

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E SAÚDE ANIMAL

LAYNASLAN ABREU SOARES

Prevalência e técnicas de diagnóstico de *Dirofilaria immitis* em cães no Sertão Paraibano

Patos/PB

2021

Laynaslan Abreu Soares

Prevalência e técnicas de diagnóstico de *Dirofilaria immitis* em cães no Sertão Paraibano

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Saúde Animal, da Universidade Federal de Campina
Grande (UFCG), como requisito parcial para obtenção do grau
de Mestre em Ciência e Saúde Animal

Orientador: Prof. Dr. Glauco José Nogueira de Galiza

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Lisanka Ângelo Maia

Patos/PB

2021

S676p

Soares, Laynaslan Abreu.

Prevalência e técnicas de diagnóstico de *dirofilaria immitis* em cães no sertão paraibano / Laynaslan Abreu Soares. – Patos, 2021. 46 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Saúde Animal) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2019.

"Orientação: Prof. Dr. Glauco José Nogueira de Galiza; Coorientação: Lisanka Ângelo Maia".

Referências.

1. Arritmia. 2. Detecção. 3. Eficácia. 4. Errante. 5. Zoonose. I. Galiza, Glauco José Nogueira de. II. Maia, Lisanka Ângelo III. Título.

CDU 636.09(043)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PÓS-GRADUACAO EM CIENCIA E SAUDE ANIMAL

Rua Aprígio Veloso, 882, - Bairro Universitário, Campina Grande/PB, CEP 58429-900

FOLHA DE ASSINATURA PARA TESES E DISSERTAÇÕES

LAYNASLAN ABREU SOARES

**PREVALÊNCIA E TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DE *D. IMMITIS* EM CÃES NO SERTÃO
PARAIBANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Saúde Animal.

Aprovada em: 18/02/2021

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Glauco José Nogueira de Galiza (Orientador - PPGCSA/UFCG)

Prof. Dr. Vinícius Longo Ribeiro Vilela (Examinador Interno - IFPB)

Prof. Dr. Arthur Willian de Lima Brasil (Examinador Externo - UFPB)



Documento assinado eletronicamente por **GLAUCO JOSE NOGUEIRA DE GALIZA, PROFESSOR(A) DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 18/02/2021, às 16:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamentono art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **Arthur Willian de Lima Brasil, Usuário Externo**, em 18/02/2021, às 17:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [PortariaSEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vinícius Longo Ribeiro Vilela, Usuário Externo**, em 18/02/2021, às 17:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [PortariaSEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufcg.edu.br/autenticidade>,informando o código verificador **1261673** e o código CRC **5385850A**.



Dedicatória

Com o coração cheio de saudade, aos meus queridos vovô Francisco (*in memorian*) e tio/padrinho Assis (*in memorian*), que sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram na realização dos meus sonhos!

Amo muito vocês!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado forças, coragem, saúde e discernimento em mais uma etapa importante de minha vida, por ter me guiado nas escolhas e por iluminar meu caminho até a finalização deste ciclo.

Aos meus pais, Maria do Céu e Stenio, por terem me apoiado, ajudado quando preciso e estarem sempre presentes. A minha irmã, avós e tios (as) por todos os momentos compartilhados, de carinho, atenção e incentivo. Amo todos vocês!

Ao meu vovô Francisco (*in memorian*) e ao meu tio/padrinho Assis (*in memorian*), dos quais eu amo muito e sinto uma saudade enorme. Queria tanto compartilhar este momento junto com vocês que sempre me incentivaram e apoiaram por toda a caminhada, mas sei que onde estiverem estarão sempre torcendo por mim e que nunca esquecerei!

As minhas amigadas, em especial, a Samara, Aline, Juliana e Francicarla que sempre estiveram presentes em momentos importantes e especiais durante esse ciclo. A Isabela, minha parceira acadêmica, que dividimos batalhas, desesperos, alegrias e risadas, muito obrigado pela paciência.

A minha orientadora, Professora Dra. Lisanka Ângelo Maia, por ter me orientado por todos esses anos, sempre com muita sabedoria e paciência, pelos momentos de alegria, correria e descontração, por todas as oportunidades conquistadas e presenteadas. Pela sua amizade, meu eterno obrigado! Também ao meu orientador Professor Dr. Glauco José Nogueira de Galiza pela oportunidade de realizar esse mestrado e pela disposição a me ajudar sempre quando preciso. Muito grato!

A todos os professores que contribuíram para minha formação e ensinaram da sua forma, em especial, ao Professor Vinicius, Thaís, Roseane e Antônio Flávio.

A toda equipe do Laboratório de Patologia Animal (LPA) do Instituto Federal da Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba (IFPB), Isabela, Hodias, Carol, Amanda, Diego, Mariana e Renault. A todos os pós-graduandos do Laboratório de Patologia Animal (LPA) da UFCG, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos que trabalhei durante o projeto que fizeram possível este trabalho, Isabela, Samara, Aline, Verinha, Hodias, Carol, Paula e Higor. A Suzana, pela parceria, vivência e conhecimentos passados. Ao Professor Dr. Arthur Brasil, por toda disposição e ajuda nos dados da estatística, que foi fundamental para realização deste trabalho. A Luana pela orientação e ajuda na realização da PCR das amostras. Gratidão a todos!

Ao IFPB e a UFCG, por disponibilizar os recursos e permitir a minha formação acadêmica. Ao CNPq por toda ajuda financeira, essencial para realização deste projeto.

Enfim, a todos aqueles que durante esses dois anos estiveram presentes em minha vida e me mostraram seu apoio.

Muito obrigado!

RESUMO

Dirofilaria immitis é um parasito zoonótico que acomete principalmente cães domésticos, e canídeos silvestres e ocasionalmente, outros mamíferos como gatos domésticos e seres humanos. Essa dissertação é composta por dois capítulos em forma de artigos científicos. No capítulo 1 objetivou-se determinar a prevalência e fatores associados à infecção por *D. immitis* em cães na cidade de Sousa, semiárido da Paraíba. Foram selecionados e avaliados 320 cães, sendo 160 domiciliados e 160 errantes, provenientes de 32 bairros da cidade de Sousa. Realizou-se o exame clínico, coleta de sangue e dados epidemiológicos de cada animal. Para pesquisa de microfilárias, foram realizados três métodos: esfregaço sanguíneo capilar (ESC), periférico (ESP) e teste de Knott-modificado (KM), associado ao diagnóstico morfométrico das microfilárias. Obteve-se prevalência de 17,5% (56/320) animais positivos para *D. immitis*, sendo 71,43% (40/56) errantes e 28,57% (16/56) domiciliados. Dos 32 bairros avaliados, em 24 foram encontrados cães positivos, sendo Angelim e Doutor Zezé, os bairros com maior percentual 1,56% (5/320) cada. As categorias de alterações cardíacas (*Odds ratio* 6,231 [IC 1.539-25.236]) e cães errantes (*Odds ratio* 2,463 [IC 1.281-4.735]) demonstraram-se fatores de risco para infecção. Dos 56 animais positivos, 28 apresentaram positividade nos três testes, e outros 28 demonstraram variação entre métodos e/ou entre lâminas confeccionadas. Considerou-se que a região do Sertão Paraibano apresenta prevalência significativa de infecção por *D. immitis*, sendo necessário estabelecer formas de controle e profilaxia, para reduzir os riscos da transmissão para animais, como também para humanos. No capítulo 2 objetivou-se avaliar e comparar a eficiência e desempenho de testes parasitológicos, sorológico e molecular no diagnóstico de *D. immitis* no Sertão Paraibano, Nordeste do Brasil. Foram utilizados sangue total e soro de 140 cães provenientes do município de Sousa. Utilizou-se três técnicas parasitológicas microscópicas (TPM): ESC, ESP e KM, associado ao diagnóstico morfométrico das microfilárias. Para detecção de antígenos de *D. immitis* foi utilizado o teste rápido imunocromatográfico (TRI) da ALERE Dirofilariose AG Teste kit[®], e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) direta como método molecular. Para avaliação dos testes foi considerado a PCR como padrão ouro, sendo calculado valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN). Para verificação da concordância dos testes realizou-se o teste de Kappa ($p \leq 0.05$). Das 140 amostras analisadas 33,6% (48/140) apresentaram microfilárias, antígeno e/ou DNA parasitário. Deste total de amostras, 23,6% (33/140) foram positivas no ESC; 25,7% (36/140) no ESP; 29,3% (41/140) no KM; 30% (42/140) no TRI e 28,6% (40/140) na PCR. Todos os métodos apresentaram concordância quase perfeita com a PCR, alta sensibilidade (0.8 a 0.95), especificidade (0.94 a 0.99), valores estabelecidos com VPP (0,8571 a 0,9722) e VPN (0,9519 a 0,9797). Todas as técnicas apresentaram alta eficácia com concordância quase perfeita com PCR. Os ESC e ESP foram as técnicas com menor sensibilidade e maior especificidade. O KM foi considerado o teste maior sensibilidade e o TRI o de escolha para infecções ocultas. A PCR apresentou alta sensibilidade e especificidade em comparação aos demais testes, e melhor identificação da *D. immitis*.

Palavras-chaves: Arritmia; Detecção; Eficácia; Errante; Zoonose.

ABSTRACT

Dirofilaria immitis is a zoonotic parasite that mainly affects domestic dogs, and wild canids and occasionally other mammals such as domestic cats and humans. This dissertation consists of two chapters in the form of scientific articles. In chapter 1, the objective was to determine the prevalence and factors associated with infection by *D. immitis* in dogs in the city of Sousa, semiarid of Paraíba. 320 dogs were selected and evaluated, of which 160 were domiciled and 160 stray, from 32 neighborhoods in the city of Sousa. Clinical examination, blood collection and epidemiological data of each animal were performed. For microfilariae research, three methods were performed: capillary blood smear (ESC), peripheral (ESP) and modified Knott-test (KM), associated with the morphometric diagnosis of the microfilariae. There was a prevalence of 17.5% (56/320) positive animals for *D. immitis*, with 71.43% (40/56) wandering and 28.57% (16/56) domiciled. Of the 32 neighborhoods evaluated, 24 were found positive dogs, with Angelim and Doutor Zezé, the neighborhoods with the highest percentage 1.56% (5/320) each. The categories of cardiac disorders (Odds ratio 6,231 [CI 1,539-25,236]) and stray dogs (Odds ratio 2,463 [CI 1,281-4,735]) were risk factors for infection. Of the 56 positive animals, 28 showed positivity in the three tests, and another 28 showed variation between methods and / or between made slides. It was considered that the region of the Sertão Paraibano has a significant prevalence of infection by *D. immitis*, being necessary to establish forms of control and prophylaxis, to reduce the risks of transmission to animals, as well as to humans. In Chapter 2, the objective was to evaluate and compare the efficiency and performance of parasitological, serological and molecular tests in the diagnosis of *D. immitis* in the Sertão Paraibano, Northeast Brazil. Whole blood and serum from 140 dogs from the municipality of Sousa were used. Three microscopic parasitological techniques (PMS) were used: ESC, ESP and KM, associated with the morphometric diagnosis of microfilariae. For the detection of *D. immitis* antigens, the rapid immunochromatographic test (TRI) of ALERE Dirofilariose AG Teste kit® was used, and direct polymerase chain reaction (PCR) as a molecular method. To evaluate the tests, PCR was considered the gold standard, with sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) values being calculated. To verify the agreement of the tests, the Kappa test was performed ($p \leq 0.05$). Of the 140 samples analyzed, 33.6% (48/140) presented microfilariae, antigen and / or parasitic DNA. Of this total of samples, 23.6% (33/140) were positive in the ESC; 25.7% (36/140) in the ESP; 29.3% (41/140) in the KM; 30% (42/140) in the TRI and 28.6% (40/140) in the PCR. All methods showed almost perfect agreement with PCR, high sensitivity (0.8 to 0.95), specificity (0.94 to 0.99), values established with VPP (0.8571 to 0.9722) and VPN (0.9519 to 0.7979). All techniques were highly effective with almost perfect agreement with PCR. ESC and ESP were the techniques with less sensitivity and greater specificity. KM was considered the most sensitive test and IRT was the choice for hidden infections. The PCR showed high sensitivity and specificity in comparison to the other tests, and better identification of *D. immitis*.

Keywords: Arrhythmia; Detection; Efficiency; Wandering; Zoonosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – Mapa com marcação geográfica de animais positivos e negativos distribuídos em todos os bairros da cidade de Sousa, Paraíba	23
Figura 02 – A. Microfilária de <i>D. immitis</i> em esfregaço sanguíneo. Obj40x. Panótico rápido. B. Microfilária de <i>D. immitis</i> distendida em lâmina do teste de Knott modificado. Obj40x. Panótico rápido. C. Amplificação por PCR espécie-específica de <i>D. immitis</i> CO1 (150 bp).....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Número de cães domiciliados e errantes positivos para <i>D. immitis</i> distribuídos por bairros da cidade de Sousa, Paraíba	22
Tabela 02 – Análise univariada de fatores de risco associados à infecção por <i>D. immitis</i> em cães da cidade de Sousa, Paraíba. ($P \leq 0,2$).	24
Tabela 03 – Fatores associados à infecção por <i>D. immitis</i> em cães do município de Sousa, Paraíba. ($P \leq 0,05$).	24
Tabela 04 – Valores de Coeficiente de Kappa, Sensibilidade, Especificidade, VPP e VPN dos testes analisados em comparação ao PCR, considerado o teste de padrão-ouro. ($p < 0.0001$).	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
- CVBD - Companion Vector-borne Diseases
- EDTA - Sal Sódico do Ácido Etilenodiaminotetracético
- ESC - Esfregaço sanguíneo capilar
- ESP - Esfregaço sanguíneo periférico
- ELISA - Ensaio imunoenzimático indireto
- HV - Hospital Veterinário
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IC - Intervalo de confiança
- IFPB - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba
- INMET - Instituto Nacional de Meteorologia
- K - Kappa
- KM - Knott-Modificado
- Km² - Quilômetro quadrado
- LPA - Laboratório de Patologia Animal
- LPV - Laboratório de Parasitologia Veterinária
- Mm - Milímetros
- PB - Paraíba
- PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
- SRD - Sem raça definida
- TPM - Técnicas parasitológicas microscópicas
- TRI - Teste rápido imunocromatográfico
- UFMG - Universidade Federal de Campina Grande
- UFPB - Universidade Federal da Paraíba
- VPN - Valor preditivo negativo
- VPP - Valor preditivo positivo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
3	CAPÍTULO 1.....	18
	3.1 Abstract.....	19
	3.2 Resumo.....	19
	3.3 Introdução.....	20
	3.4 Material e métodos.....	20
	3.5 Resultados.....	22
	3.6 Discussão.....	22
	3.7 Conclusão.....	26
	3.8 Referências bibliográficas.....	27
4	CAPÍTULO 2.....	30
	4.1 Graphical abstract.....	31
	4.2 Abstract.....	32
	4.3 Introduction.....	32
	4.4 Materials and methods.....	34
	4.5 Results.....	36
	4.6 Discussion.....	38
	4.7 Conclusion.....	40
	4.8 Highlights.....	40
	4.9 Declaration of interests.....	40
	4.10 Authors contributions.....	40
	4.11 Acknowledgment.....	40
	4.12 References.....	41
5	CONCLUSÃO.....	46

1. INTRODUÇÃO

Dirofilaria immitis é um parasito zoonótico pertencente ao filo *Nematoda*, classe *Secernentea*, da superfamília *Filaroidea*, família *Onchocercidae*, e do gênero e subgênero *Dirofilaria*, que acometem principalmente cães domésticos e canídeos silvestres, e ocasionalmente outros mamíferos, como gato e humano (ACHA; SZYFRES, 2003; FONTES-SOUSA et al., 2019; ALBERIGI et al., 2020).

A transmissão desse parasito ocorre através dos hospedeiros intermediários, os culicídeos dos gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* (TAYLOR et al., 2017). Esses mosquitos iniciam o ciclo biológico, ao ingerirem microfírias (L1) durante o repasto sanguíneo em hospedeiros definitivos infectados. No hospedeiro intermediário, as L1 se tornam L2 e L3 em até 15 dias. Durante novo repasto sanguíneo em um animal não infectado, os mosquitos infectados liberam L3, que penetram nas feridas e se instalam na pele, permanecendo durante 2 a 3 meses após a infecção nos tecidos e se tornando L4. Após aproximadamente 70 dias, as larvas L4 transformam-se em L5 e migram para as artérias pulmonares e coração. No 6º mês de infecção, as fêmeas fertilizadas possuem as L1 já desenvolvidas no útero, liberando-as na circulação sanguínea do hospedeiro definitivo, para assim serem ingeridas pelo mosquito, reiniciando o ciclo. Assim, o período pré-patente da infecção é de 6 a 9 meses (BOWMAN et al., 2010).

Os cães com carga parasitária alta de vermes adultos no ventrículo direito do coração desenvolvem Dirofilariose, ou doença do verme do coração, que caracteriza-se clinicamente por insuficiência cardíaca congestiva (NELSON et al., 2014). Entretanto, aqueles com carga parasitária baixa ou infecção recente, não demonstram sintomatologia, e por esta razão o diagnóstico é dificultoso e deve ser laboratorial, assim como nos casos de amicrofilaremia ou infecção oculta (NELSON; COUTO, 2015). A maioria dos casos de parasitismo costumam ser assintomáticos, aumentando os riscos de transmissão para outros animais susceptíveis, incluindo o homem, destacando-se a natureza zoonótica e relevância na saúde única (MANEV, 2020).

A infecção por *D. immitis* tem distribuição cosmopolita, entretanto, regiões litorâneas, brejos tropicais, mangues e outros locais de clima quente e úmido apresentam maior número de casos em cães, com importante morbidade e mortalidade, tornando esses animais uma fonte de infecção para animais silvestres (LABARTHE, 2014). Adicionalmente, desde seu reconhecimento como zoonose pela Organização Mundial da Saúde em 1979, a ocorrência desta parasitose aumentou consideravelmente em todo o mundo, influenciando pesquisas a fim de determinar parâmetros que possam estabelecer técnicas de diagnóstico, formas de profilaxia

e redução nos riscos da transmissão para os hospedeiros definitivos e intermediários (ACHA; SZYFRES, 2003; BARBOSA; ALVES, 2006).

Em humanos a *D. immitis* causa a formação de nódulos solitários no parênquima pulmonar, em consequência da migração das larvas e do desenvolvimento inadequado do parasito (CAVALLAZZI et al., 2002). O diagnóstico dificultoso e a falta de conhecimento técnico e epidemiológico desta parasitose em seres humanos provocam alto custeio em exames e procedimentos, atribuindo impacto significativo para saúde única (THEIS, 2005).

Para detecção de *D. immitis* em cães recomenda-se o diagnóstico laboratorial com pesquisa de microfilárias e/ou antígenos circulantes, principalmente utilizados na triagem de animais assintomáticos (NELSON et al., 2014). Recentemente, o diagnóstico molecular vem sendo utilizado como método mais eficaz e confirmatório de *D. immitis* (RAMOS et al., 2016; MOREIRA et al., 2019). Por essa razão, a combinação e utilização de métodos de diagnóstico para *D. immitis*, permite a identificação precisa dos animais positivos e na sinalização epidemiológica do parasito em uma região (GENCHI et al., 2019; PARANESE et al., 2020).

Estudos sobre a ocorrência de *D. immitis* em cães são realizadas em todas as regiões do Brasil (FERNANDES et al., 2000; BRITO et al., 2001; KANNENBERG et al., 2019; MOREIRA et al., 2019; TRANCOSA et al., 2020). Na Paraíba, poucos trabalhos retratam ocorrência desta parasitose em cães (VIDAL, 2014; MATIAS et al., 2016; RODRIGUES, 2019; CARNEIRO, 2020), e até o momento nenhum determinando a atual prevalência.

No município de Sousa, interior da Paraíba, no intervalo de cinco anos foram diagnosticados no Laboratório de Patologia Animal (LPA) do Hospital Veterinário do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia da Paraíba, do campus Sousa IFPB (HV-IFPB) 65/528 casos de *D. immitis* no ventrículo direito do coração de cães. No entanto, não há trabalhos avaliando a atual situação da parasitemia de *D. immitis* em cães e a utilização de métodos moleculares no diagnóstico desta parasitose na região do Sertão Paraibano. Devido à grande quantidade de casos de *D. immitis* diagnosticados em um curto período de tempo, fizeram-se necessários estudos sobre as infecções por este parasito em cães domésticos através de diferentes exames complementares, tendo em vista que essa parasitose possui potencial zoonótico.

A presente dissertação está dividida em dois capítulos com artigos científicos elaborados de acordo com as normas de periódicos a que serão submetidos a publicação, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, no programa de Pós Graduação de Ciência e Saúde Animal da UFCG, campus Patos. O primeiro capítulo descreve a prevalência e fatores de risco de *D. immitis* em cães na região semiárida da Paraíba, Nordeste

do Brasil, que será submetido à “*Pesquisa Veterinária Brasileira*”. O segundo capítulo retrata a análise comparativa da eficácia e do desempenho de testes parasitológicos, sorológico e molecular no diagnóstico de *D. immitis* em cães no Nordeste do Brasil, e será enviado a revista “*Experimental Parasitology*”.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA P. N.; SZYFRES B. Filariasis zoonóticas: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3.ed., **Organización Panamericana de la Salud - OPS**, Washington, D.C., v.3, p. 284-291, 2003.

ALBERIGI, B.; OLIVEIRA, A. C.; VIEIRA, G. S. R.; FERNANDES, P. A.; LABARTHE, N.; MENDES-DE-ALEMIDA, F. Unusual feline *Dirofilaria immitis* infection: a case report. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, n. 29, v. 3, 2020.

ALHO, A. M.; MEIRELES, J.; BELO, S.; CARVALHO, L. D. Dirofilariose canina e felina, uma parasitose em evolução (I)—etiologia, biologia e epidemiologia. **Clínica Animal**, v. 2, p. 20-25, 2014.

BARBOSA, C.L.; ALVES, L.C. Dirofilariose canina: situação atual no Brasil. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 1, p. 57-62, 2006.

BOWMAN, D. D.; LYNN, R. C.; EBERHARD, M. L.; ALCARAZ, A. Parasitologia Veterinária de Georgis. 9 ed. **Elsevier**, 2010.

BRITO, A. C.; VILA-NOVA, M. C.; ROCHA, D. A. M.; COSTA, L. G.; ALMEIDA, W. A. P.; VIANA, L. S.; LOPES, JR., R. R.; FONTES, G.; ROCHA, E. M. M.; REGIS, L. Prevalência da filariose canina causada por *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum* em Maceió, Alagoas, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 6, p. 1497-1504, 2001.

CARNEIRO, J. M. R. Pesquisa de *Dirofilaria immitis* em cães com filaremia no Brejo Paraibano. **Trabalho de Conclusão de Curso em Medicina Veterinária**, Universidade Federal da Paraíba - Centro de Ciências Agrárias, Areia, 2020.

FERNANDES, C. G. N.; MOURA, S. T.; DIAS, A. R.; VIEIRA FILHO, W. S. Ocorrência de dirofilariose canina na região da Grande Cuiabá, estado de Mato Grosso – Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 5, p. 258-261, 2000.

FONTES-SOUSA, A. P.; SILVESTRE-FERREIRA, A. C.; CARRETON, E.; ESTEVES-GUIMARÃES, J.; MAIA-ROCHA, C.; OLIVEIRA, P.; LOBO, L.; MORCHÓN, R.; ARAÚJO, F.; SIMÓN, F.; MONTOYA-ALONSO, J. A. Exposure of humans to the zoonotic nematode *Dirofilaria immitis* in Northern Portugal. **Epidemiology and Infection**, v. 147, n. 282, p. 1-5, 2019.

GENCHI, M.; RINALDI, L.; VENCO, L.; CRINGOLI, G.; VISMARRA, A.; KRAMER, L. *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat: a questionnaire study in Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 267, p. 26-31, 2019.

KANNENBERG, A. K.; FRONDANA, L.; MARTINS, I. H. R.; LONGHI, C. E.; FIALKOWSKI, M. M.; MILCZEWSKI, V. Occurrence of filarid parasites in household and sheltered dogs in the city of Joinville – Santa Catarina, Brazil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 20, p. 1-11, 2019.

LABARTHE, N. *Dirofilaria immitis*: Um desafio permanente. **Anais da 66ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, Sociedade Brasileira para o Progresso Ciência, Rio Branco - Acre, 2014.

LEIDY, J. A synopsis of entozoa and some of their ectocongeners observed by the author. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 8, n. 42, 1856.

MANEV, I. Prevalence of *Dirofilaria immitis* in stray dogs from Sofia, Bulgaria. **International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry**, v. 5, n. 4, p. 40-43, 2020.

MATIAS, I. C.; SOARES, L. A.; NASCIMENTO, M. E. L.; MENDONÇA, I. P.; NOGUEIRA, M. R. L.; SILVA, N. A.; MOURA, M. F. N.; RAMOS, M. E. O.; VILELA, V. L. R.; MAIA, L. A. *Dirofilaria immitis* em cão no sertão paraibano: achado de necropsia. **Resumo simples da IV Semana Acadêmica de Medicina Veterinária**, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2016.

MOREIRA, H. R.; MADEIRA, E. A. O.; CUNHA, D. N. L.; SCOFIELD, A.; GÓES-CAVALCANTE, G.; ABEL, I.; GUIMARÃES, R. J. P. S.; FERNANDES, J. I. *Dirofilaria immitis* infection in dogs in Algodual Island, Brazilian Amazon. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 510-515, 2019.

NELSON, C. T.; MCCALL, J.; CARITHERS, D. Current canine guidelines for the diagnosis, prevention, diagnosis, and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infections in dogs (revised July 2014). Wilmington, **American Heartworm Society (AHS)**, 2014.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Medicina Interna de pequenos animais. 4 ed. **Elsevier**, Rio de Janeiro, p. 1504, 2015.

PANTCHEV, N.; SCHNYDER, M.; VRHOVEC, M. G.; SCHAPER, R.; TSACHEV, I. Current Surveys of the Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canisi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, *Angiostrongylus vasorum* and *Dirofilaria immitis* in Dogs in Bulgaria. **Parasitology Research**, n. 114, supl. 1, p. 117-130, 2015.

PARANESE, R.; IATTA, R.; MENDOZA-ROLDAN, J. A.; SZLOSEK, D.; BRAFF, J.; LIU, J.; BEUGNET, F.; DANTAS-TORRES, F.; BEALL, M. J.; OTRANTO, D. Comparison of Diagnostic Tools for the Detection of *Dirofilaria immitis* Infection in Dogs. **Pathogens**, v. 9, n. 499, 2020.

RAMOS, R. A. N.; RÊGO, A. G. O.; FIRMINO, E. D. F.; RAMOS, C. A. N.; CARVALHO, G. A.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D.; ALVES, L. C. Filarioids infecting dogs in northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 226, p. 26-29, 2016.

RODRIGUES, R. T. G. A. Identificação de *Dirofilaria immitis* em cães do sertão paraibano e de microfilárias em lesão tumoral cutânea de um cão naturalmente infectado. **Dissertação de Mestrado em Ciência e Saúde Animal**, Universidade Federal de Campina Grande - Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Patos, 2019.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. Parasitologia Veterinária. 4 ed. **Editora Guanabara Koogan**, Rio Janeiro, 2017.

TRANCOSO, T. A. L.; LIMA, N. C.; BARBOSA, A. S.; LELES, D.; FONSECA, A. B. M.; LABARTHE, N. V.; BASTOS, O. M. P.; UCHOA, C. M. A. Detection of *Dirofilaria immitis* using microscopic, serological, molecular techniques among dogs in Cabo Frio, RJ, Brazil, **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 29, n. 1, 2020.

VIDAL, I. F. Dirofilariose canina no litoral da Paraíba. **Tese de Doutorado em Medicina Veterinária**, Universidade Federal de Campina Grande - Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Patos, 2014.

3. CAPÍTULO 1

**Prevalência e fatores associados à infecção por *Dirofilaria immitis* em cães no Sertão
Paraibano, Nordeste do Brasil**

Laynaslan A. Soares, Isabela C. Matias, Caroline G. Silva, Hodias S. Oliveira Filho, Paula M. M. Alves, Higor G. F. Sousa, Arthur W. L. Brasil, Vinicius L. R. Vilela, Glauco J. N. Galiza, Lisanka A. Maia.

Artigo científico a ser submetido ao periódico *Pesquisa Veterinária Brasileira*
(Impact fator 0.44/Qualis A4)

Prevalência e fatores associados à infecção por *Dirofilaria immitis* em cães no Sertão Paraibano, Nordeste do Brasil

Laynaslan A. Soares^{1*}, Isabela C. Matias¹, Caroline G. Silva², Hodias S. Oliveira Filho², Paula M. M. Alves², Higor G. F. Sousa², Arthur W. L. Brasil³, Vinicius L. R. Vilela⁴, Glauco J. N. Galiza⁵, Lisanka A. Maia².

¹Discente do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal, Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Av. Universitária s/n, Bairro Santa Cecília, Patos, PB 58708-110, Brasil. *Autor para correspondência: laynaslanabreu@gmail.com

²Discente de Graduação em Medicina Veterinária, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba, Rua Pedro Antunes, s/n, São Gonçalo, Sousa, PB 58814-000, Brasil.

³Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Bairro Universitário, Areia, PB 58397-000, Brasil.

⁴Docente do Curso de Medicina Veterinária, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba, Rua Pedro Antunes, s/n, São Gonçalo, Sousa, PB 58814-000, Brasil.

⁵Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal, Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Av. Universitária s/n, Bairro Santa Cecília, Patos, PB 58708-110, Brasil.

3.1 ABSTRACT. - Soares L.A., Matias I.C., Silva C.G., Oliveira Filho H.S., Alves P.M.M., Sousa H.G.F., Brasil A.W.L., Vilela V.L.R., Galiza G.J.N., Maia L.A. 2021. **Prevalência e fatores associados à infecção por *Dirofilaria immitis* em cães no Sertão Paraibano, Nordeste do Brasil.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 36(Supl.):00-00. Laboratório de Patologia Animal, Hospital Veterinário, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, Avenida Universitária s/n, Bairro Santa Cecília, Patos, PB 58708-110, Brasil. E-mail: laynaslanabreu@gmail.com

Dirofilaria immitis is a heart and large vessel parasite that mainly affects domestic dogs, also the cause of a re-emerging zoonosis in recent years. This study aimed to determine the prevalence, associated factors and geographic areas of *D. immitis* in dogs in Sertão Paraibano, Brazil. For this, 320 dogs were selected and evaluated, 160 domiciled and 160 wanderers, from 32 neighborhoods in the city of Sousa, Semi-arid of the State of Paraíba, Northeastern Brazil. Clinical examination, blood collection and epidemiological data of each animal were performed. The environment was visually observed for sanitation conditions at the time of assessment. For microfilaria research, three methods were used: capillary blood smear (CBS), peripheral (PBS) and modified Knott test (MK), associated with the morphometric diagnosis of the microfilariae. Data were submitted to uni and multivariate statistics for observation of risk factors and qualitative assessment of the tests. A prevalence of 17.5% (56/320) of positive animals for *D. immitis* was obtained, with 71.43% (40/56) straying and 28.57% (16/56) domiciled. Of the 32 neighborhoods evaluated, in 24 dogs were found positive, with Angelim and Doutor Zezé being the neighborhoods with the highest percentage of 50% (5/10) each. Only the categories of cardiac alterations (*Odds ratio* 6.231 [1.539-25.236]) and stray dogs (*Odds ratio* 2.463 [1.281-4735]) demonstrated a potential risk factor for infection. Of the 56 positive animals, 28 were positive in the three tests, and another 28 showed variance between methods and/or between prepared slides. No other filarids were observed. It was considered that the city of Sousa has a significant prevalence of *D. immitis* infection, and it is necessary to establish forms of control and prophylaxis to reduce the risks of transmission to animals, as well as to humans.

INDEX TERMS: Arrhythmia, parasite, wandering, zoonosis.

3.2 RESUMO. *Dirofilaria immitis* é um parasito de coração e de grandes vasos que acomete principalmente cães domésticos, também causador de uma zoonose reemergente nos últimos anos. Objetivou-se determinar a prevalência, fatores associados e áreas geográficas de *D. immitis* em cães na cidade de Sousa. Para isso, foram selecionados e avaliados 320 cães, sendo 160 domiciliados e 160 errantes, provenientes de 32 bairros da cidade de Sousa, Semiárido do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. Foi realizado o exame clínico, coleta de sangue e dados epidemiológicos de cada animal. O ambiente foi observado visualmente quanto as condições de saneamento no momento de avaliação. Para pesquisa de microfilárias, foram realizados três métodos: esfregaço sanguíneo capilar (ESC), periférico (ESP) e teste de Knott-modificado, associado ao diagnóstico morfométrico das microfilárias. Os dados foram submetidos a estatísticas uni e multivariadas para observação de fatores de risco e avaliação qualitativa dos exames. Obteve-se prevalência de 17,5% (56/320) de animais positivos para *D. immitis*, sendo 71,43% (40/56) errantes e 28,57% (16/56) domiciliados. Dos 32 bairros avaliados, em 24 foram encontrados cães positivos, sendo Angelim e Doutor

Zezé, os bairros com maior percentual 50% (5/10) cada. Somente as categorias de alterações cardíacas (*Odds ratio* 6,231 [1.539-25.236]) e cães errantes (*Odds ratio* 2,463 [1.281-4.735]) demonstraram potencial fator de risco para infecção. Dos 56 animais positivos, 28 apresentaram positividade nos três testes, e outros 28 demonstraram variância entre métodos e/ou entre lâminas confeccionadas. Não foram observados outros filarídeos. Considerou-se que a cidade de Sousa apresenta prevalência significativa de infecção por *D. immitis*, sendo necessário estabelecer formas de controle e profilaxia, para reduzir os riscos da transmissão para animais, como também para humanos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Arritmia, errante, parasito, zoonose.

3.3 INTRODUÇÃO

Dirofilaria immitis (Leidy 1856) é um nematódeo filarídeo transmitido principalmente através de culicídeos que afeta principalmente os cães domésticos, canídeos silvestres (Silva et al. 2008; Taylor et al. 2017), e acidentalmente felídeos (Alberigi et al. 2020) e humanos (Velev et al. 2019; Gabrielli et al., 2021). Em cães são responsáveis por causar a dirofilariose ou filariose canina, também conhecida como doença do verme do coração (Nelson et al. 2014). Os cães portadores atuam como reservatórios do parasito, servindo como fonte de infecção para outros animais e humanos, fator considerado de extrema importância para saúde única (Silva e Langoni 2009). Em humanos, os parasitos pré-adultos atingem a artéria pulmonar e desencadeia resposta inflamatória com formação de nódulos pulmonares (Símon et al. 2012), equivocadamente diagnosticados como neoplasias (Fontes-Sousa et al. 2019).

A infecção por *D. immitis* em cães é de ocorrência cosmopolita (Montoya-Alonso et al. 2011; Kamyngkird et al. 2017; Donnett et al. 2018), sendo relatada principalmente em áreas litorâneas e costeiras, onde o clima quente e úmido fornecem condições favoráveis a proliferação dos hospedeiros intermediários, os culicídeos. Entretanto, nos últimos anos essa infecção vem reemergindo em locais onde já existiam e surgindo em lugares antes não relatados (Labarthe 2014; Rodrigues et al. 2019).

No Brasil, a infecção por *D. immitis* é endêmica e estudos sobre prevalência desse parasito foram realizados nas regiões Sul (Leite et al. 2007; Kannenberg et al. 2019), Sudeste (Trancoso et al. 2020; Mendes-de-Almeida et al. 2021), Norte (Ogawa et al. 2013; Moreira et al. 2019) e Centro-oeste (Fernandes et al. 2000). Na região Nordeste, estudos sobre prevalência de *D. immitis* em cães foram realizados principalmente em regiões litorâneas, incluindo os estados Alagoas 1,3% (15/1.097) (Brito et al. 2001), Bahia 0% (00/200) (Carlos et al. 2007), Maranhão 15% (224/1.495) (Ahid et al. 1999), Pernambuco 11,54% (12/104) (Ramos et al. 2016), Rio Grande do Norte 47,7% (51/107) (Ferreira et al. 2004). As variações dos percentuais de prevalência da infecção por *D. immitis* em locais específicos estão relacionados principalmente aos tipos de exames de diagnósticos utilizados. Na Paraíba, foi relatado a ocorrência da *D. immitis* em cães no município de Sousa (Matias et al. 2016) e Patos (Rodrigues et al. 2019). No entanto, apesar da presença de parasitemia no sertão paraibano, não há trabalhos que retratem a prevalência de *D. immitis* nesta área não litorânea.

Considerando a carência de informações sobre a real situação da parasitemia no município de Sousa, associada à sua importância patogênica, objetivou-se determinar a prevalência e fatores associados a infecção por *D. immitis* em cães no Sertão Paraibano, associado a identificação de fatores epidemiológicos e demográficos que favorecem a ocorrência dessa parasitose.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo. O estudo foi realizado no município de Sousa (Lat. 6°45'39"S, Long. 38°13'51"W), localizado na mesorregião do Sertão, estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, no período de abril a dezembro de 2018. A cidade de Sousa está a 373,63 km da região litorânea, João Pessoa, capital do estado da Paraíba. Possui área territorial de 728,492 km², composto por 32 bairros, população estimada em 69.723 habitantes e densidade demográfica de 89,10 hab/km² (IBGE 2019). Contém estrutura de saneamento básico composta por rede de esgoto a céu aberto que atravessa centralmente todo o município e que desemboca nas margens do Rio do Peixe, sub-bacia do Rio Piranhas-Açu que circunda parcialmente ao norte da cidade. Ao nordeste há áreas de zona de rural com plantação de capim irrigado. Realiza coleta de lixo em todos os bairros em dias alternados e não possui abastecimento e tratamento de esgoto. Com base na classificação climática Köppen-Geiger, possui clima semiárido quente do tipo "BSh", e no ano de 2018 a temperatura média anual foi de 27°C e pluviometria de 900 mm (INMET 2019).

População e amostragem de cães. Para definição do número de animais participantes do estudo foi considerado o tamanho da população humana do município de Sousa. Foi utilizada a proporção

recomendada por Canatto et al. (2012), de 4,3 pessoas por animal, estimando-se uma população de 16.175 cães. Para determinar o número mínimo de animais a serem avaliados foi realizada uma amostragem aleatória simples (Fórmula 01) e ajuste para populações finitas com o resultado obtido (Fórmula 02) (Thrusfield 2004).

$$n = \frac{Z^2 \times P(1 - P)}{d^2}$$

n = número de animais amostrados

Z = valor da distribuição normal para o nível de confiança de 95%

P = prevalência esperada 23,1% (Labarthe et al. 2014)

d = erro absoluto de 5%

$$N_{ajus} = \frac{N \times n}{N + n}$$

n_{ajus} = tamanho da amostra ajustado

N = tamanho da população total

n = tamanho inicial da amostra

Obteve-se 268 como número mínimo de animais a serem avaliados. No entanto, como o município de Sousa possui 32 bairros, realizou-se coleta de 10 animais por bairro, totalizando 320 animais, onde 160 cães eram domiciliados e 160 errantes. Para cada bairro foram utilizados cinco cães errantes e cinco cães domiciliados, da mesma área, escolhidos de forma aleatória e de acordo com a disponibilidade dos tutores para participar da pesquisa, respectivamente. Os cães apresentavam idade igual ou superior a 9 meses.

Os bairros foram avaliados quanto a localização e separados em quatro zonas, sendo zona Norte (Alto do Cruzeiro, Angelim, Areia, Bancários, Boa Vista, Centro, Guanabara e Várzea da Cruz), zona Sul (Conjunto Nossa Senhora de Fátima, Frei Damião, Jardim Bela Vista, José Lins do Rêgo, Sorrilândia 1, Sorrilândia 2, Sorrilândia 3 e Sousa 1), zona Oeste (Alto Capanema, André Gadelha, Conjunto Augusto Braga, Jardim Brasília, Jardim Iracema, Jardim Santana, Lagoa dos Patos e Projeto Mariz) e zona Leste (Doutor Zezé, Estação, Estreito, Gato Preto, Jardins, Raquel Gadelha, São José e Zú Silva).

Inquérito epidemiológico animal e ambiental. Os dados epidemiológicos dos animais domiciliados e do ambiente foram registrados por meio de entrevistas aos tutores de cada animal. Foram coletadas informações quanto ao sexo, idade, raça, cor e comprimento da pelagem, vacinação, vermifugação, doenças e tratamentos anteriores, histórico de viagens, alimentação, contato com outros animais, situação sanitária ambiental, e controle de mosquitos. Para os animais errantes, os dados foram coletados por meio de observação dos fatores fenotípicos e do ambiente encontrado.

Avaliação e coleta de amostras. Os animais foram submetidos a avaliação clínica geral, para análise de estado nutricional, coloração das mucosas, palpação de linfonodos, grau de hidratação, pulso periférico, auscultação cardíaca e respiratória. Posteriormente, foi realizada a contenção mecânica, coletados 3 ml de sangue da veia cefálica ou jugular em tubos estéreis previamente identificados contendo anticoagulante EDTA (Sal Sódico do Ácido Etilenodiaminotetracético). A coleta das amostras de sangue foi realizada no período das 08:00 ou 18:00, onde a microfilaremia é maior, devido ao fator de adaptação das filárias aos hábitos alimentares do vetor (Acha e Szyfres, 2003). As amostras eram acondicionadas e encaminhadas para o Laboratório de Parasitologia Veterinária (LPV) do HV- IFPB, para realização dos testes de esfregaço sanguíneo periférico (ESP) e teste de Knott-modificado.

Os esfregaços de sangue capilar (ESC) foram obtidos da ponta da orelha. As lâminas dos esfregaços sanguíneos foram fixadas e coradas através de Panótico Rápido®, identificadas e encaminhadas para o LPV para visualização microscópica.

Testes de detecção de microfilárias circulantes. Para a pesquisa de microfilárias circulantes foram realizados três métodos: esfregaço sanguíneo capilar (ESC), esfregaço sanguíneo periférico (ESP) e teste de Knott-modificado (Newton e Wright 1956). Foram confeccionadas duas lâminas para cada técnica. O Knott-modificado foi realizado de acordo com a descrição de Bowman et al. (2010). O método consistiu em misturar 1 ml de sangue com 10 ml de formol a 2% em um tubo Falcon, que em seguida foi homogeneizado por inversão e agitação com o objetivo de obter a lise dos eritrócitos e conservação das microfilárias em formato distendido. O tubo com a amostra foi centrifugado à 1500 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante por inversão do tubo e em seguida foi acrescentado uma gota de azul de metileno a 0,1% na parte decantada, homogeneizando-o. Posteriormente, com auxílio de uma micropipeta, de uma parte do sedimento, que em seguida foi colocado em uma lâmina e recoberto com lamínula para visualização em microscópio óptico em busca de microfilárias distendidas coradas em azul.

Associado ao teste de Knott modificado, realizou-se o diagnóstico morfométrico das microfilárias dos animais positivos. Foram considerando os valores mencionados por CVBD (2006) para diferenciação das microfilárias de *D. immitis* de outros filarídeos. De acordo com CVBD (2006), as microfilárias de *D. immitis* são maiores, medem de 205 a 283µm de comprimento, 5 a 6,5µm de largura, com cabeça cônica e

cauda em linha reta; enquanto que outros filarídeos, como *Acanthocheilonema (Dipetalonema) reconditum*, são menores e possuem de 213 a 240µm de comprimento, 4 a 5µm de largura, cabeça contudente e cauda em forma de gancho dobrado.

Análise estatística. Com base nos questionários epidemiológicos foi possível realizar uma análise para verificação de uma possível associação entre os dados do questionário (variável independente) e o resultado exames (variável dependente). As variáveis avaliadas foram: situação do animal; sexo; idade; raça; cor e comprimento da pelagem; vacinação; vermifugação; sinais clínicos; doenças e tratamentos anteriores; histórico de viagens; contato com outros animais; lixões/entulhos, esgotos, presença de vegetação; controle de mosquitos, bairro de avaliação e horário de coleta.

Inicialmente foi realizada uma análise exploratória univariada a fim de selecionar variáveis que apresentassem $p \leq 0,2$ utilizando o teste de qui-quadrado ou exato de Fisher. No segundo momento, as variáveis que foram selecionadas foram submetidas a uma análise multivariada através da regressão logística múltipla ao nível de significância de 5% (Hosmer e Lemeshow 2000).

O ajuste do modelo final foi feito através do coeficiente de Hosmer e Lemeshow, a fim de que houvesse um bom ajuste ao valor de $p \geq 0,05$. A colinearidade das variáveis independentes foi realizada pela análise de correlação, as quais se apresentassem coeficiente de correlação $< 0,9$ uma das variáveis seria eliminada de acordo com a plausibilidade biológica (Dohoo et al. 1997). As análises de dados foram realizadas utilizando o software SPSS 23.0 for Windows.

3.5 RESULTADOS

A prevalência de cães para *D. immitis* no município de Sousa foi 17,5% (56/320 [IC 13.3 – 21.7]) em pelo menos um dos testes avaliados; 71,43% (40/56 [IC 59.6 – 833.3]) em cães errantes e 28,57% (16/56 [IC 16.7 – 40.4]) em domiciliados, onde estes diferiram estatisticamente ($P < 0,0013$). Dos 32 bairros avaliados, em 24 foram encontrados cães positivos para *D. immitis*, em pelo menos um dos testes realizados. O número de cães errantes e domiciliados positivos em cada bairro estão descritos na Tabela 1. e na Fig. 1., respectivamente.

Os bairros Angelim (Zona Norte) e Doutor Zezé (Zona Leste) apresentaram percentuais de prevalências maiores, 50% (5/10), cada. O Angelim está situado na periferia da zona norte do município de Sousa, delimitado pelo Rio do Peixe e com áreas de plantação de capim irrigado. Neste bairro obteve-se 0,63% (2/16) de positividade em animais domiciliados e 0,94% (3/40) em errantes. O bairro Doutor Zezé está próximo ao canal de esgoto que atravessa centralmente até zona leste da cidade, com 5/40 cães errantes positivos com origem desconhecida.

As características dos animais e os aspectos demográficos dos ambientes avaliados nos questionários epidemiológicos foram analisados estatisticamente em relação a presença de *D. immitis*. As variáveis de situação do animal, raça, idade, vermifugação e exame clínico demonstraram significativa influência na infecção do parasito ($p < 0,2$) (Tabela 2.). Adicionalmente, somente as categorias alterações cardíacas (exame clínico) e cães errantes (situação do animal) demonstraram potencial fator de risco para infecção. Alterações cardíacas (*Odds ratio* 6,231 - [IC 1,539-25,236]) representaram 6 vezes mais chances de manifestação na infecção por *D. immitis*, e animais errantes (*Odds ratio* 2,463 - [IC 1,281-4,735]) foram 2 vezes mais chances a contaminação quando comparados aos cães domiciliados (Tabela 3.).

Dos testes de pesquisa de microfilárias circulantes utilizados nos 56 cães positivos, 28 (50%) apresentaram positividade nos três testes, e outros 28 (50%) demonstraram variância entre métodos e/ou entre lâminas confeccionadas. O método de Knott Modificado apresentou maior número de amostras positivas (56 cães). Entretanto, 51 cães (91,07%) foram positivos em duas lâminas e cinco (8,93%) em apenas uma lâmina. No ESP, 36 (64,29%) demonstraram a microfilária em duas lâminas, 12 (21,43%) em uma única lâmina, e oito (14,28%) foram negativas nas duas lâminas. No ESC observaram-se positividade de 32 (57,14%) cães nas duas lâminas, 12 (21,43%) em uma lâmina, e em 12 (21,43%) foram negativas.

Nos esfregaços sanguíneos positivos, os exemplares de *D. immitis* caracterizaram-se por estrutura vermiforme corada basofilicamente. Todas as microfilárias observadas no teste de Knott modificado estavam entre os valores mencionados por CBVD (2006), como *D. immitis*, não sendo observados outros filarídeos.

3.6 DISCUSSÃO

A prevalência de *D. immitis* em cães no Sertão da Paraíba foi considerada significativa em comparação a Labarthe et al. (2014) e Ramos et al. (2016), contrapondo a ideia de que a parasitose é mais frequente em regiões costeiras, que apresentam condições epidemiológicas que favorecem a ocorrência dessa parasitose, no entanto, a prevalência desse parasito foi relevante no Sertão Paraibano.

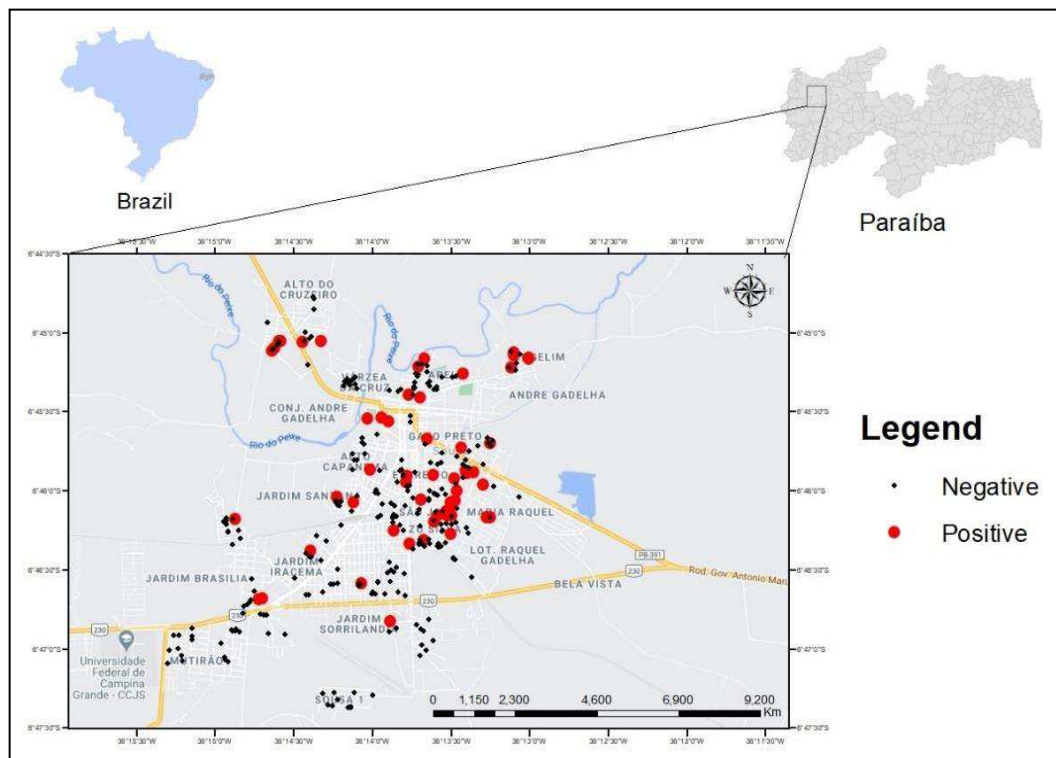
Tabela 01. Número de cães domiciliados e errantes positivos para *D. immitis* distribuídos por bairros do município de Sousa, Paraíba.

Bairros positivos	Nº de cães positivos domiciliados	Nº de cães positivos errantes
Zona Norte		
Alto do Cruzeiro	1 (0,31%)	1 (0,31%)
Angelim	2 (0,63%)	3 (0,94%)
Areias	0 (0%)	1 (0,31%)
Bancários	1 (0,31%)	2 (0,63%)
Boa Vista	2 (0,63%)	2 (0,63%)
Centro	0 (0%)	3 (0,94%)
Guanabara	1 (0,31%)	0 (0%)
Total		19 (5,89%)
Zona Sul		
Frei Damião	0 (0%)	2 (0,63%)
José Lins do Rêgo	0 (0%)	1 (0,31%)
Sorrilândia 1	0 (0%)	1 (0,31%)
Total		4 (1,24%)
Zona Oeste		
Alto Capanema	0 (0%)	1 (0,31%)
André Gadelha	1 (0,31%)	3 (0,94%)
Conjunto Augusto Braga	1 (0,31%)	0 (0%)
Jardim Brasília	0 (0%)	2 (0,63%)
Jardim Iracema	0 (0%)	1 (0,31%)
Jardim Santana	0 (0%)	2 (0,63%)
Lagoa dos Patos	0 (0%)	1 (0,31%)
Total		12 (3,72%)
Zona Leste		
Doutor Zezé	0 (0%)	5 (1,56%)
Estreito	0 (0%)	2 (0,63%)
Gato Preto	2 (0,63%)	1 (0,31%)
Jardins	1 (0,31%)	1 (0,31%)
Raquel Gadelha	2 (0,63%)	2 (0,63%)
São José	1 (0,31%)	1 (0,31%)
Zú Silva	1 (0,31%)	2 (0,63%)
Total		21 (6,51%)
TOTAL	16 (5%)	40 (12,5%)

Nº - Número

Segundo Alho et al. (2014), alguns fatores veem favorecendo o aumento e a ocorrência de infecção por *D. immitis* em regiões endêmicas e interioranas. Dentre esses a globalização, emergência de novas espécies de mosquitos vetores, resistência aos inseticidas, falta de controle dos hospedeiros sentinelas. Adicionalmente, alterações climáticas e ecológicas artificiais, onde a elevação das temperaturas, ocorrência de chuvas e a formação de “ilhas de calor” através da expansão urbanas, veem promovendo adaptação, desenvolvimento e multiplicação dos vetores, favorecendo assim a transmissão desta parasitose. Nesse estudo, embora as condições demográficas estudadas não apresentaram significância estatística, acredita-se que o município de Sousa apresenta fatores epidemiológicos demográficos que contribuem para a proliferação e manutenção de mosquitos responsáveis pela transmissão da doença, como o clima semiárido quente, saneamento básico incorreto e a presença de canal de esgoto a céu aberto cortando alguns bairros do município.

Fig. 1. Mapa com marcação geográfica de animais positivos e negativos distribuídos em todos os bairros do município de Sousa, Paraíba.



A zona Leste (21/320) e Norte (19/320) foram as áreas com maior ocorrência de animais positivos, sendo os bairros Angelim e Doutor Zezé com maior número. Na zona Norte foram observadas condições demográficas que provavelmente influenciaram a ocorrência da *D. immitis*, como a proximidade ao Rio do Peixe e as áreas de plantio de capim irrigado. Na zona Leste, os cinco cães positivos do bairro Doutor Zezé eram todos errantes, sugerindo que possivelmente a infecção tenha ocorrido em locais mais favoráveis para contaminação e posteriormente tenha ocorrido a migração desses animais para esse bairro. No entanto, na zona Leste foi identificado possível fator de influência na transmissão do parasito, como a rede de esgoto a céu aberto que atravessa os bairros desta área.

A variável “situação do animal” foi considerada fator de risco para infecção por *D. immitis*, demonstrando alta prevalência da parasitose em cães errantes em comparação aos domiciliados. Resultados semelhantes foram observados por Labarthe et al. (2014), que comparou o risco de infecção entre animais domiciliados e errantes, e observou taxa de positividade de 39,3% para cães errantes e 30,2% para domiciliados. Acredita-se que os cães domiciliados provavelmente possuam menor susceptibilidade devido a moradia em ambientes fechados e o uso de medicamentos terapêuticos e preventivos para o parasito (Manev 2020).

Leite et al. (2007) sugere que a densidade de população canina influencia na prevalência de *D. immitis*, sendo os cães errantes com maior risco da infecção, pois estes têm livre acesso as localidades do município e não possuem monitoramentos dos órgãos públicos no controle da população de cães de rua. Além disso, os cães errantes possuem maior susceptibilidade também a outros patógenos, em razão do estilo de vida ao ar livre e maior exposição a vetores (Diakou et al. 2016; Guven et al. 2017). Portanto, os resultados do presente estudo tornam-se preocupantes, tendo em vista que, os cães errantes atuam como reservatórios da enfermidade com livre acesso aos bairros da cidade de Sousa, sem controle e tratamento dos portadores e infectando indiretamente outros cães, e possivelmente outros animais e humanos.

Os fatores individuais dos hospedeiros definitivos, como sexo, idade e raça em conjunto com os fatores extrínsecos podem influenciar na ocorrência da infecção (Almeida et al. 2001). Observaram-se que 20,3% dos animais positivos eram sem raça definida. Estes valores corroboram com Almeida et al. (2001) e Moreira et al. (2019), que também não verificaram diferença estatística significativa entre a prevalência da infecção e as raças. Chamou atenção, que apesar dos resultados indicarem maior chance de infecção em animais SRD, a população canina avaliada foi maior para os mesmos, e possivelmente tenha maior taxa criação de cães sem raça definida quando comparados aos de raças puras.

Tabela 2. Análise univariada de fatores de risco associados à infecção por *Dirofilaria immitis* em cães do município de Sousa, Paraíba. ($P \leq 0,2$).

Variável	Categoria	Nº de total de animais	Nº de animais positivos (%)	P
Situação do animal				
	Domiciliado	160	16 (10.0)	<0.0001
	Errante	160	40 (25.0)	
Raça				
	SRD	261	53 (20.3)	0.005
	Com raça	59	3 (5.1)	
Idade				
	Até 12 meses	40	3 (7.5)	0.075
	Maior que 12 meses	280	53 (18.9)	
	Ambos	16	0 (0)	
Vermifugação				
	Não	262	52 (19.8)	0.062
	Sim, há 4 meses	34	2 (5.9)	
	Sim, há mais de 4 meses	24	2 (8.3)	
Exame clínico				
	Não	213	33 (15.5)	0.002
	Alterações cardíacas	35	14 (40.0)	
	Sinais de Leishmaniose	42	6 (14.3)	
	Outras alterações	30	3 (10.0)	

Nº - Número; SRD – Sem raça definida.

Tabela 3. Fatores de risco da análise multivariada para infecção por *D. immitis* em cães do município de Sousa, Paraíba. ($P \leq 0,05$).

Variável	Odds ratio	IC 95%	P
Situação do animal: Cão errante	2.463	[1.281-4.735]	0.007
Exame clínico: Alterações cardíacas	6.231	[1.539-25.236]	0.010

IC – Índice de confiança

A idade não foi considerada um fator de risco, entretanto, apresentou diferença estática na análise univariada, onde 53 dos cães positivos foram considerados acima de 12 meses, condição ideal para período pré patente de desenvolvimento da microfilaria (Bowman et al. 2010), corroborando com Trancoso et al. (2020).

Atualmente para profilaxia de *D. immitis*, são utilizadas vermífugos a base de dietilcarbamazina e agentes da família das lactonas macrocíclicas, sendo estes, que possuem uma eficácia terapêutica e profilática suficiente, pois interrompem o estágio larvar dois meses pós infecção e causam poucos efeitos adversos nos animais (Meireles et al. 2014). Acredita-se que a utilização e controle de vermifugação em 16,9% (54/320) dos animais, das categorias: “sim, há 4 meses” e “sim, há mais de 4 meses” obteve êxito na prevenção de *D. immitis*, e por esta razão houve negatividade nos testes. No entanto, 4 animais positivos também tinham histórico de vermifugação, e em virtude disso, questiona-se a veracidade de utilização de

vermífugo pelos tutores destes animais, a utilização de vermífugo eficiente contra o verme ou a carga parasitária desses animais no período de aplicação.

A arritmia cardíaca (13/320) foi o sinal clínico observado em maior número de animais positivos, entretanto, nenhum desses cães apresentaram quadro clínico de dirofilariose. Acredita-se que esses animais possuíam infecção leve a moderada, uma vez que, cães portadores de alta carga parasitária, com o tempo e conforme o número de parasitos, pode causar uma falha do ventrículo direito por estenose, bloqueio e lesões vasculares ocasionando uma hipertrofia ventricular direita, que eventualmente pode evoluir para insuficiência cardíaca direita (Zachary 2018). Com a evolução do caso, os sinais clínicos inespecíficos são manifestados pelo animal, como tosse, intolerância a exercícios, dispnéia, ruídos cardíacos e pulmonares (Nelson e Couto 2016).

Em um estudo realizado por Ferreira (2015), que buscava analisar a utilidade de um d-dímero como método de diagnóstico de tromboembolismo pulmonar no tratamento de cães com dirofilariose cardíaca, avaliou-se clinicamente 19 animais com dirofilariose canina, que 73,7% (14/19) apresentavam sinais cardíacos ($p=0,120$), sendo especificamente 63,2% (12/19) sopro cardíaco ($p=0,363$), demonstrando um importante sinal clínico indicador desta enfermidade. O cão que apresentou sopro cardíaco (1/320), manifestou durante a avaliação clínica, apatia, emagrecimento e ruídos respiratórios. No entanto, não foi possível afirmar que o mesmo apresentava quadro de dirofilariose, necessitando assim, de realização de um exame clínico minucioso associado a utilização de exames de imagem a fim de descartar outras enfermidades com sintomatologia semelhante. Os demais cães que apresentaram alterações cardíacas, não demonstraram outros sinais clínicos que indicassem um possível quadro da enfermidade.

A identificação dos parâmetros e fatores de risco de ocorrência da infecção deste parasito, estimula protocolos práticos de controle e profilaxia desta parasitose zoonótica. As áreas de maior ocorrência de *D. immitis* em cães favorecem maior risco de infecção para os seres humanos (Símon et al. 2012). Sugere-se que a cidade de Sousa possui fatores epidemiológicos que contribuem para infecção em humanos, provavelmente subdiagnosticadas e erroneamente relacionadas a neoplasias. Segundo Cavallazzi et al. (2002), a frequência e distribuição da dirofilariose humana são influenciadas principalmente pelo tamanho da população de cães, prevalência de dirofilariose canina, densidade de mosquitos e exposição desses animais à picada de vetores, fatores desses considerados significativos neste estudo.

Em áreas de ocorrência dessa parasitose em cães torna-se necessário investigação clínica e epidemiológica da transmissão para humanos, em razão da dificuldade do diagnóstico através de métodos sorológicos e moleculares, sendo preconizado a utilização de exames de imagem e histopatológicos (Gabrielli et al. 2021). Sugere-se que devido a prevalência significativa da infecção de *D. immitis* em cães na região do Sertão e a estreita relação desses animais com os seres humanos, possivelmente há transmissão e casos subdiagnosticados e erroneamente confundido com neoplasias.

Quatro cães positivos em algum dos testes foram negativos no esfregaço sanguíneo (4/28), entretanto, demonstraram positividade em apenas uma lâmina no teste de Knott-modificado. Esse resultado foi esperado, uma vez que, o mecanismo de concentração das hemácias e microfilárias obtidos no teste de Knott, facilita sua pesquisa e identificação (Newton e Wright 1956). Para identificação de microfilárias através de esfregaço sanguíneo é necessário infecção acima de 20 a 50 microfilárias por ml^{-1} (Dillon 2007; Silva e Langoni 2008), sugerindo menor sensibilidade em comparação a um teste de concentração. Acredita-se também que a baixa carga parasitária circulante no momento da coleta, vermifugação recente e/ou infecção recente, podem também contribuir para a variação de resultado entres os testes.

Para o diagnóstico mais efetivo da infecção por *D. immitis* é importante associar os testes de pesquisa de microfilárias circulantes aos exames de detecção de anticorpos ou antígenos, como Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e/ou testes rápidos imunocromatográficos que demonstram alta sensibilidade (Nelson et al. 2014). Os testes de detecção de anticorpos fornecem mais segurança no diagnóstico desta parasitose do que o teste de Knott-modificado, isso porque, o mesmo não apresenta positividade em casos de cães parasitados por vermes adultos do mesmo sexo, em infecções recentes e em animais com sistema imune elevado ocultando a microfilaremia (Fernandes et al. 2000). Por essa razão, acredita-se que a prevalência desta parasitose no Sertão da Paraíba deverá ser maior a partir da avaliação destes exames, complementando com a taxa de infecção oculta nestes animais. Adicionalmente, a taxa de ocorrência da *D. immitis* em cães encontrada nesse estudo não foi compatível com a maioria das informações encontradas na literatura, representando uma pesquisa única e importante para região.

3.7 CONCLUSÃO

A prevalência de *D. immitis* em cães no município de Sousa, Sertão Paraibano foi considerada significativa para região. Animais errantes e arritmia foram considerados fatores de risco para a parasitemia

por *D. immitis*. Dos testes utilizados para a determinação da prevalência, o teste de Knott modificado foi o método de maior positividade em comparação aos esfregaços sanguíneos.

Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). Esta pesquisa foi avaliada e aprovada pela CEUA sob cadastro de nº 01.0462.2017 e registro de nº 23000.000549.2018-37, após adequação ao parecer entregue a comissão em 25/05/2018.

Agradecimentos. Os autores agradecem ao IFPB pelo financiamento desta pesquisa.

3.8 REFERÊNCIAS

- Assis T.S., Medeiros R.M.T., Riet-Correa F., Galiza G.J.N., Dantas A.F.M. & Oliveira M.D. 2010. Intoxicações por plantas diagnosticadas em ruminantes e equinos e estimativa das perdas econômicas na Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.* 30(1):13-20. <[10.1590/S0100-736X2010000100003](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010000100003)>
- Acha P.N., Szyfres, B. 2003. Filariasis zoonóticas: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3 ed. Organización Panamericana de la Salud (OPS). (3): 284-291.
- Ahid S.M.M., Oliveira R.L., Saraiva L. 1999. Dirofilariose Canina na Ilha de São Luís, Nordeste do Brasil: zoonose potencial. *Cad. Saúd. Públ.* 15(2):405-412. <[10.1590/S0102-311X1999000200025](https://doi.org/10.1590/S0102-311X1999000200025)>
- Alberigi B., Oliveira A.C., Vieira G.S.R., Fernandes P.A., Labarthe N., Mendes-De-Almeida F. 2020. Unusual feline *Dirofilaria immitis* infection: a case report. *Braz. Journ. Vet. Parasitol.* 29(3). <[10.1590/S1984-29612020061](https://doi.org/10.1590/S1984-29612020061)>
- Alho A.M., Meireles J., Belo S., Carvalho L.D. 2014. Dirofilariose canina e felina, uma parasitose em evolução (I)–etiologia, biologia e epidemiologia. *Clín. Anim.* (2) 20-25.
- Almeida M.A.O., Barros M.TG., Santos E.P., Ayres M.C.C., Guimarães J.E., Gondim F.P. 2001. Parasitismo de cães por microfíliarias de *Dirofilaria immitis*: influência da raça, sexo e idade. *Rev. Bras. Saúd. Prod. Anim.* 2(3):59-64.
- Bowman D.D., Lynn R.C., Eberhard M.L., Alcaraz A. 2010. *Parasitologia Veterinária de Georgis*. 9ed. Elsevier.
- Brito A.C., Vila-Nova M.C., Rocha D.A.M., Costa L.G., Almeida W.A.P., Viana L.S., Lopes J.R.R., Fontes G., Rocha E.M.M., Regis L. 2001. Prevalência da filariose canina causada por *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum* em Maceió, Alagoas, Brasil. *Cad. Saúd. Públ.* 17(6):1497-1504. <[10.1590/S0102-311X2001000600021](https://doi.org/10.1590/S0102-311X2001000600021)>
- Canatto B.D., Silva E.A., Bernardi F., Mendes M.C.N.C., Paranhos N.T., Dias R.A. 2012. Caracterização demográfica das populações de cães e gatos supervisionados do município de São Paulo. *Arq. Bras. Med. Zoot.* 64(6):1515-1523. <[10.1590/S0102-09352012000600017](https://doi.org/10.1590/S0102-09352012000600017)>
- Carlos R.S.A, Muniz-Neta E.S., Spagnol F.H., Oliveira L.L.S., Brito R.L.L., Albuquerque G.R., Pamosny N. 2007. Freqüência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* e antígenos de *Dirofilaria immitis* em cães na microrregião Ilhéus-Itabuna, Bahia, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 16(3):117-120. <[10.1590/S1984-29612007000300001](https://doi.org/10.1590/S1984-29612007000300001)>
- Companion Vector-Borne Diseases (CVBD). 2006. Heartworm Disease. Disponível em: <<http://www.cvbd.org/en/mosquito-borne-diseases/heartworm-disease/diagnosis/>>. Acesso em 07 de jan. 2019.
- Diakou A., Kapantaidakis E., Tamvakis A., Giannakis V., Strus N. 2016. *Dirofilaria* infections in dogs in diferente areas of Greece. *Parasit. & Vect.* 9:508. <[10.1186/s13071-016-1797-6](https://doi.org/10.1186/s13071-016-1797-6)>
- Dillon R. 2007. Feline heartworm disease. Cats get heartworms too! College of Veterinary Medicine, Auburn University.
- Dohoo I.R., Ducrot C., Fourichon C., Donald A., Hurnik D. 1997. An overview of techniques for dealing with large numbers of independent variables in epidemiologic studies. *Prev. Vet. Med.* 29(3):221-239. <[10.1016/S0167-5877\(96\)01074-4](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(96)01074-4)>
- Donnett U., Hubbard K., Woodruff K., Varela-Stokes A. 2018. Prevalence of canine heartworm infection in Mississippi animal shelters. *Vet. Parasitol.* 259:68-73. <[10.1016/j.vetpar.2018.07.007](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.07.007)>
- Fernandes C.G.N., Moura S.T., Dias A.R., Vieira Filho W.S. 2000. Ocorrência de dirofilariose canina na região da Grande Cuiabá, estado de Mato Grosso – Brasil. *Braz. Journ. Vet. Res. Anim. Sci.* 36(5): 258-261. <[10.1590/S1413-95961999000500007](https://doi.org/10.1590/S1413-95961999000500007)>
- Ferreira D.R.A., Barbosa T.S., Castro A.U., Mariz M.A.S., Soares J.G., Teixeira D.I.A., Athayde A.C.R. 2004. Prevalência de infecções por filarídeos em cães de microrregiões de Natal, Brasil. *Ciê. Anim.* 14(2):111-115.
- Ferreira J.P.C. 2015. Doseamento do d-dímero como método de diagnóstico de tromboembolismo pulmonar em cães com dirofilariose cardíaca em Portugal. Tese de Doutorado, Universidade de Lisboa - Faculdade de Medicina Veterinária.

- Gabrielli S., Mangano V., Furzi F., Oliva A., Vita S., Poscia R., Fazii P., Di Paolo J., Marocco R., Mastroianni C.M., Bruschi F., Mattiucci S. 2021. Molecular Identification of New Cases of Human *Dirofilariosis* (*Dirofilaria repens*) in Italy. *Pathog.* 10(2):251. <[10.3390 / pathogens10020251](https://doi.org/10.3390/pathogens10020251)>
- Güven E., Avcioglu H., Cengiz S., Hayirli A. 2017. Vector-Borne Pathogens in Stray Dogs in Northeastern Turkey. *Vect. Bor. Zoon. Dis.* 17(8):610-617. <[10.1089 / vbz.2017.2128](https://doi.org/10.1089/vbz.2017.2128)>
- Hosmer D.W., Lemeshow S. 2000. Applied logistic regression. 2 ed. John Wiley & Sons, New York - USA.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2016. Sousa, Paraíba. 2020. IBGE. Disponível em:<<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pb/sousa>>. Acesso em 04 de jan. de 2020.
- Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), 2019, Sousa, Paraíba. 2019. INMET, 2019. Disponível em:<<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=tempo2/verProximosDias&code=2516201>>. Acesso em 04 de jan. de 2020.
- Kamyngkird K., Junsiri W., Witsanuwat C., Kengradomkij C., Saengow S., Sangchuto K., Kajeerum W., Pangjai D., Nimsuphan B., Inpankeaw T., Jittapalagong S. 2017. Prevalence and risk factors associated with *Dirofilaria immitis* infection in dogs e cats in Songkhla and Satun provinces, Thailand. *Agric. Nat. Res.* 51:299-302. <[10.1016/j.anres.2017.05.003](https://doi.org/10.1016/j.anres.2017.05.003)>
- Kannenber A.K., Frondana L., Martins I.H.R., Longhi C.E., Fialkowski M.M., Milczewski V. 2019. Occurrence of filarid parasites in household and sheltered dogs in the city of Joinville – Santa Catarina, Brazil. *Ciênc. Anim. Bras.* 20:1-11. <[10.1590/1809-6891v20e-53529](https://doi.org/10.1590/1809-6891v20e-53529)>
- Labarthe N.V., Paiva J.P., Reifur L., Mendes-De-Almeida F., Merlo A., Pinto C.J.C., Juliani P.S., Almeida M.A.O., Alves L.C. 2014. Updated canine infection rates for *Dirofilaria immitis* in areas of Brazil previously identified as having a high incidence of heartworm-infected dogs. *Parasit. & Vect.* 7(1):493. <[10.1186/s13071-014-0493-7](https://doi.org/10.1186/s13071-014-0493-7)>
- Labarthe N. 2014. *Dirofilaria immitis*: Um desafio permanente. Anais da 66ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Sociedade Brasileira para o Progresso Ciência, Rio Branco - Acre.
- Leidy J. 1856. A synopsis of entozoa and some of their ectocongeners observed by the author. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 8:42.
- Leite L.C., Navarro M.A.S., Luz E., Molinari H.P.; Círio S.M., Marinoni L.P., Diniz J.M.F., Leite S.C., Lunelli D., Scalet W.R. 2007. Prevalência de *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) em cães do canil municipal de Guaratuba, Paraná, Brasil. *Est. Biol.* 29(66):73-79. <[10.7213 / rev.v29i66.22209](https://doi.org/10.7213/rev.v29i66.22209)>
- Manev I. 2020. Prevalence of *Dirofilaria immitis* in stray dogs from Sofia, Bulgaria. *Int. Journ. Vet. Scie. Anim. Husb.* 5(4):40-43.
- Matias I.C., Soares L.A., Nascimento M.E.L., Mendonça I.P., Nogueira M.R.L., Silva N.A., Moura M.F.N., Ramos M.E.O., Vilela V.L.R., Maia L.A. 2016. *Dirofilaria immitis* em cão no sertão paraibano: achado de necropsia. *Res. Simp. IV Sem. Acad. Med. Vet., Universidade Federal de Campina Grande, Patos.*
- Meireles J., Paulos F., Serrão I. 2014. *Dirofilariose* em cães e gatos. *Rev. Port. Ciênc. Vet.* 109:70-78, 591-592.
- Mendes-de-Almeida F., Alves L. C., Fernandes P. A., Leivas R. M., Labarthe N. 2021. Infection with *Dirofilaria immitis* and Other Infections in Cats and Dogs from Rio de Janeiro, Brazil: The Need for Prophylactic Enforcement. *Act. Parasitol.* 66:962-968. <[10.1007 / s11686-021-00345-z](https://doi.org/10.1007/s11686-021-00345-z)>
- Montoya-Alonso J.A., Carretón E., Simón L., González-Miguel J., García-Guasch L., Morchón R., Simón, F. 2015. Prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs from Barcelona: validation of a geospatial prediction model. *Vet. Parasitol.* 212:3-4, 456-459. <[10.1016 / j.vetpar.2015.06.025](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.06.025)>
- Moreira H.R., Madeira E.A.O., Cunha D.N.L., Scofield A., Góes-Cavalcante G., Abel I., Guimarães R.J.P.S., Fernandes J.I. 2019. *Dirofilaria immitis* infection in dogs in Algodão Island, Brazilian Amazon. *Pesq. Vet. Bras.* 39(7):510-515. <[10.1590/1678-6160-PVB-5916](https://doi.org/10.1590/1678-6160-PVB-5916)>
- Nelson C.T., Mccall J., Carithers D. 2014. Current canine guidelines for the diagnosis, prevention, diagnosis, and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infections in dogs (revised July 2014). *Wilmington, Am. Heart. Soc. (AHS).*
- Nelson R.W., Couto C.G. 2016. *Medicina Interna de pequenos animais.* 4 ed. Elsevier., Rio de Janeiro, 1504.
- Newton M.D., Wright L.M. 1956. The occurrence of a dog filariid other than *Dirofilaria immitis* in the United States. *Journ. Parasitol.* 42:246-58. <[10.2307/3274849](https://doi.org/10.2307/3274849)>
- Ogawa G.M., Cruz E.N.D., Cunha P.N.A., Camargo L.M.A. 2013. Canine heartworm disease in Porto Velho: first record, distribution map and occurrence of positive mosquitoes. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 22(4):559-564. <[10.1590/S1984-29612013000400017](https://doi.org/10.1590/S1984-29612013000400017)>
- Ramos R.A.N., Rego A.G.O., Firmino E.D.F., Ramos C.A.N., Carvalho G.A., Dantas-Torres F., Otranto D., Alves L. C. 2016. Filaroid infection dogs in northeastern Brazil. *Vet. Parasitol.* 226:26-29. <[10.1016 / j.vetpar.2016.06.025](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.06.025)>
- Rodrigues R.T.G.A., Borges O.M.M., Dantas A.K.F.P., Tôrres L.M., Lucena R.S., Souza A.P. 2019. Presença de *Leishmania* sp. e *Dirofilaria immitis* em Tumor Venéreo Transmissível Canino cutâneo. *Act. Scient. Vet.* 47:399. <[10.22456 / 1679-9216.93570](https://doi.org/10.22456/1679-9216.93570)>

- Silva A.M.A., Almeida K.S., Sousa J.J.N., Freitas F.L.C. 2008. Dirofilariose Canina no Município de Coari, Amazonas, Brasil. Arch. Vet. Scie. 13(2):145-150. <[10.5380/avs.v13i2.11613](#)>
- Silva R.C., Langoni H. 2009. Dirofilariose. Zoonose emergente negligenciada. Ciên. Rur. 39(5):1614-1623. <[10.1590/S0103-84782009005000062](#)>
- Taylor M.A., Coop R.L., Wall R.L. 2017. Parasitologia Veterinária. 4 ed. Guanabara Koogan, Rio Janeiro.
- Thrusfield M. 2004. Epidemiologia veterinária. 2. ed. Roca, São Paulo.
- Trancoso T.A.L., Lima N.C., Barbosa A.S., Leles D., Fonseca A.B.M., Labarthe N.V., Bastos O.M.P., Uchoa C.M.A. 2020. Detection of *Dirofilaria immitis* using microscopic, serological, molecular techniques among dogs in Cabo Frio, RJ, Brazil, Braz. Journ. Vet. Parasitol. 29(1). <[10.1590/S1984-29612020009](#)>
- Velev V., Vutova K., Pelov T., Tsachev I. 2019. Human dirofilariasis in Bulgaria between 2009 and 2018. Helm. 56(3):247-251. <[10.2478 / helm-2019-0016](#)>
- Zachary J.F. 2018. Bases da Patologia Veterinária. 6. ed. Elsevier, Rio de Janeiro.

4. CAPÍTULO 2

Parasitological, serological and molecular diagnosis of *Dirofilaria immitis* in dogs in Northeastern Brazil

Laynaslan A. Soares, Isabela C. Matias, Samara S. Silva, Maria Estrela O. Ramos, Aline P. Silva, Mariana L. M. Barretto, Arthur W. L. Brasil, Maria Luana C. R. Silva, Glauco J. N. Galiza, Lisanka A. Maia.

Artigo científico submetido ao periódico *Experimental Parasitology*
(Impact fator 1.690/Qualis A4)

Parasitological, serological and molecular diagnosis of *Dirofilaria immitis* in dogs in Northeastern Brazil

Laynaslan A. Soares^{a*}, Isabela C. Matias^a, Samara S. Silva^b, Maria Estrela O. Ramos^c, Aline P. Silva^c, Mariana L. M. Barretto^d, Arthur W. L. Brasil^e, Maria Luana C. R. Silva^a, Glauco J. N. Galiza^f, Lisanka A. Maia^g.

^a Postgraduate Program in Animal Science and Health, Federal University of Campina Grande – UFCG, Patos, PB, Brazil.

^b Graduate Program in Animal Science, Federal University of Campina Grande – UFCG, Patos, PB, Brazil.

^c Graduation in Veterinary Medicine, Federal Institute of Paraíba - IFPB, Sousa, PB, Brazil.

^d Postgraduate Program in Veterinary Medicine, Rural Federal University of Pernambuco – UFRPE, Recife, PE, Brazil.

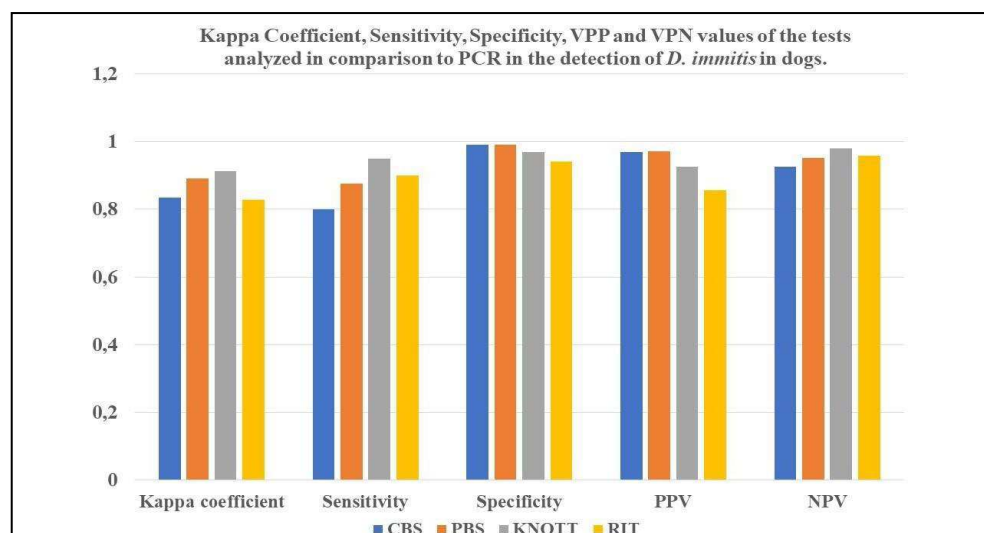
^e Department of Morphology, Federal University of Paraíba – UFPB, João Pessoa, PB, Brazil.

^f Department of Veterinary Medicine, Federal University of Campina Grande – UFCG, Patos, PB, Brazil.

^g Department of Veterinary Medicine, Federal Institute of Paraíba - IFPB, Sousa, PB, Brazil.

* Corresponding author: Laynaslan Abreu Soares. Postgraduate Program in Animal Science and Health, Federal University of Campina Grande – UFCG, Av. Universitária, s/n, Santa Cecília, CEP 58708-110, Patos, PB, Brazil. Email: laynaslanabreu@gmail.com.

4.1 Graphical abstract



4.2 Abstract

Dirofilaria immitis is a zoonotic filarid that mainly affects the domestic dog, causing a generally fatal chronic disease, known as heart worm disease. In addition to dogs, the parasite can affect wild canids, cats, and humans. Due to its importance to One Health, detection of parasitism by *D. immitis* in dogs can help the adoption of control measures that aim to reduce the occurrence of parasitosis in animals and humans. The detection of *D. immitis* is based on the use of parasitological, serological, and molecular methods, which vary in sensitivity and specificity. Therefore, the objective was to evaluate and compare the efficiency and performance of parasitological, serological, and molecular tests in the detection of *D. immitis* in dogs in Northeastern Brazil. Whole blood and serum from 140 dogs from the municipality of Sousa were used, varying between males and females; aged one to 17 years; pure and mixed breeds; domiciled and stray. Three microscopic parasitological techniques (MPT) were used: capillary blood smear (CBS), peripheral (PBS) and modified Knott test (MK) associated with the morphometric diagnosis of the microfilariae. For the detection of *D. immitis* antigens, a rapid immunochromatographic test (RIT) (ALERE Dirofilariose AG Teste kit®, Seogu-dong, Korea) was used, and polymerase chain reaction (PCR) as a molecular method. To evaluate the tests, PCR was considered the gold standard, and sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) values were calculated. To verify the agreement of the tests, the Kappa test was performed ($p \leq 0.05$). From the 140 analyzed samples, 33.6% (48/140) presented microfilariae, antigen and / or parasitic DNA. 23.6% (33/140) were positive in the CBS; 25.7% (36/140) in the PBS; 29.3% (41/140) in the MK; 30% (42/140) in the RIT and 28.6% (40/140) in the PCR. All methods showed almost perfect agreement with PCR, high sensitivity (0.8 to 0.95), specificity (0.94 to 0.99), and values established with VPP (0.8571 to 0.9722) and VPN (0.9519 to 0.9797). The CBS and PBS showed less sensitivity and greater specificity. MK presented the highest sensitivity and RIT was the choice for hidden infections. The diagnostic methods employed confirmed the occurrence of *D. immitis* in dogs in a non-coastal region of Northeastern Brazil.

Keywords: Effectiveness. Filarial worms. PCR.

4.3. Introduction

Filarial worms are nematode parasites transmitted by vectors that affect different systems in the definitive hosts (Kannenberg et al., 2019), causing zoonotic diseases of extreme

importance for public health (Silva and Langoni, 2009). In Brazil, *Acanthocheilonema* (*Dipetalonema*) *reconditum*, *Cercophtifilaria baina*, *Dipetalonema grassi*, *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* were identified parasiting canids (Vicent et al., 1997), the latter being the most prevalent in several regions (Labarthe et al., 2014).

Dirofilaria immitis it is a zoonotic filarid that mainly affects the domestic dog (Leidy, 1856). Microfilariae in their infectious form (L3) are transmitted mainly through culicids of the genus *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* (Taylor et al., 2017). The adult form of this parasite usually inhabits the pulmonary arteries and right ventricle of the heart of infected dogs, which develop clinical signs when they have a high parasite load (Mccall et al., 2008).

The diagnostic tests available for the detection of *D. immitis* are based on parasitological, serological, and molecular techniques, which vary in sensitivity and specificity (Ferreira et al., 2017; Moreira et al., 2019; Trancoso et al., 2020). Microscopic analysis tests are used to detect circulating microfilariae, such as blood smears from peripheral veins and capillaries (Pastrav et al., 2018), and the modified Knott test (concentration method) (Newton and Wright, 1956), both considered quick and low-cost methods. However, these tests have limited differentiation of filarial species and low sensitivity at night (Kamyngkird et al., 2017).

The detection tests for circulating antigens are the most sensitive methods for screening in asymptomatic dog populations and for the evaluation of suspected cases, recommending that they be associated with parasitological examination for greater sensitivity in the diagnosis (Diakou et al., 2016). These methods detect the presence of adult female larvae through lateral flow immunochromatographic tests and indirect immunoenzymatic assay (ELISA), and are highly sensitive and specific, which facilitates the detection of hidden infections (Nelson et al., 2014).

The Polymerase Chain Reaction (PCR) is currently being recommended as a species-specific test in the detection of *D. immitis* (Ramos et al., 2016; Moreira et al., 2019). Molecular methods present high sensitivity, allow better characterization and filarial differentiation, and can detect animals with low parasitemia, confirm true negative cases and the real prevalence of the parasite (Nuchpravoon, 2009; Kamyngkird et al., 2017). The association of different diagnostic tests for *D. immitis* is an important epidemiological strategy in the detection of parasitized animals in a population and region (Paranese et al., 2020), helping to carry out accurate diagnosis and consequently reduce the transmission of this parasite to other animals and humans (Genchi et al., 2019).

Research evaluating the efficiency of diagnostic tests for the detection of *D. immitis* in domestic dogs has been carried out in several regions of Brazil (Ramos et al., 2016; Kannenberg

et al., 2019; Moreira et al., 2019). However, few studies carried out comparative analysis of the performance of the parasitological and serological methods with PCR (Trancoso et al., 2020), and so far, none in the Northeast region of Brazil. Thus, the objective was to evaluate and compare the efficiency and performance of parasitological, serological, and molecular tests in the detection of *D. immitis* in dogs in Northeastern Brazil.

4.4. Materials and methods

4.4.1 Declaration of ethics

This research was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the IFPB, Brazil, under registration numbers 01.0462.2017 of May 25th, 2018.

4.4.2 Study area and sample bank

Samples of whole blood and serum from 140 dogs were collected from April to December 2018 in Sousa, Paraíba, Northeast Brazil. (Lat. 6 ° 45'39 " S, Long. 38 ° 13'51 " W). The city of Sousa has a territorial area of 728,492 km², consisting of 32 neighborhoods, an estimated population of 69,723 habitants and a demographic density of 89.10 habitants/km² (IBGE, 2019). It has a warm semi-arid climate of the "BSh" type, according to the Köppen-Geiger climate classification, and in 2018, the average annual temperature was 27 °C and 900 mm rainfall (INMET, 2019).

To determine the minimum number of dogs to be evaluated, a simple random sampling was performed (Equation 01), resulting in an array of 262 samples. Equation 01: Simple random sampling (Thrusfield, 2004): $n = \frac{Z^2 \times P(1-P)}{d^2}$ (n = number of animals sampled / Z = normal distribution value for the 95% confidence level / P = expected prevalence 23.1% (Labarthe et al. 2014) / d = absolute error of 5%). Then the adjustment was made for finite populations with the result obtained (Equation 02) (Thrusfield, 2004).

Equation 02: Adjustment for finite populations (Thrusfield, 2004): $N_{ajus} = \frac{N \times n}{N + n}$ (n_{ajus} = adjusted sample size / N = total population size / n = initial sample size).

The minimum number of samples was 136; however, 140 samples were collected for a better evaluation of the data. Sampling was randomized: the selected dogs were both purebred or mixed breed, male or female, aged one to 17 years, domiciled or stray. Domiciled dogs were included due to the availability of information provided by tutors.

From each animal, 5 ml of blood from the cephalic vein was collected; 2 ml was placed in sterile tubes previously identified containing anticoagulant (Sodium Salt of

Ethylenediaminetetraacetic Acid - EDTA); 3 ml was placed in sterile tubes without anticoagulant, centrifuged and the serum was stored in sterile microtubes and kept at -20°C. All samples were properly identified for parasitological and serological tests.

4.4.3 Microscopic parasitological techniques (MPT)

Three methods of detecting circulating microfilariae in whole blood were used: capillary blood smear (CBS), peripheral blood smear (PBS) and modified Knott test (MK). Two slides were made for each technique. Samples for CBS and PBS were obtained from the tip of the ear and the superficial cephalic vein, respectively. Smears were fixed and stained by Romanowsky's Diff-Quik. CBS and PBS were evaluated qualitatively.

The modified Knott test was performed according to the description by Bowman et al. (2010): "1 ml of blood was added to 10 ml of 2% formaldehyde in a Falcon tube, which was homogenized by inversion and agitation to lyse erythrocytes and conserve microfilariae in a stretched format. The sample tube was then centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes. After centrifugation, the supernatant was discarded by inversion of the tube and then a drop of 0.1% methylene blue was added to the sediment and homogenized. Then, a drop of the sediment was collected, placed on a slide and covered with a coverslip for viewing under an optical microscope in search of blue-stained distended microfilariae".

In this examination, the morphometric diagnosis of the microfilariae of the positive animals was also carried out based on the values mentioned by Companion Vector-Borne Diseases-CVBD (2006): "*D. immitis* microfilariae are larger, measure 205 to 283µm in length, 5 to 6.5µm in width, have conical head and tail in a straight line, and *Acanthocheilonema (Dipetalonema) reconditum* are smaller, measure 213 at 240µm in length, 4 to 5µm in width, present blunt head and tail in a folded hook shape".

4.4.4 Rapid immunochromatographic test (RIT)

Serum samples were tested for antigens from adult females of *D. immitis* using commercially available immunochromatographic rapid test kits from ALERE Dirofilariose AG Test kit® (BioNote Inc., Seogu-dong, Korea), in accordance to the manufacturer's recommendations. The rapid test has a sensitivity of 98.6% and a specificity of 100%.

4.4.5 Molecular detection

DNA was extracted from serum samples using the PureLink® PCR Purification Kit (Invitrogen, California, United States), following the manufacturer's recommendations. PCR

was performed as previously described by Oh et al. (2017). Species-specific primers of the *D. immitis* COI gene (forward: 5'-ATT GGG TGC CCC TGA AAT GG -3 ' and reverse: 5'-CCC TCT ACA CTC AAA GGA GGA -3') were used to detect the DNA of *D. immitis*, with an amplification of 150 bp in 2% agarose gel. A serum sample from a positive dog in a Knott-modified test and necropsy was used as a positive control and ultrapure water as a negative control.

4.4.6 Statistical analysis

To evaluate the effectiveness of diagnostic tests, PCR was considered the gold standard. It was possible to calculate the values of sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV). In addition, to verify the agreement between the PCR and CBS, PBS, MK and RIT, the Kappa test was performed ($p \leq 0.05$). The values obtained were classified according to Landis & Koch (1977): coefficient < 0 (no agreement), between 0 and 0.19 (slight agreement), between 0.20 and 0.39 (fair agreement), between 0.40 and 0.59 (moderate agreement), 0.60 and 0.79 (substantial agreement), and 0.80 and 1.00 (almost perfect agreement). Data analysis was performed using the SPSS 23.0 for Windows software.

4.5. Results

Of 140 samples analyzed, 33.6% (48/140) presented microfilariae, antigen and / or parasitic DNA. Of these, 23.6% (33/140) were positive at CBS; 25.7% (36/140) in the PBS; 29.3% (41/140) in the MK; 30% (42/140) in the RIT and 28.6% (40/140) in the PCR. In the parasitological diagnosis by microscopy, 76.2% (32/42) were positive in all techniques (CBS, PBS and MK) and 23.8% (10/42) in at least one. In the MK 92.7% (38/41) were also positive in the PCR; 4.9% (2/41) positive only in the MK; and 2.4% (1/41) positive also in RIT.

The RIT obtained 85.7% (36/42) of positivity in the PCR positive samples; 88.1% (37/42) with MPT; and 9.5% (4/42) only in RIT. Of the positive samples for PCR, 95% (38/40) were also positive for PMS; 90% (36/40) with RIT; and only 2.5% (1/40) were positive exclusively for PCR.

PCR was used as a reference test ($p < 0.0001$). Agreement levels of 0.834 were obtained for CBS; 0.892 for PBS; 0.913 for MK and 0.828 for RIT. Table 1 shows the results of agreement of positive and negative results and the values of sensitivity, specificity, PPV and NPV of the analyzed tests.

In the positive CBS and PBS, the *D. immitis* specimens were characterized by a vermiform structure stained in purple (Figure 1A). All microfilariae observed in the modified

Knott test (Figure 1B) presented measures according to those mentioned by CBVD (2006). In PCR, DNA amplification in 150bp occurred in 40/140 (28.6%) samples (Figure 1C).

Table 1. Kappa Coefficient, Sensitivity, Specificity, PPV and NPV values of the tests analyzed in comparison to PCR, considered the gold standard test. ($p < 0.0001$).

Test	Kappa coefficient	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
CBS	0.834	0,8	0.99	0.9696	0.9252
PBS	0.892	0.875	0.99	0.9722	0.9519
KNOTT	0.913	0.95	0.97	0.9268	0.9797
RIT	0.828	0.9	0.94	0.8571	0.9591

CBS – Capillary blood smear. PBS – Peripheral blood smear. KNOTT – Modified Knott test. RIT – Rapid immunochromatographic test. PPV – Positive Predictive Value. NPV – Negative Predictive Value.

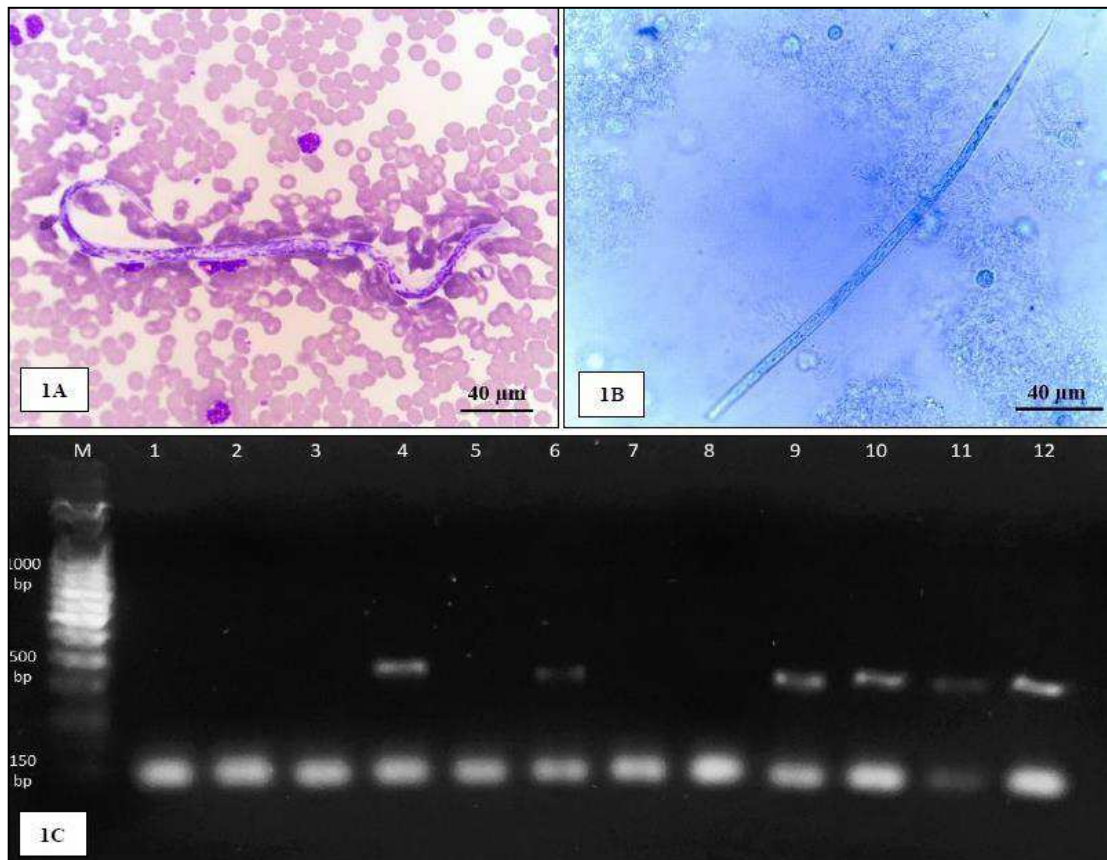


Figure 1. A. Microfilaria of *D. immitis* in a blood smear. 40x. Romanowsky Diff-Quik. B. Distended *D. immitis* microfilaria in a modified Knott test slide. 40x. Methylene blue. C. Species-specific PCR amplification of *D. immitis* COI gene (150 bp). Molecular weight marker (M); Negative control (1); Selected test samples (2-11); Positive control (12).

4.6 Discussion

In the present study, there were no significant differences between parasitological, serological, and molecular tests ($p \leq 0.05$). All the methods showed high efficiency and reliability, considering that they presented almost perfect agreement with the PCR. MK was considered the most effective parasitological method, sensitive and consistent with PCR ($K = 0.913$ / Sensitivity 0.95 / NPV 0.9797), possibly as a result of the high microfilaremia present in the animals evaluated (Trancoso et al., 2020). Similar results were obtained by other authors (Vieira et al., 2014; Ramos et al., 2016; Moreira et al., 2019). It is believed that CBS and PBS did not achieve the same performance when compared to MK, due to the concentration of microfilariae in this technique, allowing greater precision and better identification of filarids (Nelson et al., 2014).

Additionally, it is suggested that the lower sensitivity in the detection of *D. immitis* by blood smears in positive samples may be associated with the blood collection site. In a study by Pastrav et al. (2018), *D. immitis* microfilaraemia was considered lower in capillary blood from extremities than in peripheral venous blood, mainly due to the difficulty and lack of adequate collection methods for capillaries, which justifies the lower sensitivity to CBS (0.8) found in this study. Another hypothesis is that blood smears with a small amount of blood associated with a low parasite load can result in false-negative results (Trancoso et al., 2020). However, it is noteworthy that CBS and PBS presented the highest specificity (0.99) and PPV (0.9696 and 0.9722, respectively), which indicates greater safety of negative results in these tests.

It is important to note that 92.7% of the samples that were positive in MK and PCR were possibly from microfilaremic animals, since the detection in both tests is related to the presence of circulating microfilariae, even in small quantities (Trancoso et al., 2020). Two samples (4.9%) were positive only in the MK and one sample (2.4%) was positive in the RIT, probably associated with low parasite load, high amounts of antigen-antibody complexes, recent adulticidal treatments, presence of other filarids mistakenly identified as *D. immitis* (Donnett et al., 2018), presence of male parasites (Mccall et al., 2008), and/or failure to amplify DNA as a result of inhibitors (Butler, 2012).

The sensitivity (90%) and specificity (94%) values of the RIT were lower than those indicated by the ALERE Dirofilariose AG Teste kit® (Sensitivity 98.6% and Specificity 100%), which may be related to the number of samples and the evaluated geographic areas. In addition, the RIT showed the least agreement with the results obtained by the PCR ($K = 0.828$), a divergent finding established by some authors, who established it as a test of election and

screening with high agreement (Genchi et al., 2017; Henry et al., 2018). The low number of mature females, low antigenemia and/or high amounts antigen-antibody complexes may interfere and may mask the antigen reactivity, which may be related to reduced sensitivity when compared to PCR and MPT, possibly characterizing false-negative samples (Borthakur et al., 2015; Drake et al., 2015; Henry et al., 2018). The strict presence of male parasites was ruled out due to the positivity obtained in the MK and PCR tests, which sensibly detect circulating microfilariae (Nelson et al., 2014).

In contrast, four samples (9.5%) were positive only at RIT, possibly evidencing hidden infections in dogs. The animal's immune response, low parasite load, parasite infertility and the use of microfilaricides are considered the main factors that promote hidden infections (Little et al., 2018; Laidoudi et al., 2020). For this reason, we believe that the analyzed samples came from animals possibly treated with macrocyclic lactones and/or doxycycline, a common protocol in the treatment of tick infestations and gastrointestinal worms in the Northeast region of Brazil (Silva Neto et al., 2020). Doxycycline acts reducing the population of *Wolbachia* sp., mandatory endo-symbiotic intracellular bacteria present in *D. immitis*, affecting all larval and adult stages, generating false-negative samples due to the suppression of the microfilaremia of positive animals (Mccall et al., 2008; Nelson et al., 2014). Another possibility for reactivity of these samples is cross-reaction with other secretory antigens, which can react in some RIT kits, such as *Toxocara canis*, *Dipylidium caninum*, *Taenia teaniaeformis*, *Dirofilaria repens*, *Angiostrongylus vasorum* and *Spirocerca lupi* (Venco et al., 2017; Henry et al., 2018; Panarese et al., 2020).

The comparison of PCR with parasitological and serological tests was necessary to estimate the effectiveness of the tests and to better identify *D. immitis*. PCR is an accurate, extremely sensitive and specific method for detecting filarids (Silbermayr et al., 2014; Ferreira et al., 2017), and can even identify larvae in the first stage (L1) in intermediate hosts (Nutman, 2008). There was a greater agreement of positive animals with PMS (95%) than RIT (90%). These results are probably related to the presence of DNA of circulating microfilariae detected by PCR and MPT, in comparison to samples of suspected hidden infections detected only by RIT (9.5%), which would make detection by PCR difficult. This assumption was also suggested by Simsek et al. (2008), who obtained 27/211 seropositive dogs in the RIT and all negative in the PCR. The dogs had a history of monthly chemoprophylaxis (ivermectin), and there was a possible failure in the amplification of the DNA due to the presence of inhibitors such as EDTA. Additionally, it is believed that positive samples for MPT and negative for PCR and TRI (4.9%), may be related to the absence of microfilariae in the analyzed sample.

4.7 Conclusion

All the methods evaluated showed high performance, efficacy and almost perfect agreement when compared to PCR in the detection of *D. immitis* in dogs from a non-coastal region of Northeastern Brazil. CBS and PBS were the techniques with less sensitivity and greater specificity. MK presented the highest sensitivity and RIT was the most adequate choice to evaluate hidden infections.

4.8. Highlights

- Almost perfect agreement of parasitological and serological exams with PCR in the detection of *D. immitis* in dogs.
- CBS and PBS were the techniques with the lowest sensitivity and highest specificity.
- MK was considered the most sensitive test.
- RIT was the most suitable test to evaluate hidden infections.
- The diagnostic methods confirmed the occurrence of this parasitosis in dogs in a non-coastal region of Northeast Brazil.

4.9. Declaration of interests

The authors declare that there is no commercial or financial conflict of interest.

4.10. Authors contributions

Laynaslan A. Soares: Data Curation, Writing - Original draft, Visualization. **Isabela C. Matias, Samara S. Silva, Maria Estrela O. Ramos, Aline P. Silva, Mariana L. M. Barretto, Maria Luana C. R. Silva:** Research and Visualization. **Arthur W. L. Brasil:** Formal analysis. **Glauco J. N. Galiza, Lisanka A. Maia:** Validation, Writing - Review and Editing, Supervision.

4.11. Acknowledgment

The authors would like to thank IFPB campus Sousa - Interconnects (01/2018/Research Notice) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for funding

this research. To the entire team of the Laboratory of Veterinary Parasitology of IFPB campus Sousa and of the Laboratory of Molecular Biology of UFCG campus Patos, for providing the necessary subsidies to carry out this experiment.

4.12. References

Albonico, F., Loiacono, M., Gioia, G., Genchi, C., Genchi, M., Mortarino, M. 2014. Rapid differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood by real-time PCR coupled to high resolution melting analysis. *Vet. Parasit.* 200, 128-132. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.11.027>

Batista, N.C., Bezerra, N.M., Gadelha, I.C.N., Borges, M.E.O., Cabral, S.O., Dias, C.E.V., Sakamoto, S.M., Freitas, C.I.A. 2008. Utilização de kit comercial Anigen Rapid *Dirofilaria immitis* Ag[®] em comparação com a técnica de Knott modificada no diagnóstico da incidência de cães portadores da dirofilariose. *Act. Vet. Bras.* 2, 3, 76-79. <https://doi.org/10.21708/avb.2008.2.3.703>

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. *Scie. Wor. Journ.* <https://doi.org/10.1155/2015/265385>

Bowman, D.D., Lynn, R.C., Eberhard, M.L., Alcaraz, A. 2010. *Parasitologia Veterinária de Georgis*. 9 ed. Elsevier.

Butler, J. 2012. PCR Chapter 4: Amplification: Capabilities and Cautions. In: *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Elsevier, 69-97. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-04189-3>

Companion Vector-Borne Diseases (CVBD). 2006. Heartworm Disease. Disponível em: <<http://www.cvbd.org/en/mosquito-borne-diseases/heartworm-disease/diagnosis/>>. Acesso em 07 de jan. 2019.

Diakou, A., Kapantaidakis, E., Tamvakis, A., Giannakis, V., Strus, N. 2016. *Dirofilaria* infections in dogs in different areas of Greece. *Parasit. & Vect.* 9, 508.

<https://doi.org/10.1186/s13071-016-1797-6>

Donnett, U., Hubbard, K., Woodruff, K., Varela-Stokes, A. 2018. Prevalence of canine heartworm infection in Mississippi animal shelters. *Vet. Parasitol.* 259, 68-73.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.07.007>

Drake, J., Gruntmeir, J., Merritt, H., Allen, L., Little, S.E. 2015. False negative antigen tests in dogs infected with heartworm and placed on macrocyclic lactone preventives. *Parasit. & Vect.* 8, 68. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0698-4>

<https://doi.org/10.1186/s13071-015-0698-4>

Ferreira, C., Afonso, A., Calado, M., Maurício, I., Alho, A.M., Meireles, J., Carvalho, L.M., Belo, S. 2017. Molecular characterization of *Dirofilaria* spp. circulating in Portugal. *Parasit. & Vect.* 10, 250, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2180-y>

<https://doi.org/10.1186/s13071-017-2180-y>

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

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.01.014>

Henry, L.G., Brunson, K.J., Walden, H.S., Wenzlow, N., Beachboard, S.E., Barr, K.L., Long, M.T. 2018. Comparison of six commercial antigen kits for detection of *Dirofilaria immitis* infections in canines with necropsy confirmed heartworm status. *Vet. Parasit.* 254, 178-182.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.037>

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.037>

Kamyngkird, K., Junsiri, W., Witsanuwat, C., Kengradomkij, C., Saengow, S., Sangchuto, K., Kajeerum, W., Pangjai, D., Nimsuphan, B., Inpankeaw, T., Jittapalagong, S. 2017.

Prevalence and risk factors associated with *Dirofilaria immitis* infection in dogs and cats in Songkhla and Satun provinces, Thailand. *Agric. Nat. Res.* 51, 299-302.

<https://doi.org/10.1016/j.anres.2017.05.003>

Kannenbergh, A.K., Frondana, L., Martins, I.H.R., Longhi, C.E., Fialkowski, M.M., Milczewski, V. 2019. Occurrence of filarid parasites in household and sheltered dogs in the

city of Joinville – Santa Catarina, Brazil. Ciên. Anim. Bras. 20, 1-11.
<https://doi.org/10.1590/1809-6891v20e-53529>

Labarthe, N.V., Paiva, J.P., Reifur, L., Mendes-De-Almeida, F., Merlo, A., Pinto, C.J.C., Juliani, P.S., Almeida, M.A.O., Alves, L.C. 2014. Updated canine infection rates for *Dirofilaria immitis* in areas of Brazil previously identified as having a high incidence of heartworm-infected dogs. Parasit. & Vect. 7, 1, 493. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0493-7>

Laidoudi, Y., Davoust, B., Varloud, M., Niang, E.H.A., Fernollar, F., Mediannikov, O. 2020. Development of a multiplex qPCR-based approach for the diagnosis of *Dirofilaria immitis*, *D. repens* and *Acanthocheilonema reconditum*. Parasit. & Vect. 13, 319.
<https://doi.org/10.1186/s13071-020-04185-0>

Landis, J.R., Koch, G.G. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. Biomet. 33, 159-174.

Leidy, J. 1856. A synopsis of entozoa and some of their ectocongeners observed by the author. Proc. Nat. Acad. Sci. 8, 42.

Little, S., Saleh, M., Wohltjen, M., Nagamori, Y. 2018. Prime detection of *Dirofilaria immitis*: understanding the influence of blocked antigen on heartworm test performance. Parasit. & Vect. 11, 1, 186. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2736-5>

McCall, J.W., Genchi, C., Kramer, L.H., Guerrero, J., Venco, L. 2008. Heartworm disease in animals and humans. Adv. Parasit. 66, 193-285, 2008. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)00204-2](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)00204-2)

Moreira, H.R., Madeira, E.A.O., Cunha, D.N.L., Scofield, A., Góes-Cavalcante, G., Abel, I., Guimarães, R.J.P.S., Fernandes, J.I. 2019. *Dirofilaria immitis* infection in dogs in Algodual Island, Brazilian Amazon. Pesq. Vet. Bras. 39, 7, 510-515. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-6160-pvb-5916>

Nelson, C.T., McCall, J., Carithers, D. 2014. Current canine guidelines for the diagnosis, prevention, diagnosis, and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infections in dogs (revised July 2014). Wilmington, Am. Heart. Soc. (AHS).

Newton, M.D., Wright, L.M. 1956. The occurrence of a dog filariid other than *Dirofilaria immitis* in the United States. *Journ. Parasitol.* 42, 246-58.

Nuchprayoon, S. 2009. DNA-based diagnosis of lymphatic filariasis. *South. Asi. Journ. Trop. Med. Publ. Heal.* 40, 5, 904-913.

Nutman, B.T. Filarial infections. In: Jong, E.C., Sanford, C.A. 2008. *The travel and tropical medicine manual*. 4 ed., Elsevier, 611–625.

Oh, E.Y., Kim, K.T., Sung, H.J. 2017. Molecular Detection of *Dirofilaria immitis* Specific Gene from Infected Dog Blood Sample Using Polymerase Chain Reaction. *Iran. Journ. Parasit.* 12, 3.

Paranese, 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. *Pathog.* 9, 499.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9060499>

Pastrav, I.R., Ionica, A.M., Pestean, C., Novakova, E., Modry, D., Mihalca, A.D. 2018. Peripheral venous vs. capillary microfilariaemia in a dog co-infected with *Dirofilaria repens* and *D. immitis*: a comparative approach using triatomine bugs for blood collection. *Vet. Parasit.* 257, 54-57. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.05.017>

Ramos, R.A.N., Rego, A.G.O., Firmino, E.D.F., Ramos, C.A.N., Carvalho, G.A., Dantas-Torres, F., Otranto, D., Alves, L. C. 2016. Filarioids infection dogs in northeastern Brazil. *Vet. Parasitol.* 226, 26-29. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.06.025>

Silbermayr, K., Eigner, B., Duscher, G.G., Joachim, A., Fuehrer, H.P. 2014. The detection of different *Dirofilaria* species using direct PCR technique. *Parasit. Res.* 113, 2, 513-516.
<https://doi.org/10.1007/s00436-013-3682-y>

- Silva Neto, J.S., Bezerra, R.A., Costa, P.W.L., Vilela, V.L.R., Feitosa, T.F. 2020. Hemoparasitoses causadas por *Ehrlichia* spp. e *Babesia* spp. em cães atendidos no Hospital Veterinário do IFPB, Campus Sousa. *Atual. Med. Trop. Bras. Vet.* 80-92. <https://doi.org/10.35170/ss.ed.9786586283037.04>
- Silva, R.C., Langoni, H. 2009. Dirofilariose. Zoonose emergente negligenciada. *Ciê. Rur.* 5, 39, 1614-1623. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000062>
- Simsek, S., Utuk, A.E., Koroglu, E., Rishniw, M. 2008. Serological and molecular studies on *Dirofilaria immitis* in dogs from Turkey. *Journ. Helmin.* 82, 181-186. <https://doi.org/10.1017/S0022149X0896079X>
- Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L., 2017. *Parasitologia Veterinária*. 4 ed. Guanabara Koogan, Rio Janeiro.
- Thrusfield, M. 2004. *Epidemiologia veterinária*. 2. ed. Roca, São Paulo.
- Trancoso, T.A.L., Lima, N.C., Barbosa, A.S., Leles, D., Fonseca, A.B.M., Labarthe, N.V., Bastos, O.M.P., Uchoa, C.M.A. 2020. Detection of *Dirofilaria immitis* using microscopic, serological, molecular techniques among dogs in Cabo Frio, RJ, Brazil, *Braz. Journ. Vet. Parasitol.* 29, 1. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612020009>
- Venco, L., Manzocchi, S., Genchi, M., Kramer, L.H. 2017. Heat treatment and false-positive heartworm antigen testing in ex vivo parasites and dogs naturally infected by *Dirofilaria repens* and *Angiostrongylus vasorum*. *Parasit. & Vect.* 10, 476. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2444-6>
- Vicente, J.J., Rodrigues, H.D.O., Gomes, D.C., Pinto, R.M. 1997. Nematóides do Brasil. Parte V: Nematóides de Mamíferos. *Rev. Bras. Zool.* 14, 1-452.
- Vieira, A.L., Vieira, M.J., Oliveira, J.M., Simões, A.R., Diez-Baños, P., Gestal, J. 2014. Prevalence of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs of central Portugal. *Paras.* 21, 5. <https://doi.org/10.1051/parasite/2014003>

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram alta prevalência (17,5%) de *D. immitis* em cães no Sertão Paraibano, considerando animais errantes e arritmia como fatores de risco para infecção. Os métodos parasitológico, sorológico e molecular apresentaram alto desempenho e eficácia na detecção do parasitismo dos cães na região. A detecção de *D. immitis* em diferentes testes confirma a ocorrência da parasitose no Sertão Paraibano, indicando riscos de transmissão para outros animais e humanos, e demonstrando a importância em sinalizar aos órgãos de vigilância epidemiológica e sanitária a prevenção e controle dessa zoonose.