relativa, podendo durar entre sete dias a 31°C, a vinte dias a 20°C. Cada espécie possui o seu intervalo ótimo. É imprescindível a disponibilidade de água, dado que as larvas e as pupas destes mosquitos são aquáticas (Almeida, 2011).

Os mosquitos da família *Culicidae* têm elevada importância na dispersão e propagação de diversos agentes e das patologias por estes transmitidas a nível mundial. São responsáveis pela transmissão de filárias, protozoários e vírus que causam danos significativos em saúde humana e animal. Em menor escala, podem também ser vetores de agente bacterianos (Oliveira-Christe & Marrelli, 2024). O seu papel como vetores está relacionado com a alimentação hematófaga das fêmeas que lhes permite a maturação ovárica (Tandina et al., 2018). Diante das atuais alterações climáticas, coloca-se a hipótese de (re)introdução de espécies exóticas de mosquitos, não apenas aumentando o número de casos de algumas doenças e consequentemente, o seu risco, mas também introduzindo novos agentes considerados exóticos. Prevê-se assim um aumento na densidade populacional de mosquitos nos meses mais quentes, como resultado das alterações climáticas e também consequência do aumento da mobilidade humana (Almeida, 2011). É de salientar que a zona do estuário do Sado é uma zona propensa ao desenvolvimento de mosquitos devido às condições naturais de humidade e temperatura. Na Figura 1 observa-se a distribuição de *Culex theileri* e de *Aedes albopictus* em Portugal, no ano de 2024.

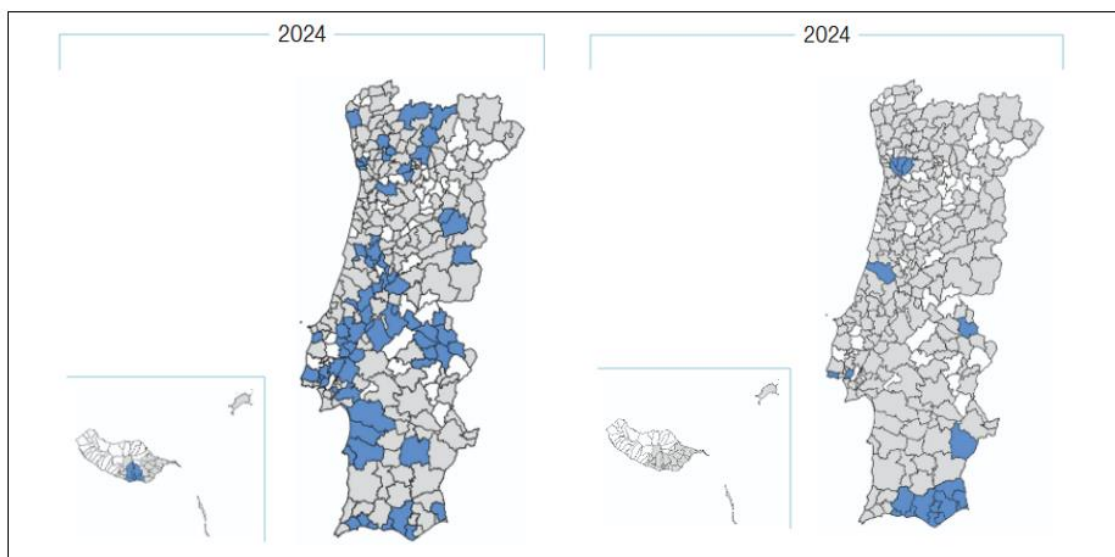


Figura 1 - Distribuição geográfica de *Culex theileri* e de *Aedes albopictus*, respetivamente (Cambournac, 2025).

Ambas as espécies são vetores de dirofilariose. Os mapas representam a cinzento os concelhos onde foram realizadas colheitas, a azul os concelhos onde foram identificadas as espécies e a branco as áreas onde não foram realizadas colheitas.

1.3 Relação de endossimbiose com a bactéria *Wolbachia pipientis*

Entende-se por endossimbiose uma relação simbiótica onde um organismo, denominado de simbionte, sobrevive dentro de outro organismo, o hospedeiro, nos seus tecidos ou no interior das suas células. Dentro desta relação, é possível existirem interações parasitárias e prejudiciais ou mutualísticas e benéficas (Manoj et al., 2021). Focando nas interações mutualistas, estas podem ser obrigatórias, essenciais para a sobrevivência do hospedeiro e do simbionte ou facultativas, oferecendo benefícios em determinadas circunstâncias a ambos (Landmann, 2019). Muitas interações obrigatórias são baseadas na complementaridade dos processos metabólicos entre os dois organismos (Manoj et al., 2021).

Wolbachia pipientis é uma *Alphaproteobacteria* da ordem *Rickettsiales*, família *Anaplasmataceae*, sendo o microorganismo simbionte mais prevalente do mundo animal. É a única espécie conhecida do seu género e está presente nas gónadas de culicídeos, tendo sido descrita pela primeira vez há quase um século (Kaur et al., 2021). Trata-se de uma bactéria gram-negativa intracelular obrigatória com um número elevado de hospedeiros. A presença da divergência filogenética entre os hospedeiros de *Wolbachia*, por exemplo a que ocorre entre os culicídeos e os nemátodes, sugere que durante a evolução desta bactéria ocorreu transmissão horizontal interespecie (Manoj et al., 2021). A distribuição global de *Wolbachia* é, assim, não só justificada pela sua transmissão vertical transovárica, mas também pela transmissão horizontal (Landmann, 2019).

Nos filarídeos, *Wolbachia* adquiriu uma função essencial e obrigatória na reprodução, fertilidade e desenvolvimento do parasita. A bactéria possui genes que codificam proteínas necessárias ao metabolismo do grupo heme e da riboflavina, apesar de, no entanto, ser importante salientar que ainda não se conhecem claramente todos os seus mecanismos genéticos e biológicos (Kaur et al., 2021). Em retorno, existe a hipótese de que os filarídeos providenciam aminoácidos essenciais, como a biotina, folatos, coenzima A e vitaminas às bactérias simbiontes (Manoj et al., 2021).

A localização da bactéria difere entre as espécies de nemátodes, mas em geral, esta encontra-se no sistema reprodutivo da fêmea e pensa-se estar relacionada com a embriogénese de *D. immitis* e com a presença de microfilárias (Manoj et al., 2021).

Reações inflamatórias causadas pela presença da bactéria e pela sua libertação aquando da morte do parasita são esperadas em cães parasitados, desencadeadas pela forte resposta imune do hospedeiro contra as proteínas de superfície WSP (*Wolbachia* Surface Proteins). A quantidade de IgG anti-WSP produzida está dependente da espécie do hospedeiro, fase da infeção e carga parasitária (Louzada-Flores et al., 2022). Em cães infetados com dirofilariose, a *W. pipientis* pode contribuir para a progressão de doença renal imunomediada (Louzada-Flores et al., 2022) ou de danos pulmonares e manifestar-se através de sinais respiratórios como tosse e dispneia (Carretón et al., 2020). Os efeitos de *Wolbachia* nos seus hospedeiros estão a ser investigados para desenvolver estratégias de controlo e tratamento para a dirofilariose (Manoj et al., 2021), dado que eliminando a bactéria *Wolbachia*, interrompe-se o ciclo de vida de *D. immitis* (Kaur et al., 2021).

O uso de antibióticos, como a doxiciclina, tem vindo a ser explorado e utilizado no tratamento adjuvante da dirofilariose canina. É indicada antes do tratamento antiparasitário e está comprovada a redução dos efeitos adversos causados pelas drogas antihelmínticas (Landum et al., 2014). A doxiciclina elimina a bactéria de todos os estadios de desenvolvimento de *D. immitis*, minimizando a libertação de *W. pipientis* durante a morte das larvas (Carretón et al., 2020).

1.4 Ciclo biológico

Dirofilaria immitis é um nemátode com um ciclo de vida heteroxeno, o que significa que as suas formas evolutivas se encontram em mais do que um hospedeiro (Western College of Veterinary Medicine, 2021).

Para se desenvolver e reproduzir, este parasita necessita de um hospedeiro definitivo (mamífero) e de um hospedeiro intermediário (artrópoda), que se comporta como um vetor biológico (Noack et al., 2021). No hospedeiro definitivo, *D. immitis* atinge a fase adulta e a maturidade sexual. A maturidade sexual é alcançada aproximadamente 120 dias após a infeção. As fêmeas iniciam a libertação de microfilárias para o sistema circulatório do hospedeiro num período de seis meses a nove meses pós-infeção (AHS, 2024). No hospedeiro intermediário, ocorre o desenvolvimento das fases larvares microfilárias de L1 até L3, sendo o último o estadio infetante (McCrea et al., 2020).

O ciclo de vida, representado na Figura 2, tem início com uma refeição de sangue realizada pelo mosquito fêmea num mamífero reservatório que apresente microfilarémia.

As microfílarias ingeridas pelo mosquito encontram-se no estadio L1 e migram até ao intestino do vetor, onde sofrem duas mudas nos túbulos de Malpighi, passando do

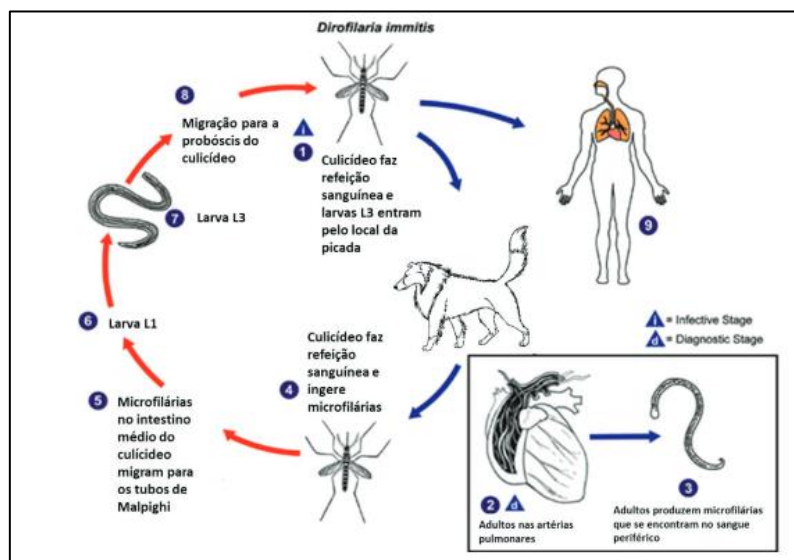


Figura 2 - Ciclo de vida da *Dirofilaria immitis* adaptado de *Centers for disease control and prevention (CDC)* (2012) por Meireles (2014)

estadio de desenvolvimento L1 para o estadio L2 em dez dias, seguido de L2 para L3 em quatro dias (AHS, 2024). Posteriormente, o estadio infetante L3 migra até ao aparelho bucal do culicídeo, onde se mantém até à próxima refeição de sangue (Alho, 2017). O tempo para que ocorra o desenvolvimento das fases larvares do parasita no organismo do vetor é determinado pela combinação de condições específicas de temperatura e humidade relativa. Se a temperatura rondar os 27°C e a humidade relativa se encontrar a cerca de 80%, o desenvolvimento dá-se entre os dez e os catorze dias. Se a temperatura for mais baixa, o processo de desenvolvimento é mais demorado (AHS, 2024). A uma temperatura constante de 18°C as larvas L1 levam cerca de um mês a atingir a fase infetante. O desenvolvimento não ocorre abaixo dos 14°C (Western College of Veterinary Medicine, 2021).

Ao realizar uma refeição de sangue, o proboscis do mosquito penetra na pele do animal e as L3 infetantes invadem o organismo do hospedeiro definitivo através da ferida resultante da picada (ESCCAP, 2021), estabelecendo-se a migração de *Dirofilaria immitis*. A primeira fase da migração denomina-se de fase tecidular. As microfílarias

mantêm-se no local de entrada três a quatro dias e sofrem uma muda para o estágio L4 (AHS, 2024). As larvas L4 possuem cerca de 1,5mm e migram através do tecido subcutâneo e muscular durante dois meses. A última muda para L5 ocorre 50 a 70 dias pós-infecção, originando adultos juvenis sexualmente imaturos com 15mm (Bowman, 2023). Os adultos juvenis continuam a migração, iniciando a fase sanguínea quando atingem o sistema circulatório, nomeadamente o ventrículo direito e os vasos pulmonares. À medida que maturam e aumentam de tamanho, as L5 são forçadas pela pressão sanguínea a deslocarem-se para vasos de maior calibre. Consequentemente, a localização destes parasitas vai depender do tamanho do hospedeiro definitivo e da carga parasitária que este possui (AHS, 2024). Após atingirem a maturidade sexual e se reproduzirem, há a libertação de microfilárias para a corrente sanguínea e a perpetuação do ciclo de vida de *Dirofilaria immitis*.

1.5 Principais fatores envolvidos na disseminação de *Dirofilaria immitis*

A transmissão de dirofilariose está dependente de diversos fatores. Primeiramente, é necessária a existência de hospedeiros definitivos reservatórios capazes de transmitir a doença e a presença de mosquitos vetores. A coexistência de populações de hospedeiros definitivos e de hospedeiros intermediários é crucial para a disseminação e manutenção do ciclo de vida de *D. immitis*. Outro fator determinante é a presença de condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento das larvas do parasita e dos mosquitos (Western College of Veterinary Medicine, 2021).

O histórico sanitário/manejo de cada animal é essencial para a saúde animal em geral e para a vigilância de doenças transmitidas por vetores, em particular. Os cães podem ser divididos em quatro grupos: cães com tutores que recebem cuidados médico veterinários, cães com tutores sem cuidados veterinários, cães de rua e cães de abrigo/associação. Presume-se que os animais que recebem cuidados médicos veterinários tenham acesso periódico a medidas preventivas, como os antiparasitários (Hazelrig et al., 2023). Os animais a quem não são administrados antiparasitários periodicamente são mais suscetíveis a serem portadores e, eventualmente, reservatórios de *D. immitis*. É importante reforçar a necessidade de implementar medidas de profilaxia eficazes e regulares, uma vez que inexistência destas medidas torna os cães mais

vulneráveis a esta parasitose (Angelou et al., 2019). Cães com acesso ao exterior nas horas de maior atividade do mosquito estão expostos durante mais tempo aos vetores culicídeos (Sebolt et al., 2022). Outros fatores, como a idade e peso corporal, podem também influenciar a probabilidade de infecção. Cães mais velhos apresentam uma maior possibilidade de exposição ao vetor ao longo da vida, ao contrário de cães com idade inferior a um ano que, devido ao longo ciclo de vida do parasita (seis a nove meses), possuem baixa probabilidade de serem acometidos pela doença. É de notar que cães com uma condição corporal debilitada podem apresentar comprometimento imunitário, facilitando a infecção por *D. immitis* (Hazelrig et al., 2023). A introdução de cães infetados ou vulneráveis em novas regiões causada pela deslocação de tutores com os seus animais, pode afetar a propagação e a variação anual da doença (Brown et al., 2012).

Fatores climáticos como a temperatura, humidade relativa, disponibilidade de água, latitude, altitude e eventos relacionados com o ritmo circadiano influenciam a distribuição da dirofilariose. Tanto a temperatura como a humidade relativa e disponibilidade de água, afetam a sobrevivência, desenvolvimento e comportamento dos vetores. A latitude e altitude podem ser indicativas do clima típico da região. A atividade circadiana pode ser relevante para o comportamento de algumas espécies de culicídeos que possuem atividades específicas durante o dia (Brown et al., 2012). Locais próximos a charcos de água, lagos ou vales agrícolas podem abrigar a fase aquática do ciclo de vida dos culicídeos (Angelou et al., 2019). Zonas mais urbanizadas com diversificadas mudanças antrópicas diminuem a predominância da dirofilariose (Sebolt et al., 2022).

1.6 Distribuição geográfica

Dirofilaria immitis é o filarídeo mais difundido e com maior importância clínica em cães a nível global. A dirofilariose possui maior prevalência em regiões quentes, principalmente na região dos trópicos, contudo poderá alargar-se a regiões mais frias, quando são reunidas as condições de temperatura e humidade relativa ideais para a proliferação dos mosquitos e desenvolvimento das larvas (Dantas-Torres & Otranto, 2020). As regiões tropicais oferecem os fatores necessários para a propagação da doença. O clima adequado, abundância de mosquitos vetores e de hospedeiros reservatórios (populações de cães de rua ou de abrigo) e a baixa adesão dos tutores a métodos de

prevenção e controlo regulares tornam estas regiões fontes problemáticas de disseminação (Dantas-Torres et al., 2023).

A lista de países considerados endémicos para *D. immitis* inclui Portugal (Munhoz et al., 2024), Espanha, Grécia, Hungria, Roménia, Itália, Tunísia, Arábia Saudita, Estados Unidos da América, México e Brasil (Alsarraf et al., 2023). A Figura 3 destaca a distribuição mundial de *D. immitis*.

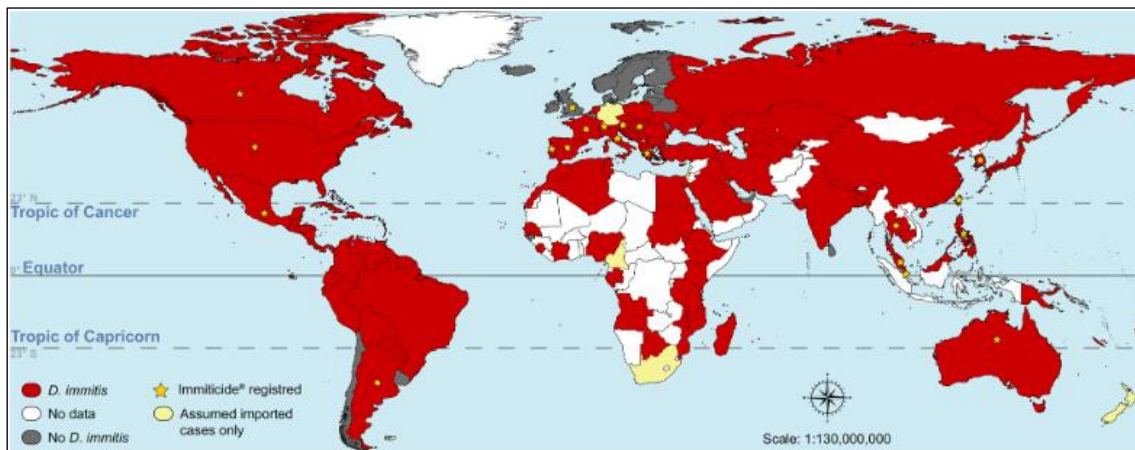


Figura 3 - Distribuição mundial de *D. immitis* (Dantas-Torres et al., 2023)

O vermelho não significa que *D. immitis* está presente em todo o país.

Na Europa, a dirofilariose está a dissipar-se para territórios mais a norte das áreas anteriormente consideradas endémicas e, ao mesmo tempo, está a estabelecer-se em regiões mais a sul que eram consideradas livres ou apenas com casos esporádicos de *D. immitis* (Diakou & Prichard, 2021). No norte de Itália, Ventre et al. (2017) observaram uma prevalência de 29% de *D. immitis* em cães. No nordeste da Grécia localiza-se uma região com uma prevalência de 29,3% segundo trabalhos de Dimzas et al. (2024). Ainda assim, não existem estudos muito detalhados relativos à prevalência de dirofilariose na Europa. É importante salientar que o parasita ainda não é considerado endémico em determinados países europeus, como Polónia, Chéquia, Dinamarca, Finlândia, Islândia e Suécia, onde a prevalência registada é baixa ou inexistente (Alsarraf et al., 2023).

A prevalência de dirofilariose varia regionalmente em Portugal, como observado na Figura 4. Estudos realizados por Alho et al. (2014) demonstraram uma prevalência entre os 13,2% e os 24,8% em três regiões centrais costeiras (Setúbal, Coimbra e Santarém). No distrito de Setúbal, verificou-se uma redução na prevalência de dirofilariose desde 2014, de 24,8% para 8,7% na última década (Esteves-Guimarães et al., 2024).

Mais recentemente, no norte de Portugal, em contrapartida, os valores de prevalência aumentaram de 2,1% (2015) para 6,3% em Viana do Castelo. Distritos como Porto, Bragança e Vila Real, antes livres de dirofilariose, registam agora prevalências entre 1,4% e 3,4%. Na região centro, os distritos de Coimbra e Aveiro apresentam prevalências de 9,9% e 15%, respetivamente. Uma prevalência significativamente alta foi observada na Figueira da Foz (27,3%). Na capital, Lisboa, a prevalência estimada é de 3,6%. Na região do Algarve, observou-se uma redução de 9,4% (2015) para 8,8% (2024) (Esteves-Guimarães et al., 2024).

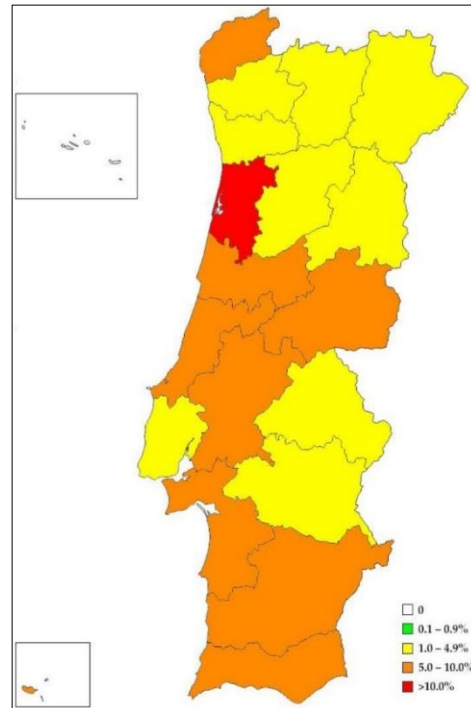


Figura 4 - Mapa da prevalência de *D. immitis* nos distritos de Portugal e ilhas da Madeira e Açores. (Esteves-Guimarães et al., 2024).

Em Aveiro, a área branca representa a Ria de Aveiro.

No continente Americano, a prevalência é mais elevada na América do Sul, América Central e Caraíbas. É de notar que a prevalência varia entre países, estados, cidades e até bairros (Dantas-Torres & Otranto, 2020). Nos Estados Unidos da América a prevalência encontra-se geralmente entre 1% e 12%, mas em áreas de foco endémico ronda os 40%, enquanto no sul de Ontário, Canadá, uma zona mais fria, a prevalência é normalmente mais baixa, mas pode vir a atingir os 8,4% (Lee et al., 2010; Dantas-Torres & Otranto, 2020). Ao longo da costa adjacente ao mar das Caraíbas até à América do Sul, a prevalência torna-se extremamente elevada. No México encontra-se a 42%, nas Caraíbas 63,2% e na Argentina 74% (Simón et al., 2012; Dantas-Torres & Otranto, 2020). No Brasil, a prevalência de dirofilariose pode ser inferior a 10% em determinadas regiões ou superior a 30% em regiões de transmissão ativa (Figueredo et al., 2017; Dantas-Torres et al., 2024).

Na Ásia, *D. immitis* é considerada endêmica no Bangladesh e no norte de Índia de acordo com Fuehrer et al. (2013). No sul da Índia e no Sri Lanka não foram reportados nenhuns casos de *D. immitis* conforme investigações realizadas por Borthakur et al. (2015) e Dasanayake et al. (2022). No Japão, o número de casos clínicos tem vindo a decair como consequência de uma maior conscientização da população sobre os riscos e métodos de controlo da doença (Oi et al., 2014; Noack et al., 2021).

Na Austrália, a dirofilariose tem reemergido na última década (Panetta et al., 2021). É considerada endêmica, mas atualmente a doença clínica tem se apresentado rara e de baixa prevalência (Nguyen et al., 2016; Noack et al., 2021).

A informação da prevalência de casos de *D. immitis* em África é limitada devido à falta de vigilância e de estudos epidemiológicos, sendo estes mais focados noutras doenças também transmitidas por vetores, como é o exemplo da malária. No entanto a dirofilariose tem sido reportada na Tunísia, Moçambique, São Tomé e Príncipe, Argélia e Tanzânia. A presença de *D. immitis* e de *D. repens* tem vindo a aumentar nos últimos anos, apesar do filarídeo mais influente no continente africano ser *Acanthocheilonema dracunculoides*, também denominada de *Dipetalonema* (Genchi & Kramer, 2020; Noack et al., 2021).

1.7 Fisiopatologia e apresentação clínica da dirofilariose

A dirofilariose é uma doença multissistémica de progressão crónica com alterações vasculares que afeta principalmente os pulmões, coração, fígado e rins (Montoya-Alonso et al., 2022). Os animais infetados podem apresentar-se assintomáticos, com sinais de doença cardíaca direita congestiva ou com síndrome da veia cava aguda/crónica (Monobe et al., 2017). A morte súbita dos parasitas adultos e a libertação da bactéria endossimbionte *Wolbachia pipientis* podem tornar esta parasitose fatal. A mortalidade está associada à falência cardíaca e renal e, quando decorrente do tratamento, a tromboembolismo pulmonar agudo (Montoya-Alonso et al., 2022).

Os sinais clínicos da dirofilariose dependem da carga parasitária, da resposta imunitária do hospedeiro e da duração de infeção (Abdulkadir & Kebede, 2024). Estes sinais estão frequentemente associados à fase do ciclo de vida do parasita. Durante a

primeira fase de microfilarémia, a quantidade de adultos juvenis é baixa e muitos deles ainda se encontram na fase de migração. A maioria dos pacientes apresenta apenas sinais inespecíficos como tosse, dispneia, anorexia e perda de peso. Já na fase adulta, os parasitas alojam-se no ventrículo direito, causando hipertensão pulmonar (Monobe et al., 2017). A maturação dos adultos nas artérias pulmonares causa reações inflamatórias na microvasculatura pulmonar e nas artérias de grande calibre dos hospedeiros. A artéria pulmonar expande em diâmetro e o endotélio e a túnica média tornam-se mais espessas (Adebayo et al., 2024). O dano vascular provoca endarterite proliferativa (inflamação do endotélio) que resulta na formação de microvilosidades intravasculares e na diminuição do lúmen dos vasos. A endarterite provoca a perda de elasticidade das artérias pulmonares, o que cronicamente desencadeia hipertensão pulmonar. Também as proteínas secretadas pela *Dirofilaria immitis* podem contribuir para a endarterite proliferativa (Serrano-Parreño et al., 2017). Nesta fase, a auscultação pode revelar sons pulmonares anómalos (estertores) sobre os lobos caudais dos pulmões, podendo ouvir-se um desdobramento do segundo som cardíaco (ESCCAP, 2021). Consequentemente, o animal desenvolve doença cardíaca congestiva direita e insuficiência hepática, apresentando sinais mais específicos, como intolerância ao exercício, taquipneia, stress respiratório, taquicardia, arritmia, murmúrios cardíacos e alterações circulatórias (e.g., ascite). Taquipneia e stress respiratório podem também ser causados por tromboembolismo devido à morte do parasita (Monobe et al., 2017). O ventrículo direito distende, a vasculatura pulmonar dilata e há a presença de infiltrados eosinofílicos no parênquima pulmonar (Adebayo et al., 2024). A deposição de complexos imunes e de fibrina nos glomérulos pode provocar glomerulonefrite e falência renal (Monobe et al., 2017). A inflamação derivada da migração e posterior morte dos parasitas, resulta no transporte dos mediadores inflamatórios para o leito dos capilares alveolares. Desse modo, este processo conduz a edema das células alveolares, fragilizando-as e tornando-as suscetíveis a rotura, principalmente em momentos de maior atividade ou exercício. Dá-se o aumento do fluxo sanguíneo no alvéolo, deposição de fibrina e agravamento do estado fibrótico (AHS, 2024).

A hipertensão pulmonar e as alterações hemodinâmicas podem vir a desencadear um conjunto de sinais denominados de síndrome da veia cava (SVC). A SVC, também conhecida como hemoglobinúria dirofilarial, pode ter desenvolvimento agudo em cães

com elevada carga parasitária. Os parasitas realizam uma migração retrógrada até ao ventrículo direito e à veia cava, provocando hemólise e impedindo a circulação normal do fluxo sanguíneo e, por sua vez, o correto encerramento da válvula tricúspide (Abdulkadir & Kebede, 2024). Esta interferência provoca regurgitação da válvula, murmúrio cardíaco e pulso da jugular, bem como a diminuição do output pulmonar, o que conduz a uma congestão hepática. A SVC é diagnosticada pelos sinais de reduzido output cardíaco (fraqueza, mucosas pálidas, dispneia), anemia e hemoglobinúria e é confirmada pela observação de parasitas intracardíacos e/ou na veia cava, ecograficamente ou numa necrópsia (Chandrasakha et al., 2021). É considerada uma emergência e é frequentemente fatal se não se proceder à remoção cirúrgica dos parasitas dentro de dois dias (AHS, 2024).

Os sinais hematológicos mais comumente observados são ligeira trombocitopenia, anemia não regenerativa, ligeira leucocitose (por neutrofilia, basofilia e eosinofilia) e microfilarémia. Em análises bioquímicas, as alterações renais e hepáticas são esperadas, como o aumento da creatinina (CREA) e ureia (BUN), hipoalbuminémia e o aumento da ALT, ALP, GGT e bilirrubina (Monobe et al., 2017).

1.8 Métodos de diagnóstico

Os métodos de diagnóstico são baseados na observação direta de microfilárias circulantes (métodos diretos) e/ou na utilização de testes imunológicos/moleculares para detetar antígenos e/ou microfilárias (métodos indiretos). A diferenciação morfológica entre *D. immitis* e *D. repens* pode dificultar o diagnóstico a partir dos métodos diretos. Testes serológicos são mais sensíveis, ou seja, resultam em menos falso-negativos, mas estão dependentes da resposta imunológica do hospedeiro. Existe ainda a possibilidade de reação cruzada com outros parasitas, podendo originar falso-positivos (Monobe et al., 2017).

1.8.1 Métodos diretos

1.8.1.1 Testes parasitológicos

Em cães microfilarémicos, é possível a observação de microfilárias microscopicamente após realizar-se um esfregaço de sangue (AHS, 2024). Para a

realização desta técnica é colocada uma gota de sangue fresco na extremidade de uma lâmina. Outra lâmina é posicionada sobre a primeira de modo a formar um ângulo de 45 graus à frente da gota. A segunda lâmina, a “deslizadora”, é puxada para trás até contatar com a gota de sangue e, de seguida, é deslizada num movimento rápido para a frente até à outra extremidade da primeira lâmina (Berndt et al., 2019). A coloração de Diff-Quick (baseada na coloração de Wright-Giemsa) é então aplicada, começando por fixar o esfregaço de sangue em metanol entre 30 segundos e um minuto. De seguida, a lâmina é mergulhada nos corantes eosina (corante ácido) e azul de metileno (corante básico), durante cinco a dez segundos cada. Por fim, a lâmina é lavada com água destilada e deixada secar ao ar (Bristol, 2017).

Em adição, a técnica da gota fresca não só permite observar a presença de microfilárias, mas também a sua movimentação estacionária no meio celular. A movimentação das microfilárias permite diferenciar *D. immitis* de *Acanthocheilonema dracunculoides*, uma vez que os movimentos de *D. immitis* são mais rápidos e progressivos, enquanto *A. dracunculoides* tende a enrolar-se com mais frequência. Esta técnica consiste na coleta de sangue, colocação de uma gota de sangue sobre uma lâmina, cobrição com uma lamela e observação microscópica até 30 a 60 minutos após colheita (AHS, 2024).

Ambos os testes previamente descritos são pouco sensíveis quando estão presentes números baixos (50-100/ml) de microfilárias circulantes (AHS, 2024). Testes negativos para microfilarémia não podem descartar infeção, uma vez que as microfilárias nem sempre estão presentes, como é o caso de infeções apenas com parasitas adultos sem microfilárias circulantes (ESCCAP, 2021).

Para obter uma maior sensibilidade na testagem, técnicas de concentração ou de filtração poderão ser utilizadas. O teste modificado de Knott é um teste de concentração, utilizado para determinar a presença de microfilárias (AHS, 2024). Este teste consiste em adicionar 1ml de sangue com anticoagulante (EDTA) a 9ml de formalina a 2% num tubo colocado a centrifugar entre 1100rpm e 1150rpm durante cinco a oito minutos. O papel da formalina é lisar os glóbulos vermelhos da amostra. Após centrifugação, o sobrenadante é descartado e o sedimento é corado com azul de metileno. O sedimento corado é então colocado sobre uma lâmina, coberto com uma

lamela e observado ao microscópio ótico. A objetiva de 10x é utilizada para examinar a presença de microfilárias e a objetiva de 40x para avaliar a morfologia das mesmas (Rawlings, 1986; AHS, 2024).

O método de Knott é o preferido para posteriormente diferenciar outras espécies de filarídeos de *Dirofilaria immitis* (AHS, 2024). A **Tabela 1** descreve os parâmetros morfológicos utilizados na diferenciação das espécies *D. immitis*, *D. repens*, *Acanthocheilonema reconditum* e *A. dracunculoides* (ESCCAP, 2021).

Tabela 1 - Parâmetros morfológicos dos diferentes filarídeos do sangue de cães (adaptado de ESCCAP, 2021)

Espécies	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Morfologia
<i>Dirofilaria immitis</i>	290-330	5-7	Sem bainha, extremidade cefálica pontiaguda, cauda reta com a ponta afiada
<i>Dirofilaria repens</i>	300-370	6-8	Sem bainha, extremidade cefálica obtusa, cauda filiforme com a ponta frequentemente em forma de gancho
<i>Acanthocheilonema reconditum</i>	260-283	4	Sem bainha, extremidade cefálica obtusa com papilas cefálicas proeminentes, botão caudal em forma de gancho
<i>Acanthocheilonema dracunculoides</i>	190-247	4-6,5	Com bainha, extremidade cefálica obtusa, extremidade caudal afilada e reta

Os métodos de testagem parasitológicos são rápidos e de baixo custo económico. No entanto, são de baixa sensibilidade e possuem a limitação de poderem resultar em falso-positivos se a identificação morfológica da espécie não for realizada corretamente ou a falso-negativos se a carga parasitária for baixa. O sangue deverá ser colhido no início do dia ou no final da tarde, de acordo com o ritmo circadiano dos vetores, pois são nessas horas que estes se encontram mais ativos e a

probabilidade das microfilárias se encontrarem em circulação é maior (Soares et al., 2022).

1.8.2 Métodos indiretos

1.8.2.1 Testes serológicos

A detecção de antígenos circulantes é o método mais sensível para identificar infecções em cães assintomáticos e analisar casos suspeitos. É recomendada a combinação dos testes de observação de microfilárias com um teste de antígeno para obter um diagnóstico com maior sensibilidade e especificidade. Os testes serológicos possuem uma especificidade de 100% (AHS, 2024). O teste serológico detecta uma glicoproteína produzida no trato reprodutivo de fêmeas adultas através de testes imunocromatográficos de fluxo lateral ou de um ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA). Esta testagem facilita a detecção de infecções ocultas (Soares et al., 2022). Os antígenos das fêmeas adultas estão presentes aproximadamente seis a oito meses pós início de infecção (ESCCAP, 2021). Um teste negativo não significa que o animal está livre de infecção, simplesmente indica que nenhum antígeno foi detectado. Se apenas fêmeas imaturas ou machos estiverem presentes, estes testes não irão detectar antígeno circulante no organismo do hospedeiro (Western College of Veterinary Medicine, 2021). Em alguns cães infetados, situações de formação de complexos antígeno-anticorpo poderão interferir com a detecção de antígeno pelos testes serológicos ao bloquearem o antígeno, ocasionando falso-negativos. Estudos demonstraram que aquecendo as amostras de soro, ocorre a libertação do antígeno, resultando num maior número de positivos (Velasquez et al., 2014; AHS, 2024). Quando as instruções do kit de testagem não são seguidas corretamente, o diagnóstico pode também ser comprometido (AHS, 2024).

1.8.2.2 Testes moleculares

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica utilizada para amplificação de determinadas sequências específicas de DNA, permitindo a obtenção de cópias de uma região-alvo do DNA *in vitro*. O processo de PCR baseia-se no uso

de uma DNA polimerase termoestável, a Taq polimerase, e requer *primers*, pequenas sequências de DNA desenhadas especificamente para se ligarem à região de interesse. O PCR ocorre por meio de ciclos repetidos de variação de temperatura, onde a DNA polimerase sintetiza novas cadeias de DNA a partir dos *primers* (Mullis & Faloona, 1987).

O conteúdo e a integridade do DNA do parasita não variam conforme a fase do ciclo de vida do mesmo, nem são afetados por fatores ambientais que poderiam modificar os processos de transcrição e de pós-transcrição. A testagem baseada em métodos moleculares focados no genoma do parasita evita ambiguidades associadas com outros métodos de detecção (Zarlenga & Higgins, 2001). Ferramentas baseadas na utilização do PCR têm vindo a ser desenvolvidas com o objetivo de detetar DNA de filarídeos no hospedeiro definitivo e nos seus mosquitos vetores. Recentemente, a técnica de RT-PCR tem sido avaliada para utilização em diagnóstico de casos de infecção por *D. repens* e *D. immitis*. Estudos comprovam que o método é capaz de simultaneamente detetar e diferenciar as duas espécies (Latrofa et al., 2012).

1.8.3 Testes complementares de diagnóstico

Métodos imagiológicos, como a radiografia, ecografia e ecocardiografia, são úteis na confirmação de diagnóstico e classificação da severidade da doença (AHS, 2024).

i. Radiografia

A avaliação cardiopulmonar através do uso de Raio-x contribui para a previsão de prognóstico do paciente, avaliando o estado cardiopulmonar do animal e estimando o risco de complicações que poderão decorrer pós-tratamento (AHS, 2024). As alterações radiográficas variam conforme a gravidade, a duração da infecção e da resposta individual da vascularização do cão afetado. Radiografias torácicas com três projeções (lateral esquerda, lateral direita e ventrodorsal) são recomendadas para análise de padrões pulmonares bronco-intersticiais ou vasculares, lesões no parênquima pulmonar e avaliação das artérias pulmonares periféricas quanto ao diâmetro (Maerz, 2020). Os sinais, quase patognomónicos, de doença vascular causada pela dirofilariose passam pelo aumento das artérias periféricas inter e

intralobulares com maior recorrência nos lobos diafragmáticos. Em casos mais severos, ocorre o alargamento da silhueta cardíaca (forma de “D” reverso) (AHS, 2024).

ii. Ecografia

A ecografia POCUS é um recurso valioso para avaliação de distúrbios pulmonares e é amplamente utilizada como meio de diagnóstico de patologias respiratórias em cães. É caracterizada por ser um método não invasivo, portátil e por gerar imagens em tempo real. A identificação de vários aspetos patológicos depende da interpretação correta dos artefactos gerados pela interação das ondas ultrassonográficas com a interface pleuropulmonar ou com a interface ar (Armenise, 2025). Este exame deteta efusões cavitárias e permite diagnosticar patologias cardiopulmonares, como tromboembolismos, hipertensão pulmonar e distensão das veias cava e hepáticas. Em determinados contextos clínicos, a ecografia POCUS mostrou-se mais sensível e específica do que a radiografia convencional (Armenise, 2025).

iii. Ecocardiografia

A ecocardiografia é uma ferramenta importante no diagnóstico e quantificação de hipertensão pulmonar e na visualização de parasitas intracardíacos (Romano et al., 2021). A parede corporal dos parasitas é altamente ecogénica, produzindo imagens características compostas por dois traços curtos paralelos, assemelhando-se a um sinal de igual (=) (AHS, 2024). A hipertensão pulmonar é identificada através do uso de cálculos de gradientes de pressão, recorrendo ao Doppler, se existir insuficiência pulmonar ou da válvula tricúspide (Maerz, 2020; Serrano-Parreño et al., 2017). Contudo, o diagnóstico pode depender de parâmetros subjetivos, especialmente quando a regurgitação da válvula tricúspide e/ou a insuficiência pulmonar são difíceis de avaliar. Nesses casos, é utilizado o Índice de Distensibilidade da Artéria Pulmonar Direita (RPDA Index), baseado na diferença de diâmetro entre a artéria pulmonar direita em sístole e em diástole, medida no modo M (Serrano-Parreño et al., 2017). Um valor de RPDA Index inferior a 35% pode ser indicativo de hipertensão pulmonar, permitindo a avaliação da sua severidade. Índices com valores entre 35% e 28% estão associados a hipertensão sistólica leve, entre 27% e 23% a casos moderados, enquanto valores iguais ou inferiores a 22% são compatíveis com hipertensão pulmonar grave

(Venco et al., 2014). A ecocardiografia pode fornecer evidências definitivas de infecção por dirofilariose e das alterações estruturais e funcionais que a patologia provoca no coração, vasos sanguíneos e pulmões. Em cães grandes ou com baixa carga parasitária, apresenta-se um método pouco eficiente, dado que os parasitas alojam-se normalmente nos ramos periféricos das artérias pulmonares, o que se afasta da área de visualização ecocardiográfica, possuindo a ecocardiografia apenas capacidade de avaliação das artérias pulmonares junto à base do coração (AHS, 2024). A ecocardiografia permite localizar os parasitas antes de definir um protocolo de tratamento da dirofilariose. É um teste que deverá ser realizado antes de se iniciar um protocolo que inclua remoção cirúrgica dos parasitas, posto que, segundo Romano et al. (2021), é relevante a diferenciação de um cão com elevada carga parasitária de um cão com baixa carga parasitária para desenvolvimento de um plano de tratamento correto. É importante salientar que as recomendações para tratamento de dirofilariose são principalmente baseadas na presença de sinais clínicos e síndrome da veia cava, em vez de carga parasitária (Romano et al., 2021).

1.9 Abordagem terapêutica

O tratamento da dirofilariose é desafiante para o médico veterinário, tutor e animal. Trata-se de um procedimento dispendioso, moroso, com potenciais efeitos colaterais e com a necessidade de restrição marcada da atividade física por parte do animal (Dantas-Torres et al., 2023).

Testes diagnósticos deverão ser realizados antes da prescrição e administração de fármacos preventivos de dirofilariose. É imprescindível conhecer o estado de infecção por *D. immitis* do cão, dado que, sem esse conhecimento, conduz-se a uma seleção das dirofilárias resistentes às lactonas macrocíclicas (LM) (AHS, 2024). As diferentes fases larvares possuem diferentes sensibilidades aos antihelmínticos. Ao eliminarem-se as L3 e L4 suscetíveis com a utilização das LM, apenas as larvas resistentes irão sobreviver, desenvolver-se e reproduzir-se, aumentando a proporção de indivíduos com genes resistentes na população e, por sua vez, serão estas larvas resistentes que estarão disponíveis para transmissão aos vetores (ESCCAP, 2021).

O tratamento de pacientes assintomáticos ou com sinais leves, desde que o exercício físico seja restringido, possui pouca probabilidade de causar efeitos colaterais graves. Infecções moderadas a graves ou em pacientes com doenças concomitantes podem apresentar mais dificuldades no tratamento. Cães com sintomatologia grave deverão ser estabilizados antes da administração de adulticida. A estabilização poderá requerer a administração de glucocorticoides, diuréticos, vasodilatadores pulmonares, ionotrópicos positivos e fluidoterapia (AHS, 2024).

Os principais objetivos do tratamento da dirofilariose passam por melhorar a condição clínica do animal e eliminar todos os estádios (microfilárias, fases larvares, jovens adultos e adultos) presentes no hospedeiro com o mínimo de complicações pós-tratamento (AHS, 2024).

O protocolo de tratamento, atualizado em 2024, recomendado pela American Heartworm Society (AHS) incorpora a administração de doxiciclina, uma LM e melarsomina num regime de três injeções. Tanto o European Scientific Counsel Companion Animal Parasites (ESCCAP) como o Tropical Counsel Companion Animal Parasites (TropCCAP) corroboram a utilização deste protocolo. Já o Companion Animal Parasite Council (CAPC) e o European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis (ESDA) diferem ligeiramente na utilização deste protocolo. Apesar das variações, todas estas entidades reconhecem o impacto da doxiciclina na melhoria do animal e reconhecem a melarsomina como adulticida de primeira linha (Dantas-Torres et al., 2023). Protocolos com a utilização de LM como adulticidas não são recomendados atualmente devido ao aumento da probabilidade de resistências (Kramer et al., 2018).

A eliminação de *Wolbachia* é prejudicial para as filárias e o tratamento com doxiciclina mostrou-se eficaz na eliminação de oócitos nas fêmeas adultas, na eliminação de estados embrionários iniciais e de microfilárias e também apresenta efeitos adulticidas variados, apesar destes últimos serem lentos e fracos (Kramer et al., 2018). A doxiciclina deverá ser administrada antes da administração de melarsomina, de maneira que a população de *Wolbachia* e os seus metabolitos estejam reduzidos ou ausentes aquando da morte dos parasitas. Em adição, a doxiciclina possui uma atividade imunomoduladora ao inibir diversas vias inflamatórias. A dose de doxiciclina recomendada é de 10mg/kg BID oral durante 28 dias. Um período de pausa de um mês após toma de doxiciclina é

recomendado antes de iniciar as injeções de melarsomina (AHS, 2024). As LM, como a ivermectina e a moxidectina, são bastante eficientes na eliminação de L3 e L4, mas relativamente aos adultos, apresentam um efeito de eliminação lento (*slow-kill*), sendo capazes de provocar disfunção neuromuscular nas larvas adultas e degeneração de estados embrionários e consequentemente, diminuição da produção de microfilárias (Kramer et al., 2018). Foi demonstrado que a administração de doxiciclina em conjunto com ivermectina proporciona uma atividade microfilaricida e adulticida superior ao uso de ivermectina isolada e ainda reduz significativamente os números de *Wolbachia* de forma mais eficaz do que a doxiciclina sozinha (AHS, 2024). A melarsomina (dicloridrato de melarsomina) é o único adulticida aprovado pela Food and Drug Administration (FDA). Segundo o protocolo de três injeções, é administrada via intramuscular (IM), entre a terceira e quinta vértebra lombar, na dose de 2.5 mg/kg, seguida de duas administrações da mesma dose e via após um mês da primeira e com 24 horas de intervalo (AHS, 2024). A melarsomina está disponível em dois produtos, Immiticide® (Boehringer Ingelheim) e Diroban™ (Zoetis). Contudo, em vários países onde a dirofilariose é endémica, este fármaco não se apresenta disponível (Dantas-Torres et al., 2023).

1.9.1 Protocolo de tratamento para *D. immitis*, adaptado de AHS (2024)

DIA 0

- Em cão diagnosticado e confirmado como positivo para dirofilariose por:
 - Teste de antígeno e observação de microfilárias;
 - Sem observação de microfilárias, confirmado por um segundo teste de antígeno.
- 1. Administrar fármaco preventivo da dirofilariose oral/tópico (duração mensal) ou injetável (duração entre seis e doze meses);
Se microfilárias detetadas, de modo a reduzir o risco de choque anafilático, realizar um tratamento prévio com antihistamínicos e glucocorticóides, caso ainda não se esteja a fornecer prednisolona ao animal. Manter animal em observação por oito horas.
- 2. Administrar doxiciclina 10 mg/kg BID durante 28 dias consecutivos;
- 3. Administrar produto ectoparasiticida tópico para repelir e matar mosquitos;

4. Começar restrição de atividade física – quantos maior número de sinais o animal apresentar, mais rígida deverá ser a restrição.

- Em cão sintomático:

1. Estabilizar com a terapia adequada;
2. Prescrever prednisolona na dose 0.5 mg/kg BID na primeira semana, 0.5 mg/kg SID na segunda semana e 0.5 mg/kg a cada 48 horas na terceira e quarta semanas.

DIA 30

1. Assegurar término do tratamento com doxiciclina;
2. Administrar fármaco preventivo da dirofilariose (exceto se administrado o injetável no DIA 0);
3. Administrar produto ectoparasiticida tópico para repelir e matar mosquitos.

DIA 31-59

Período de pausa recomendado entre a toma de doxiciclina e o início das injeções de melarsomina, de modo a eliminar os metabolitos e as WSP do organismo do hospedeiro antes de começar o tratamento adulticida.

DIA 60

1. Administrar fármaco preventivo da dirofilariose (exceto se administrado o injetável no DIA 0);
2. Administrar a primeira injeção de melarsomina 2.5 mg/kg IM;
Monitorizar para a possibilidade de choque anafilático pós-injeção.
3. Prescrever prednisolona na dose 0.5 mg/kg BID na primeira semana, 0.5 mg/kg SID na segunda semana e 0.5 mg/kg a cada 48 horas na terceira e quarta semanas;
4. Restrição rígida de exercício físico: restrição em jaula, trela obrigatória quando animal no exterior;
5. Administrar produto ectoparasiticida tópico para repelir e matar mosquitos.

DIA 90

1. Administrar fármaco preventivo da dirofilariose (exceto se administrado o injetável no DIA 0);
2. Administrar a segunda injeção de melasormina 2.5 mg/kg IM;
Monitorizar para a possibilidade de choque anafilático pós-injeção.
3. Prescrever prednisolona na dose 0.5 mg/kg BID na primeira semana, 0.5 mg/kg SID na segunda semana e 0.5 mg/kg a cada 48 horas na terceira e quarta semanas;
4. Administrar produto ectoparasiticida tópico para repelir e matar mosquitos.

DIA 91

1. Administrar a terceira injeção de melasormina 2.5 mg/kg IM no lado oposto ao do dia anterior;
Monitorizar para a possibilidade de choque anafilático pós-injeção.
2. Continuar restrição rígida de exercício físico durante as próximas seis a oito semanas: restrição em jaula, trela obrigatória quando animal no exterior.

DIA 120

Testar para presença de microfilarémia. Se positivo:

- Tratar com microfilaricida e retestar em quatro semanas até animal se tornar microfilarémico negativo. Se microfilarémia persistir, ponderar testes adicionais para resistência.

1. Continuar programa anual de prevenção de dirofilariose e prevenção contra mosquitos;
2. Gradualmente, retornar à atividade física durante as próximas quatro semanas.

DIA 325

Após nove meses da última injeção de melasormina, realizar teste de antígeno e teste de observação de microfilárias. Se antígeno-positivo, tratar novamente com doxiciclina durante 28 dias e realizar duas injeções de melarsomina (2.5 mg/kg cada IM) com 24 horas de intervalo.

1.9.2 Tratamento cirúrgico

A remoção cirúrgica dos parasitas é recomendada quando existe uma sobrecarga elevada de larvas no átrio e ventrículo direitos, o que, por sua vez, inicia a síndrome de veia cava (*ESCCAP*, 2021). O aumento da pressão arterial pulmonar pode ser provocado pelo embolismo parasitário (Romano et al., 2021). O acesso cirúrgico é realizado através da veia jugular externa, utilizando uma sedação leve, anestesia local e uma pinça intravascular flexível, sempre com assistência da ecocardiografia. A pinça deverá ser passada até nenhuma larva ser removida em cinco passagens consecutivas (AHS, 2024). Com a indução anestésica e a estabilização pré-cirúrgica, pode ocorrer a migração das larvas do coração direito para as artérias pulmonares, associada à administração de pimobendano e sildenafil (Romano et al., 2021). Nestes casos, a pinça intravascular poderá ser cuidadosamente direcionada através da válvula pulmonar para a artéria pulmonar, de modo a remover as larvas presentes nesse local. Após recuperação cirúrgica, deverá ser iniciado o protocolo de tratamento recomendado pela AHS para eliminação das larvas que persistirem (AHS, 2024). Em cães com síndrome da veia cava, a extração dos parasitas resulta na resolução da hemoglobinúria e da anemia. Se bem sucedida, a remoção cirúrgica apresenta um prognóstico favorável a longo prazo em cães que sobrevivem até à alta médica (Romano et al., 2021).

1.9.3 Complicações

A complicação mais frequente causada por um tratamento adulticida eficaz é o tromboembolismo pulmonar. Estes trombos são compostos por fragmentos dos parasitas, agregados com plaquetas e acumulação de fibrina. De modo a reduzir o aparecimento desta complicação, a restrição rígida de exercício físico torna-se essencial. Poderão ser administrados preventivamente glucocorticoesteróides para reduzir a inflamação associada às WSP e metabolitos libertados na morte dos parasitas (AHS, 2024).

1.10 Prevenção e o seu papel na saúde pública

A dirofilariose canina apesar de ser uma doença potencialmente fatal, é também passível de prevenção. Para todos os cães que habitem em áreas endémicas, a prevenção médica tem de ser uma prioridade, devendo o protocolo ser iniciado após as oito semanas

de vida. É importante realizar testagem de antígenos e de observação de microfilárias antes de iniciar a prevenção, uma vez que podem existir infecções subclínicas. Nestes casos, o uso de fármacos preventivos conduz à morte dos adultos (*slow-kill*) inintencionalmente, podendo ter como consequência o surgimento de resistências (AHS, 2024).

Os fármacos preventivos aprovados pela FDA e pela European Medicines Agency disponíveis no mercado fazem parte do grupo das LM e correspondem à ivermectina, moxidectina, milbemicina e selamectina (AHS, 2024). A ivermectina e a milbemicina estão disponíveis para toma oral, a selamectina em apresentação tópica e a moxidectina pode ser administrada via injetável, via oral e via tópica. As LM tópicas ou orais são administradas mensalmente e possuem efeito eficaz contra as L3 e L4 que se tenham vindo a desenvolver nos últimos trinta dias. As LM injetáveis estão disponíveis em alguns países europeus, incluindo Portugal, e devem ser utilizadas em cães com idade superior a seis meses, com registo de duração de proteção de um ano (ESCCAP, 2021). As LM são fármacos considerados seguros e existem estudos que comprovam a sua segurança de utilização mesmo em raças de cães sensíveis (cães com deficiência em P-glicoproteína e que possuem mutação no gene MDR1), como os *Border Collies*, desde que sejam cumpridas as dosagens recomendadas (Washington State University, 2022; AHS, 2024). Para além da sua segurança, as LM são fáceis de administrar, eficazes e pouco dispendiosas quando comparadas com o tratamento (McCall et al., 2017). A administração dos produtos preventivos durante doze meses do ano, mesmo em regiões onde não exista a transmissão contínua durante todo o ano, melhora a adesão ao tratamento e pode prevenir outras infeções parasitárias (AHS, 2024).

Apesar destes fatores, muitas vezes a prevalência da dirofilariose não diminui com a utilização destes métodos de prevenção. Este facto deve-se muitas vezes à administração inconsistente e falta de adesão por parte dos tutores e à existência de resistências às LM das larvas de *D. immitis*. Quando um gene resistente é estabelecido numa população de parasitas, a pressão seletiva das LM irá favorecer a persistência de parasitas que possuem tais genes. Se os vetores não forem em conjunto eliminados, poderá ocorrer a disseminação geográfica destes parasitas resistentes (McCall et al., 2017). O controlo dos vetores torna-se um elemento de grande peso na prevenção de dirofilariose. A utilização de repelentes (permetrinas), que previnem a atividade de refeição de sangue e de

ectoparasiticidas (isoxazolinas), cujo efeito é eliminar os mosquitos, deverá ser mais agressiva nos meses mais quentes e húmidos (ESCCAP, 2021). As isoxazolinas (e.g., fluralaner e afoxolaner) não previnem a picada do mosquito, mas provocam a sua morte 24-48 horas após a refeição de sangue em cães tratados (AHS, 2024). A AHS recomenda a eliminação de potenciais habitats de larvas e de mosquitos adultos, como fontes de água parada, em associação com tratamentos biológicos e a diminuição da exposição dos cães, ao reduzir o tempo no exterior nas horas de maior atividade do mosquito.

A utilização de uma abordagem multimodal, com a utilização de repelentes/ectoparasiticidas e LM foi comprovada por McCall et al. (2017) como tendo uma maior eficácia no controlo da dirofilariose do que a utilização de LM isoladas. Deste modo, para obter melhores resultados na prevenção de dirofilariose, é recomendado o uso profilático de LM durante todo o ano juntamente com produtos tópicos para repelir e matar mosquitos (AHS, 2024).

A prevenção da infeção por *Dirofilaria immitis* não é apenas uma medida essencial na perspetiva da saúde animal, mas também apresenta-se como uma questão relevante para a saúde pública (Angelou et al., 2019). Os humanos são hospedeiros acidentais de *D. immitis* e a sua infeção pode levar a dirofilariose pulmonar humana com a formação de nódulos nas artérias pulmonares e em outras regiões ectópicas, incluindo o tecido subcutâneo, conjuntiva ocular e serosas (Riebenbauer et al., 2021). Os pacientes humanos poderão apresentar sinais como tosse, dor no peito, hemoptise, dispneia e desconforto ocular (Dantas-Torres & Otranto, 2020). No entanto, a maioria das infeções em humanos são autolimitantes, com manifestações subclínicas, podendo, em algumas situações, permanecer assintomáticas e não diagnosticadas. Considera-se que *Dirofilaria spp* não completa o seu ciclo de vida em humanos, dado que as larvas infetantes são eliminadas após transmissão ou não são capazes de atingir a maturidade sexual (Riebenbauer et al., 2021). Evidências recentes tornam esta consideração mais complexa, considerando que Potters et al. (2018) descreveram um caso onde um parasita adulto, da espécie *D. repens*, foi identificado num paciente humano. A microfilarémia é um evento muito raro em humanos (Riebenbauer et al., 2021).

A dirofilariose humana é considerada como uma doença zoonótica esporádica. Contudo, nas últimas décadas, o número de casos reportados tem vindo a aumentar,

podendo ser consequência de vários fatores que promovem a propagação de agentes transmitidos por vetores e do aprimoramento da conscientização da comunidade médica quanto a esta parasitose (Dimzas et al., 2024). A disseminação da dirofilariose está principalmente relacionada com a disponibilidade de hospedeiros reservatórios, à sua biologia e comportamento, à presença de vetores, ao clima e às mudanças na atividade humana (Riebenbauer et al., 2021).

A vigilância epidemiológica a longo prazo é crucial para identificar focos emergentes de doença. Para além da vigilância contínua, é necessário testar os animais e aplicar as medidas preventivas estipuladas, principalmente em regiões endêmicas. Os médicos veterinários devem estar cientes da prevalência de infecção nas suas áreas de atuação. É fundamental uma visão baseada na *One Health* ao abordar a dirofilariose, reconhecendo a interdependência que existe entre as saúdes animal, humana e ambiental, favorecendo a colaboração entre médicos e médicos veterinários no controlo desta zoonose (Chocobar et al., 2024).

1.11 Prognóstico

A dirofilariose possui um prognóstico favorável em pacientes com infecção leve a moderada, intermédio a reservado em casos mais graves e crítico em pacientes com síndrome da veia cava, tromboembolismo pulmonar grave ou insuficiência cardíaca congestiva (Hoch & Strickland, 2008).

2. Medicina de abrigo

A medicina de abrigo é uma área da Medicina Veterinária dedicada ao cuidado de animais acolhidos por associações ou abrigos de acolhimento temporário. Difere da prática médico veterinária clínica convencional uma vez que aborda simultaneamente a medicina individual e coletiva, atuando num contexto caracterizado por múltiplos desafios financeiros, logísticos e sociais. Ao contrário da medicina clínica, centrada individualmente em animais com tutores, a medicina de abrigo lida frequentemente com animais sem histórico clínico, muitas vezes vítimas de maus-tratos e negligência, exigindo uma gestão eficaz da saúde coletiva, prevenção de doenças infetocontagiosas e

promoção do bem-estar físico e comportamental da população residente (ASV, The Association of Shelter Veterinarians, 2022). Os abrigos, por norma, operam com recursos limitados, sendo obrigados a priorizar as intervenções preventivas, diagnósticas e terapêuticas. A ausência de conhecimento preciso sobre o risco de exposição a uma afeção como a dirofilariose, dificulta a tomada de decisão (Gettings et al., 2023). O médico veterinário desempenha um papel fundamental na orientação técnica e no funcionamento dos abrigos, ao garantir condições sanitárias adequadas e educação dos cuidadores. Para além da função clínica, atua também como gestor da saúde coletiva da população, com a implementação de protocolos de prevenção, medidas de diagnóstico e controlo de doenças infetocontagiosas, incluindo a dirofilariose (ASV, The Association of Shelter Veterinarians, 2022). Este tipo de medicina de abrigo constitui importantíssimas células de saúde pública.

II. Estudo

3. Objetivos

O OneVet - Hospital Veterinário VetSet, local onde a autora conduziu o seu estágio curricular, mantém uma ampla rede de parcerias com associações e abrigos de animais, os quais constituem uma parcela significativa dos seus clientes. A alta prevalência de dirofilariose no distrito de Setúbal tem sido constatada tanto nos animais provenientes dessas instituições quanto nos demais pacientes atendidos no hospital.

Este estudo visa averiguar a prevalência de microfilarémia num abrigo de cães localizado no distrito de Setúbal, cuja responsável relata a presença de casos de dirofilariose diagnosticados (6 casos diagnosticados previamente ao estudo), mas enfrenta restrições financeiras que comprometem a realização de testes de diagnóstico e a implementação de medidas preventivas.

Previamente à realização do estudo, foi obtido o consentimento informado da responsável do abrigo e autorização pelo Órgão Responsável pelo Bem-Estar Animal da Universidade de Évora (ORBEA-UÉ). Procurou-se comparar os métodos de observação de microfilárias, destacando as diferenças encontradas entre a sensibilidade e especificidade dos mesmos, assumindo como método de referência “Gold Standard” a técnica de Knott.

4. Material e métodos

4.1 Área de estudo

O estudo incidiu sobre a população de cães que habitam no abrigo “101 Rafeiros” situado na localidade de Águas de Moura, na freguesia da Marateca, concelho de Palmela, distrito de Setúbal (38° 35' N, 8° 42' O). A Figura 5 demonstra imagens representativas das instalações do abrigo. Esta zona encontra-se na periferia do estuário do Sado, caracterizado pelo clima mediterrâneo, de transição entre o clima marítimo e o clima continental. O presente trabalho foi desenvolvido durante o mês de maio, a meio da estação primaveril, onde as temperaturas médias diurnas variam em torno dos 20°C e as noturnas ficam em cerca de 10°C. Durante este período, a precipitação costuma-se registar entre os 50mm e os 70mm (Weather Atlas, 2025).

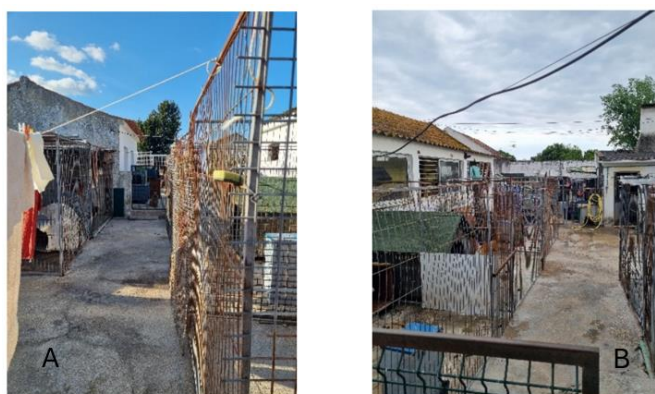


Figura 5 - (A) Zona da entrada do abrigo; (B) Zona do terreno superior e início da zona do telheiro do abrigo. (*Originais*)

O abrigo encontra-se dividido em oito setores, destacados na Figura 6, cinco deles sendo espaços exteriores, dois espaços interiores e um armazém.

A recolha de material, em particular das amostras sanguíneas, foi realizada no próprio abrigo, na zona (6), ilustrado na Figura 7, de modo a minimizar o stress associado ao transporte dos animais. Os testes esfregaço de sangue e gota fresca foram realizados logo após o momento da colheita. O esfregaço sanguíneo foi fixado e corado no local. A técnica de Knott foi efetuada no laboratório do OneVet – Hospital Veterinário VetSet, bem como a observação microscópica de todos os testes de observação de microfilárias.

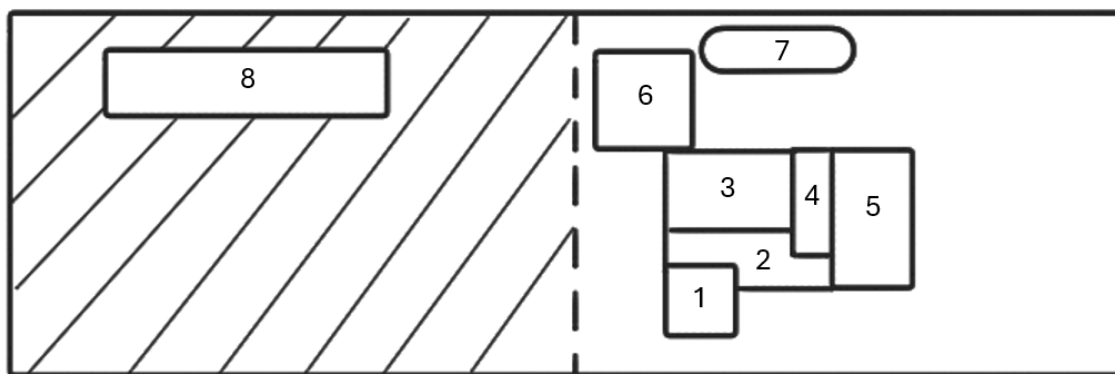


Figura 6 - Esboço da área do abrigo (*Original*)

Legenda:

- 1) Enfermaria
- 2) Entrada
- 3) Terreno superior
- 4) Marquise
- 5) Cozinha
- 6) Armazém
- 7) Telheiro
- 8) Terreno inferior



Figura 7 - (A), (B), (C) Espaços montados para recolha das amostras no abrigo. (*Originais*)

4.2 População em estudo

O estudo foi conduzido através da colheita de sangue de 62 animais utilizando a veia safena como ponto de acesso. O grupo de cães é constituído por indivíduos de ambos os sexos e diversas idades, raças e pesos, sendo estas as variáveis registadas em cada animal. Todos os animais foram submetidos a um exame físico detalhado e de modo a garantir o bem-estar animal e a validade dos resultados, os animais que apresentaram idade inferior a um ano, comportamento agressivo, stress excessivo, anemia, desidratação, distúrbios térmicos (hipo/hipertermia) ou um estado clínico comprometido foram excluídos do estudo. O abrigo alberga no total 66 cães, dos quais quatro foram excluídos da amostragem. As exclusões ocorreram devido aos critérios previamente estabelecidos, existindo um cão com idade inferior a um ano, dois cães cujo stress no momento da colheita impossibilitou a recolha de amostras e um cão com doença crónica em fase de agudização. Para averiguar o número mínimo de animais a utilizar, garantindo poder estatístico ao estudo, é aplicada a seguinte fórmula (Stevenson, 2021):

$$n \geq \frac{N \times Z_{\{1-\frac{\alpha}{2}\}}^2 \times P_y(1 - P_y)}{(E^2 \times (N - 1)) + \left(Z_{\{1-\frac{\alpha}{2}\}}^2 \times P_y(1 - P_y) \right)}$$

Em que,

n : tamanho da amostra

N : tamanho da população (66)

$Z_{\{1-\frac{\alpha}{2}\}}$: valor da distribuição normal para um nível de confiança de 95%, $Z=1.96$

E : margem de erro (5%)

P_y : proporção estimada (0.5)

Após substituição e resolução da equação, obtém-se um tamanho mínimo de 57 indivíduos, valor que garante a representatividade da amostra com um nível de confiança de 95% e um erro absoluto de 5%.

4.3 Colheita e análise sanguínea

As amostras foram colhidas pela autora do estudo. Pelo menos 1,5ml de sangue foi retirado de cada animal. Inicialmente, foi realizada a tricotomia e assepsia do local de colheita com álcool a 70%. De seguida, foi efetuada a venopunção da veia safena com agulhas de 23 Gauges (G) e seringas de 2ml e de 1ml estéreis. A colheita das amostras foi realizada ao final do dia, entre as 18 e as 20 horas. As amostras foram imediatamente colocadas e armazenadas em tubos de EDTA para posterior análise realizada no laboratório do OneVet – Hospital Veterinário VetSet, representado na Figura 8. A partir das amostras sanguíneas foi possível utilizar uma gota para a elaboração do esfregaço de sangue, outra gota para a técnica de gota fresca (ambas as gotas retiradas previamente à colocação das amostras nos tubos de



Figura 8 - Análise laboratorial no OneVet - Hospital Veterinário Vetset. (Original)

EDTA) e 1ml para a realização do método de Knott para cada animal. As técnicas da gota fresca e do esfregaço de sangue foram realizadas no próprio local de colheita. O esfregaço foi posteriormente fixado e corado nas mesmas instalações, possibilitando a preservação das características morfológicas das células sanguíneas. As amostras colocadas em tubos de EDTA foram acondicionadas sob refrigeração durante o transporte. Após chegada das amostras ao laboratório, as lâminas contendo a gota fresca foram analisadas num prazo de três horas pós colheita, apesar da técnica recomendar a observação ao microscópio até 30 a 60 minutos pós-colheita. O cumprimento deste intervalo é recomendado para minimizar a probabilidade de erros na avaliação, dado que as microfilárias perdem a motilidade e podem entrar em processos de degradação. Os esfregaços de sangue fixados e corados foram observados ao microscópio até 72 horas depois da sua realização. Para a realização da técnica de Knott, e assegurando a conservação do sangue, as amostras foram transferidas para tubos contendo formol a 2% imediatamente após chegada ao laboratório e foram refrigeradas até serem centrifugadas, coradas e analisadas num prazo de 48 horas pós colheita.

4.4 Técnicas laboratoriais

As técnicas empregadas neste estudo pertencem aos métodos diretos, integrando-se nos procedimentos parasitológicos para observação de microfilárias.

4.4.1 Gota fresca

A técnica de gota fresca, observada na Figura 9, possibilita a observação da movimentação de microfilárias no meio celular. Envolve a colheita de sangue, colocação de uma gota de sangue sobre uma lâmina, cobertura com uma lamela e exame microscópico (AHS, 2024).



Figura 9 - Microfilária (seta) encontrada ao realizar a técnica de gota fresca objetiva 40x. (*Original*)

4.4.2 Esfregaço sanguíneo

Como referido anteriormente, consiste na aplicação de uma gota de sangue numa lâmina, seguida da preparação de um esfregaço com uma segunda lâmina deslizadora (Berndt et al., 2019).

A coloração de Diff-Quick é realizada, fixando o esfregaço em metanol, seguido de imersão nos corantes eosina e azul de metileno, com posterior lavagem com água destilada e secagem ao ar (Bristol, 2017). A lâmina é examinada ao microscópio para identificação de microfilárias, ilustrado na Figura 10.

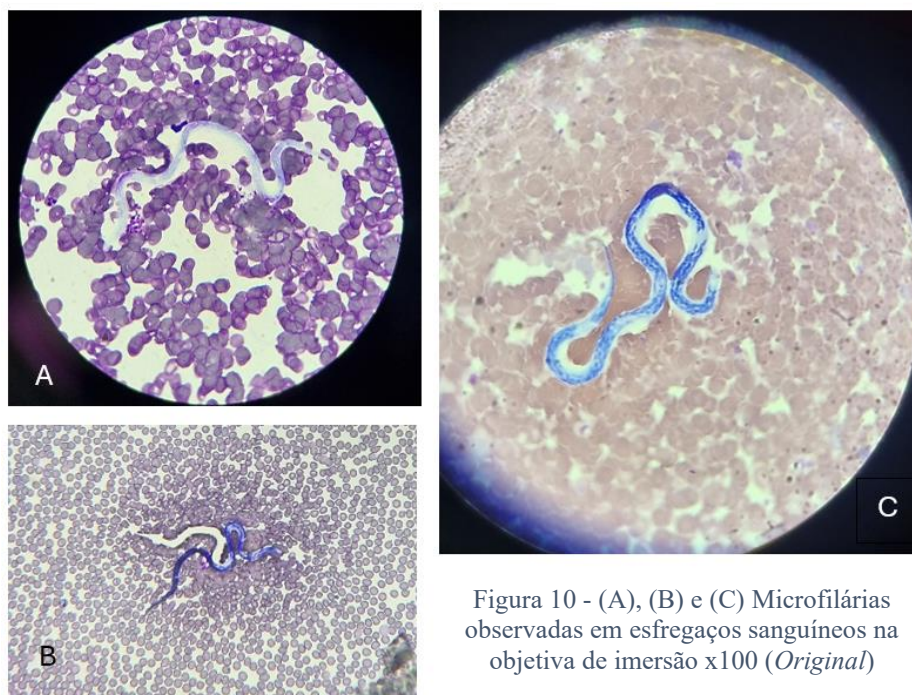


Figura 10 - (A), (B) e (C) Microfilárias observadas em esfregaços sanguíneos na objetiva de imersão x100 (*Original*)

4.4.3 Método de Knott

O método de Knott é uma técnica de concentração que, resumidamente, consiste em adicionar 1ml de sangue em EDTA a 9ml de formol a 2%, centrifugar a 1100-1150 rpm durante cinco a oito minutos e corar o sedimento com azul de metileno. O sedimento é observado ao microscópio para detecção de microfilárias (Figura 11 e Figura 12). Este método permite realizar uma caracterização morfológica das larvas, permitindo diferenciar as microfilárias de *D. immitis* das de outros parasitas (Rawlings, 1986; AHS, 2024), através da avaliação da extremidade anterior, posterior e da movimentação das microfilárias, não tendo sido possível neste estudo uma diferenciação a partir de medições de comprimento ou largura. Devido a limitações orçamentais, apenas estavam disponíveis tubos para centrifuga com a capacidade para 6ml. Consequentemente, procedeu-se à adaptação da técnica de Knott, realizando duas amostras de 0,5ml de sangue por animal, cada uma diluída em 4,5ml de formol a 2%. Assim, assegurou-se a análise de 1ml de sangue por animal diluído em 9ml de formol, conforme os requisitos da técnica.

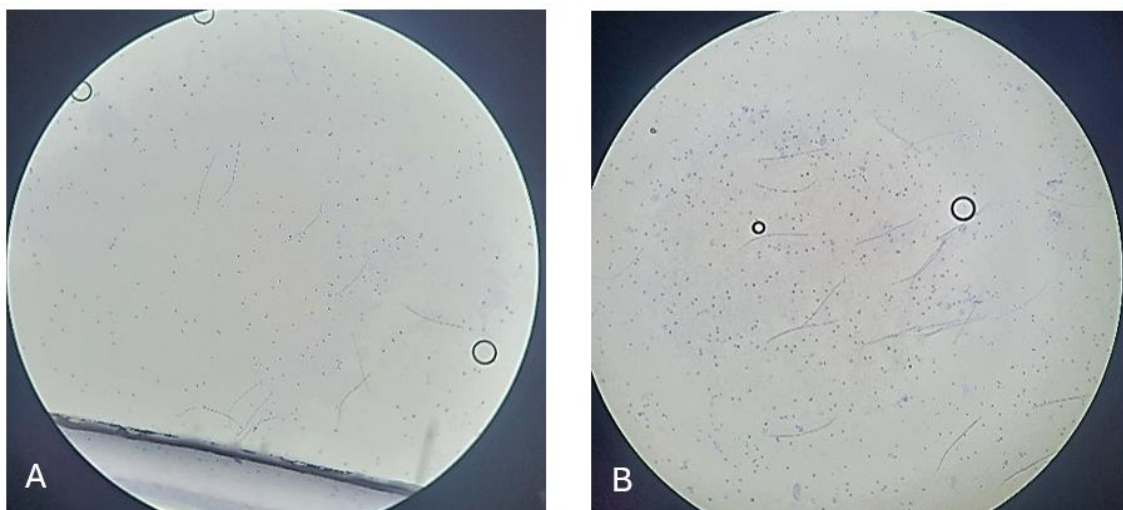


Figura 11 – Microfilárias observadas pelo método de Knott na objetiva de 10x (*Original*)

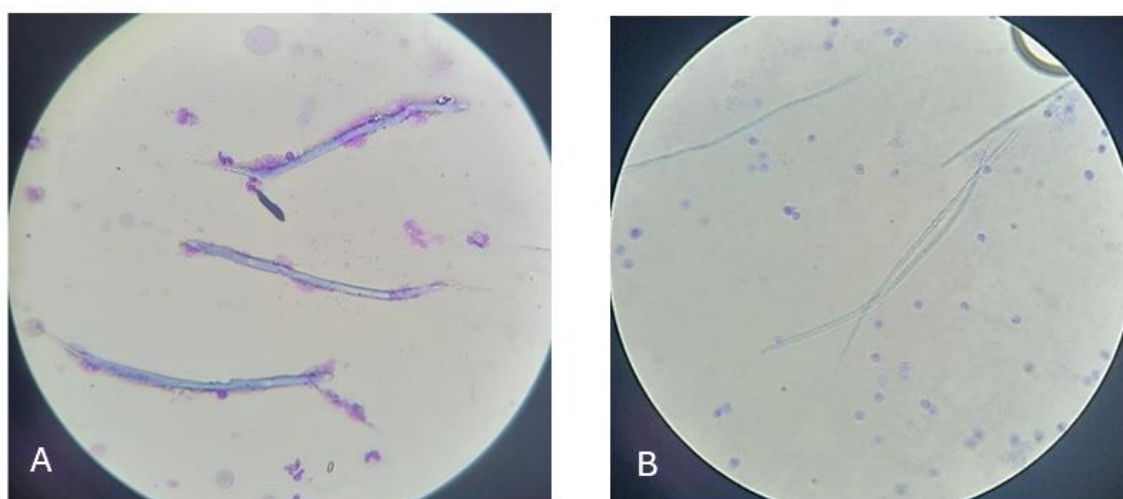


Figura 12 - Microfilárias observadas pelo método de Knott na objetiva de 40x (*Original*)

4.5 Análise de dados

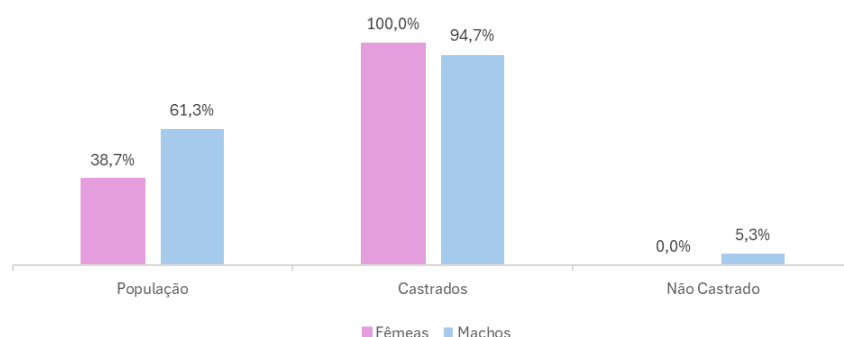
Os dados obtidos foram introduzidos numa folha de cálculo Microsoft® Excel® para Microsoft 365, a qual serviu de suporte para a análise estatística realizada, recorrendo à linguagem de programação Python executada no ambiente Jupyter Notebook. Foram aplicados testes de percentagens para determinar a frequência de positividade, o teste do Qui-Quadrado para avaliar associações entre variáveis categóricas e o coeficiente de concordância de Cohen's Kappa para medir o grau de concordância entre os diferentes testes diagnósticos. Adicionalmente, foram construídas tabelas de contingência (cross-tabulations) e calculadas métricas de desempenho diagnóstico (sensibilidade e especificidade) para comparar a eficácia dos métodos realizados.

5. Resultados

5.1 Análise descritiva da população

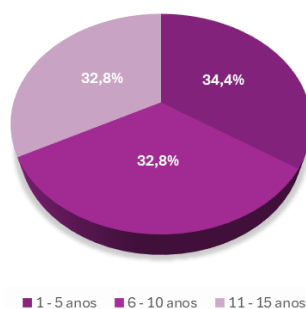
Para a realização do presente estudo, 62 cães foram considerados elegíveis, provenientes de uma população com um total de 66 animais. A amostra foi composta por 38 (61,3%) machos e 24 (38,7%) fêmeas. Dentro da população total de machos (n=38), 36 estão castrados (94,7%) ao passo que entre as fêmeas, 24 estão castradas (100%), como consta no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Distribuição percentual dos indivíduos por sexo e estado de castração



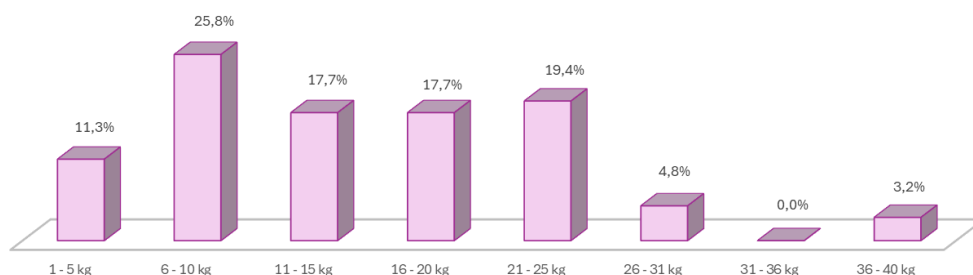
A amostra foi categorizada em faixas etárias com os seguintes intervalos: 1-5 anos; 6-10 anos; 11-15 anos – Gráfico 2. Observou-se que 34,4% (21/62) dos cães encontravam-se na primeira faixa etária, 32,8% (20/62) e 32,8% (20/62) nas subsequentes, respetivamente. Não foi possível obter registo preciso da idade de um dos indivíduos, resultando num dado ausente para esta variável. A média de idades observada foi de 7,5 anos com um desvio padrão de 4,03.

Gráfico 2 - Distribuição percentual dos indivíduos por faixa etária



Os resultados referentes ao peso foram organizados em faixas nos intervalos 1-5kg, 6-10kg, 11-15kg, 16-20kg, 21-25kg, 26-30kg, 31-35kg e 36-40kg, sendo a mais frequente entre os 6-10kg (16/62; 25,8%). A distribuição percentual dos indivíduos de acordo com o peso encontra-se detalhada no Gráfico 3. A média do peso corporal na população foi de 15,45kg com um desvio padrão de 8,3kg, com valores distribuídos entre um mínimo de 3kg e máximo de 40kg.

Gráfico 3 - Distribuição percentual dos indivíduos por faixas de peso



Observou-se que 91,9% dos cães avaliados (57/62) foram classificados Sem Raça Definida (SRD), enquanto os restantes pertenciam às raças Poodle (2/62; 3,2%), Pinscher (1/62; 1,6%), Pastor Australiano (1/62; 1,6 %) e Cão de Água Português (1/62; 1,6%).

Outras informações percentuais relativas às restantes variáveis, como estilo de vida, vacinação obrigatória em dia, uso de preventivo nos últimos 12 meses, diagnóstico prévio de dirofilariose e presença de sintomas clínicos a consultar na Tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição percentual e numérica de diversas variáveis associadas a cada indivíduo

Estilo de vida	Exterior	95,2%	59/62
	Interior	4,8%	2/62
Raça	SRD	91,9%	57/62
	Pinscher	3,2%	2/62
	Cão de Água Português	1,6%	1/62
	Pastor Australiano	1,6%	1/62
	Poodle	1,6%	1/62
Vacinação em dia	Sim	96,8%	60/62
	Não	3,2%	2/62
Uso de preventivo (Moxidectina) nos últimos 12 meses	Sim	3,2%	2/62
	Não	96,8%	60/62
Diagnóstico prévio de Dirofilariose	Sim	8,1%	5/62
	Não	91,9%	57/62
Presença de sinais clínicos	Sim	3,2%	2/62
	Não	96,8%	60/62

De acordo com a organização física do local, os animais analisados em estudo encontravam-se distribuídos por setores conforme a sua zona de permanência no dia a dia (Tabela 3). A estratificação por setores possui a seguinte frequência: telheiro 29% (18/62), terreno inferior 19,4% (12/62), terreno superior 17,4% (11/62), marquise 16,1% (10/62), entrada 12,9% (8/62) e cozinha 4,8% (3/62).

Os diferentes setores do abrigo apresentaram distintas prevalências de infecção. O setor “terreno inferior”, um espaço exterior, registou uma prevalência de 100%, obtendo a maior frequência de casos positivos, em contraste com o setor denominado “cozinha”, um espaço interior, onde não se registou nenhum caso positivo, verificando-se uma prevalência de 0%.

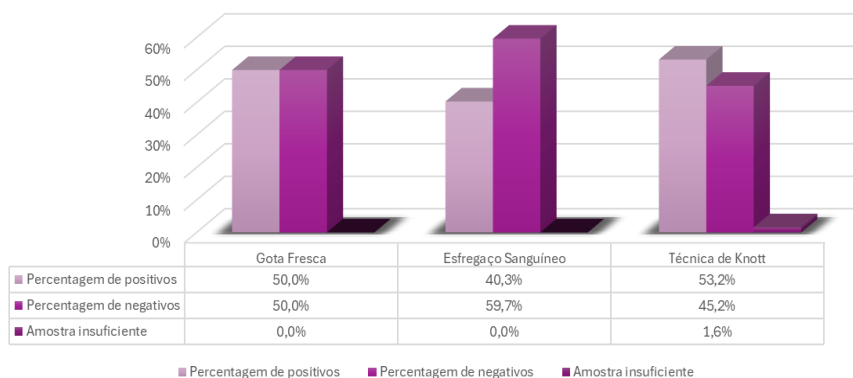
Tabela 3 - Prevalência de infecção por setor

Setor	Total de animais no setor	Número de positivos	Prevalência de infecção
Telheiro	18	7	38,9%
Terreno inferior	12	12	100,0%
Terreno superior	11	6	54,5%
Marquise	10	8	80,0%
Entrada	8	3	37,5%
Cozinha	3	0	0,0%
Total	62	36	58,1%

5.2 Resultados dos testes parasitológicos

Em relação aos testes de parasitológicos realizados, foi possível observar-se uma variação diante das taxas de positivos entre os três métodos de observação de microfilárias, como consta no Gráfico 4.

Gráfico 4 - Comparação de resultados entre os diferentes métodos parasitológicos



A técnica de gota fresca apresentou uma percentagem de deteção positivos para microfilarémia de 50% (31/62) da população analisada, enquanto o esfregaço sanguíneo identificou apenas 40,3% (25/62) dos positivos. O método de Knott demonstrou-se com a maior taxa de deteção, com 53,2% (33/62) de indivíduos positivos.

Não foram encontradas evidências estatísticas que comprovem uma associação significativa entre a prevalência de microfilarémia e as variáveis individuais analisadas ($p \geq 0,05$), com exceção das variáveis “peso” e “setor”. A variável “peso” apresentou uma relação estatisticamente significativa com a presença de microfilarémia - Teste Qui-Quadrado $\chi^2=18,290$; $p=0,0055$, assim como a variável “setor” - Teste Qui-Quadrado $\chi^2=18,960$; $p=0,002$.

5.3 Validação diagnóstica em relação aos métodos utilizados

Considerando o método de Knott como teste “Gold Standard”, a comparação com a técnica de gota fresca revelou uma sensibilidade de 84,8%, o que indica que esta técnica foi capaz de identificar corretamente 84,8% dos indivíduos positivos detetados pelo método de Knott. A especificidade observada foi de 89,3%, demonstrando que a gota fresca classificou 89,3% dos resultados negativos segundo o método de Knott. Já o esfregaço sanguíneo demonstrou uma sensibilidade inferior ao da gota fresca, com o valor de 75,8%. No entanto, a especificidade do esfregaço sanguíneo em relação ao método de Knott foi de 100%, indicando que todos os indivíduos classificados como negativos com o método de Knott foram-no também corretamente classificados no esfregaço sanguíneo.

5.4 Concordância entre os testes de observação de microfilárias

Aplicando o Coeficiente de Cohen Kappa (κ), foi possível averiguar a concordância entre os diferentes testes parasitológicos realizados. Para interpretação dos valores de κ é utilizada a seguinte escala (Cohen, 1960):

0 – 0,2	nenhuma ou pouca concordância
0,21 – 0,4	concordância fraca
0,41 – 0,6	concordância moderada
0,61 – 0,8	concordância substancial
0,81 – 1	excelente ou perfeita concordância

Na Tabela 4 encontram-se os resultados obtidos. Ao analisar os resultados, pode-se constatar que todos os testes para detecção de microfilárias – gota fresca, esfregaço sanguíneo, técnica de Knott – possuem uma concordância substancial, revelando que os testes são, em grande medida, consistentes entre si.

Tabela 4 - Concordância entre os diferentes testes de observação de microfilárias

Comparação entre métodos	Coefficiente de Cohen Kappa (κ)	Interpretação da Concordância
Gota fresca vs Esfregaço Sanguíneo	0,742	Substancial
Gota fresca vs Método de Knott	0,714	Substancial
Método de Knott vs Esfregaço Sanguíneo	0,719	Substancial

6. Discussão

O presente trabalho visa apurar a prevalência de microfilarémia em cães de abrigo residentes numa zona endêmica de dirofilariose, em particular numa população sem recurso a protocolos profiláticos (ou com o seu uso irregular) e com diagnósticos prévios da parasitose. Esta abordagem permitiu avaliar a disseminação da infecção em condições não controladas. Adicionalmente, procedeu-se a uma comparação da eficácia de detecção de microfilárias por três métodos distintos, entre eles a gota fresca, esfregaço sanguíneo e método de Knott. Esta comparação visa identificar a técnica mais apropriada para a observação de microfilárias, em especial em contextos com limitações financeiras, onde a escolha de métodos de diagnóstico deve considerar não só o custo, mas também a sensibilidade, especificidade e aplicabilidade prática.

Dado que a maioria dos cães foram classificados como SRD, não foi possível estabelecer relação entre raça e ocorrência de infecção. As variáveis “Vacinação obrigatória em dia”, “Uso de preventivo nos últimos 12 meses”, “Diagnóstico prévio de dirofilariose” e “Presença de sintomas clínicos” foram avaliadas quanto à associação com a ocorrência de infecção. A distribuição muito concentrada das respostas dentro de cada variável dificulta a comparação estatística entre grupos. Em termos percentuais, 96,7% da população possui vacinação obrigatória, 96,8% não utilizou preventivo nos últimos 12 meses, 91,9% não possui diagnóstico prévio de dirofilariose e 96,8% não apresentava sintomas clínicos. Estes valores limitam a possibilidade de analisar estatisticamente a influência destas variáveis na prevalência da infecção, e, assim sendo, por conseguinte, nenhuma associação foi estabelecida.

Não foi observada uma associação estatística entre a prevalência de infecção e o sexo dos cães, estando em concordância com estudos prévios (Wang et al., 2016; Cai et al., 2023; Khouri et al., 2024). A manutenção dos animais num ambiente uniforme (espaço exterior) provavelmente diminuiu as diferenças entre machos e fêmeas, que em outras situações poderiam influenciar a suscetibilidade à infecção. Contudo, embora esses mesmos estudos e em outros (Pedram et al., 2019) apontem a idade como um fator de risco relevante para infecção, tal associação não foi evidenciada neste estudo, sendo possível a hipótese de que a organização dos grupos etários influenciou o resultado e, por sua vez, determinou a ausência de associação estatística. Esta discrepância pode também ser justificada pelo facto de o tempo de permanência no abrigo, e por extensão, o tempo de exposição aos vetores nesse local, não estar totalmente relacionado à idade dos animais, diluindo o efeito desta variável como fator de risco.

Com base nos resultados, foi comprovada uma associação entre a variável “peso” e a prevalência de microfilarémia. Cães com peso inferior a 15kg apresentam uma menor frequência de positivos para microfilarémia, ao contrário dos cães com pesos compreendidos entre os 16kg e os 40 kg, que concentram as faixas de peso com um maior número de positivos. Esta distribuição pode sugerir que cães com maior peso corporal (ou condição corporal mais elevada) possuem uma maior probabilidade de infecção, contrapondo-se aos achados de Hazelrig et al. (2023), onde se constata que cães com condição corporal mais baixa possuem maior risco de infecção. A divergência observada pode ser justificada por diferenças comportamentais, tendendo os cães de peso elevado a ser menos ativos que os cães de peso baixo, o que influencia os padrões de exposição aos vetores, sobretudo em ambientes exteriores. Além disso, cães com peso elevado residem provavelmente há mais tempo no abrigo, potencializando uma exposição contínua ao vetor. De acordo com estudo realizados por Donnett et al. (2018), demonstrou-se uma associação com a presença de antígeno de *D. immitis* e o peso do animal. Cães com elevado peso apresentam 2,16 vezes mais probabilidade de se encontrarem positivos do que cães com peso corporal médio, enquanto cães com peso baixo apresentam 2,26 vezes mais probabilidade em relação ao mesmo grupo de referência.

A distribuição dos animais por sete setores não só contribui para a organização da rotina diária do abrigo, como também se mostrou uma variável associada à prevalência de microfilarémia. Dos animais que habitam no exterior (59/62), foram detetados 36

positivos. Este resultado pode ser explicado pela maior probabilidade de picada dos vetores nos cães que se encontram no exterior, especialmente nas horas de maior atividade das microfilárias, como sustentado pelos trabalhos de Wang et al. (2016) e Fuehrer et al. (2021). A associação estatística entre setores e prevalência de microfilarémia pode ser justificada por fatores ambientais, dado que o setor com maior número de infetados (“terreno inferior”) é um espaço circundado por densa vegetação alta e por sua vez, com maior acumulação de matéria orgânica e presença de água, formando uma ambiente propício à proliferação de mosquitos (Montoya-Alonso et al., 2017).

Estão disponíveis diversas técnicas para pesquisa de microfilárias. O presente trabalho visa avaliar três técnicas: esfregaço sanguíneo, gota fresca e método de Knott, os resultados relativos à deteção de positivos, as suas vantagens e desvantagens diagnósticas e limitações. Segundo os resultados, o método de Knott demonstrou a maior taxa de deteção de positivos, classificando 53,2% (33/62) da população de cães como microfilarémicos. A técnica de gota fresca classificou 50% (31/62) como positivos e o esfregaço sanguíneo 40,3% (25/62).

Comparando os diversos testes, o método de Knott mostrou um desempenho superior na identificação de animais microfilarémicos, podendo este facto ser justificado pelo volume superior de sangue que é avaliado, recorrendo à utilização de uma etapa de concentração (Smith et al., 2024). O método de Knott é considerado o teste parasitológico mais eficiente na deteção de microfilárias, sendo amplamente reconhecido como o método de referência “Gold Standard” em condições de recursos limitados e contexto de trabalho de campo, uma vez que é um método de execução simples, económico e com baixa necessidade de equipamentos especializados (Soares et al., 2022). Em adição, o método de Knott ainda permite identificar morfologicamente os diferentes filarídeos, permitindo descartar falso-positivos de dirofilariose (AHS, 2024). Neste estudo, não é possível excluir totalmente a possibilidade de infeção concomitante com outros filarídeos.

A técnica de gota fresca mostrou-se, em termos de desempenho, inferior ao método de Knott, porém superior ao esfregaço sanguíneo, destacando-se como um método intermédio na deteção de microfilárias. A gota fresca é uma técnica rápida e simples, permitindo a visualização do movimento tipicamente estacionário das microfilárias (AHS, 2024). De acordo com Smith et al. (2024), em concentrações iguais

ou superiores a 50 microfilárias por mililitro, a gota fresca possui um desempenho similar ao método de Knott. No entanto, se os níveis de microfilarémia se encontrarem abaixo deste limite, a técnica de gota fresca torna-se menos fiável e a sua sensibilidade decresce consideravelmente. Na população estudada neste trabalho, a redução entre a percentagem de positivos detetados pelo método de Knott e a gota fresca é pouco evidente (3,2%), o que sugere, indiretamente, que a maioria dos animais apresenta níveis de microfilarémia iguais ou superiores a 50 microfilárias por mililitro. Considerando que a amostra é composta apenas por cães de abrigo, um grupo com geralmente altas taxas de infeção por *D. immitis*, a elevada carga parasitária pode atenuar a diferença de desempenho entre os testes. Isto ocorre porque uma maior concentração parasitária aumenta a probabilidade de existência de microfilárias e facilita a sua deteção, mesmo por métodos menos sensíveis (Smith et al., 2024).

O esfregaço sanguíneo, em norma realizado com um volume inferior de sangue relativamente aos outros dois métodos, subestima a carga de microfilárias presentes no sangue. Animais com baixa carga parasitária possuem maior probabilidade de resultados falso-negativos quando utilizados métodos com menor sensibilidade diagnóstica (Trancoso et al., 2020). A ausência de microfilárias em circulação, não só está associada a uma baixa carga parasitária, como também ao longo período pré-patente do parasita (cerca de sete meses) e a baixa concentração de microfilárias nas amostras realizadas (Panarese, Iatta, Mendoza-Roldan, et al., 2020). Com o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz ou do declínio das fêmeas adultas, um cão poderá tornar-se amicrofilarémico um ano pós-infeção (Rawlings et al., 1982; Panarese, Iatta, Mendoza-Roldan, et al., 2020). Um estudo comparativo demonstrou uma redução de 20% na taxa de deteção de microfilárias pelo esfregaço sanguíneo em relação ao método de Knott (Courtney & Zeng, 2001). Os níveis elevados de microfilarémia observados, mesmo recorrendo a uma técnica de sensibilidade inferior como o esfregaço sanguíneo, são justificados, mais uma vez, pela tipologia da população analisada, composta por animais de abrigo que geralmente apresentam maior exposição e carga parasitária.

Para avaliar a sensibilidade e especificidade, foi classificado o método de Knott como “Gold Standard”, de modo a proceder corretamente à comparação entre as diferentes técnicas, uma vez que não se realizaram mais testes para a confirmação definitiva da presença ou ausência de infeção nos indivíduos analisados (por exemplo

testes serológicos, moleculares ou necropsia). Esta escolha é justificada pela maior sensibilidade do método de Knott, que lhe confere maior credibilidade e estabelece-o como padrão para avaliação dos restantes métodos parasitológicos (AHS, 2024). A sensibilidade da gota fresca foi de 84,8%, enquanto a do esfregaço sanguíneo foi inferior, alcançando os 75,8%. Um estudo realizado por Courtney & Zeng. (2001) aferiu que a técnica do esfregaço sanguíneo detetou 80,9% das amostras positivas confirmadas pelo método de Knott, um valor superior, mas mantendo-se consistente com os dados do presente estudo. Em relação à especificidade, a gota fresca apresentou 89,3%, ao passo que o esfregaço sanguíneo mostrou superioridade, atingindo 100%. Estes métodos apresentam uma especificidade bastante elevada devido à observação microscópica direta das microfilárias, reduzindo a ocorrência de resultados falso-positivos para microfilarémia (Simón et al., 2012).

É importante salientar a possibilidade de existência de resultados falso-positivos e falso-negativos para presença de infecção por *D. immitis*. Os métodos parasitológicos baseiam-se na observação microscópica, que por sua vez, está sujeita à subjetividade do observador, sendo, portanto, dependentes da experiência e conhecimento do mesmo para identificar e classificar corretamente as microfilárias. As microfilárias foram identificadas como pertencentes a *D. immitis* apenas através da avaliação da extremidade cefálica, da extremidade posterior e da movimentação. Não foi possível realizar medições de comprimento ou largura das microfilárias, o que pode causar um viés de classificação, uma vez que outras espécies, como *D. repens* ou *A. dracunculoides*, podem evidentemente estar presentes. Resultados falso-positivos podem ocorrer quando microfilárias de outras espécies de filarídeos são incorretamente identificadas como pertencentes a *D. immitis* (Rojas et al., 2015). Alguns dos casos considerados positivos no estudo para infecção por *D. immitis* podem corresponder a falso-positivos, decorrentes das limitações na identificação morfológica. Fatores como a presença de adultos juvenis, uma infecção composta por apenas fêmeas ou apenas machos ou a não libertação de microfilárias pelas fêmeas na altura da testagem podem resultar em falso-negativos. Tais limitações diagnósticas devem ser tidas em consideração na interpretação dos resultados e, consequentemente, na estimativa da prevalência de infecção da população (Genchi et al., 2014; Ogbaje & AbelDanjuma, 2016).

Relativamente aos testes serológicos, estes apresentam uma sensibilidade superior aos testes parasitológicos, dado que detetam antígenos circulantes, predominantemente gerados pelo trato reprodutor das fêmeas adultas de *D. immitis* (AHS, 2024). Quando comparados ao método de Knott, considerado o “Gold Standard” das técnicas parasitológicas, os testes serológicos, como o ELISA, possuem maior capacidade de deteção de casos positivos. Num estudo de Panarese, Iatta, Latrofa, et al. (2020) o método de Knott detetou cerca de 30,3% menos casos positivos em relação ao ELISA, reforçando assim, a limitação dos testes parasitológicos. Porém, existem determinadas situações em que um cão apresenta resultado negativo para antígeno, apesar da presença de microfilárias circulantes. Isto pode ocorrer em caso de morte dos parasitas adultos com persistência das microfilarias, transmissão transplacentária de microfilarias, transmissão por transfusão sanguínea (Smith et al., 2024) ou ainda, devido ao bloqueio de deteção de antígeno ocasionado pela formação de complexos antígeno-anticorpo (AHS, 2024).

A utilização de testes moleculares, como o PCR, aumenta a sensibilidade da deteção de microfilárias quando comparada ao método de Knott, visto que não depende da interpretação morfológica do observador durante a leitura das lamina. No entanto, apesar da sua eficácia, esta técnica possui um elevado custo, tempo de processamento mais elevado e não está disponível para rotina em ambiente clínico (Smith et al., 2024).

Embora os testes serológicos e moleculares possuam relevância diagnóstica, não foram incluídos neste estudo em função das limitações financeiras e da necessidade de equipamentos especializados.

A divergência de resultados entre os métodos ressalta a importância de uma seleção criteriosa quanto às técnicas diagnósticas utilizadas (Smith et al., 2024). Segundo a AHS, a testagem para microfilarémia em todos os cães é essencial. A deteção de microfilárias em circulação valida testes serológicos, identifica o animal como reservatório e fonte de disseminação e permite antecipar possíveis reações adversas associadas ao tratamento microfilaricida.

A gestão da dirofilariose em contexto de abrigo envolve desafios complexos, incluindo fatores económicos, sociais e legais. Do ponto de vista económico, o elevado custo dos testes (ELISA ou PCR) e do tratamento (melasormina), mostram-se como obstáculos. Em termos sociais, a baixa sensibilização da comunidade quanto à

dirofilariose, a sua transmissão e importância de prevenção, perpetuam o ciclo do parasita. Legalmente, a falta de protocolos obrigatórios de rastreio e tratamento também dificultam o controlo da parasitose. A presença de cães infetados com *D. immitis* em ambientes de abrigo representa outros riscos. A adoção por famílias não informadas sobre o estado de saúde do animal ou o transporte de cães infetados para regiões não endémicas, pode contribuir para aumentar a disseminação da doença. Por outro lado, um diagnóstico falso-positivo, pode impedir a adoção de um animal saudável (Lane et al., 2021).

Segundo as diretrizes das AHS e ESCCAP todos os cães, independentemente do seu estatuto domiciliário, devem ter acesso a medidas preventivas e a tratamento adequados. Num ambiente de abrigo, a implementação dessas medidas e da terapêutica, é, contudo, limitada.

Recomenda-se a utilização de repelentes em todos os animais, principalmente nos animais microfilarémicos, uma vez que estes constituem a principal fonte de infeção dos vetores e, consequentemente, transmissão dentro do abrigo. O recurso a repelentes com permetrinas e de ectoparasiticidas com isoxazolinias interrompe o ciclo de transmissão (ESCCAP, 2021). A combinação de múltiplos testes na abordagem diagnóstica de populações de abrigo pode representar uma alternativa viável em relação à testagem indiscriminada com testes serológicos (mais dispendiosos) da totalidade da população, o que permite uma utilização mais eficiente dos recursos disponíveis (Donnett et al., 2018). Nos animais negativos para microfilarémia, considerando que estão continuamente expostos ao vetor, é fundamental realizar testagem serológica para presença de antígeno, de modo a confirmar a ausência de infeção. Quando confirmada a negatividade, recomenda-se estabelecer um protocolo profilático com recurso a LM mensal ou anual (AHS, 2024), para proteção contra a infeção. Nos casos positivos, o ideal seria aplicar o tratamento recomendado pela AHS, que inclui doxiciclina, LM e, posteriormente, o adulticida melarsomina. No entanto, o elevado custo do tratamento pode inviabilizar a sua realização em abrigos. Esta limitação impõe a possibilidade de optar por um tratamento menos eficaz de morte lenta “*slow-kill*”. Este regime terapêutico consiste na administração de um ciclo inicial de doxiciclina durante 28 dias e LM mensais. Os cães submetidos a este tratamento deverão ser rigorosamente monitorizados e com re-testagem aos seis e doze meses após início de tratamento. O tratamento é considerado bem-sucedido quando o animal apresenta negatividade para antígeno e para microfilarémia.

Caso, depois de 12 meses, o animal se mantiver antigénio positivo, recomenda-se repetir terapia com novo ciclo de doxiciclina, mantendo as LM mensais (Dantas-Torres et al., 2023). Os custos poupados com a adoção do tratamento “*slow-kill*” poderiam ser estrategicamente redirecionados para garantir uma prevenção eficaz no futuro e profilaxia regular.

Cães em abrigos constituem um grupo particularmente vulnerável à infeção por *Dirofilaria immitis*. Estes abrigos são responsáveis por recolher e albergar um grande número de animais, enfrentando diversas limitações financeiras, temporais ou organizacionais, o que dificulta a prevenção, diagnóstico e tratamento eficazes da dirofilariose. Torna-se imperativo aplicar medidas de triagem práticas para animais recém admitidos e medidas de diagnóstico que possibilitem o controlo da disseminação da parasitose num ambiente coletivo (Lane et al., 2021). É necessário equilibrar a realidade do abrigo com o dever ético de zelar pelo bem-estar animal e proteger a saúde pública. Para mitigar estes desafios, poderão ser estratégias a colaboração com ONGs, a implementação de protocolos de medicina de abrigo e o acesso a financiamento público.

A gestão de populações em abrigos é desafiante, uma vez que são populações frequentemente heterogéneas, com variabilidade de tempos de permanência e imprevisibilidade de entradas e saídas de animais. Todos estes fatores dificultam a gestão, o manejo e o controlo de doenças infecciosas. Em Portugal, as medidas obrigatórias apenas se limitam à saída de animais dos abrigos municipais e incluem a identificação eletrónica, desparasitação e vacinação antirrábica. Idealmente, deveria existir controlo também na admissão de animais nos abrigos, com exame clínico, testagem para doenças infecciosas com maior prevalência e risco zoonótico, vacinação e prevenção parasitária (Marques et al., 2023).

Cães alojados em abrigos são reconhecidos como uma população de risco elevado de transmissão de diversas doenças zoonóticas relevantes tanto para animais como para humanos (Patterson et al., 2020). Adicionalmente, os abrigos em zonas endémicas constituem um importante foco de dirofilariose devido a diversos fatores, como a elevada densidade animal em instalações frequentemente precárias, a facilidade de transmissão em canis, a significativa exposição ao vetor e a introdução constante de novos animais com estatuto sanitário desconhecido. Estes cães podem vir a servir de reservatório de *D.*

immitis para as populações de cães circundantes (Alsarraf et al., 2021). Em grande parte, os cães de abrigo não se encontram devidamente protegidos contra estes parasitas, tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos. Isto favorece a transmissão dos parasitas no interior dos próprios abrigos, contribuindo para a manutenção do ciclo de vida deste agente (Otranto et al., 2017). Esta situação representa um crescente risco para a população de animais de companhia e, devido à capacidade deste filarídeo de atravessar a barreira entre espécies, constitui também uma ameaça para a saúde pública, considerando a potencial infeção humana accidental (Ciuca et al., 2023).

Segundo um questionário realizado por Marques et al.(2023), médicos veterinários de abrigo em Portugal referem que algumas condições nestas instituições melhoraram nas últimas décadas, enquanto outras continuam a exigir intervenções urgentes. O primeiro Censo Nacional dos Animais Errantes, realizado em 2023, estima que existam em Portugal Continental mais de 930 mil animais errantes, entre eles 830 541 gatos e 101 015 cães (ICNF, 2023). A subnotificação da ocorrência de doenças infecciosas em abrigos, aliada à inexistência de sistemas eficazes de monitorização contribui para que a situação de ocorrência de surtos ou agentes emergentes em Portugal permaneça pouco clara (Marques et al., 2023). É imprescindível uma compreensão mais aprofundada sobre a gestão da dirofilariose por parte dos médicos veterinários em contexto de abrigo. É função dos médicos veterinários a redução das complicações terapêuticas, a orientação dos tutores adotantes e o conhecimento do funcionamento do abrigo da região. Deste modo, é possível recorrer a uma atuação empática, ética e eficaz por parte do médico veterinário, combinando a medicina de abrigo com a prática clínica. Os abrigos constituem um pilar da comunidade, sendo responsáveis pelo controlo de animais fora do estatuto domiciliário. Importante salientar que a infeção por *D. immitis* não deve ser encarada como uma falha ou negligência do abrigo. Muitos destes casos ocorrem devido a situações de vulnerabilidade económica e social, nas quais o acesso a profilaxia é irregular ou mesmo inexistente. Os abrigos tornam-se, assim, fundamentais como espaços de recuperação clínica e de reinserção destes animais em ambientes domiciliários (Smith-Blackmore, 2025).

As limitações financeiras, organizacionais, a falta de equipamentos laboratoriais especializados e a impossibilidade de execução de testes serológicos e moleculares, influenciaram a escolha e recurso a métodos parasitológicos, o que pode ter subestimado

o valor real da prevalência de dirofilariose no abrigo. A análise dos fatores de risco da população foi dificultada pela homogeneidade da população em relação a diversas variáveis (“Vacinação obrigatória em dia”, “Uso de preventivo nos últimos 12 meses”, “Diagnóstico prévio de dirofilariose” e “Presença de sintomas clínicos”). Essa uniformidade dificultou o reconhecimento de tais variáveis como potenciais fatores de risco. Os resultados estatísticos obtidos referem-se a uma população específica, situada numa zona endêmica de dirofilariose, não sendo possível garantir que tais resultados possam ser generalizados para todas as populações caninas de abrigo. Em estudos futuros, seria interessante acompanhar os cães positivos e a escolha do tratamento a adotar, avaliando a resposta de cada animal e monitorizando a sua eventual seroconversão. Por outro lado, seria pertinente confirmar a ausência de dirofilariose nos cães negativos e avaliar a eficácia da profilaxia regular administrada. Uma variável com interesse a estudar seria o tempo de permanência no abrigo, tendo em conta a hipótese de que estadias mais prolongadas possam aumentar o risco de microfilarémia. Visando a saúde pública, dada a elevada prevalência de dirofilariose no abrigo, aconselhar-se-ia a testagem dos funcionários do abrigo.

Este estudo tenciona enfatizar a necessidade de aplicação de medidas diagnóstico e prevenção em ambientes de abrigo, considerando a vulnerabilidade destas instituições e o seu potencial papel na manutenção do ciclo de *Dirofilaria immitis*.

7. Conclusão

A dirofilariose apresenta um desafio em contexto de abrigo, não só pela alta vulnerabilidade e exposição dos animais, mas também pela escassez de recursos financeiros. Os abrigos podem constituir pontos críticos, especialmente em áreas endêmicas.

Este estudo demonstra a alta prevalência de microfilarémia de *D. immitis* na população estudada, evidenciando os casos com infecção ativa e ressaltando a importância da escolha de métodos de diagnóstico adequados. Não podem ser totalmente excluídas infecções simultâneas por *D. repens* ou *A. dracunculoides*, devido às limitações na confirmação morfológica das microfíliarias, o que pode ter influenciado a prevalência de

infecção de dirofilariose. Foram aplicados três métodos parasitológicos para detecção de microfilárias, entre eles a gota fresca, esfregaço sanguíneo e o método de Knott, considerado o método “Gold Standard”, com a maior taxa de detecção de positivos neste estudo. A testagem para a presença de microfilárias é uma etapa essencial para o diagnóstico e rastreio de dirofilariose. A escolha do método de diagnóstico deve equilibrar a sensibilidade e especificidade do teste com os fatores práticos, custo, equipamento a utilizar e tempo despendido na técnica. O acesso facilitado a métodos de diagnóstico de *D. immitis* que sejam rápidos, de baixo custo e viáveis é fundamental para a implementação de estratégias de monitorização da parasitose em larga escala. A combinação de múltiplos testes maximizaria a detecção de casos positivos. Para futuros trabalhos, é recomendada a inclusão de outras técnicas diagnósticas complementares, como técnicas moleculares ou serológicas, de modo a melhorar a fiabilidade dos resultados. No presente estudo, o peso corporal e a distribuição setorial dos animais dentro do abrigo foram considerados como potenciais fatores de risco para a presença de microfilarémia.

A identificação de um número significativo de casos positivos em ambiente de abrigo reforça a necessidade de prevenir e diagnosticar a dirofilariose, não apenas pelo impacto no bem-estar animal, mas também pelas implicações na saúde pública e no controlo da disseminação da doença. A implementação de medidas de triagem e de prevenção devem ser adaptadas à realidade estrutural e económica dos abrigos, destacando-se o papel do médico veterinário na vigilância epidemiológica, na educação dos responsáveis do abrigo, outros funcionários e dos adotantes e na definição de protocolos de controlo. As intervenções dirigidas a esta população são fundamentais para a proteção da saúde e bem-estar animal, mas também para a mitigação de riscos para a saúde pública. Torna-se necessário dar continuidade a estudos epidemiológicos em animais que habitem em zonas endémicas de modo a monitorizar os padrões de distribuição de *Dirofilaria immitis*.

Por todas as razões apontadas, entendemos que este estudo e trabalho tem uma relevância muito particular, visando sensibilizar sobre esta zoonose e as suas medidas de diagnóstico, tratamento e prevenção. A compreensão da realidade da dirofilariose em contexto de abrigo providencia informação para direcionar essas ações.

O procedimento adotado e seguido neste estudo é, no entender da autora, passível de ser replicado e esta estratégia aplicada a nível nacional será certamente muito pertinente e uma fonte crucial de dados de saúde pública.

Bibliografia

- Abdulkadir, M., & Kebede, I. A. (2024). *A Review of Canine Dirofilariasis and It's Zoonotic Importance*. 2(1).
- Adebayo, O., Akande, F., & Adenubi, O. T. (2024). *CANINE DIROFILARIASIS: A CASE REPORT AND REVIEW OF THE LITERATURE*. <https://doi.org/10.2478/fv-2020-0029>
- AHS. (2024). *American Heartworm Society Canine Guidelines for the Prevention, Diagnosis, and Management of Heartworm (Dirofilaria immitis) Infection in Dogs*.
- Alho, A. M., Landum, M., Ferreira, C., Meireles, J., Gonçalves, L., de Carvalho, L. M., & Belo, S. (2014). Prevalence and seasonal variations of canine dirofilariosis in Portugal. *Veterinary Parasitology*, 206(1), 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.08.014>
- Alho, A. M. (2017). *Dirofilaria immitis and Angiostrongylus vasorum: Epidemiology and impact of major heartworms in carnivores in Portugal* [doctoralThesis, Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária]. <https://repositorio.ulisboa.pt/handle/10400.5/13975>
- Almeida, A. P. G. de. (2011). Os mosquitos (Diptera, Culicidae) e a sua importância médica em Portugal: Desafios para o século XXI. *Acta Médica Portuguesa*, 24(6), Artigo 6. <https://doi.org/10.20344/amp.1419>
- Alsarraf, M., Carretón, E., Ciuca, L., Diakou, A., Dwużnik-Szarek, D., Fuehrer, H.-P., Genchi, M., Ionică, A. M., Kloch, A., Kramer, L. H., Mihalca, A. D., Miterpáková, M., Morchón, R., Papadopoulos, E., Pękacz, M., Rinaldi, L., Alsarraf, M., Topolnytska, M., Vismarra, A., ... Bajer, A. (2023). Diversity and geographic distribution of haplotypes of *Dirofilaria immitis* across European endemic countries. *Parasites & Vectors*, 16, 325. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05945-4>
- Alsarraf, M., Levytska, V., Mierzejewska, E. J., Poliukhovych, V., Rodo, A., Alsarraf, M., Kavalevich, D., Dwużnik-Szarek, D., Behnke, J. M., & Bajer, A. (2021). Emerging risk of *Dirofilaria* spp. infection in Northeastern Europe: High prevalence of *Dirofilaria*

- repens in sled dog kennels from the Baltic countries. *Scientific Reports*, 11(1), 1068.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-80208-1>
- Angelou, A., Gelasakis, A. I., Verde, N., Pantchev, N., Schaper, R., Chandrashekar, R., & Papadopoulos, E. (2019). Prevalence and risk factors for selected canine vector-borne diseases in Greece. *Parasites & Vectors*, 12, 283. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3543-3>
- Armenise, A. (2025). Point-of-Care Lung Ultrasound in Small Animal Emergency and Critical Care Medicine: A Clinical Review. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 15(1), 106. <https://doi.org/10.3390/ani15010106>
- ASV, The Association of Shelter Veterinarians. (2022). The Guidelines for Standards of Care in Animal Shelters: Second Edition. *Journal of Shelter Medicine and Community Animal Health*, 1(S1), Artigo S1. <https://doi.org/10.56771/ASVguidelines.2022>
- Berndt, T. R., Ecco, L. M. J. L., Santi, F. S. C. L., Neto, J. B., Vasconcelos, A. L., Menezes, A. M., Kataoka, A., & Novais, A. A. (2019). Comparative evaluation of peripheral blood smear preparation techniques as a diagnostic method for hemoparasitosis in dogs (*Canis lupus familiaris*, Linnaeus, 1758). *Scientific Electronic Archives*, 12(1), Artigo 1.
<https://doi.org/10.36560/1212019630>
- Borthakur, S. K., Deka, D. K., Islam, S., Sarma, D. K., & Sarmah, P. C. (2015). Prevalence and molecular epidemiological data on *Dirofilaria immitis* in dogs from Northeastern States of India. *TheScientificWorldJournal*, 2015, 265385.
<https://doi.org/10.1155/2015/265385>
- Bowman. (2023). *Georgis' Parasitology for Veterinarians 11th Edition* (11th ed.).
- Bristol, U. of. (2017). *Laboratory techniques*. University of Bristol.
<https://www.bristol.ac.uk/vet-school/research/comparative-clinical/veterinary-education/clinical-skills-booklets/laboratory-techniques/>
- Brown, H. E., Harrington, L. C., Kaufman, P. E., McKay, T., Bowman, D. D., Nelson, C. T., Wang, D., & Lund, R. (2012). Key factors influencing canine heartworm, *Dirofilaria*

- immitis, in the United States. *Parasites & Vectors*, 5(1), 245.
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-245>
- Cai, D., Tian, B., Liu, Y., Rehman, M. U., Ranucci, D., Veronesi, F., Varcasia, A., Jia, W., & Liu, J. (2023). The seroprevalence of canine dirofilariosis in dogs in the eastern coastal areas of China. *Heliyon*, 9(6), e17009. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17009>
- Cambournac, C. de E. de V. e D. I. D. F. (2025). *Relatório REVIVE 2024 - Culicídeos, Ixodídeos e Flebótomos: Rede de Vigilância de Vetores*. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP. <http://hdl.handle.net/10400.18/10500>
- Carretón, E., Morchón, R., Falcón-Cordón, Y., Falcón-Cordón, S., Matos, J. I., & Montoya-Alonso, J. A. (2020). Evaluation of different dosages of doxycycline during the adulticide treatment of heartworm (*Dirofilaria immitis*) in dogs. *Veterinary Parasitology*, 283, 109141. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109141>
- CDC, C. for disease control and prevention. (2012). *CDC - DPDx—Dirofilariasis*.
<https://www.cdc.gov/dpdx/dirofilariasis/index.html>
- Chandrasakha, P., Osathanon, R., & Suemanotham, N. (2021). *Case Report: Long-Term Management of Imidacloprid-Moxidectin in a Dog with Caval Syndrome*.
[https://doi.org/Journal of Applied Animal Science 2021; 14\(2\): 33-44](https://doi.org/Journal of Applied Animal Science 2021; 14(2): 33-44)
- Chocobar, M. L. E., Schmidt, E. M. dos S., Weir, W., & Panarese, R. (2024). The Distribution, Diversity, and Control of Dirofilariosis in Brazil: A Comprehensive Review. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 14(17), 2462.
<https://doi.org/10.3390/ani14172462>
- Ciuca, L., Caruso, V., Illiano, S., Bosco, A., Maurelli, M. P., & Rinaldi, L. (2023). Emerging risk of *Dirofilaria* spp. Infection in shelter dogs in southern Italy. *Frontiers in Veterinary Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1112036>
- Cohen, J. (1960). A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educational and Psychological Measurement*, 20(1), 37–46.
<https://doi.org/10.1177/001316446002000104>

- Courtney, C. H., & Zeng, Q.-Y. (2001). Relationship between microfilaria count and sensitivity of the direct smear for diagnosis of canine dirofilariosis. *Veterinary Parasitology*, 94(3), 199–204. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00377-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00377-0)
- Dantas-Torres, F., Figueredo, L. A., Sales, K. G. da S., de Luna, R. L. N., de Sousa-Paula, L. C., da Silva, L. G., Bonifácio, L. L. N., & Otranto, D. (2024). Prevention of heartworm infection in dogs using a combination of moxidectin, imidacloprid and praziquantel: Evidence from a randomized clinical trial. *Parasitology Research*, 123(1), 94. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-08112-x>
- Dantas-Torres, F., Ketzis, J., Pérez Tort, G., Mihalca, A. D., Baneth, G., Otranto, D., Watanabe, M., Linh, B. K., Inpankaew, T., Borrás, P., Arumugam, S., Penzhorn, B. L., Ybañez, A. P., Irwin, P., & Traub, R. J. (2023). *Heartworm adulticide treatment: A tropical perspective*. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/62914>
- Dantas-Torres, F., & Otranto, D. (2020). Overview on *Dirofilaria immitis* in the Americas, with notes on other filarial worms infecting dogs. *Veterinary Parasitology*, 282, 109113. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109113>
- Dasanayake, R., Balendran, T., Atapattu, D., & Iddawela, D. (2022). A study on canine dirofilariosis in selected areas of Sri Lanka. *BMC Research Notes*, 15(1), 137. <https://doi.org/10.1186/s13104-022-06024-0>
- Diakou, A., & Prichard, R. K. (2021). Concern for *Dirofilaria immitis* and Macrocytic Lactone Loss of Efficacy: Current Situation in the USA and Europe, and Future Scenarios. *Pathogens*, 10(10), 1323. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101323>
- Dimzas, D., Aindelis, G., Tamvakis, A., Chatzoudi, S., Chlichlia, K., Panopoulou, M., & Diakou, A. (2024). *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens*: Investigating the Prevalence of Zoonotic Parasites in Dogs and Humans in a Hyperenzootic Area. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 14(17), 2529. <https://doi.org/10.3390/ani14172529>

- Donnett, U., Hubbard, K., Woodruff, K., & Varela-Stokes, A. (2018). Prevalence of canine heartworm infection in Mississippi animal shelters. *Veterinary Parasitology*, 259, 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.07.007>
- ESCCAP. (2021). European Scientific Counsel Companion Animal Parasites (2021). Guideline 01 for worm control in dogs and cats. <https://www.esccap.org/national-associations/Portugal/8/>
- Esteves-Guimarães, J., Matos, J. I., Leal-Sousa, B., Oliveira, P., Lobo, L., Silvestre-Ferreira, A. C., Soares, C. S., Rodríguez-Escolar, I., Carretón, E., Morchón, R., Fontes-Sousa, A. P., & Montoya-Alonso, J. A. (2024). Current State of Canine Heartworm in Portugal. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 14(9), 1300. <https://doi.org/10.3390/ani14091300>
- Figueroa, L. A., Sales, K. G. da S., Deuster, K., Pollmeier, M., Otranto, D., & Dantas-Torres, F. (2017). Exposure to vector-borne pathogens in privately owned dogs living in different socioeconomic settings in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 243, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.05.020>
- Fuehrer, H.-P., Morelli, S., Unterköfler, M. S., Bajer, A., Bakran-Lebl, K., Dwużnik-Szarek, D., Farkas, R., Grandi, G., Heddergott, M., Jokelainen, P., Knific, T., Leschnik, M., Miterpáková, M., Modrý, D., Petersen, H. H., Skirnisson, K., Vergles Rataj, A., Schnyder, M., & Strube, C. (2021). *Dirofilaria* spp. and *Angiostrongylus vasorum*: Current Risk of Spreading in Central and Northern Europe. *Pathogens*, 10(10), 1268. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101268>
- Fuehrer, H.-P., Treiber, M., Silbermayr, K., Baumann, T. A., Swoboda, P., Joachim, A., & Noedl, H. (2013). Indigenous *Dirofilaria immitis* in Bangladesh. *Parasitology Research*, 112(6), 2393–2395. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3311-9>
- Genchi, C., Bowman, D., & Drake, J. (2014). Canine heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) in Western Europe: Survey of veterinary awareness and perceptions. *Parasites & Vectors*, 7(1), 206. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-206>

- Genchi, C., & Kramer, L. H. (2020). The prevalence of *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in the Old World. *Veterinary Parasitology*, 280, 108995.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108995>
- Gettings, J. R., McMahan, C. S., Cleveland, C. A., Varela-Stokes, A., Hubbard, K., Hamer, S. A., Walden, H. S., & Yabsley, M. J. (2023). Association between vector-borne pathogen seroprevalence in shelter-housed and owned dog populations in the contiguous United States of America. *Parasites & Vectors*, 16, 405.
<https://doi.org/10.1186/s13071-023-05994-9>
- Gomes-de-Sá, S., Santos-Silva, S., Moreira, A. de S., Barradas, P. F., Amorim, I., Cardoso, L., & Mesquita, J. R. (2023). Assessment of the circulation of *Dirofilaria immitis* in dogs from northern Portugal through combined analysis of antigens, DNA and parasite forms in blood. *Acta Tropica*, 239, 106799. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106799>
- Hazlerig, C. M., Gettings, J. R., Cleveland, C. A., Varela-Stokes, A., Majewska, A. A., Hubbard, K., Burton, K. W., & Yabsley, M. J. (2023). Spatial and risk factor analyses of vector-borne pathogens among shelter dogs in the Eastern United States. *Parasites & Vectors*, 16, 197. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05813-1>
- Hoch, H., & Strickland, K. (2008). *Canine and Feline Dirofilariasis: Prophylaxis, Treatment, and Complications of Treatment*.
- ICNF, Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas. (2023). *Censo Nacional dos Animais Errantes 2023*
<https://www.icnf.pt/animaisdecompanhia/animaiserrantes> (acedido a 30-11-2025 16:03:38)
- Kaur, R., Shropshire, J. D., Cross, K. L., Leigh, B., Mansueto, A. J., Stewart, V., Bordenstein, S. R., & Bordenstein, S. R. (2021). Living in the endosymbiotic world of Wolbachia: A centennial review. *Cell Host & Microbe*, 29(6), 879–893.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.03.006>
- Khanmohammadi, M., Akhlaghi, L., Razmjou, E., Falak, R., Enameh, R. Z., Mokhtarian, K., Arshadi, M., Tasbihi, M., & Meamar, A. R. (2020). Morphological Description,

- Phylogenetic and Molecular Analysis of *Dirofilaria immitis* Isolated from Dogs in the Northwest of Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 15(1), 57.
- Khoury, N. K., Singh, S., Noble, S. A. A., Kirlaw, T. V., Golding, M. A. J., Ali, I., Wilson-Clarke, C., Cadogan, P., Lindo, J. F., & Sandiford, S. L. (2024). Prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs in Jamaica. *Parasitology Research*, 123(12), 411.
<https://doi.org/10.1007/s00436-024-08434-4>
- Kramer, L., Crosara, S., Gnudi, G., Genchi, M., Mangia, C., Viglietti, A., & Quintavalla, C. (2018). *Wolbachia*, doxycycline and macrocyclic lactones: New prospects in the treatment of canine heartworm disease. *Veterinary Parasitology*, 254, 95–97.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.005>
- Landmann, F. (2019). The *Wolbachia* Endosymbionts. *Microbiology Spectrum*, 7(2).
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAI-0018-2019>
- Landum, M., Ferreira, C. C., Calado, M., Alho, A. M., Maurício, I. L., Meireles, J. S., Carvalho, L. M. de, Cunha, C., & Belo, S. (2014). Detection of *Wolbachia* in *Dirofilaria* infected dogs in Portugal. *Veterinary Parasitology*, 204(3), 407–410.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.05.027>
- Lane, J. N., Litster, A., Little, S. E., Rodriguez, J. Y., Mwacalimba, K. K., Sundstrom, K. D., Amirian, E. S., Guerios, S. D., Serrano, M. A., Hays, K. M., & Levy, J. K. (2021). Optimizing heartworm diagnosis in dogs using multiple test combinations. *Parasites & Vectors*, 14, 224. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04715-4>
- Latrofa, M. S., Dantas-Torres, F., Annoscia, G., Genchi, M., Traversa, D., & Otranto, D. (2012). A duplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection of and differentiation between *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in dogs and mosquitoes. *Veterinary Parasitology*, 185(2), 181–185.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.10.038>
- Lee, A. C. Y., Montgomery, S. P., Theis, J. H., Blagburn, B. L., & Eberhard, M. L. (2010). Public health issues concerning the widespread distribution of canine heartworm

- disease. *Trends in Parasitology*, 26(4), 168–173.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.01.003>
- Louzada-Flores, V. N., Kramer, L., Brianti, E., Napoli, E., Mendoza-Roldan, J. A., Bezerra-Santos, M. A., Latrofa, M. S., & Otranto, D. (2022). Treatment with doxycycline is associated with complete clearance of circulating *Wolbachia* DNA in *Dirofilaria immitis*-naturally infected dogs. *Acta Tropica*, 232, 106513.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106513>
- Maerz, I. (2020). Clinical and diagnostic imaging findings in 37 rescued dogs with heartworm disease in Germany. *Veterinary Parasitology*, 283, 109156.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109156>
- Manoj, R. R. S., Latrofa, M. S., Epis, S., & Otranto, D. (2021). Wolbachia: Endosymbiont of onchocercid nematodes and their vectors. *Parasites & Vectors*, 14(1), 245.
<https://doi.org/10.1186/s13071-021-04742-1>
- Marques, S., Gomes-Neves, E., Baptista, C. S., Pereira, F. R., Alves-Pereira, A., Osório, P., & Müller, A. (2023). A Survey on Vaccination and Disease Occurrence in Municipal and Non-Profit Animal Shelters in Portugal. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 13(17), 2723. <https://doi.org/10.3390/ani13172723>
- McCall, J. W., Varloud, M., Hodgkins, E., Mansour, A., DiCosty, U., McCall, S., Carmichael, J., Carson, B., & Carter, J. (2017). 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*, 10(2), 525. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2438-4>
- McCrea, A. R., Jimenez Castro, P. D., Kaplan, R. M., & Povelones, M. (2020). Activation of the Toll pathway in *Aedes aegypti* blocks the development of emerging third-stage larvae of drug-resistant *Dirofilaria immitis*. *Veterinary parasitology*, 282, 109100.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109100>

- Meireles, J. (2014). MEIRELES, J., PAULOS, F. SERRÃO, I., *Dirofilariose em cães e gatos*.
Rev. Port. Ciênc. Vet. Fev RCPV (2014) 109 (591-592) 70-78
http://www.fmv.utl.pt/spcv/PDF/pdf12_2014/70-78.pdf. *Revista Portuguesa Ciências Veterinárias*, 109, 70–78.
- Monobe, M. M., da Silva, R. C., Araujo Junior, J. P., & Takahira, R. K. (2017). Microfilaruria by *Dirofilaria immitis* in a dog: A rare clinical pathological finding. *Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology*, 41(3), 805–808.
<https://doi.org/10.1007/s12639-017-0892-8>
- Montoya-Alonso, J. A., Morchón, R., Falcón-Cordón, Y., Falcón-Cordón, S., Simón, F., & Carretón, E. (2017). Prevalence of heartworm in dogs and cats of Madrid, Spain. *Parasites & Vectors*, 10, 354. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2299-x>
- Montoya-Alonso, J. A., Morchón, R., García-Rodríguez, S. N., Falcón-Cordón, Y., Costa-Rodríguez, N., Matos, J. I., Rodríguez Escolar, I., & Carretón, E. (2022). Expansion of Canine Heartworm in Spain. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 12(10), 1268. <https://doi.org/10.3390/ani12101268>
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. Em *Methods in Enzymology* (Vol. 155, pp. 335–350). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)
- Munhoz, A. M., Molarinho, J., Ramos, S., Marcelino, E., Hapetian, J., Medeiros, M., Delgado, I. L. S., & Cardoso, L. (2024). *Dirofilariose canina e a importância zoonótica em Portugal*. *Revista Lusófona de Ciência e Medicina Veterinária*, 15, 6–6.
<https://doi.org/10.60543/rbcmv.v15i.9257>
- Nguyen, C., Koh, W. L., Casteriano, A., Beijerink, N., Godfrey, C., Brown, G., Emery, D., & Šlapeta, J. (2016). Mosquito-borne heartworm *Dirofilaria immitis* in dogs from Australia. *Parasites & Vectors*, 9(1), 535. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1821-x>
- Noack, S., Harrington, J., Carithers, D. S., Kaminsky, R., & Selzer, P. M. (2021). Heartworm disease – Overview, intervention, and industry perspective. *International Journal for*

- Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 16, 65–89.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2021.03.004>
- Ogbaje, C., & AbelDanjuma, A. (2016). Prevalence and risk factors associated with *Dirofilaria immitis* infection in dogs in Makurdi, Benue State, Nigeria. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 3, 1. <https://doi.org/10.5455/javar.2016.c170>
- Oi, M., Yoshikawa, S., Ichikawa, Y., Nakagaki, K., Matsumoto, J., & Nogami, S. (2014). Prevalence of *Dirofilaria immitis* among shelter dogs in Tokyo, Japan, after a decade: Comparison of 1999–2001 and 2009–2011. *Parasite*, 21, 10.
<https://doi.org/10.1051/parasite/2014008>
- Oliveira, A. M. F. (2023). *Avaliação dos efeitos da Dirofilariose Cardiopulmonar sobre os parâmetros de função cardíaca e hemodinâmicos em cães na Ilha da Madeira*.
- Oliveira-Christe, R., & Marrelli, M. T. (2024). Taxonomic history, biology and ecology of *Culex (Microculex)* (Diptera: Culicidae). *Acta Tropica*, 259, 107387.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2024.107387>
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Mihalca, A. D., Traub, R. J., Lappin, M., & Baneth, G. (2017). Zoonotic Parasites of Sheltered and Stray Dogs in the Era of the Global Economic and Political Crisis. *Trends in Parasitology*, 33(10), 813–825.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.05.013>
- Panarese, R., Iatta, R., Latrofa, M. S., Zatelli, A., Čupina, A. I., Montarsi, F., Pombi, M., Mendoza-Roldan, J. A., Beugnet, F., & Otranto, D. (2020). Hyperendemic *Dirofilaria immitis* infection in a sheltered dog population: An expanding threat in the Mediterranean region. *International Journal for Parasitology*, 50(8), 555–559.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.04.002>
- Panarese, R., Iatta, R., Mendoza-Roldan, J. A., Szlosek, D., Braff, J., Liu, J., Beugnet, F., Dantas-Torres, F., Beall, M. J., & Otranto, D. (2020). Comparison of Diagnostic Tools for the Detection of *Dirofilaria immitis* Infection in Dogs. *Pathogens*, 9(6), 499.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9060499>

- Panetta, J. L., Calvani, N. E. D., Orr, B., Nicoletti, A. G., Ward, M. P., & Šlapeta, J. (2021). Multiple diagnostic tests demonstrate an increased risk of canine heartworm disease in northern Queensland, Australia. *Parasites & Vectors*, 14, 393.
<https://doi.org/10.1186/s13071-021-04896-y>
- Patterson, G., Tanhauser, M., Schmidt, P., Spangler, D., Faulkner, C., Faulkner, V., Kish, D., Gruszynski, K., Naikare, H., Coarsey, M. D., & Verma, A. (2020). Serosurvey of arthropod-borne diseases among shelter dogs in the Cumberland Gap Region of the United States. *BMC Veterinary Research*, 16, 221. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02440-1>
- Pedram, N., Tabrizi, A. S., Hosseinzadeh, S., Pourmontaseri, M., & Rakhshandehroo, E. (2019). Prevalence of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in outdoor dogs in Tehran Province, Iran. *Comparative Clinical Pathology*, 28(4), 1165–1169.
<https://doi.org/10.1007/s00580-019-02964-5>
- Potters, I., Vanfraechem, G., & Bottieau, E. (2018). *Dirofilaria repens* Nematode Infection with Microfilaremia in Traveler Returning to Belgium from Senegal. *Emerging Infectious Diseases*, 24(9), 1761–1763. <https://doi.org/10.3201/eid2409.180462>
- Prichard, R. K. (2021). Macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*: Risks for prevention of heartworm disease. *International Journal for Parasitology*, 51(13), 1121–1132. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.08.006>
- Rawlings, C. A. (1986). *Heartworm disease in dogs and cats*. W. B. Saunders Company.
- Rawlings, C. A., Dawe, D. L., McCall, J. W., Keith, J. C., & Prestwood, A. K. (1982). Four types of occult *Dirofilaria immitis* infection in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 180(11), 1323–1326.
- Riebenbauer, K., Weber, P. B., Walochnik, J., Karlhofer, F., Winkler, S., Dorfer, S., Auer, H., Valencak, J., Laimer, M., & Handisurya, A. (2021). Human dirofilariosis in Austria: The past, the present, the future. *Parasites & Vectors*, 14, 227.
<https://doi.org/10.1186/s13071-021-04696-4>

- Rojas, A., Rojas, D., Montenegro, V. M., & Baneth, G. (2015). 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*, 8(1), 170. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0783-8>
- Romano, A. E., Saunders, A. B., Gordon, S. G., & Wesselowski, S. (2021). Intracardiac heartworms in dogs: Clinical and echocardiographic characteristics in 72 cases (2010-2019). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 35(1), 88–97. <https://doi.org/10.1111/jvim.15985>
- Sebolt, A. P. R., Snak, A., de Lima, F. R., Pilati, G. V. T., de Quadros, R. M., Miletti, L. C., Chryssafidis, A. L., & de Moura, A. B. (2022). Prevalence and risk factors for *Dirofilaria immitis* in dogs from Laguna, Santa Catarina, Brazil. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 29, 100697. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2022.100697>
- Serrano-Parreño, B., Carretón, E., Caro-Vadillo, A., Falcón-Cordón, S., Falcón-Cordón, Y., & Montoya-Alonso, J. A. (2017). Pulmonary hypertension in dogs with heartworm before and after the adulticide protocol recommended by the American Heartworm Society. *Veterinary Parasitology*, 236, 34–37. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.02.001>
- Shaikevich, E., Bogacheva, A., & Ganushkina, L. (2019). *Dirofilaria* and *Wolbachia* in mosquitoes (Diptera: Culicidae) in central European Russia and on the Black Sea coast. *Parasite*, 26, 2. <https://doi.org/10.1051/parasite/2019002>
- Simón, F., Siles-Lucas, M., Morchón, R., González-Miguel, J., Mellado, I., Carretón, E., & Montoya-Alonso, J. A. (2012). Human and animal dirofilariasis: The emergence of a zoonotic mosaic. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(3), 507–544. Scopus. <https://doi.org/10.1128/CMR.00012-12>
- Smith, R. C., Tomlinson, T. D., Bowles, J. V., & Starkey, L. A. (2024). Comparative performance analysis of different microfilaria testing methods for *Dirofilaria immitis* in

- canine blood. *Parasites & Vectors*, 17(1), 460. <https://doi.org/10.1186/s13071-024-06537-6>
- Smith-Blackmore, M. (2025). *Managing Heartworm Disease in Shelter Animals*. American Heartworm Society. <https://www.heartwormsociety.org/veterinary-resources/veterinary-education/ahs-board-speaks-out/281-managing-heartworm-disease-in-shelter-animals>.
- Soares, L. A., Matias, I. C., Silva, S. S., Ramos, M. E. O., Silva, A. P., Barretto, M. L. M., Brasil, A. W. L., Silva, M. L. C. R., Galiza, G. J. N., & Maia, L. A. (2022). Parasitological, serological and molecular diagnosis of *Dirofilaria immitis* in dogs in Northeastern Brazil. *Experimental Parasitology*, 236–237, 108233. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108233>
- Stevenson, M. A. (2021). Sample Size Estimation in Veterinary Epidemiologic Research. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 539573. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.539573>
- Tandina, F., Doumbo, O., Yaro, A. S., Traoré, S. F., Parola, P., & Robert, V. (2018). Mosquitoes (Diptera: Culicidae) and mosquito-borne diseases in Mali, West Africa. *Parasites & Vectors*, 11(1), 467. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3045-8>
- Trancoso, T. A. L., Lima, N. da C., Barbosa, A. S., Leles, D., Fonseca, A. B. M., Labarthe, N. V., Bastos, O. M. P., & Uchôa, C. M. A. (2020). Detection of *Dirofilaria immitis* using microscopic, serological and molecular techniques among dogs in Cabo Frio, RJ, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 29, e017219. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612020009>
- Velasquez, L., Blagburn, B. L., Duncan-Decoq, R., Johnson, E. M., Allen, K. E., Meinkoth, J., Gruntmeir, J., & Little, S. E. (2014). Increased prevalence of *Dirofilaria immitis* antigen in canine samples after heat treatment. *Veterinary Parasitology*, 206(1–2), 67–70. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.021>
- Venco, L., Mihaylova, L., & Boon, J. A. (2014). Right Pulmonary Artery Distensibility Index (RPAD Index). A field study of an echocardiographic method to detect early development of pulmonary hypertension and its severity even in the absence of

- regurgitant jets for Doppler evaluation in heartworm-infected dogs. *Veterinary Parasitology*, 206(1), 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.08.016>
- Ventre, E., Rozières, A., Lenief, V., Albert, F., Rossio, P., Laoubi, L., Dombrowicz, D., Staels, B., Ulmann, L., Julia, V., Vial, E., Jomard, A., Hacini-Rachinel, F., Nicolas, J.-F., & Vocanson, M. (2017). Topical ivermectin improves allergic skin inflammation. *Allergy*, 72(8), 1212–1221. <https://doi.org/10.1111/all.13118>
- Wang, S., Zhang, N., Zhang, Z., Wang, D., Yao, Z., Zhang, H., Ma, J., Zheng, B., Ren, H., & Liu, S. (2016). Prevalence of *Dirofilaria immitis* infection in dogs in Henan province, central China. *Parasite*, 23, 43. <https://doi.org/10.1051/parasite/2016054>
- Washington State University, C. of V. M. (2022). *Problem medications for dogs | Program in Individualized Medicine | Washington State University | College of Veterinary Medicine*. <https://prime.vetmed.wsu.edu/2022/03/01/problem-medications-for-dogs/>
- Weather Atlas. (2025). *Yearly & Monthly weather—Setúbal Municipality, Portugal*. Weather Atlas. <https://www.weather-atlas.com/en/portugal/setubal-municipality-climate>
- Western College of Veterinary Medicine. (2021, setembro 17). *Dirofilaria Immitis—Western College of Veterinary Medicine*. Wcvm-Learnaboutparasites. <https://wcvm.usask.ca/learnaboutparasites/parasites/dirofilaria-immitis.php>
- Ying, Z., Upadhyay, A., Wang, J., Han, Q., & Liu, Q. (2023). The prevalence of canine dirofilariasis in China: A systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors*, 16(1), 207. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05770-9>
- Zarlenga, D. S., & Higgins, J. (2001). PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology*, 101(3), 215–230. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00568-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00568-4)

Anexo 1 – Registo de dados

ID	Zona	Idade	Sexo	Raça	Peso (kg.)	Estilo de Vida	Vacinação em Dia	Castrado	Uso de Preventivo	Data Prevenção Anual	Diagnóstico Prévio de Dirofilariose	Data Diagnóstico	Gota Fresca	Esfregão Sanguíneo	Técnica de Knott	Sintomas Clínicos	Resultado Final	Motivo Exclusão
1	Entrada	0,7	Masculino	SRD	6,45	Exterior	fev-25	Não	Não		Não						Excluída	Idade inferior a 1 ano
2	Entrada	3	Feminino	SRD	25	Exterior	abr-26	Sim	Não		Não		Não	Não	Não	Não	Negativo	
3	Entrada	12	Masculino	SRD	23,5	Exterior	abr-23	Sim	Não		Sim	2023	Não	Não	Não	Não	Negativo	
4	Entrada	3	Masculino	SRD	36,2	Exterior	abr-23	Sim	Não		Não		Sim	Sim	Sim	Não	Positivo	
5	Entrada	4	Masculino	SRD	11,1	Exterior		Sim	Não		Não		Não	Não	Não	Não	Negativo	
6	Entrada	12	Feminino	SRD	8	Exterior	abr-23	Sim	Não		Sim	2024	Não	Não	Não	Sim	Negativo	
7	Entrada	12	Masculino	SRD	7,5	Exterior	mai-24	Sim	Não		Não		Sim	Sim	Sim	Não	Positivo	
8	Entrada	14	Feminino	SRD	6,3	Exterior	set-24	Sim	Não		Não		Sim	Não	Sim	Não	Positivo	
9	Entrada	12	Masculino	SRD	20,1	Exterior	abr-23	Sim	Não		Sim	out-24				Sim	Excluída	Stress
10	Entrada	13	Masculino	SRD	9,2	Exterior	abr-23	Sim	Não		Sim	mai-24	Não	Não	Não	Sim	Negativo	
11	Terreno superior	8	Masculino	SRD	16,8	Exterior	abr-23	Sim	Não		Não		Sim	Não	Não	Não	Positivo	
12	Terreno superior	8	Masculino	Poodle	29,2	Exterior	set-24	Sim	Não		Não		Sim	Sim	Sim	Não	Positivo	
13	Terreno superior	6	Feminino	Pinscher	4,8	Exterior	fev-24	Sim	Não		Não		Não	Não	Não	Não	Negativo	
14	Terreno superior	12	Feminino	SRD	24,1	Exterior	abr-23	Sim	Não		Não		Sim	Sim	Sim	Não	Positivo	
15	Terreno superior	15	Feminino	SRD	9,2	Exterior	abr-23	Sim	Não		Não		Não	Não	Não	Não	Negativo	
16	Terreno superior	11	Feminino	SRD	12,4	Exterior	mar-24	Sim	Não		Sim	jun-24	Não	Não	Não	Não	Negativo	
17	Terreno superior	7	Feminino	SRD	14,4	Exterior	set-24	Sim	Não		Não		Não	Não	Não	Não	Negativo	
18	Terreno superior	12	Masculino	SRD	8	Exterior	abr-23	Sim	Não		Não		Sim	Sim	Sim	Não	Positivo	
19	Cozinha	11	Feminino	SRD	4,6	Interior	abr-23	Sim	Sim	Jun-24	Não		Não	Não	Não	Não	Negativo	
20	Terreno superior	6	Masculino	SRD	5,8	Exterior	mai-21	Sim	Não		Não		Sim	Não	Sim	Não	Positivo	
21	Terreno superior	12	Masculino	SRD	7,2	Exterior	abr-23	Sim	Não		Sim	jan-24	Não	Não	nostra Insuficier	Não	Negativo	
22	Terreno superior	7	Feminino	SRD	9,7	Exterior	fev-24	Sim	Não		Não		Sim	Não	Não	Não	Positivo	

ID	Zona	Idade	Sexo	Raça	Peso (kg.)	Estilo de Vida	Vacinação em Dia	Castrado	Uso de Preventivo	Data Prevenção Anual	Diagnóstico Prévio de Dirofilariose	Data Diagnóstico	Gota Fresca	Esfregão Sanguíneo	Técnica de Knott	Sintomas Clínicos	Resultado Final	Motivo Exclusão
23	Terreno superior	15	Masculino	SRD	8,8	Exterior	set-24	Não	Não		Não						Excluída	Stress
24	Cozinha	15	Masculino	SRD	4,2	Interior	mai-25	Não	Não		Não		Não	Não	Não	Não	Negativo	
25	Cozinha	15	Masculino	Pinscher	3	Interior	fev-24	Sim	Não		Não		Não	Não	Não	Não	Negativo	
26	Marquise	11	Masculino	SRD	22,3	Exterior	jun-22	Sim	Sim	jul-24	Não		Não	Não	Sim	Não	Positivo	
27	Marquise	7	Feminino	SRD	20,6	Exterior	mai-24	Sim	Não		Não		Sim	Não	Sim	Não	Positivo	
28	Marquise	4	Masculino	SRD	13,6	Exterior	dez-24	Sim	Não		Não		Não	Não	Sim	Não	Positivo	
29	Marquise	7	Masculino	SRD	17,4	Exterior	abr-23	Sim	Não		Não		Sim	Sim	Sim	Não	Positivo	
30	Marquise	9	Feminino	SRD	5,7	Exterior	abr-23	Sim	Não		Não		Não	Não	Não	Não	Negativo	
31	Marquise	9	Masculino	SRD	25,4	Exterior	abr-23	Sim	Não		Não		Sim	Sim	Sim	Não	Positivo	
32	Marquise	9	Feminino	SRD	8,6	Exterior	jun-22	Sim	Não		Não		Não	Não	Sim	Não	Positivo	
33	Marquise	11	Masculino	SRD	12,7	Exterior	abr-23	Sim	Não		Não		Sim	Sim	Sim	Não	Positivo	
34	Marquise	7	Masculino	SRD	17,4	Exterior	abr-23	Sim	Não		Não		Não	Não	Não	Não	Negativo	
35	Telheiro	11	Feminino	SRD	24,9	Exterior	abr-23	Sim	Não		Não		Sim	Sim	Sim	Não	Positivo	
36	Marquise	11	Feminino	SRD	18,5	Exterior	abr-23	Sim	Não		Não		Sim	Sim	Sim	Não	Positivo	
37	Telheiro	14	Masculino	Pastor Australiano	26,1	Exterior	abr-23	Sim	Não		Não		Não	Não	Sim	Não	Positivo	
38	Telheiro	3	Masculino	SRD	14	Exterior	jun-23	Sim	Não		Não		Sim	Não	Não	Não	Positivo	
39	Telheiro	11	Masculino	SRD	13,4	Exterior	abr-23	Sim	Não		Não		Não	Não	Não	Não	Negativo	
40	Telheiro	5	Masculino	SRD	16,2	Exterior	abr-23	Sim	Não		Não		Sim	Não	Sim	Não	Positivo	
41	Telheiro	5	Masculino	SRD	12	Exterior	mai-22	Sim	Não		Não		Não	Não	Não	Não	Negativo	
42	Telheiro	3	Feminino	SRD	5,8	Exterior	ago-23	Sim	Não		Não		Não	Não	Não	Não	Negativo	
43	Telheiro	7	Feminino	SRD	10,5	Exterior	mai-24	Sim	Não		Não		Não	Não	Não	Não	Negativo	
44	Telheiro	4	Masculino	SRD	8,3	Exterior	set-24	Sim	Não		Não		Sim	Sim	Sim	Não	Positivo	

ID	Zona	Idade	Sexo	Raça	Peso (kg.)	Estilo de Vida	Vacinação em Dia	Castrado	Uso de Preventivo	Data Prevenção Anual	Diagnóstico Prévio de Dirioflariose	Data Diagnóstico	Gota Fresca	Esfregão Sanguíneo	Técnica de Knott	Sintomas Clínicos	Resultado Final	Motivo Exclusão
45	Telheiro	8	Masculino	SRD	7,8	Exterior	abr-23	Sim	Não		Não		Sim	Sim	Sim	Não	Positivo	
46	Telheiro	5	Masculino	SRD	10,4	Exterior	abr-23	Sim	Não		Não		Não	Não	Não	Não	Negativo	
47	Telheiro	3	Masculino	SRD	11,1	Exterior	abr-23	Sim	Não		Não		Não	Não	Não	Não	Negativo	
48	Telheiro	1	Feminino	SRD	10,4	Exterior	jan-25	Sim	Não		Não		Não	Não	Não	Não	Negativo	
49	Telheiro	1	Feminino	SRD	14,8	Exterior	set-24	Sim	Não		Não		Não	Não	Não	Não	Negativo	
50	Telheiro	2	Masculino	SRD	12,2	Exterior	out-23	Sim	Não		Não		Sim	Sim	Sim	Não	Positivo	
51	Telheiro	1	Feminino	SRD	7,5	Exterior	set-24	Sim	Não		Não		Não	Não	Não	Não	Negativo	
52	Telheiro	1	Feminino	SRD	6,7	Exterior	set-24	Sim	Não		Não		Não	Não	Não	Não	Negativo	
53	Telheiro	11	Masculino	Cão de Água	17,8	Exterior	set-24	Sim	Não		Não		Não	Não	Não	Não	Negativo	
54	Terreno inferior	8	Masculino	SRD	17,2	Exterior	ago-23	Sim	Não		Não		Não	Sim	Sim	Não	Positivo	
55	Terreno inferior	6	Feminino	SRD	20,1	Exterior	abr-23	Sim	Não		Não		Sim	Sim	Sim	Não	Positivo	
56	Terreno inferior	9	Masculino	SRD	40	Exterior	abr-23	Sim	Não		Não		Sim	Sim	Sim	Não	Positivo	
57	Terreno inferior	10	Masculino	SRD	30,1	Exterior	abr-23	Não	Não		Não		Sim	Sim	Sim	Não	Positivo	
58	Terreno inferior	4	Feminino	SRD	19,6	Exterior	jun-23	Sim	Não		Não		Sim	Sim	Sim	Não	Positivo	
59	Terreno inferior	6	Feminino	SRD	24,5	Exterior	abr-23	Sim	Não		Não		Sim	Sim	Sim	Não	Positivo	
60	Terreno inferior	0	Masculino	SRD	21	Exterior	abr-23	Sim	Não		Não		Sim	Sim	Sim	Não	Positivo	
61	Terreno inferior	3	Masculino	SRD	18,8	Exterior	abr-23	Sim	Não		Não		Sim	Sim	Sim	Não	Positivo	
62	Terreno inferior	7	Masculino	SRD	22,2	Exterior	abr-23	Sim	Não		Não		Sim	Sim	Sim	Não	Positivo	
63	Terreno inferior	5	Masculino	SRD	25,5	Exterior	abr-23	Sim	Não		Não		Sim	Sim	Sim	Não	Positivo	
64	Terreno inferior	5	Masculino	SRD	22	Exterior	abr-23	Sim	Não		Não		Sim	Sim	Sim	Não	Positivo	
65	Terreno inferior	5	Masculino	SRD	24,6	Exterior	abr-23	Sim	Não		Não		Sim	Sim	Sim	Não	Positivo	
66	Enfermaria	13	Feminino	Cocker Spaniel	8,85	Exterior	jul-25	Sim	Não		Não		Sim	Sim	Sim	Não	Positivo	Otitte crónica agudizada

Anexo 2 – Formulário de consentimento

Formulário de Consentimento

Eu, maria João naves, responsável pela associação "101 Rafeiros", declaro que aceito que os animais a meu cuidado participem no projeto intitulado "Prevalência da microfilarémia em cães de abrigo em Setúbal: Comparação de métodos de observação de microfilárias" (título sujeito a alterações), da autoria de Luana Ricci, aluna do Mestrado Integrado de Medicina Veterinária da Universidade de Évora (nº de aluno 46061) sob supervisão da Diretora Clínica Médica Veterinária Cristina Maria Goulartt de Medeiros de Lemos Costa e Orientadora do Projeto Catarina Falcão Trigosso Vieira Branco Lavrador.

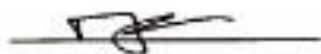
Declaro ter sido informado dos seguintes pontos:

- A participação é voluntária, podendo os animais serem retirados do estudo a qualquer momento;
- Fui elucidado sobre os procedimentos;
- Os resultados do projeto podem ser divulgados e publicados sem menção do nome do responsável da associação, dos animais da associação e dos seus números de identificação.

Por estar de acordo, assino o presente consentimento informado.

Por nome, 2, de maio, de 2025

Assinatura do responsável

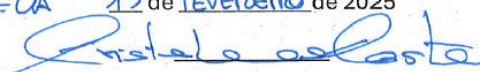


BI/CC nº

Anexo 3 – Autorização da utilização do espaço laboratorial

**Autorização da realização do estudo da aluna LUANA RICCI com recurso ao
laboratório do ONEVET-VETSET Hospital Veterinário, Palmela.**

Eu, Cristina Maria Goulartt de Medeiros de Lemos Costa, Diretora Clínica do ONEVET-VETSET Hospital Veterinário em Palmela, declaro que autorizo a utilização do laboratório do hospital para a realização do estudo denominado “Prevalência da Microfilarémia em cães de abrigo em Setúbal: Comparação de métodos de observação de microfilárias” (título sujeito a alterações) da aluna Luana Ricci (nº de aluno 46061) do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Universidade de Évora.

Palmela 19 de Fevereiro de 2025


Assinatura