

Pesquisa e identificação de filarídeos em cães residentes nos distritos de Évora e Portalegre

STEFANIE SANTOS HERMANN

Enfermagem Veterinária

2022

STEFANIE SANTOS HERMANN

Pesquisa e identificação de espécies de filarídeos em cães residentes nos distritos de Évora e Portalegre

Relatório de estágio curricular do tipo II – Introdução às Atividades de I&DE, apresentado para obtenção do grau de licenciado em Enfermagem Veterinária conferido pelo Instituto Politécnico de Portalegre

Orientador interno: Luísa Silva Pereira

Coorientador: Jacinto Gomes

Orientador Externo: Lina Costa

Arguente: Laura Hurtado

Presidente do Júri: Elvira Pinto

Classificação: 18 valores

Escola Superior Agrária de Elvas

2022

Agradecimentos

Após este percurso académico e uma das melhores etapas da minha vida, não posso deixar de agradecer a todas as pessoas que estiveram presentes e que de alguma forma me acompanharam e a tornaram ainda mais especial.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram e incentivaram a ultrapassar obstáculos e seguir os meus sonhos, sem alguma vez duvidarem das minhas capacidades e que sempre me tentaram ajudar de qualquer forma possível.

Ao meu irmão, que é o meu melhor amigo, confidente e a pessoa que desde pequena sempre vi como um exemplo, que sempre acreditou em mim e esteve sempre presente ainda que por vezes longe.

À minha Orientadora Interna, professora Dra. Luísa Silva Pereira, por toda a dedicação, todas as lições, preocupação, paciência e ajuda que forneceu, em todo o meu percurso académico.

À minha Orientadora Externa, professora Dra. Lina Costa, por todo o carinho e preocupação para a construção de um percurso profissional exemplar.

Ao meu Co-orientador, Dr. Jacinto Gomes, por toda a dedicação e pelos conhecimentos que me transmitiu na realização deste trabalho.

A todos os docentes, que me acompanharam no meu percurso académico e que me ajudaram a crescer como pessoa.

À minha madrinha que desde o momento em que conheci me acolheu, apoiou, só me deu memórias boas e com quem eu me sentia sempre segura.

À minha “Cavia” com quem aprendi muito e que me inspirou a ser a melhor versão de mim.

À Xana, por todas as diretas a estudar e todos os bons momentos com os nossos patudos.

Às minhas afilhadas que tornaram o último ano deste percurso no melhor de todos, que me deram força e nunca duvidaram de mim, e com quem partilhei as melhores memórias.

Às minhas “flores”, que sempre foram o meu porto seguro, sempre me apoiaram, incentivaram, deram forças para lutar e que sempre me fizeram rir. Para mim foram uma família e mesmo nos piores momentos estiveram sempre comigo para me ajudar a levantar.

Ao meu pseudo-afilhado, que para além de confidente é das pessoas mais especiais na minha vida e com quem partilhei muitas gargalhadas.

A todos os meus amigos que Elvas me deu, e que sabem que tornaram o meu percurso académico inesquecível.

Aos integrantes do Grupo Folclórico de Faro, que me viram crescer e acompanharam o meu percurso de longe, mas sempre com muito carinho e muita saudade.

Ao meu cão, Anubis, que todos os dias me recorda dos meus objetivos e da beleza desta profissão.

A todos os que não referi, mas que sabem que foram e são importantes para mim, e com quem sempre partilharei boas memórias.

Muito obrigada a todos!

Resumo

As microfilárias são a fase larvar dos filarídeos que pertencem à Família Onchocercidae. Estas são expulsas pelos parasitas adultos na circulação sanguínea, sendo assim possível visualizar em amostras de sangue se existir microfilarémia. Em Portugal há quatro parasitas cujas microfilárias se podem ver em amostras de sangue, *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens*, *Acanthocheilonema reconditum* e *Acanthocheilonema dracunculoides*. Estas apresentam diferente patogenia, sendo a mais conhecida e mais patogénica a espécie *Dirofilaria immitis*. As microfilárias das diferentes espécies apresentam diferentes características fisiológicas e morfológicas, sendo possível, através da observação destas, identificá-las e diagnosticar corretamente o animal infetado. Neste estudo, foram colhidas e observadas 180 amostras de sangue de cães dos distritos de Évora e Portalegre, com o objetivo de caracterizar os animais infetados, identificar casos assintomáticos, avaliar a distribuição de casos positivos nestes distritos e testar técnicas laboratoriais, sorológicas e moleculares para identificação de microfilárias. Foram realizadas a técnica de gota fresca, esfregaço sanguíneo com recurso à coloração Diff-Quick e técnica de Knott modificada em todas as amostras. Foi ainda realizado PCR e eletroforese nos animais em que foi detetada microfilarémia. Estas técnicas mostraram ter diferentes vantagens e desvantagens para a diferenciação morfológica das microfilárias, e todas mostraram a necessidade de realizar mais do que uma técnica para este efeito. De 180 amostras, em nove foi detetada microfilarémia por observação do sangue ao microscópio pelas técnicas referidas. Destes positivos, sete eram machos e dois eram fêmeas, e apenas quatro positivos apresentaram sinais clínicos, sendo os restantes cinco assintomáticos. Através de PCR e eletroforese duas amostras deram resultado inconclusivo, e foi detetado um falso negativo num teste sorológico. Concluindo que animais infetados podem ser assintomáticos, sendo imprescindível a realização de testagens de rotina, para detetar estas infeções de forma precoce, utilizando diferentes técnicas de diagnóstico, por estas mostrarem diferentes graus de eficácia.

Palavras-chave: microfilárias; Évora; Portalegre; técnica de Knott modificada; *Dirofilaria*; *Acanthocheilonema*.

Abstract

Microfilariae are the larval stage of filarids that belong to the family Onchocercidae. They are expelled by the adult parasites into the bloodstream, so it is possible to see them in blood samples if there is microfilariaemia. In Portugal there are four parasites whose microfilariae can be detected in blood samples: *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens*, *Acanthocheilonema reconditum* and *Acanthocheilonema dracunculoides*. These show different pathogenesis, the best known and most pathogenic being *Dirofilaria immitis*. The microfilariae of the different species have different physiological and morphological characteristics, and it is possible to identify and correctly diagnose the infected animal by looking at them. In this study, 180 blood samples were collected and observed from dogs in the districts of Évora and Portalegre, aiming to characterize the infected animals, identify asymptomatic cases, evaluate the distribution of positive cases in these districts and test laboratory, serological and molecular techniques for microfilariae identification. The fresh drop technique, blood smear using Diff-Quick staining and modified Knott's technique were performed on all samples. PCR and electrophoresis were also performed in animals in which microfilariaemia was detected. These techniques showed different advantages and disadvantages for the morphological differentiation of microfilariae, and all showed the need to perform more than one technique for this purpose. Of 180 samples, in nine microfilariaemia was detected by microscopic observation of the blood by the above techniques. Of these positives seven were males and two were females, and only four positives showed clinical signs, and the remaining five were asymptomatic. Through PCR and electrophoresis two samples gave inconclusive results, and one false negative was detected in a serological test. In conclusion, infected animals can be asymptomatic, and routine testing is essential to detect these infections early, using different diagnostic techniques, as they show different degrees of effectiveness.

Keywords: microfilariae; Évora; Portalegre; modified Knott's technique; *Dirofilaria*; *Acanthocheilonema*.

Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

A. dracunculoides – *Acanthocheilonema dracunculoides*

A. reconditum – *Acanthocheilonema reconditum*

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AHS – American Heartworm Society

CAMV – Centro de Atendimento Médico Veterinário

CAVE – Centro de Atendimento Veterinário Escolar

CVBD – Canine Vector – Borne Diseases

D. immitis – *Dirofilaria immitis*

D. repens – *Dirofilaria repens*

DGAV – Direção Geral da Alimentação e Veterinária

ESAE – Escola Superior Agrária de Elvas

ESCCAP – European Scientific Counsel Companion Animal Parasites

L1 – Larvas no 1º estágio larvar

L3 – Larvas no 3º estágio larvar

ml – Mililitros

mm - Milímetro

MO – Microscópio ótico

PCR – Polymerase Chain Reaction

pb – Pares-base

Rpm – Rotações por minuto

Índice Geral

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Abreviaturas, Siglas e Acrónimos.....	v
Índice Geral.....	vi
Índice de Tabelas.....	vii
Índice de Figuras.....	viii
1. Introdução e Objetivos.....	1
1.1. Introdução.....	1
1.2. Objetivos.....	2
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Parasitas que Provocam Microfilarémia.....	3
2.2. Ciclo Biológico de <i>Dirofilaria spp.</i>	3
2.3. Ciclo Biológico de <i>Acanthocheilonema spp.</i>	5
2.4. Doenças Associadas a Microfilarémia e Sinais Clínicos.....	6
2.5. Diagnóstico destas Parasitoses.....	7
2.6. Morfologia das Microfilárias e dos Parasitas Adultos.....	11
2.7. Importância na Saúde Animal e Saúde Pública.....	13
2.8. Profilaxia.....	13
2.9. Caracterização epidemiológica nos distritos de Évora e Portalegre.....	16
3. Materiais e Métodos.....	17
3.1. Materiais.....	17
3.2. Métodos.....	19
4. Resultados.....	21
5. Discussão.....	26
6. Conclusões.....	29
7. Bibliografia.....	31
Anexo I.....	35

Índice de Tabelas

Tabela I - Fármacos utilizados na profilaxia de filarídeos, vias de administração e intervalo de administrações.....	15
--	----

Índice de Figuras

Figura 1 - Visualização de microfilária, evidenciada a vermelho, entre eritrócitos na técnica de gota fresca, ampliação 40x (fotografia da autora).....	8
Figura 2 - Visualização de microfilária na técnica de esfregaço sanguíneo, ampliação 100x (fotografia da autora).....	9
Figura 3 - Visualização de microfilária na técnica de Knott modificada, ampliação 40x (fotografia da autora)	10
Figura 4 - Representação gráfica dos animais positivos dentro da população total de animais testados	21
Figura 5 - Representação gráfica do número de machos e fêmeas do conjunto de animais positivos	21
Figura 6 - Representação gráfica da distribuição geográfica dos animais positivos.....	22
Figura 7 - Representação gráfica dos intervalos de idade dos animais positivos.....	22
Figura 8 - Representação gráfica dos portes dos animais positivos	23
Figura 9 - Representação gráfica da apresentação de sinais clínicos dos animais positivos.....	23
Figura 10 - Representação gráfica do contexto em que foram realizadas as colheitas de amostras de sangue dos animais positivos	24
Figura 11 - Eletroforese de 7 indivíduos (fotografia da autora)	25
Figura 12 - Eletroforese de 3 indivíduos (fotografia da autora)	25

I. Introdução e Objetivos

I.1. Introdução

Os nemátodos filarídeos são parasitas que libertam microfilárias, ou seja, larvas para a corrente sanguínea dos animais. Em Portugal existem quatro espécies importantes destas, sendo a mais conhecida a *Dirofilaria immitis*, causadora da dirofilariose cardiopulmonar, transmitida através da picada do mosquito. Apesar de vastamente conhecida, ainda muitos tutores falham em perceber o risco que este parasita pode causar à saúde dos seus animais, bem como a toda a população. Para além de ser o filarídeo mais conhecido, é também o causador de microfilarémia mais patogénico e letal para os animais, sendo os seus principais alvos os canídeos domésticos e selvagens, e os felídeos, apesar de em menor quantidade (Gallego et al., 2012). Estes podem ainda infetar os humanos, porém não evoluindo até à fase adulta, causando, portanto, menos danos do que nos animais (Genchi, Rinaldi, Mortarino, Genchi, & Cringoli, 2009).

Para além da *Dirofilaria immitis*, a espécie *Dirofilaria repens* também existe em Portugal, igualmente transmitida através da picada do mosquito, e as espécies *Acanthocheilonema reconditum* e *Acanthocheilonema dracunculoides*, cujos vetores são pulgas, carraças e piolhos. Estas são menos estudadas, porém, tal como a *Dirofilaria immitis*, libertam microfilárias para a corrente sanguínea, sendo por isso fundamental a sua identificação correta e diagnóstico acertado, pois estes parasitas apresentam patogenias distintas, causando danos diferentes no organismo do animal, e assim, têm também tratamentos diferentes (Gallego et al., 2012).

Alguns animais, apesar de apresentarem microfilarémia, não apresentam sinais clínicos, sendo por isso difícil o diagnóstico destas parasitoses sem a realização de testes laboratoriais, sorológicos ou moleculares. Para além deste aspeto, cada técnica e cada teste tem uma sensibilidade diferente, podendo originar resultados falsos positivos. Assim, é aconselhada uma examinação mais aprofundada, isto é, com recurso a várias técnicas, para um correto diagnóstico, sendo isto fundamental para o tratamento e diminuição da mortalidade.

1.2. Objetivos

Este trabalho de investigação tem como objetivo principal avaliar a presença de cães infetados por diferentes espécies de parasitas filarídeos nos distritos de Évora e Portalegre, fazendo um perfil e caracterizar os animais infetados.

Outro objetivo deste trabalho é a avaliação de casos subclínicos, ou seja, avaliar a presença de microfilarémia em cães assintomáticos, ou sem sinais clínicos aparentes.

Dos animais com microfilarémia, é de interesse identificar as espécies de microfíliarias presentes, através da observação das características morfológicas das mesmas, bem como com o auxílio de técnicas sorológicas e moleculares.

Tem ainda o objetivo de avaliar a eficácia de diferentes técnicas laboratoriais, testes sorológicos e moleculares, recorrendo a conhecimentos adquiridos ao longo da Licenciatura em Enfermagem Veterinária, e por fim, fazer uma comparação entre estas técnicas.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Parasitas que Provocam Microfilarémia

As microfílarias são a fase larvar dos filarídeos pertencentes à Ordem Spirurida, Superfamília Filarioidea e Família Onchocercidae (Mahmud, Lim, & Amir, 2017; Napoli et al., 2014; Brianti et al., 2012).

Se estiverem microfílarias presentes na circulação sanguínea de um animal, diz-se que este apresenta microfilarémia. Esta pode ser provocada, no cão, por quatro parasitas diferentes: *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens*, *Acanthocheilonema reconditum* e *Acanthocheilonema dracunculoides*, sendo *D. immitis* a mais conhecida e de maior importância na saúde animal e saúde pública, por ser mais patogénica e apresentar maior taxa de mortalidade (Gallego et al., 2012).

Por apresentarem diferente patogenicidade, é importante a deteção e correta identificação do parasita no sistema circulatório do animal. Por isso, é imprescindível a diferenciação e atenção às características do parasita encontrado, pois por apresentarem diferentes ameaças à saúde do animal, e assim, diferentes tratamentos, o correto diagnóstico permitirá realizar a terapêutica mais adequada.

2.2. Ciclo Biológico de *Dirofilaria spp.*

As *Dirofilaria spp.* são parasitas com ciclo de vida heteroxeno, isto é, durante o seu ciclo de vida apresentam mais do que um hospedeiro, ou seja, um hospedeiro intermediário, ou vetor, e um hospedeiro definitivo (Jacobs, Fox, Gibbons, & Hermosilla, 2016).

No caso de *D. immitis*, o hospedeiro intermediário é o mosquito, podendo este ser de diferentes géneros. Alguns dos géneros mais comuns capazes de transportar este parasita e infetar animais são *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Culiseta* e *Coquillettidia*. Os hospedeiros definitivos naturais deste parasita são cães e outros canídeos selvagens (Gallego et al., 2012), e com menor frequência pode ainda infetar gatos (CVBD, 2020). O ser humano pode ser considerado um hospedeiro acidental, pois pode ser infetado, todavia, as larvas não têm capacidade de se desenvolver até à fase adulta (Genchi et al., 2009) e alojar-se no coração (Jacobs et al., 2016).

O mosquito, ao picar um animal infetado, para se alimentar do seu sangue, vai ingerir larvas L1 de *Dirofilaria spp.* (Gallego et al., 2012). Estas, dentro do hospedeiro intermediário, ou vetor, vão se deslocar do intestino médio para os túbulos de Malpighi, onde se vão desenvolver até chegar ao estado L3 (CVBD, 2020), demorando cerca de 10 a 15 dias para completar esta transição, indo, por fim, para as peças bucais do mosquito para depois ser expelido para o hospedeiro definitivo (Gallego et al., 2012).

Seguidamente, ao picar outro animal não infetado, para se alimentar, o mosquito vai expulsar estas larvas, entrando assim L3 para o organismo do hospedeiro definitivo. Após 3 a 4 dias, estas tornam-se L4, e por ter grande capacidade de penetração nos tecidos, migram até ao espaço subcutâneo torácico e após 50 a 70 dias desenvolvem-se para L5, ou pré-adultos. Estas entram pela circulação venosa e alojam-se primeiramente nas artérias pulmonares e ventrículo direito, podendo depois alojar-se também na aurícula direita, e nas veias cava e hepáticas, no caso de a carga parasitária ser muito elevada (Gallego et al., 2012). As fêmeas adultas no coração, sensivelmente 6 meses após a infeção, vão eliminar microfilárias L1 para a corrente sanguínea, podendo estas ser ingeridas por um novo mosquito, permitindo que se desenvolvam para os próximos estados larvares. Caso estas não sejam ingeridas por um mosquito, não serão capazes de se desenvolver (CVBD, 2020).

Os ciclos de vida da *D. immitis* e da *D. repens* são muito semelhantes até à entrada das L3 para o organismo do hospedeiro definitivo, sendo que no caso do segundo parasita, estas larvas não sofrem migração, ou seja, permanecem no tecido subcutâneo, onde sofrem maturação até à fase adulta, podendo permanecer alojadas no espaço subcutâneo durante vários anos (Gallego et al., 2012).

O período pré-patente entende-se como o período de tempo que decorre entre a entrada do parasita, neste caso das L3, e o aparecimento das primeiras formas detetáveis do mesmo, ou seja, das microfilárias na circulação sanguínea. O período pré-patente da *D. immitis* é inferior ao da *D. repens*, sendo 6 meses e 6 a 8 meses, respetivamente (Gallego et al., 2012).

2.3. Ciclo Biológico de *Acanthocheilonema* spp.

Acanthocheilonema spp., tal como *Dirofilaria* spp., são parasitas heteroxenos, necessitando, por isso, de um vetor para poder infectar cães domésticos e outros carnívoros selvagens (Schwan & Schroter, 2006).

No caso da *Acanthocheilonema dracunculoides*, conhecem-se dois vetores comuns deste parasita – *Rhipicephalus sanguineus* (Muñoz et al., 2020), uma carrapa da família Ixodidae (Mullen & Durden, 2019), e *Hippobosca longipennis* (Muñoz et al., 2020), uma mosca hematófaga, conhecida como mosca do cão (Mullen & Durden, 2019).

Acanthocheilonema reconditum possui mais vetores conhecidos, entre eles, os piolhos das espécies *Heterodoxus spiniger*, *Linognathus setosus* (Engelmann et al., 2018) e *Trichodectes canis* (Leite et al., 2012), e as pulgas das espécies *Ctenocephalides canis*, *Ctenocephalides felis*, *Echidnophaga galinacea*, *Pulex irritans* e *Pulex simulans* (Brianti et al., 2012).

Apesar de haver pouca informação acerca do ciclo de vida destes parasitas (Napoli et al., 2014), acredita-se que seja semelhante aos das *Dirofilaria* spp., diferenciando apenas no local onde as suas formas adultas se alojam no hospedeiro definitivo. *A. dracunculoides* é encontrada na cavidade peritoneal e, por vezes, também na cavidade torácica (Szatmári, van Leeuwen, Piek, & Venco, 2020), enquanto *A. reconditum* se aloja no tecido subcutâneo, nas fâscias musculares (Gallego et al., 2012) e, por vezes, no tecido perirrenal (Leite et al., 2012).

Não se conhece ainda muito acerca das migrações que este parasita realiza dentro do organismo do hospedeiro definitivo (Schwan & Schroter, 2006), porém, sabe-se que as microfilárias, depois de serem libertadas pelas fêmeas adultas, movimentam-se para entrar na corrente sanguínea, de forma a serem ingeridas pelos vetores aquando da sua alimentação (Napoli et al., 2014). No entanto, segundo alguns estudos realizados, acredita-se que o período pré-patente da *Acanthocheilonema* spp. varie entre 67 e 101 dias (Brianti et al., 2012).

2.4. Doenças Associadas a Microfilarémia e Sinais Clínicos

Dirofilaria immitis, popularmente conhecida como lombriga do coração, é considerada o filaróide mais patogênico, e é responsável pela dirofilariose cardiopulmonar canina e felina (ESCCAP, 2019).

A dirofilariose, se não for diagnosticada atempadamente e devidamente tratada, pode levar à morte do animal infetado, por insuficiência cardíaca direita e mesmo impedimento da circulação sanguínea pela presença de adultas no lado direito do coração nas fases mais tardias da doença, porém é essencialmente uma doença pulmonar, pois os parasitas adultos alojam-se primeiro nas artérias pulmonares, e apenas depois no ventrículo direito (Gallego et al., 2012).

O animal infetado começa por perder condição corporal e apresenta os primeiros sinais clínicos respiratórios tal como dispneia, tosse e síncope após esforços, exercício intenso ou mesmo excitação. Estes primeiros sinais surgem entre 5 e 7 meses após a picada do mosquito infetado, pois é o tempo que as microfílaras demoram a evoluir, desde a entrada no organismo do vertebrado, até à fase adulta e a deslocar-se ao coração (Gallego et al., 2012).

Se a doença não for diagnosticada e tratada atempadamente, os sinais clínicos evoluem para tosse crónica, taquipneia, taquicardia, hemoglobínúria e nalguns casos é possível identificar murmúrios cardíacos ou mesmo sopro cardíaco devido à insuficiência da válvula tricúspide (Gallego et al., 2012). A hemoglobínúria surge devido à congestão do fígado, provocada pela insuficiência da válvula tricúspide, logo, evolui para insuficiência hepática, levando ao aumento da fragilidade dos eritrócitos, que ao serem destruídos libertam hemoglobina (Jacobs et al., 2016).

Por ocuparem o lado direito do coração, estes parasitas impedem a passagem do sangue e correto funcionamento do coração, provocando insuficiência cardíaca direita. Esta, por sua vez, é responsável pelo aparecimento de sinais clínicos como ascite, edema e anorexia (Kittleson, 2016).

Por fim, em casos graves de dirofilariose, uma elevada carga parasitária leva à acumulação de parasitas adultos no coração, podendo resultar no colapso cardiovascular, levando à morte do animal (Gallego et al., 2012).

Dirofilaria repens provoca a dirofilariose subcutânea, sendo a filariose subcutânea mais frequente. Os animais infetados com este parasita tendem a ser maioritariamente assintomáticos, podendo esta doença provocar nódulos ou outras lesões cutâneas (Gallego et al., 2012; ESCCAP, 2021).

A dirofilariose subcutânea é também considerada zoonose, sendo mais comum nos seres humanos do que a dirofilariose cardiopulmonar, apresentando nódulos subcutâneos e nalguns casos parasitas na conjuntiva (ESCCAP, 2021).

Acanthocheilonema spp. são menos patogénicas que *Dirofilaria spp.* e muitas vezes é diagnosticada acidentalmente (Leite et al., 2012). Muitos animais infetados por este parasita não apresentam qualquer sinal clínico ou alteração, porém, nalguns casos infetados por *Acanthocheilonema dracunculoides*, foram detetadas alterações como pelagem seca, frágil e quebradiça, prurido, alopecia, rubor, úlceras na pele, efusão pleural, dispneia, cianose (Muñoz et al., 2020), caquexia (Schwan & Schroter, 2006), alterações neurológicas, provocando ataxia e em raros casos provocou a morte do animal (Muñoz et al., 2020).

Animais parasitados com *Acanthocheilonema reconditum* apresentam, normalmente, menos sinais clínicos, tendo sido já identificados casos que apresentaram elevada eosinofilia e aumento da contagem leucocitária, anemia hemolítica e distúrbios a nível renal e hepático (Leite et al., 2012).

2.5. Diagnóstico destas Parasitoses

O diagnóstico, para Dirofilariose, mais comumente usado em clínica, e mais recomendado, é o teste sorológico para deteção de antigénio, ou teste rápido. Este é o método mais sensível e específico para diagnóstico e consegue identificar animais infetados em que não seja detetada microfilarémia, mas que possuam parasitas adultos no coração. Porém, para o resultado do teste ser positivo, o animal deve conter pelo menos uma fêmea adulta no coração. Se o animal possuir apenas machos adultos, o teste de antigénio não vai detetar a presença dos parasitas, tendo um resultado falso-negativo (AHS, 2020).

Os antigénios são libertados na circulação sanguínea pelas fêmeas adultas que estão alojadas no coração. Assim, quanto maior o número de fêmeas adultas, maior a

quantidade de antígeno em circulação e maior a probabilidade de o teste apresentar resultado positivo. Porém, se este número for reduzido, ou existirem complexos antígeno-anticorpo, o teste pode não detectar antígeno e dar falso-negativo, pois estes complexos podem bloquear totalmente a detecção dos antígenos pelo teste (AHS, 2020).

Além do teste de detecção de antígeno, podem ser realizadas outras técnicas laboratoriais para visualização direta de microfilárias em amostras de sangue, como a gota a fresco, o esfregaço sanguíneo, e a técnica de Knott modificada.

A gota a fresco, técnica apresentada na figura 1, é também comumente realizada em contexto de clínica, pois é um método fácil e rápido para a detecção de microfilarémia. Esta pode, no entanto, dar falso-negativo, pois a carga parasitária pode ser baixa e numa gota não existir nenhuma microfilária apesar de o animal apresentar microfilarémia, ou o animal pode mesmo ser amicrofilarémico, ou seja, não apresentar formas larvares do parasita em circulação, mas existirem adultas alojadas no coração (AHS, 2020).



Figura 1 - Visualização de microfilária, evidenciada a vermelho, entre eritrócitos na técnica de gota fresca, ampliação 40x (fotografia da autora)

O esfregaço sanguíneo permite melhor visualização das microfilárias por estas corarem com a solução basófila, o que lhes confere uma cor azul e permite melhor observação das características das mesmas (Mallawaarachchi et al., 2013), o que é possível verificar na figura 2. Esta utilização de uma solução acidófila e de uma solução basófila, juntamente com um agente fixador, é conhecida como Diff-Quick. Nesta coloração, as componentes ácidas da citologia são coradas pela solução basófila que confere uma cor azul, e as componentes básicas são coradas pela solução acidófila, que se apresentam com uma cor avermelhada (Singer, 1954).



Figura 2 - Visualização de microfilária na técnica de esfregaço sanguíneo, ampliação 100x (fotografia da autora)

A técnica de Knott modificada, dos métodos apresentados, é o mais complexo e menos realizado em contexto de clínica. Este método tem como objetivo aumentar a concentração de microfilárias em cada gota de sangue, de forma a reduzir o número de falsos negativos, centrifugando as amostras de sangue juntamente com formalina a 2% para hemolisar os eritrócitos, facilitando a visualização ao MO. É também utilizada uma solução basófila, mais comumente o azul-de-metileno, para a coloração e melhor visualização das microfilárias. Esta técnica é a mais comumente usada para identificação morfológica das larvas, pois apresentam-se estendidas, como apresentado na figura 3, permitindo observação mais precisa do seu comprimento e outras componentes como

a cauda e a cabeça (AHS, 2020). Isto não é possível na técnica de gota fresca, por as microfilárias se encontrarem em constante movimento e, por vezes, por existir grande sobreposição de células. Já no esfregaço sanguíneo, apesar da visualização ser mais clara, estes parasitas encontram-se muitas vezes em posições que tornam difícil a perceção do seu tamanho e de outras características morfológicas.



Figura 3 - Visualização de microfilária na técnica de Knott modificada, ampliação 40x (fotografia da autora)

Para a identificação das microfilárias pode também ser utilizada a coloração pela fosfatase ácida. Esta é uma enzima (Henneberry, Engel, & Grayhack, 1979), que se encontra em grandes concentrações nos locais onde ocorre absorção, secreção e excreção (Maki & Yanagisawa, 1980). As diferentes espécies destes parasitas que provocam microfilarémia, apresentam diferentes padrões de concentração de fosfatases ácidas, ou seja, com esta coloração é possível identificar os locais de maior atividade de fosfatases ácidas e fazer um correto diagnóstico (Ortega-Mora, Gomez-Bautista, & Rojo-Vazquez, 1989). Após a coloração, as áreas de maior concentração são apresentadas por pontos de cor avermelhada (Lee et al., 2004).

Para além destas técnicas, podem ainda realizar-se testes moleculares, que permitem identificar as microfilárias relativamente à espécie. A PCR baseia-se na extração e replicação do ADN presente na amostra de sangue, necessitando de nucleótidos livres, ADN polimerase e primers, que vão definir a sequência amplificada

(Merta, Pinkr, & Janstová, 2020). Seguidamente é realizada eletroforese para separar os fragmentos de ADN que foram amplificados no PCR, sendo assim possível determinar o tamanho da banda de ADN (Green & Sambrook, 2019). Estes tamanhos são determinados pelo número de pares-base (pb), o que varia consoante a espécie de microfilária presente na amostra. Na técnica de PCR descrita por Rishniw, dos quatro parasitas que provocam microfilarémia, *D. repens* é o que apresenta a banda de menor tamanho, tendo 484pb, *D. immitis* tem 542pb, *A. reconditum* tem 578pb, e *A. dracunculoides* é o que apresenta maior número de pares-base, tendo 584pb (Rishniw et al., 2006). Assim, por estes parasitas apresentarem diferentes tamanhos, a eletroforese é uma técnica vantajosa para a identificação correta dos mesmos, comparando os valores dos tamanhos obtidos com os valores descritos.

2.6. Morfologia das Microfilárias e dos Parasitas Adultos

A diferenciação das espécies de microfilárias é essencial, visto que a patogenia dos possíveis parasitas é diferente e os tratamentos também variam consoante o parasita encontrado. Por haver diferentes tratamentos, é importante fazer um diagnóstico correto, para garantir, assim, que o tratamento também seja o mais adequado (Gallego et al., 2012).

As microfilárias, apesar de idênticas, são possíveis de diferenciar utilizando algumas técnicas específicas para o mesmo, porém, sem coloração esta diferenciação torna-se mais difícil diferenciar este conjunto de características (ESCCAP, 2019).

Na técnica de gota a fresco é possível observar o movimento das larvas no sangue, sendo este diferente entre a *Acanthocheilonema spp.* e a *Dirofilaria spp.* Segundo estudos realizados, a *Dirofilaria spp.* apresenta um movimento mais lento e serpentiforme e a *Acanthocheilonema spp.* tem um movimento mais errático e rápido pelo sangue (Brito et al., 2001).

Outra característica comumente observada nas microfilárias para proceder à sua identificação é o seu comprimento e largura. Segundo estudos realizados em 2001, observou-se que a *Dirofilaria spp.* tem cerca de $298.1\mu\text{m} \pm 5.5\mu\text{m}$ de comprimento e $7.3\mu\text{m} \pm 0.3\mu\text{m}$ de largura (Brito et al., 2001), sendo que a *Acanthocheilonema spp.* é significativamente mais curta (Szatmári et al., 2020) e fina (Engelmann et al., 2018),

medindo cerca de $249.2\mu\text{m} \pm 8.7\mu\text{m}$ de comprimento e $4.4\mu\text{m} \pm 1.2\mu\text{m}$ de largura (Brito et al., 2001). Porém, esta é uma forma pouco fiável para identificar corretamente o filarídeo presente (Szatmári et al., 2020).

As extremidades das microfilárias também são características que permitem diferenciação morfológica das mesmas. A extremidade anterior de *Dirofilaria spp.* tem uma forma mais oval do que a da *Acanthocheilonema spp.* que se apresenta mais achatada. A extremidade posterior, ou caudal, de *Acanthocheilonema spp.* tem forma de gancho, ao contrário da *Dirofilaria spp.* que tem uma cauda reta (Brito et al., 2001).

Através da atividade das fosfatases ácidas das diferentes espécies de microfilárias, que após coloração se apresentam com uma cor avermelhada, é possível identificá-las e chegar a um diagnóstico definitivo. As microfilárias de *D. immitis* apresentam 2 pontos de atividade no poro anal e no poro excretor, sendo que a *D. repens* apresenta apenas 1 ponto no poro anal. Já as microfilárias de *A. reconditum* ficam totalmente coradas, e as de *A. dracunculoides* apresentam atividade de fosfatase ácida no poro anal, no poro excretor e na parte média do seu corpo (Gallego et al., 2012). Assim, como cada espécie possui um padrão diferente de atividade destas enzimas, é possível fazer uma identificação mais fiável com o auxílio destas características fisiológicas que as distinguem (Ortega-Mora et al., 1989).

Nos parasitas adultos é também possível encontrar diferenças morfológicas, especialmente em relação ao seu comprimento, sendo este superior em fêmeas, nas diferentes espécies. Nos machos de *D. immitis* este comprimento varia entre 119.4mm e 162.3mm, e nas fêmeas pode variar entre 177mm e 272mm (Furtado, Melo, Giese, & Santos, 2010). Os machos de *D. repens* apresentam um comprimento entre 50mm e 70mm, e as fêmeas entre 100mm e 170mm (Matějů et al., 2016). Quanto à espécie *A. dracunculoides*, os machos medem entre 15mm e 32mm, e as fêmeas entre 30mm e 60mm de comprimento (Schwan & Schroter, 2006). Na espécie *A. reconditum*, os machos medem apenas entre 9mm e 17mm, sendo uma diferença significativa em relação às fêmeas que medem entre 20mm e 32mm (Marchiondo, Cruthers, & Reinemeyer, 2019). Quanto à largura, as fêmeas também apresentam, normalmente, valores superiores em relação aos machos, porém esta diferença é pouco significativa (Furtado et al., 2010).

2.7. Importância na Saúde Animal e Saúde Pública

As parasitoses descritas são consideradas metazoonoses, ou seja, zoonoses que requerem um vetor para infectar o ser humano (Jacobs et al., 2016). Assim, tal como nos animais, estes parasitas infectam os humanos através de hospedeiros intermediários. No entanto, estes parasitas não atingem a fase adulta dentro do organismo humano. Ainda assim, apesar de pouco patogénicas para o Homem, podem provocar lesões (Gallego et al., 2012), tendo sido comumente descritos nódulos e lesões subcutâneas e oculares. Vários estudos realizados aferiram que as microfilárias são capazes de infectar vários órgãos nos humanos, tal como os olhos, pulmões, cérebro, fígado, intestinos, linfonodos, músculos e tecido mamário (Iddawela, Ehambaram, & Wickramasinghe, 2015; Prioleau, Parker, Bradham, & Georgie, 1976), sendo por isso necessário alertar e sensibilizar sobre o ciclo de vida e o perigo que estes parasitas têm para os animais de companhia.

Cada vez mais, os tutores realizam viagens com os seus animais de companhia, dentro do país e mesmo entre vários países. Estes podem ou não ser endémicos, porém, estas deslocações podem resultar num aumento de casos infectados nas várias regiões (AHS, 2020).

Assim, a American Heartworm Society aconselha a realização de testes para deteção de filarioses antes de deslocações, permitindo assim um maior controlo e impedindo o aumento do número de casos positivos. O mesmo procedimento deve ser realizado no ato de adoção de um animal, pois este, se positivo, pode infectar animais nas regiões próximas da nova casa ou mesmo de animais coabitantes (AHS, 2020). Estes testes podem ser testes sorológicos, moleculares, ou mesmo por observação direta ao microscópio por diferentes técnicas.

2.8. Profilaxia

Sendo que estes parasitas necessitam de vetores para infectar animais, é de extrema importância impedir o aumento de casos positivos, através do controlo dos seus vetores. Assim, é fundamental reduzir o contacto entre os animais e estes vetores, isto é, os mosquitos, pulgas, carraças e piolhos.

Esta prevenção pode ser realizada de várias formas, e não só pelo tutor, como também pelo médico veterinário e pelas autoridades municipais para redução do

número de vetores no meio ambiente (AHS, 2020). Desta forma, é realizada prevenção individual de cada animal, e da população de cães em geral.

O tutor deve reduzir a exposição do seu animal às horas de maior atividade dos vetores. No caso da *Dirofilaria spp.*, os mosquitos têm maior atividade durante o amanhecer e o anoitecer (Mullen & Durden, 2019), assim, estes períodos devem ser evitados para reduzir a probabilidade de o animal ser picado por um dos vetores.

Uma parte do ciclo de vida do mosquito ocorre no meio aquático, pois as larvas e pupas, ou seja, os estágios mais imaturos deste inseto, desenvolvem-se na água. As fêmeas podem depositar ovos na superfície e dentro de água, ou mesmo em zonas que estejam frequentemente sobreaguadas (Mullen & Durden, 2019). Assim, devem ser evitados passeios perto de locais como rios, ribeiros, piscinas e locais onde existam muitas poças resultantes da chuva.

As autoridades municipais devem eliminar zonas de águas paradas, ou na impossibilidade de tal, realizar tratamento adequado com reguladores de crescimento de insetos, limitando o crescimento da população de mosquitos (AHS, 2020).

O médico veterinário tem como função instruir o tutor e advertir para os perigos destas parasitoses, bem como recomendar profilaxia do animal. Esta pode ser realizada através da administração de lactonas macrocíclicas, como a ivermectina, milbemicina oxima, moxidectina e selamectina, mostrando-se muito eficazes se administradas corretamente. É importante uma administração adequada e cuidada, pois uma administração atrasada pode ser o suficiente para o animal ser infetado. Cachorros devem iniciar um plano profilático de preferência antes das 8 semanas de idade, sendo que em animais mais velhos, antes de iniciar a administração de lactonas macrocíclicas devem ser feitas testagens para garantir que este não se apresenta já infetado, ajudando a detetar infeções subclínicas, ou seja, sem sinais clínicos aparentes, isto porque, as lactonas macrocíclicas ajudam o organismo a combater as fases larvares destes parasitas, porém nalguns casos pode mesmo combater os parasitas já adultos e alojados dentro do coração (AHS, 2020).

Na seguinte tabela I encontram-se as lactonas macrocíclicas referidas, juntamente com alguns exemplos de nomes comerciais, a sua via de administração e o intervalo de tempo entre administrações (AHS, 2020).

Tabela I - Fármacos utilizados na profilaxia de filarídeos, vias de administração e intervalo de administrações

Princípio Ativo	Nomes Comerciais	Via de administração	Intervalo de administrações
Ivermectina	Heartgard®	PO	Mensal
Milbemicina oxima	Interceptor® MilbeGuard®	PO	Mensal
Moxidectina	Moxiclear®	Spot-on	Mensal
Selamectina	Revolution® Stronghold®	Spot-on	Mensal

Apesar de ainda não existir nenhuma vacina para a prevenção da dirofilariose (Pękacz et al., 2022), já estão a ser efetuadas investigações para a criação da mesma (University of Liverpool, 2020). Porém, em Portugal existe o Guardian®, que é um desparasitante cuja via de administração é subcutânea e a sua preparação se assemelha a uma vacina. Este tem como princípio ativo a moxidectina e deve ser administrado anualmente (DGAV, 2019).

No caso da *Acanthocheilonema spp.*, os seus vetores são diferentes, e por isso são necessários também outros cuidados. As carraças são artrópodes que se encontram essencialmente na vegetação, e que se agarram ao pêlo do animal quando este se cruza com as mesmas. Assim, o comprimento do pêlo é um fator que pode aumentar a probabilidade de estes vetores se agarrarem ao hospedeiro definitivo, ou seja, um cão com pelo mais comprido terá maior tendência a ser parasitado com estes parasitas externos, que por sua vez podem estar infetados e transportar larvas de *Acanthocheilonema spp.* (Beck et al., 2014).

As carraças apresentam maior atividade, e por isso, encontram-se em maior número, entre maio e junho e entre setembro e outubro (Beck et al., 2014). Assim, nestas alturas do ano pode ser benéfico realizar tosquia aos cães com pêlo comprido.

As pulgas, embora não se encontrem em locais muito expostos ao sol, podem ser encontradas essencialmente na vegetação em locais mais abrigados do sol e de outras condições ambientais. É, por isso, importante expor locais destes ao sol, se possível,

para secar os ovos e impedir o desenvolvimento dos embriões. Dentro de casa, estas costumam deixar ovos nos locais mais frequentados pelos animais, principalmente onde dormem. Assim, quando perante este parasita externo devem ser realizadas limpezas nestas zonas diariamente para retirar os ovos ou pode ainda ser utilizado controlo químico para parar o desenvolvimento dos embriões (Mullen & Durden, 2019).

Os piolhos, apesar de menos frequentes, tendem a ser encontrados em animais mais jovens e em animais geriátricos, pois estes não conseguem realizar um grooming adequado (Mullen & Durden, 2019).

2.9. Caracterização epidemiológica nos distritos de Évora e Portalegre

Em Portugal, a dirofilariose é considerada uma doença endémica, tal como em vários outros países da Europa (Alho et al., 2014), sendo os outros parasitas filarídeos também encontrados em Portugal (ESCCAP, 2019).

Em 2014 foi realizado um estudo para avaliar a situação e distribuição da dirofilariose em vários distritos do país, dois dos quais, os distritos de Évora e Portalegre. Este estudo concluiu que nestes dois distritos de interesse, não se registaram infeções por *D. immitis*, nem por *D. repens*, tendo sido utilizados testes sorológicos e a técnica de Knott modificada (Alho A. , 2017).

Noutros estudos da caracterização epidemiológica no país, foram focados outros distritos havendo, por isso, pouca informação relativamente à evolução da situação epidemiológica nos distritos de Évora e Portalegre.

3. Materiais e Métodos

Foi realizado um estudo, pela autora, entre fevereiro de 2022 e junho de 2022, sobre a deteção de microfilárias e consequentes parasitoses nos distritos de Évora e Portalegre com o objetivo de recolher e testar amostras sanguíneas de vários cães de diferentes regiões para deteção de microfilarémia e consequente observação para caracterização e identificação das espécies das microfilárias encontradas, com recurso a diferentes técnicas, visando também à análise das características dos hospedeiros definitivos.

3.1. Materiais

Para a realização deste estudo sobre a deteção de microfilárias, foram utilizadas amostras de sangue de 180 cães dos distritos de Évora e Portalegre, pois estas regiões apresentam um clima propício à atividade de mosquitos, pulgas e carraças, bem como grande abundância de locais que possibilitam a reprodução destes mesmos vetores, como grandes campos de vegetação, barragens, rios e ribeiros, sendo Portugal já, de modo geral, um país endémico em relação à dirofilariose.

As amostras de sangue foram recolhidas de diferentes pacientes por 6 entidades, tanto para a realização de outros exames sanguíneos, como hemogramas ou perfil bioquímico, bem como em pacientes em que inicialmente não seria realizada colheita, tendo esta sido feita em específico para a realização deste estudo. Desta forma, as amostras foram colhidas de animais com diferentes quadros sintomatológicos de diferentes naturezas, e também em animais aparentemente saudáveis, isto é, sem sinais clínicos aparentes.

Além destes CAMV, foram ainda contactadas outras entidades para colaboração neste estudo, não tendo sido possível, no entanto, obter amostras das mesmas.

As amostras foram colhidas de diferentes veias (jugular, cefálica e safena), entre os meses de fevereiro de 2022 e junho de 2022, em machos e fêmeas, com idades, raças, condição física, sintomatologia e estilos de vida diferentes.

As amostras foram todas colocadas em tubos de EDTA ou heparina de 1ml. Algumas amostras foram fornecidas por clínicas veterinárias destes distritos, e outras

foram colhidas de cães aparentemente saudáveis, na ESAE e no Canil de Campo Maior, ou seja, que não apresentavam quaisquer sinais clínicos.

Os tubos das amostras foram identificados, pelas clínicas onde foi realizada a colheita, com número interno do animal nas suas bases de dados, ou nome do animal e nome do tutor.

A manipulação destas amostras foi diferente consoante a sua origem, no entanto, todas foram refrigeradas desde o momento da sua colheita até ao momento da sua testagem, tendo sido mantidas, sempre que possível, em posição vertical. Porém, nalguns casos o transporte foi realizado à temperatura ambiental e sem suporte para os tubos. As amostras em que foram detetadas microfilárias, foram, após a realização das técnicas de deteção e observação das mesmas, congeladas para realizar, depois, a técnica de PCR.

Foram excluídas do estudo, todas as amostras que apresentavam coágulos que impedissem a sua testagem, bem como amostras cujo período entre a sua colheita e a sua testagem era muito extenso e que impedisse, por isso, a correta visualização das mesmas, tendo sido colocado um limite de 3 semanas após o momento da colheita. Foram também excluídas do estudo todas as amostras que não apresentavam volume de sangue suficiente para a realização das 3 técnicas de visualização de microfilárias, tendo sido o volume mínimo utilizado 0.25ml de amostra. Foram, porém, incluídas todas as amostras nas quais a visualização e interpretação do campo visual no MO não se mostravam comprometidas, ou seja, em que ainda seria possível visualizar microfilárias, mesmo que com pouca atividade das mesmas.

Foram testados 91 cães do Hospital Veterinário Muralha de Évora, 14 de Reguengos de Monsaraz, 9 do Centro Idoso Animal, 14 do Canil de Campo Maior, 21 da CLILEGRE – Hospital Veterinário de Portalegre, e 31 de Elvas, recolhidos em consultas no CAVE e aulas de Cuidados de Higiene e Estética Animal.

Os tutores foram previamente questionados para autorização do uso das amostras dos seus animais, tendo sido utilizadas apenas amostras de animais cujos tutores aceitaram participar no estudo. Os resultados destas observações foram disponibilizados aos CAMV que forneceram amostras para o estudo, disponibilizando-os seguidamente aos tutores. Nos casos dados como positivos, ou seja, em que foram detetadas microfilárias, os tutores foram alertados e aconselhados para realizar o

tratamento dos animais. Foram também pedidas amostras de animais coabitantes dos casos positivos para testagem destes.

3.2. Métodos

Foram realizadas 3 técnicas diferentes para a detecção e identificação de microfilárias em todas as amostras obtidas e utilizadas no estudo: Técnica de gota a fresco, esfregaço sanguíneo com recurso à coloração Diff-Quick e técnica de Knott modificada.

Para a técnica de gota fresca, para além das amostras de sangue, foram utilizadas lâminas, lamelas e pipetas. Para cada amostra foi colocada uma gota de sangue numa lâmina com o auxílio de uma pipeta, colocando de seguida a lamela por cima, de forma que a gota se espalhasse pela extensão desta, tendo em atenção o volume da gota, para que seja possível uma boa visualização dos eritrócitos e estes não se apresentem muito sobrepostos, e o tempo entre a deposição da gota e a colocação da lamela, para evitar que esta coagulasse. Por fim, as amostras foram observadas ao MO para detecção de movimento entre os eritrócitos que pudesse evidenciar atividade dos filarídeos. A figura 1 é um exemplo dos resultados obtidos através desta técnica.

Para a realização do esfregaço sanguíneo, para cada amostra de sangue foram necessárias duas lâminas e uma pipeta. Neste caso, a gota da amostra foi colocada numa das pontas mais distais da lâmina, ao invés de colocar no centro da mesma, como feito na técnica de gota fresca. Seguidamente, com o auxílio da segunda lâmina, colocada a um ângulo de 45° em relação à primeira lâmina, a gota é arrastada ao longo desta, para haver menor sobreposição de células e facilitar a visualização das larvas. Tal como na gota fresca, é necessário ter atenção ao volume da gota para evitar muita sobreposição de células, bem como atenção ao tempo em que a gota pode coagular. Após a realização do esfregaço, as amostras foram deixadas em posição horizontal, à temperatura ambiente para secar. Depois deste processo, cada amostra citológica foi submersa em 3 substâncias que compõem a coloração Diff-Quick, passando primeiro pelo metanol, ou seja, o fixador, durante 1 minuto, depois pela solução acidófila 3 vezes durante períodos de 3 segundos, e por fim, pela solução basófila, mergulhando a amostra 3 vezes durante 2 segundos. Por fim, cada amostra foi colocada debaixo de água corrente com baixa intensidade, para retirar o excesso de corante, tendo em atenção para a água não

contactar diretamente com a superfície em que se encontravam as células sanguíneas. Assim, após a lâmina secar era, por fim, possível observar ao MO. Na figura 2 observa-se uma microfilária após a realização desta técnica.

Para a técnica de Knott, para cada amostra, foi utilizado um tubo de 5ml, no qual foi colocado 0.5ml de sangue e 4.5ml de formalina a 2%. Nos casos em que o volume da amostra presente era inferior a 0.5ml, foram utilizados 0.25ml de sangue e 2.25ml de formalina a 2%. Seguidamente, cada tubo foi agitado e centrifugado a 1500rpm durante 8 minutos. Após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante e foram colocadas 2 gotas de uma solução basófila no sedimento. Deste sedimento foi retirada uma gota e colocada numa lâmina. Por fim, foi colocada uma lamela e visualizado ao MO. Nos casos positivos, observaram-se campos visuais no MO como na figura 3.

Foram excluídas todas as lâminas cuja amostra era de difícil visualização e interpretação, realizando a técnica em causa novamente, nos casos em que se criaram bolhas de ar muito grandes entre a lâmina e a lamela, esta era descartada e repetida, tal como nos casos em que o esfregaço não fixasse na totalidade à lâmina, saindo, por isso, parte desta amostra, sendo impossível a sua visualização. Assim, todas as amostras cuja visualização foi possível sem qualquer obstáculo, foram incluídas sem realizar repetição das mesmas.

Foram utilizadas apenas amostras cujo período entre a colheita e a sua examinação não superava as 4 semanas, tendo estas estado sempre devidamente refrigeradas, preferindo amostras até 2 semanas, pois a motilidade das microfilárias continua bem visível.

Após a realização destas técnicas, as amostras de sangue dos animais que apresentaram microfilariemia e dos animais com resultados duvidosos foram guardadas e congeladas para realizar PCR, com o objetivo de identificar corretamente a espécie em causa, cujo protocolo se encontra no anexo I.

Foram ainda realizados alguns testes rápidos SNAP 4DX da IDEXX, sendo este um teste sorológico ELISA com 98% de sensibilidade e 100% de especificidade para a *Dirofilaria immitis*, segundo a IDEXX (IDEXX, 2022).

4. Resultados

Do total de 180 animais cujas amostras de sangue foram examinadas, foram detetadas microfíliarias através das técnicas de observação ao MO nas amostras de 9 animais, o que equivale a 5% da população total testada, estes foram então dados como positivos. Na figura 4 apresenta-se uma representação gráfica desta população.

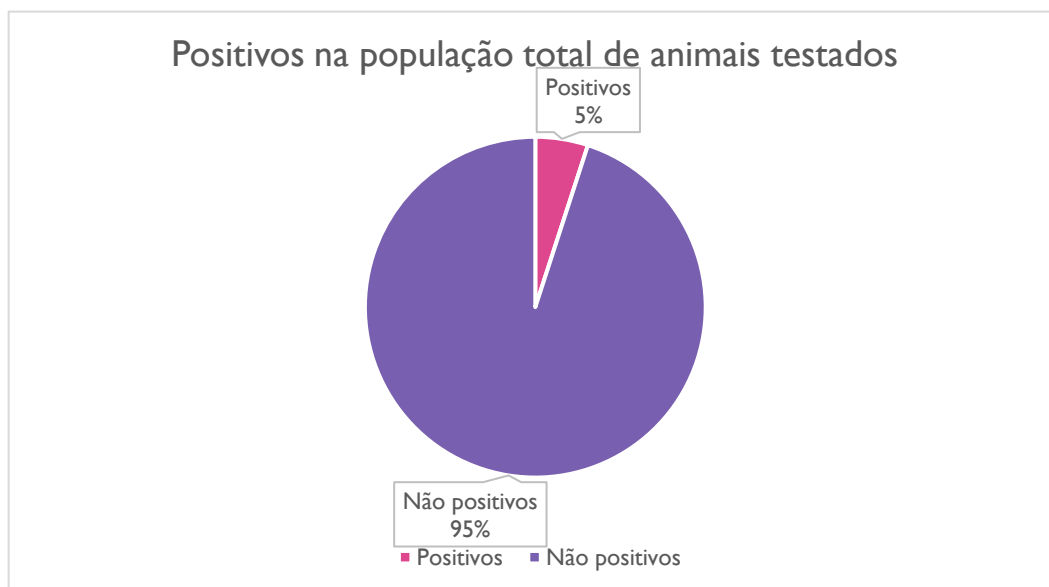


Figura 4 - Representação gráfica dos animais positivos dentro da população total de animais testados

Relativamente ao género dos animais dados como positivos, um total de 7 eram machos e 2 eram fêmeas, o que equivale a 78% e 22% to total de positivos, respetivamente, que se encontra representado na figura 5.

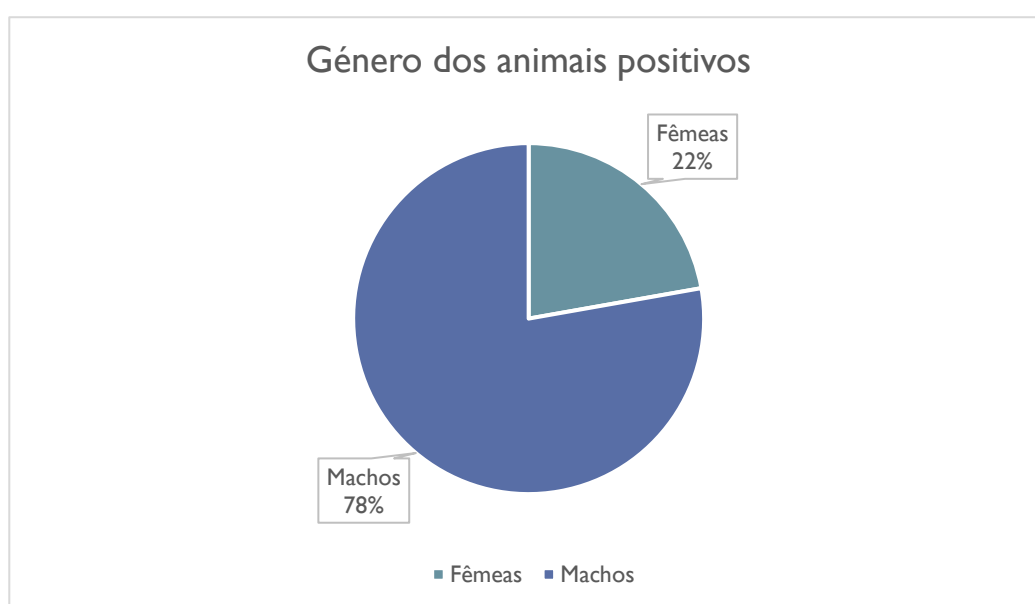


Figura 5 - Representação gráfica do número de machos e fêmeas do conjunto de animais positivos

Por habitarem em diferentes regiões, foi importante analisar a distribuição geográfica destes animais, sendo que dos animais dados como positivos, 2 residiam no distrito de Évora, e os restantes 7 no distrito de Portalegre. Do distrito de Portalegre, 3 destes animais realizam frequentemente viagens para outros distritos. Estes dados verificam-se representados pela figura 6.

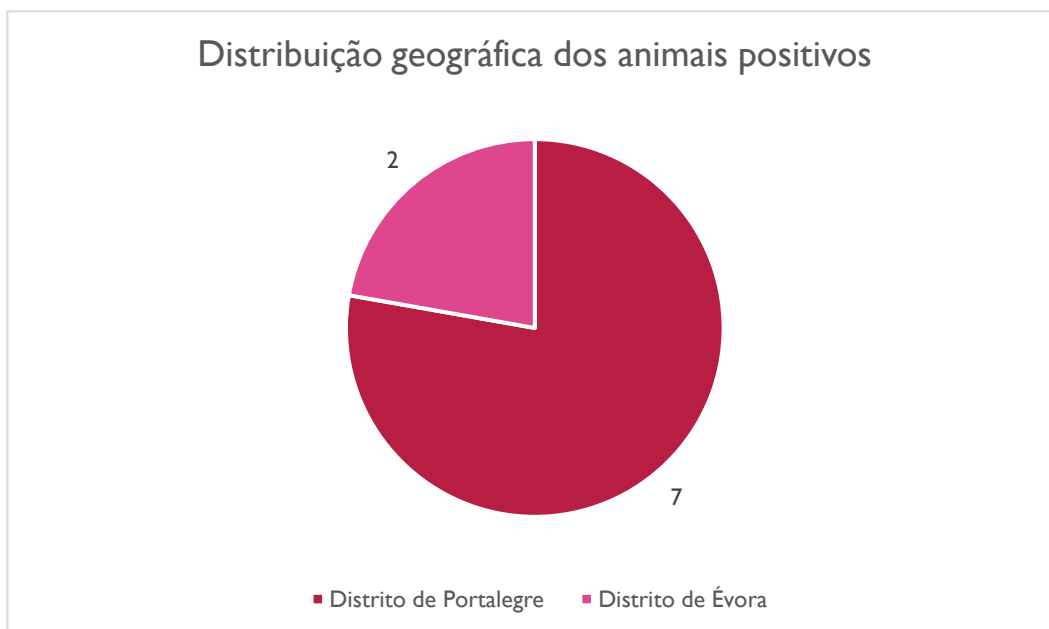


Figura 6 - Representação gráfica da distribuição geográfica dos animais positivos

Quando analisadas as idades, verificou-se que 4 destes animais tinham até 3 anos de idade, 1 entre os 4 e os 6 anos e 4 tinham a idade compreendida entre os 7 e os 9 anos, tal como é possível observar na figura 7.



Figura 7 - Representação gráfica dos intervalos de idade dos animais positivos

Ao comparar os dados relativamente aos portes dos animais, verificou-se que dos 9 animais positivos, 3 foram de porte pequeno, 2 de porte médio, 2 de porte grande e 2 de porte gigante. Estes dados encontram-se visualmente representados na figura 8.

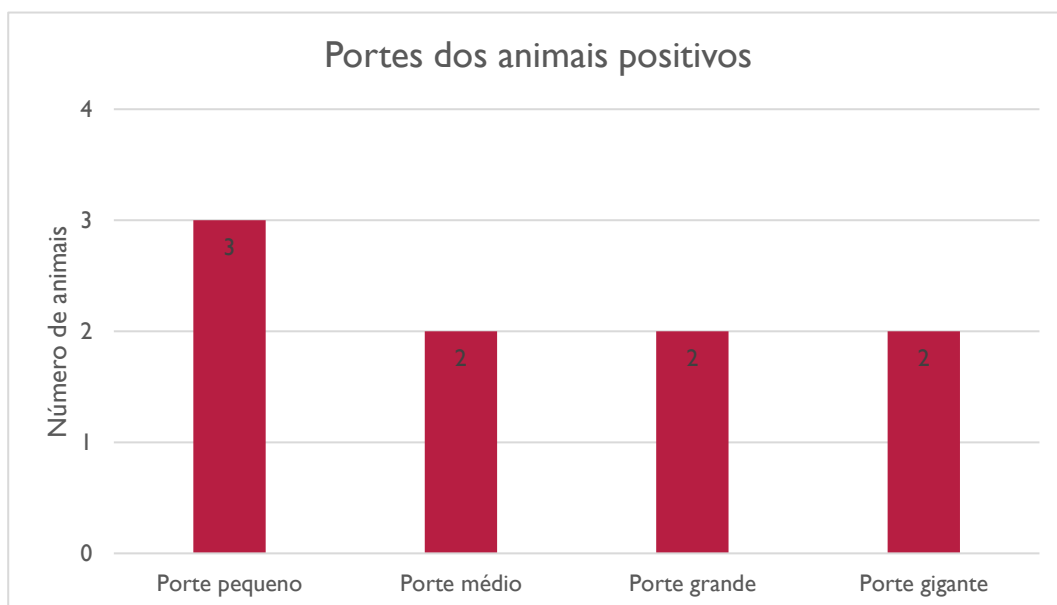


Figura 8 - Representação gráfica dos portes dos animais positivos

Foram também recolhidos dados destes 9 animais positivos, em relação à presença de sinais clínicos, sendo que, como é possível observar na figura 9, 5 não apresentavam qualquer sinal clínico aparente, porém 4 apresentavam um ou mais sinais clínicos, de diferentes naturezas, como dispneia, prostração, perda de condição corporal, taquipneia, anemia ligeira e efusão pericárdica e pleural, entre outros de menor importância.

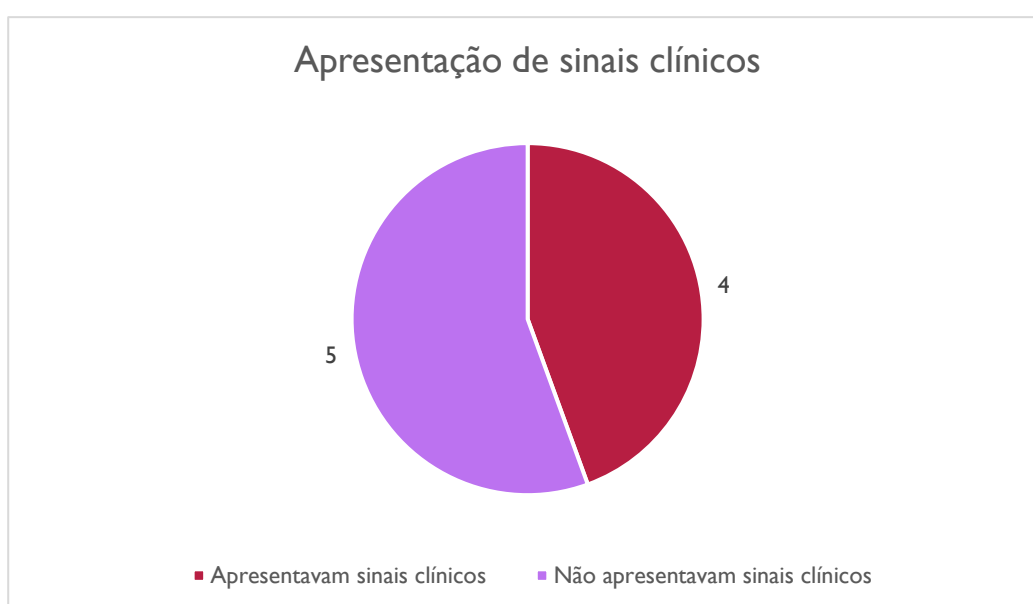


Figura 9 - Representação gráfica da apresentação de sinais clínicos dos animais positivos

Destas 9 amostras, 7 foram recolhidas apenas para contribuição neste estudo, ou seja, sem qualquer outro objetivo clínico, sendo que 3 destes animais estiveram presentes em consulta, porém sem necessidade de exames sanguíneos, e 4 foram recolhidos fora de contexto clínico. Apenas 2 destas 9 amostras foram colhidas para realizar outros procedimentos, sendo depois utilizadas para este estudo. Estes dados encontram-se apresentados na figura 10.

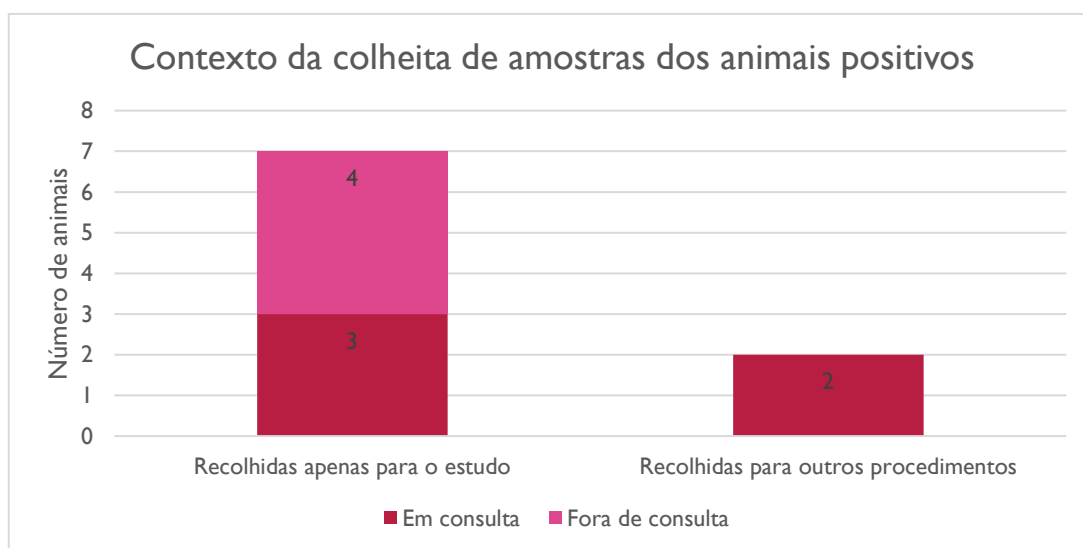


Figura 10 - Representação gráfica do contexto em que foram realizadas as colheitas de amostras de sangue dos animais positivos

Relativamente ao estilo de vida destes animais, foi importante analisar o tempo que estes passam dentro ou fora de casa, ou seja, mais expostos aos vetores, concluindo-se que 4 destes animais passam mais tempo fora de casa, e 5 habitam dentro de casa, estando menos expostos aos vetores.

Foram realizados testes rápidos SNAP 4DX a 3 indivíduos, entre os quais 2 apresentavam microfírias nas 3 técnicas realizadas com visualização ao MO, e 1 indivíduo suspeito, porém que não apresentou microfírias em nenhuma das técnicas. Destes, o teste rápido do indivíduo suspeito apresentou resultado negativo à Dirofilariose, e ambos os testes rápidos dos indivíduos em que foram encontradas microfírias nas amostras sanguíneas apresentaram resultado positivo à Dirofilariose.

Foram realizados PCR e eletroforese a todos os animais dados como positivos e ao coabitante de um dos positivos, ou seja, a um total de 10 animais, tendo sido os resultados os seguintes: em 6 animais o tamanho da banda que representa a quantidade de pares-base coincidiu com o tamanho da banda do controlo de *D. immitis*, em 1 dos animais o tamanho da banda coincidiu com o controlo de *A. dracunculoides*, em 1 das

amostras não ocorreu amplificação apesar de haver microfilarémia, em 1 das amostras o resultado é pouco perceptível e por fim, o coabitante não apresentou banda na eletroforese, que juntamente com a ausência de microfilarémia se pode assumir como não infetado. As imagens seguintes mostram os resultados obtidos na eletroforese, nestas os controlos são apresentados pelas últimas 2 bandas de cada imagem representadas pelas figuras 11 e 12, sendo a primeira de *D. immitis* e a segunda de *A. dracunculoides*.

Na figura 11 é possível verificar que um dos resultados apresenta pouca fluorescência, sendo de difícil percepção, originando um resultado duvidoso, o que também acontece com uma das amostras na figura 12, porém neste caso não há qualquer fluorescência, originando um falso negativo.

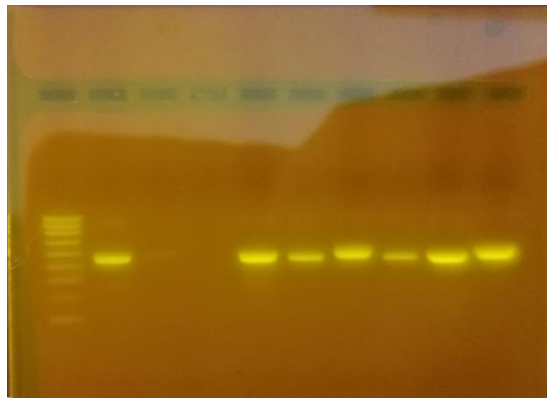


Figura 11 - Eletroforese de 7 indivíduos (fotografia da autora)

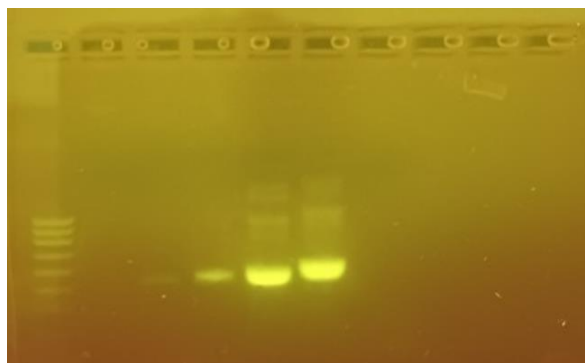


Figura 12 - Eletroforese de 3 indivíduos (fotografia da autora)

Em relação à caracterização morfológica das microfíliarias detetadas nas técnicas de gota fresca, esfregaço sanguíneo e técnica de Knott modificada, foram facilmente detetáveis diferenças, especialmente na grossura do corpo da larva e forma da cabeça. Porém não foi fácil a distinção entre estes parasitas relativamente aos seus padrões de motilidade.

5. Discussão

Com o objetivo de apurar a distribuição de animais infetados por filarídeos nos distritos de Évora e Portalegre, observou-se uma incidência de apenas 5% numa população de 180 amostras. Apesar de baixa, esta incidência apresenta-se mais elevada do que a apurada em 2014 nestes mesmos distritos, em que não tinha sido detetado qualquer cão infetado por estes parasitas (Alho A. , 2017). Foi ainda possível identificar maior quantidade de animais infetados no distrito de Portalegre, perfazendo 78% dos animais positivos. Esta diferença é significativa, visto que mais de metade das amostras analisadas foram de cães habitantes no distrito de Évora, porém, isto pode justificar-se também por estas amostras se centrarem apenas em 2 zonas do distrito, sendo que as amostras provenientes do distrito de Portalegre foram recolhidas de vários pontos em locais afastados.

Observou-se uma maior e significativa prevalência em machos, o que coincide com alguns estudos realizados por outros autores (Pereira, 2010).

Dos animais dados como positivos em Elvas, 3 destes são cães de alunos da ESAE, sendo que todos se deslocam com frequência entre vários distritos do país com maior prevalência de dirofilariose, mais concretamente nos distritos de Lisboa, Setúbal e Faro, o que pode justificar a infeção destes animais, colocando em risco os habitantes da localidade de Elvas. Assim, esta pode ser uma justificação do aumento de casos positivos nesta mesma localidade, pois grande parte da população de animais viaja frequentemente, o que segundo a AHS é um fator que influencia o aumento de casos de dirofilariose (AHS, 2020).

Observou-se maior incidência em animais com as idades compreendidas entre 1 e 3 anos e entre 7 e 9 anos, sendo descrito por outros autores que a prevalência é superior em animais com idade a partir dos 3 anos (Meireles, Paulos, & Serrão, 2014). Isto significa que estas infeções podem iniciar-se nos primeiros anos de vida e prolongar-se caso não seja feita a terapêutica adequada, ou podem mesmo iniciar-se em animais mais velhos.

Não foi possível identificar se existe relação entre o porte do animal e a sua predisposição para ser infetado por estes parasitas filarídeos, pois a diferença destes números não foi significativa.

Dentro dos 9 animais em que foi observada microfilarémia, apenas 4 mostraram ter sinais clínicos, dentro dos quais se verificaram dispneia, prostração, perda de condição corporal, taquipneia, anemia ligeira e efusão pericárdica e pleural, que coincidem com sinais clínicos provocados por estas parasitoses (Gallego et al., 2012; Jacobs et al., 2016; Muñoz et al., 2020), comprovando que nem todos os animais infetados apresentam sinais clínicos evidentes para se suspeitar de infeção. Além disso, o animal com maior carga parasitária estava no grupo de animais que não apresentava qualquer tipo de quadro sintomatológico, comprovando também que não há relação entre a carga parasitária e a gravidade do quadro clínico.

Dos 9 animais infetados, apenas 2 foram sujeitos a uma colheita de sangue para realização de outros procedimentos, o que significa que em 7 destes animais a infeção apenas foi detetada por participarem neste estudo, caso contrário as suas infeções seriam desconhecidas. Sendo, por isto, importante a realização de testes de rotina, para a deteção precoce destas parasitoses e respetivo tratamento (AHS, 2020).

Os testes rápidos SNAP 4DX da IDEXX, num dos animais apresentou o resultado imediatamente positivo, porém, para outro animal, apenas numa segunda repetição foi possível identificar um resultado positivo. A amostra deste mesmo animal, na eletroforese apresentou-se positivo a *D. immitis*, o que indica que o primeiro teste rápido apresentou um resultado falso negativo, podendo ser justificado pela sensibilidade do teste, pois apesar de ter 98% de sensibilidade, ainda é possível a existência de falsos negativos por 2%. Por este ter sido manipulado da mesma forma e utilizada a mesma amostra de sangue, é pouco provável que o resultado falso negativo se justifique neste aspeto.

Na técnica de gota fresca, foi perceptível o movimento das microfilárias, porém se estas apresentassem baixa motilidade, devido ao tempo entre a colheita da amostra e a sua análise ser muito elevado, era de difícil observação, o que pode levar a resultados falso negativos. Esta motilidade reduzida pode ainda estar relacionada com a espécie em questão, pois estas têm diferentes padrões de movimento (Brito et al., 2001).

No esfregaço sanguíneo com coloração Diff-Quick, a observação destes parasitas mostrou-se mais fácil devido à sua coloração azul. Sendo este corante responsável por corar os componentes ácidos das amostras, significa isto que o corpo das microfilárias

têm pH ácido. Nesta técnica as microfilárias apresentaram-se muitas vezes enroladas, sendo difícil ter percepção do seu tamanho para identificação.

Na técnica de Knott, esta visualização foi mais fácil, pois as microfilárias apresentaram-se esticadas, com menor quantidade de células e em maior concentração. Porém, num dos animais positivos foi necessário observar a amostra resultante desta técnica duas vezes, utilizando outra gota da mesma amostra já centrifugada e corada, pois já tinham sido detetadas microfilárias nas técnicas anteriores, o que não se verificou nesta técnica na sua primeira observação.

No PCR, apesar da alta sensibilidade (cerca de 95%), registaram-se dois resultados inconclusivos, sendo que num dos casos acredita-se não ter ocorrido amplificação do ADN e noutro caso apesar de ter sido amplificado, foi de difícil percepção na eletroforese, o que indica a importância da repetição de testagens nas amostras, caso o resultado apresentado seja inconclusivo ou suspeito, sendo necessário também uma relação com sinais clínicos, caso o animal os apresente.

6. Conclusões

Os objetivos propostos foram atingidos, tendo sido possível fazer uma pequena distribuição geográfica dos casos positivos do estudo, os animais que apresentaram microfilarémia foram caracterizados e foram detetados casos assintomáticos nestes distritos. Foram encontradas vantagens e desvantagens em cada técnica utilizada, e foi possível a identificação das espécies de microfilárias presentes nas amostras.

Nos distritos de Évora e Portalegre existe uma incidência crescente de animais infetados por parasitas filarídeos.

No distrito de Portalegre, mais concretamente na localidade de Elvas, este aumento de casos pode ser justificado por infeções subclínicas de animais que habitam também em outras zonas mais endémicas, como o caso dos animais dos alunos que habitam em outras cidades, o que coloca em risco todos os animais das localidades envolvidas.

Os tutores de animais que realizam várias viagens na companhia destes, devem ser alertados para os perigos de movimentar um animal potencialmente infetado. Assim, devem ser aconselhados a realizar testes rápidos ou testes laboratoriais para garantir que este não tem uma infeção subclínica, o que seria um risco para outros animais.

É importante alertar os tutores para o risco que estes parasitas colocam à saúde dos seus animais, pois os casos subclínicos podem ser justificados pela falta de realização de testes e exames de rotina, e pela profilaxia inadequada a estes parasitas.

Deve iniciar-se um protocolo profilático nos animais o quanto antes, de forma a possibilitar que estes não sejam infetados, impedindo assim não só riscos de saúde para o animal em causa, mas também para evitar que este sirva como reservatório, aumentando a propagação destas infeções causadas por estes parasitas.

As técnicas laboratoriais utilizadas apresentaram diferentes graus de fiabilidade para a deteção, e de utilidade para a caracterização das microfilárias. Na técnica de gota fresca, era possível observar o tipo de movimentos que as microfilárias realizavam, o que por vezes era impossibilitado pela sobreposição de células sanguíneas e pelo período de tempo entre a colheita e a observação ser elevado. Na técnica de esfregaço sanguíneo, estas eram facilmente detetáveis por se apresentarem coradas com uma cor

diferente da maioria dos outros componentes da citologia. Já na técnica de Knott modificada, as microfilárias apresentavam-se coradas da mesma cor que o resto da lâmina, porém a caracterização morfológica era mais facilmente observada.

Nenhuma das técnicas apresentadas é totalmente fiável para a deteção de microfilárias, podendo sempre ocorrer resultados falso negativos. Assim, deve ser realizada sempre mais que uma técnica para o aumento da fiabilidade dos resultados, sendo ainda uma mais-valia a repetição destes testes mesmo sendo da mesma amostra. Além disso, cada técnica apresenta vantagens diferentes em relação à observação e identificação das microfilárias. Já as técnicas sorológicas e moleculares mostram-se mais úteis para a correta identificação das espécies causantes da infeção, sendo fundamental a realização de técnicas sorológicas para a deteção de infeções amicrofilarémicas.

A identificação das microfilárias e correto diagnóstico é fundamental para a saúde e bem-estar do animal, pois as diferentes espécies de filarídeos apresentam diferentes riscos para a saúde do animal, bem como diferentes tratamentos.

7. Bibliografia

- AHS - American Heartworm Society. (2020). *Current Canine Guidelines for the Prevention, Diagnosis, and Management of Heartworm (Dirofilaria immitis) Infection in Dogs*. Consultado a 27 maio, 2022, em https://d3ft8sckhnqim2.cloudfront.net/images/pdf/AHS_Canine_Guidelines_11_13_20.pdf?1605556516
- Alho, A. (2017). *Dirofilaria immitis* and *Angiostrongylus vasorum* : epidemiology and impact of major heartworms in carnivores in Portugal. *Tese de Doutoramento*. Consultado em <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/13975>
- Alho, A., Nunes, T., Rinaldi, L., Meireles, J., Belo, S., Deplazes, P., & Carvalho, L. M. (2014, abril). Transmission risk of Dirofilariasis in Portugal. *Parasites & Vectors*(7). doi:10.1186/1756-3305-7-S1-O16
- Beck, S., Schreiber, C., Schein, E., Krücken, J., Baldermann, C., Pachnicke, S., et al. (2014). Tick infestation and prophylaxis of dogs in northeastern Germany: A prospective study. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 5(3), pp. 336-342. doi:10.1016/j.ttbdis.2013.12.009
- Brianti, E., Gaglio, G., Napoli, E., Giannetto, S., Dantas-Torres, F., Bain, O., & Otranto, D. (2012). New insights into the ecology and biology of *Acanthocheilonema reconditum* (Grassi, 1889) causing canine subcutaneous filariasis. *Parasitology*, 139(4), pp. 530-536. doi:10.1017/S0031182011002198
- Brito, A. C., Vila-Nova, M. C., Rocha, D. A., Costa, L. G., Almeida, W. A., Viana, L. S., et al. (2001). Prevalência da filariose canina causada por *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum* em Maceió, Alagoas, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 17(6). doi:10.1590/S0102-311X2001000600021
- CVBD Canine Vector - Borne Diseases. (2020). *Mosquito Borne Diseases | Heartworm Disease*. Consultado a 3 junho, 2022, em <https://cvbd.elanco.com/diseases/mosquito-borne-diseases/heartworm-disease>
- DGAV. (2019, dezembro). Resumo das características do medicamento - Guardian SR 3,4 mg/ml pó e solvente para suspensão injetável para cães.
- Engelmann, A. M., Schafer, A. S., Lhamas, C. L., Dornelles, G. L., Cargnelutti, J. F., Ramos, R. A., et al. (2018). Morphological and molecular identification of *Acanthocheilonema reconditum* in a canine. *Comparative Clinical Pathology*, 28, pp. 271-274. doi:10.1007/s00580-018-2859-2
- ESCCAP - European Scientific Counsel Companion Animal Parasites. (2019). *Guidelines 5 - Control of Vector-Borne Diseases in Dogs and Cats*. Consultado a 6 junho, 2022, em Web site da ESCCAP: https://www.esccap.org/uploads/docs/yhwdhifq_0775_ESCCAP_Guideline_GL5_v10_1.p.pdf

- ESCCAP - European Scientific Counsel Companion Animal Parasites. (2021, maio). *Guidelines 1 - Worm Control in Dogs and Cats*. Consultado a 6 junho, 2022, em Web site da ESCCAP: https://www.esccap.org/uploads/docs/oc1bt50t_0778_ESCCAP_GLI_v15_1p.pdf
- ESCCAP - European Scientific Counsel Companion Animal Parasites. (n.d.). *Endoparasites - Nematodes - Subcutaneous Worms - Dirofilaria repens*. Consultado a 6 junho, 2022, em Web site da ESCCAP: <https://www.esccap.org/parasites/Endoparasites/1/#c13>
- Furtado, A. P., Melo, F. T., Giese, E. G., & Santos, J. N. (2010). Morphological Redescription of *Dirofilaria immitis*. *Journal of Parasitology*, 96(3), pp. 499-504.
- Gallego, L. S., Breitschwerdt, E. B., Corrales, G. M., Baneth, G., Maggi, R. G., Moreno, R. M., et al. (2012). *Enfermedades Vectoriales del Perro y el Gato*. Madrid: Acalanthis.
- Genchi, C., Rinaldi, L., Mortarino, M., Genchi, M., & Cringoli, G. (2009). Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Veterinary Parasitology*, 163(4), pp. 286-292. doi:10.1016/j.vetpar.2009.03.026
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Analysis of DNA by Agarose Gel Electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(1), pp. 6-15. doi:10.1101/pdb.top100388
- Henneberry, M. O., Engel, G., & Grayhack, J. T. (1979). Acid Phosphatase. *The Urologic Clinics of North America*, 6(3), pp. 629-641. doi:10.1016/S0094-0143(21)01218-0
- Iddawela, D., Ehambaram, K., & Wickramasinghe, S. (2015, novembro 14). Human ocular dirofilariosis due to *Dirofilaria repens* in Sri Lanka. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8(12), pp. 1022-1026. doi:10.1016/j.apjtm.2015.11.010
- IDEXX. (2022). Consultado em SNAP 4Dx Plus Test - Test accuracy: <https://www.idexx.com/files/snap-4dx-plus-test-accuracy.pdf>
- Jacobs, D., Fox, M., Gibbons, L., & Hermosilla, C. (2016). *Principles of Veterinary Parasitology*. West Sussex, Reino Unido: Wiley-Blackwell.
- Kittleston, M. D. (2016). *Overview of Heart Disease and Heart Failure*. Consultado a 6 junho, 2022, em MSD MANUAL: Veterinary Manual: <https://www.msdsvetmanual.com/circulatory-system/heart-disease-and-heart-failure/overview-of-heart-disease-and-heart-failure>
- Lee, S.-E., Song, K.-H., Liu, J., Kim, M.-C., Park, B.-K., Cho, K.-W., et al. (2004). Comparison of the Acid-phosphatase Staining and Polymerase Chain Reaction for Detection of *Dirofilaria repens* Infection in Dogs in Korea. *Journal of Veterinary Medical Science*, 66(9), pp. 1087-1089. doi:10.1292/jvms.66.1087
- Leite, L. C., Luz, E., Cirio, S. M., Leite, M. C., Molinari, H., Zadorosnei, A. C., et al. (2012). Infecção de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*, Linnaeus, 1758) da região metropolitana de Guaratuba, Paraná, Brasil por microfilárias circulantes de *Acanthocheilonema reconditum* (Grassi, 1899). *Semina: Ciências Agrárias*, 33(3), pp. 1149-1156. doi: 10.5433/1679-0359.2012v33n3p1149
- Mahmud, R., Lim, Y. A., & Amir, A. (2017). *Medical Parasitology: A Textbook*. Cham, Suíça: Springer. doi:10.1007/978-3-319-68795-7

- Maki, J., & Yanagisawa, T. (1980). Acid phosphatase activity demonstrated in the nematodes, *Dirofilaria immitis* and *Angiostrongylus cantonensis* with special reference to the characters and distribution. *Parasitology*, *80*(1), pp. 23-38. doi:10.1017/s003118200000482
- Mallawaarachchi, S., Premalal, G. V., Wimalana, K. W., Liyanage, A. S., Samarasinghe, S., & Nanayakkara, N. D. (2013). Detection of microfilariae in peripheral blood smears using image analysis. *8th International Conference on Industrial and Information Systems*, pp. 300-303. doi:10.1109/iciinfs.2013.6731999
- Marchiondo, A. A., Cruthers, L. R., & Reinemeyer, C. R. (2019). *Parasiticide Screening*. Elsevier.
- Matějů, J., Chanová, M., Modrý, D., Mitková, B., Hrazdilová, K., Žampachová, V., & Kolářová, L. (2016, abril 19). *Dirofilaria repens*: emergence of autochthonous human infections in the Czech Republic (case reports). *BMC Infectious Diseases*, *16*(171).
- Meireles, J., Paulos, F., & Serrão, I. (2014). *Dirofilariose canina e felina*. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, *109*, pp. 70-78.
- Merta, L., Pinkr, T., & Janstová, V. (2020). A Hands-On Set for Understanding DNA Replication, Transcription & Polymerase Chain Reaction (PCR). *The American Biology Teacher*, *82*(1), pp. 49-51. doi:10.1525/abt.2020.82.1.49
- Mullen, G. R., & Durden, L. A. (2019). *Medical and Veterinary Entomology* (3^a ed.). Elsevier.
- Muñoz, C., González, M., Rojas, A., Martínez-Carrasco, C., Baneth, G., Berriatua, E., & Ortiz, J. (2020). Massive microfilaremia in a dog subclinically infected with *Acanthocheilonema dracunculoides*. *Parasitology International*. doi:10.1016/j.parint.2020.102070
- Napoli, E., Brianti, E., Falsone, L., Gaglio, G., Foit, S., Abramo, F., et al. (2014). Development of *Acanthocheilonema reconditum* (Spirurida, Onchocercidae) in the cat flea *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera, Pulicidae). *Parasitology*, *141*(13), pp. 1718-1725. doi:10.1017/s0031182014001000
- Ortega-Mora, L. M., Gomez-Bautista, M., & Rojo-Vazquez, F. A. (1989). The acid phosphatase activity and morphological characteristics of *Dipetalonema dracunculoides* (cobbold, 1870) microfilariae. *Veterinary Parasitology*, *33*(2), pp. 187-190. doi:10.1016/0304-4017(89)90066-6
- Pękcacz, M., Basańaj, K., Kalinowska, A., Klockiewicz, M., Stopka, D., Baška, P., et al. (2022, fevereiro 10). Selection of new diagnostic markers for *Dirofilaria repens* infections with the use of phage display technology. *Scientific Reports*, *12*.
- Pereira, S. R. (2010, abril). Estudo transversal de dirofilariose canina na região da Madeira, Portugal. *Relatório Final de Estágio*.
- Prioleau, W. H., Parker, E. E., Bradham, R. R., & Georgie, H. B. (1976, maio). *Dirofilaria immitis* (Dog Heartworm) as a Pulmonary Lesion in Humans. *The Annals of Thoracic Surgery*, *21*(5).
- Rishniw, M., Barr, S. C., Simpson, K. W., Frongillo, M. F., Franz, M., Luis, J., & Alpizar, D. (2006). Discrimination between six species of canine microfilariae by a single

polymerase chain reaction. *Veterinary Parasitology*, 135(3-4), pp. 303-314.
doi:10.1016/j.vetpar.2005.10.013

Schwan, E. V., & Schroter, F. G. (2006). First record of *Acanthocheilonema dracunculoides* from domestic dogs in Namibia: short communication. *Journal of the South African Veterinary Association*, 77(4), pp. 220-221. doi:10.4102/jsava.v77i4.381

Singer, M. (1954, abril 12). The Staining of Basophilic Components. *Department of Zoology, Cornell University*, pp. 322-333.

Szatmári, V., van Leeuwen, M. W., Piek, C. J., & Venco, L. (2020). False positive antigen test for *Dirofilaria immitis* after heat treatment of the blood sample in a microfilaremic dog infected with *Acanthocheilonema dracunculoides*. *Parasites & Vectors*, 13(1).
doi:10.1186/s13071-020-04376-9

University of Liverpool. (2020, maio 20). *New vaccine project underway for heartworm disease in dogs*. Consultado em Web site da University of Liverpool:
<https://news.liverpool.ac.uk/2020/05/20/new-vaccine-project-underway-for-heartworm-disease-in-dogs/>

Anexo I



NZY Tissue gDNA Isolation kit

Catalogue numbers:

MB13502, 50 columns

MB13503, 200 columns

Description

NZY Tissue gDNA Isolation kits are designed for the simple and rapid small-scale preparation of highly pure genomic DNA from a variety of sample sources including animal cells and tissues, Gram-positive and Gram-negative bacteria, mouse tails, yeast, forensic samples and clinical samples. The method is spin column silica-based and requires no phenol or chloroform extraction. This kit uses optimized lysis buffers containing Proteinase K and SDS to release DNA from cells. After preparing the lysate, DNA is selectively absorbed into the NZYSpin Tissue Column and other impurities such as proteins and salts are removed during the washing steps. The eluted genomic DNA has a $A_{260}/_{280}$ ratio between 1.7 and 1.9 what makes it ready to use in applications like sequencing, PCR, multiplex-PCR, genotyping and a wide range of other enzymatic manipulations.

The NZY Tissue gDNA Isolation kit is optimized to isolate up to 35 μg of DNA from up to 25 mg of tissue samples or 10^7 cells. We suggest not using more than the recommended starting material to prevent reduction in yield and purity of DNA isolated. For samples with very high RNA and protein contents (e.g. liver or spleen tissues), use only up to 15 mg of the sample. This kit is suitable for isolation of DNA from human or animal blood.

Storage conditions and reagents preparation

All kit components can be stored at room temperature (20-25 °C) and are stable till the expiry date. Before use, add 1.35 mL (MB13502/3) of Proteinase buffer to each vial of Proteinase K and vortex. Proteinase K solution is stable at -20 °C for up to 6 months. Add 28 mL (MB13502) or 100 mL (MB13503) of ethanol (96-100%) to each bottle of buffer NW2. Buffers NL and NW1 contain guanidine hydrochloride. Wear gloves and goggles when using this kit.

System Components

Component	50 columns	200 columns
Buffer NT1	20 mL	80 mL
Buffer NL	15 mL	60 mL
Buffer NW1	30 mL	120 mL
Buffer NW2 (concentrate)	2 x 7 mL	2 x 25 mL
Buffer NE	15 mL	60 mL
Proteinase K (lyophilized)	30 mg	4 x 30 mg
Proteinase buffer	1.8 mL	7 mL
NZYSpin Tissue columns (light green ring)	50	200
Collection tubes (2 mL)	100	400

Standard protocol for isolating genomic DNA from animal tissues, cultured cells and bacteria cells

1. Sample preparation

Animal Tissues: Cut up to 25 mg tissue sample into small pieces, and place it in a microcentrifuge tube. Proceed with step 2.

Notes: Tissue samples can be ground under liquid nitrogen for more efficient lysis. For rodent tails, place one (for rat) or two (for mouse) 0.6 cm-long pieces in a 1.5 mL tube.

Cultured Cells: Re-suspend up to 10^7 cells in 200 μ L Buffer NT1. Add 25 μ L Proteinase K solution and 200 μ L Buffer NL*. Mix thoroughly by vortex, and incubate at 56 °C for 10-15 min. Vortex occasionally during incubation. Proceed with step 5.

*Mix Buffer NL thoroughly by shaking before use.

Bacteria Cells: Pellet up to 1 mL bacteria culture for 5 min at 8,000 xg. Discard supernatant. Re-suspend cell pellet in 180 μ L Buffer NT1 by pipetting up and down. Add 25 μ L Proteinase K solution and vortex vigorously. Incubate at 56 °C for 1-3 hours. Mix occasionally during incubation. Proceed with step 3.

For other sample sources see the support procedures available in <https://www.nzytech.com/products-services/kits-genomic-dna-purification/mb135/>.

2. Pre-lysis of sample

Add 180 μ L of Buffer NT1 and 25 μ L Proteinase K solution to the sample. Mix thoroughly by vortex. Incubate at 56 °C for 1-3 hours and vortex occasionally during incubation.

Note: *Samples that are difficult to lyse can be incubated overnight as well.*

3. Removal of RNA (optional)

If RNA-free DNA is required, add 10 μ L of RNase A (40 mg/mL) solution (not included, available as MB18701 – NZY RNase A, 100 mg) to each sample. Mix and incubate for 5 min at room temperature.

4. Lysis of sample

Vortex the sample. Add 200 μ L Buffer NL* to the sample, and mix by vortex for 10 seconds.

Notes: *If insoluble particles are visible, centrifuge for 5 min at full speed and transfer the supernatant to a new microcentrifuge tube. *Mix Buffer NL thoroughly by shaking before use.*

5. Addition of ethanol

Add 210 μ L of 100% ethanol to the sample and mix immediately by vortex.

6. DNA binding

Transfer the mixture from step 5 into a NZYSpin Tissue Column placed in a 2 mL collection tube. Centrifuge for 1 min at > 11,000 xg. Discard flow-through and place the column in a new collection tube.

7. Wash silica membrane

Add 500 μ L of Buffer NW1 to the column. Centrifuge for 1 min at > 11,000 xg. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.

Add 600 μ L of Buffer NW2 (make sure ethanol was previously added) to the column, and centrifuge for 1 min at > 11,000 xg. Discard flow-through.

Note: *For isolations of viral DNA from stool, we recommend to repeat the wash silica membrane step with Buffer NW2. Add more 600 μ L of Buffer NW2 to the column, and centrifuge for 1 min at > 11,000 xg. Discard flow-through.*

8. Dry silica membrane

Place the NZYSpin Tissue Column back into the collection tube and centrifuge for 2 min at > 11,000 xg.

9. Elute DNA

Place the column into a clean microcentrifuge tube and add 100 μ L of Buffer NE, TE buffer or sterile water (preheating of elution buffer to 70 °C may improve yield) directly in the membrane column. Incubate 1 min at room temperature and centrifuge at >11,000 xg for 2 min to elute DNA. The genomic DNA can be stored at 4 °C or -20 °C.

Data:

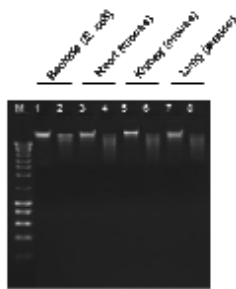


Fig. 1. Genomic DNA from various sources isolated with NZY Tissue gDNA Isolation kit. 0.25 µg of each isolated DNA was analysed on a 0.8% agarose gel. Lanes 2, 4, 6 and 8: gDNA digested with *EcoR* I. Lanes 1, 3, 5 and 7: undigested gDNA. M: NZYDNA Ladder III (MB0440); 1, 2: gDNA from bacteria (*E. coli*); 3, 4: gDNA from mouse heart; 5, 6: gDNA from mouse kidney; 7, 8: gDNA from mouse lung.

Quality control assay

Functional assay

All components of NZY Tissue gDNA Isolation kit are tested following the isolation protocol described above. The purification system must isolate 25-35 µg of gDNA/column.

V1901

Certificate of Analysis	
Test	Result
Functional assay	Pass

Approved by: 

Patricia Ponte
Senior Manager, Quality Systems

For research use only



Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal
Tel.: +351.213643514 Fax: +351.217151168
www.nzytech.com