



Relatório Final de Estágio

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**“ESTUDO TRANSVERSAL DE DIROFILARIOSE CANINA NA
REGIÃO DA MADEIRA, PORTUGAL”**

Sara Raquel Teixeira Pereira

Orientador

Dr. ° Armando José da Silva Lemos

Co-Orientador

Dr. ª Helena Isabel Quaresma Nunes

Porto, Abril 2010

Relatório Final de Estágio

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**“ESTUDO TRANSVERSAL DE DIROFILARIOSE CANINA NA
REGIÃO DA MADEIRA, PORTUGAL”**

Sara Raquel Teixeira Pereira

Orientador

Dr. ° Armando José da Silva Lemos

Co-Orientador

Dr. ª Helena Isabel Quaresma Nunes

Porto, Abril 2010

RESUMO

A dirofilariose é uma das principais doenças do cão, transmitida por mosquitos, visto apresentar um carácter patogénico para canídeos e felídeos, sendo por vezes zoonótica. Esta doença é considerada endémica na Madeira, na qual o mosquito da espécie *Culex theileri* foi identificado como possível vector natural na transmissão da L₃ aos cães.

Foi efectuado um estudo transversal (cross-sectional study), por busca passiva de amostras representativas de cães domésticos da Madeira, levados às clínicas Vetmédicas e à Sociedade Protectora de Animais Domésticos do Funchal sediadas no Funchal, em Machico e em Câmara de Lobos, de forma a estimar a prevalência da dirofilariose canina na Madeira.

Foram analisados 257 cães, dos quais foram detectados 30 animais com microfilárias de *Dirofilaria immitis*. Além do diagnóstico parasitológico pela técnica de gota fresca e técnica de Knott modificada para identificação de microfilárias, foi utilizado um teste imunológico rápido para detecção dos vermes adultos, o qual confirmou os dados parasitológicos obtidos no estudo.

Os resultados obtidos indicam que a prevalência estimada de Dirofilariose canina na Madeira, actualmente é 11,67%, pelo que parece ter diminuído nos últimos anos. Ao nível da localização, os resultados indicaram que os cães de Câmara de Lobos são 3 a 6 vezes mais afectados que os cães do Funchal, de Machico e de Santa Cruz.

Relativamente aos factores de risco, o género e a pelagem parecem ser factores de risco, em que neste estudo os cães machos são 2,3 vezes mais afectados que as fêmeas e que os cães de pêlo curto são 2,2 vezes mais afectados que os de pêlo comprido. Neste estudo, a idade, o porte, o habitat e a raça não demonstraram terem influência significativa sobre a prevalência da dirofilariose canina.

Palavras-chave: Dirofilariose; *Dirofilaria immitis*; Estudo transversal (cross-sectional study); Prevalência; Região Autónoma da Madeira, Portugal

AGRADECIMENTOS

Quero prestar o meu maior agradecimento à mãe Idalina e ao pai José António que, tornaram tudo isto possível, com o seu apoio e carinho; à avó Isabel que me criou e que tudo fez para que este projecto fosse alcançado, e que apesar de já não o poder ver, certamente seria o seu orgulho; ao Daniel pelo seu apoio, amor e compreensão; aos amigos que me acompanharam nesta jornada Cláudia, Sofia e Filipa; aos amigos de sempre e para sempre Marlene, Susana, Ana Cristina, Luís e Sílvia;

Aos professores que me marcaram neste percurso Margarida Araújo, Paulo Vaz-Pires, Paulo Costa, Augusto Faustino, Nuno Canada, Carla Mendonça, António Rocha e Armando Lemos, meu orientador que sempre se mostrou disponível para encaminhar e apoiar na realização deste estudo;

Ao Dr. ^o Duarte Correia, à Dr. ^a Rosalina Coelho e ao Sr. ^o Reis que tornaram este estágio possível, concedendo-me esta oportunidade enriquecedora de aprendizagem; ao corpo clínico e auxiliares da Vetmédis, em especial à Dr. ^a Isabel Quaresma que em tudo contribuiu para o sucesso deste projecto, à Dr. ^a Joana Lopes que me acompanhou e ajudou a crescer e às auxiliares Maria José e Cidália;

Ao Laboratório Regional de Veterinária e Segurança Alimentar (LRVSA) pelo seu contributo no conhecimento e aperfeiçoamento das técnicas utilizadas neste estágio, essenciais para a concretização do mesmo;

À Sociedade Protectora de Animais Domésticos do Funchal (SPAD) pela sua disponibilidade e seu contributo na recolha das amostras de reconhecida importância.

ÍNDICE GERAL

CAPA.....	i
CONTRA-CAPA.....	ii
RESUMO.....	iii
AGRADECIMENTOS.....	iv
ÍNDICE GERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	vii
INTRODUÇÃO.....	1
Motivo da escolha do tema	3
DIROFILARIOSE CANINA.....	5
Transmissão.....	5
Ciclo de vida.....	6
Diagnóstico.....	7
Sintomatologia	8
Distribuição e prevalência	9
METODOLOGIA.....	10
Descrição da área geográfica.....	10
População alvo	11
Amostragem	11
Método de colheita.....	12
Análise estatística.....	14
RESULTADOS	15
DISCUSSÃO	21
BIBLIOGRAFIA.....	27
ANEXOS.....	30
Anexo 1	30
Anexo 2.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Técnica de diferenciação histo-química entre microfírias de <i>D. immitis</i> (A) e <i>D. reconditum</i> (B) (fotografias originais tiradas a lâminas cedidas pelo LRVSA).....	1
Figura 2 – Formulações de controlo preventivo de <i>D. immitis</i> em cães. A - Heartgard® da Merial ^[20] e B - Guardian® da For Dodge (fotografia original).....	2
Figura 3 – Ciclo de vida de <i>D. immitis</i> ^[6]	3
Figura 4 – Mapa de casos identificados nos EUA de dirofilariose pulmonar em humanos por <i>D. immitis</i> . (1995) ^[28]	3
Figura 5 – Secção transversal de um nódulo pulmonar humano com um verme no interior (seta). ^[33]	4
Figura 6 – Vermes adultos de <i>D. immitis</i> alojados no átrio direito do coração. ^[44]	5
Figura 7 – <i>Culex pipiens</i> ^[17]	5
Figura 8 – Tempo de maturação larvar durante o ciclo de vida de <i>D. immitis</i> . ^[28]	6
Figura 9 – Técnica de Knott modificada. (fotografia original).....	7
Figura 10 – Extremidade anterior e posterior de microfírias de <i>D. immitis</i> (A e B) e de <i>D. reconditum</i> (C e D) obtidas pela técnica de Knott modificada. ^[16]	7
Figura 11 – Teste imunológico rápido efectuado neste estudo. (fotografia original)	8
Figura 12 – Caquexia num Pointer (fotografia original)	9
Figura 13 – Distribuição da <i>Dirofilaria immitis</i> na Europa ^[14]	9
Figura 14 - Mapa dos concelhos da ilha da Madeira ^[22]	10
Figura 15 - Temperatura média diária do ar, na ilha da Madeira. ^[18]	11
Figura 16 - Técnica de Knott modificada: preparação das lâminas (A), observação ao microscópio (B) e identificação de microfíria <i>D. immitis</i> (C). (fotografias originais) ...	12
Figura 17 – Instruções de uso do kit Witness® Dirofilária (Synbiotics).....	14
Figura 18 – Teste imunológico Witness® Dirofilária (Synbiotics) (Fotografia original) .	14
Figura 19 – Exemplo do aspecto de teste Witness® Dirofilária (Synbiotics) positivo e negativo.....	24
Figura 20 – Testes rápidos com resultado positivo (fotografia Original)	24
Figura 21 – Inquérito usado no estudo transversal da dirofilariose canina na ilha da Madeira (imagem original extraída do ficheiro em pdf).....	30
Figura 22 – Teste do Qui-quadrado na análise estatística dos dados dos resultados (imagem original extraída do ficheiro em pdf).	31

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios de diferenciação entre microfilárias de <i>D. immitis</i> , <i>D. repens</i> e <i>D. reconditum</i> . ^{Adaptado [11] e de [16]}	13
Tabela 2 – Frequências absoluta e relativa das diferentes técnicas utilizadas no estudo.....	15
Tabela 3 – Prevalência da dirofilariose canina em ambos os géneros.	15
Tabela 4 – Prevalência da dirofilariose canina nos concelhos da região da Madeira ..	16
Tabela 5 - Prevalência da dirofilariose canina consoante a faixa etária	17
Tabela 6 – Prevalência nos grupos de animais de acordo com seu peso.	18
Tabela 7 – Prevalência da dirofilariose canina nos diferentes habitats dos cães analisados.	19
Tabela 8 – Prevalência da dirofilariose canina consoante a pelagem apresentada pelos animais.	20
Tabela 9 – Raça dos animais avaliados e afectados por <i>D. immitis</i>	20

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Género dos animais infestados por <i>D. immitis</i>	15
Gráfico 2 – Localização dos animais positivos à dirofilariose canina.....	16
Gráfico 3 – Faixas etárias afectadas pela dirofilariose canina.....	17
Gráfico 4 – Porte dos animais afectados pela dirofilariose canina.....	18
Gráfico 5 – Habitat dos animais afectados pela dirofilariose canina.....	19
Gráfico 6 – Pelagem dos animais afectados por <i>D. immitis</i>	19

INTRODUÇÃO

O estágio curricular foi desenvolvido na Clínica Médico-Veterinária Vetmédis do Funchal entre o dia 14 de Dezembro de 2009 e o dia 03 de Abril de 2010, com uma carga horária de 480 horas totais. Este consistiu na elaboração de um estudo transversal (cross-sectional study) para estimar a prevalência de *Dirofilaria immitis*, por busca passiva de amostras representativas de cães domésticos da Madeira levados às clínicas Vetmédis e SPAD sediadas no Funchal, Machico e em Câmara de Lobos para observação clínica em diversos contextos.

Inicialmente, foi efectuado o cálculo da dimensão da amostra, segundo o método de amostragem para estimar a prevalência de uma doença, para a população canina da Madeira, que resultou na dimensão $n=257$.

A técnica da gota fresca e a técnica de Knott modificada foram executadas e treinadas no Laboratório Regional de Veterinária e Segurança Alimentar (LRVSA), a pedido especial de colaboração feito pela Clínica Médico-Veterinária Vetmédis através da co-orientadora Dr. ^a Isabel Quaresma, durante uma semana para que o operador fosse mais experiente e treinado na detecção e identificação de microfilárias *D. immitis*, imprescindíveis na elaboração das respectivas técnicas. Foi possível igualmente, acompanhar a execução da técnica de diferenciação histo-química entre as microfilárias de *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum* baseado na coloração das microfilárias pela fosfatase ácida, que devido ao seu elevado custo não foi incluída no estudo (Figura 1).

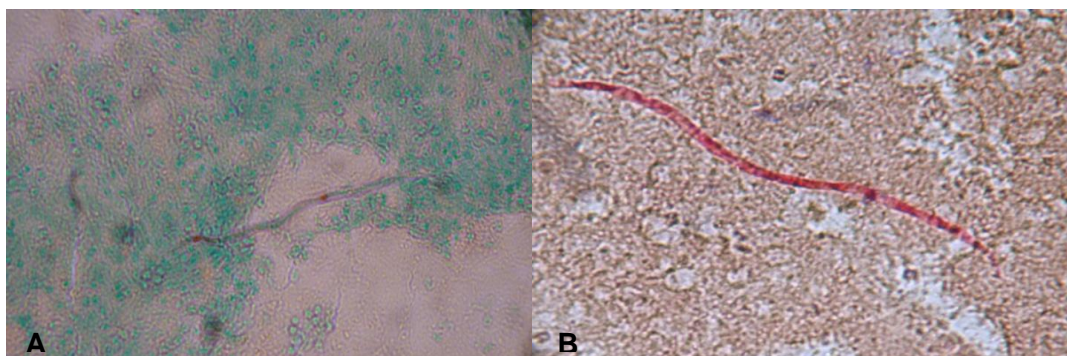


Figura 1 – Técnica de diferenciação histo-química entre microfilárias de *D. immitis* (A) e *D. reconditum* (B) (fotografias originais tiradas a lâminas cedidas pelo LRVSA).

As actividades diárias realizadas na Clínica Médico-Veterinária Vetmédis do Funchal consistiam na assistência às consultas durante as quais era introduzido ao proprietário a temática do verme do coração (*Dirofilaria immitis*), explicada a importância da patologia, a sua prevalência e a importância da sua prevenção. Após esclarecimento do proprietário, as informações sobre raça, pelagem, idade, peso, sexo, habitat, localidade, sintomatologia e profilaxia eram registadas através um inquérito padrão e era efectuada a recolha de sangue do animal para testar a presença da *D. immitis*.

Sempre que havia disponibilidade económica por parte do proprietário era efectuado o teste imunológico rápido – Witness® *Dirofilaria* (Synbiotics) e registado o seu resultado. As amostras foram numeradas e efectuado o teste da gota a fresco de imediato e registado o seu resultado. As amostras para efectuar a técnica de Knott modificada eram armazenadas sob refrigeração até ao dia seguinte.

Para que a amostra fosse a mais representativa possível, houve a necessidade de recolher parte das amostras nas Clínicas Médico-Veterinárias Vetmédis de Machico e de Câmara de Lobos e na Clínica Médico-Veterinária SPAD pelos respectivos clínicos de serviço. Estes efectuaram o inquérito padrão que lhes foi fornecido, recolheram as amostras, efectuaram a gota a fresco e o teste imunológico, quando possível. Além disso eram conservadas as amostras sob refrigeração e enviadas acompanhadas dos dados do inquérito para a Vetmédis do Funchal para ser efectuada a técnica de Knott modificada. Parte das amostras foram recolhidas, também, durante a preparação pré-cirúrgica dos animais de cirurgia programada (ovariorrectomias, orquiectomias, mastectomias, excisão de nódulos cutâneos, destartarizações, etc.) sempre acompanhadas do preenchimento dos dados no inquérito.

No início das actividades do dia as amostras eram colocadas a temperatura ambiente e em movimento durante pelo menos dez minutos antes de efectuar a técnica de Knott modificada propriamente dita. A técnica de Knott modificada era efectuada e registado o seu resultado.

Os resultados obtidos foram sempre comunicados aos proprietários pelos clínicos de serviço. Caso fosse negativo era recomendada e iniciada a prevenção com ivermectina a 6 µg associada a 5 mg de pamoato de pirantel por kg de peso vivo do cão, por via oral mensal, Heartgard® (Bayer) ou com moxidectina a 0,17 mg (0,05 ml) por kg de peso vivo do animal, injectável subcutaneamente anual, Guardian® (For Dodge), consoante preferência e opção do clínico e do proprietário (Figura 2).



Figura 2 – Formulações de controlo preventivo de *D. immitis* em cães. A - Heartgard® da Merial [20] e B - Guardian® da For Dodge (fotografia original)

No caso de positivo, era recomendado e iniciado o tratamento adequado consoante a sintomatologia e severidade da doença, assim como instituído tratamento sintomático e estabilização nos casos em que se mostrasse necessário.

Os resultados obtidos foram registados e introduzidos numa base de dados, foi feita a sua análise estatística, o cálculo da prevalência e análise da significância das relações encontradas entre os diferentes factores de risco analisados.

Este estudo transversal tem como objectivo estimar a prevalência na amostra estudada, avaliar a correlação entre a prevalência e diversos factores que influenciam a exposição e postular possíveis relações.

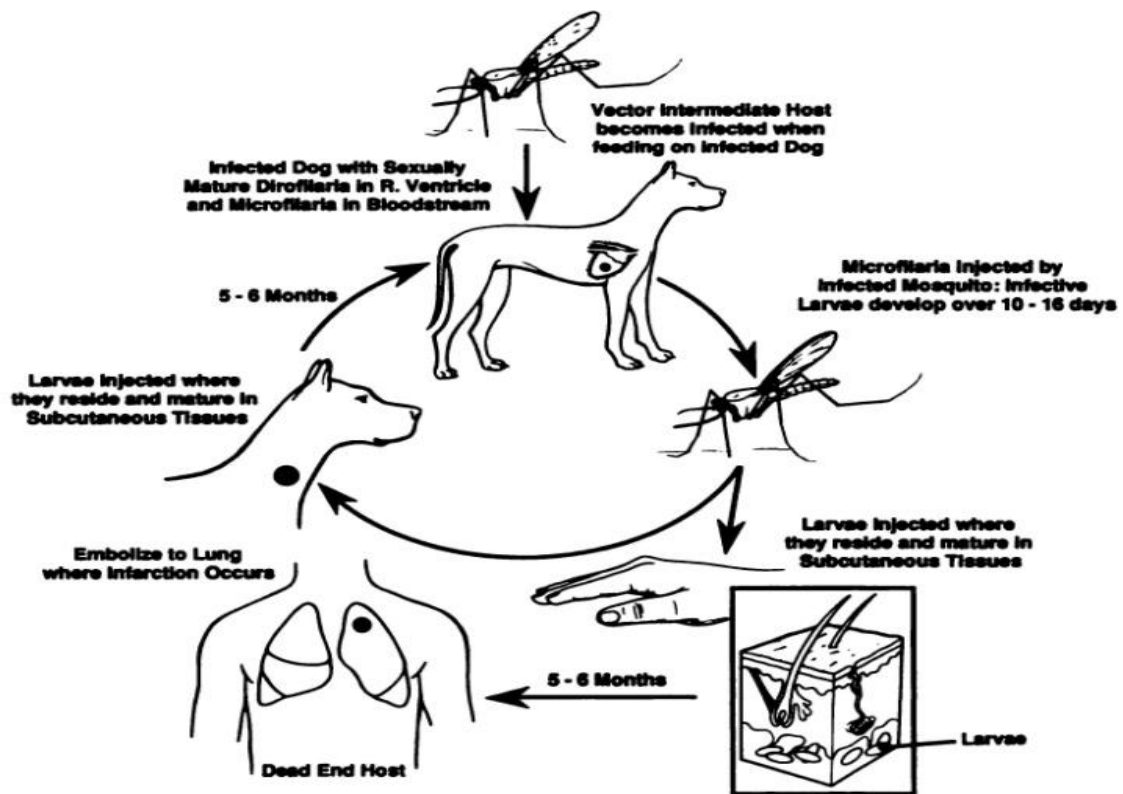


Figura 3 – Ciclo de vida de *D. immitis*. [6]

Motivo da escolha do tema

As doenças parasitárias que são transmitidas por mosquitos têm vindo a ocorrer com maior frequência, conseqüentemente à distribuição dos vectores, à sua capacidade de dispersão, à existência de hospedeiros infectados, às condições climáticas e à movimentação dos animais entre zonas endémicas e não endémicas.

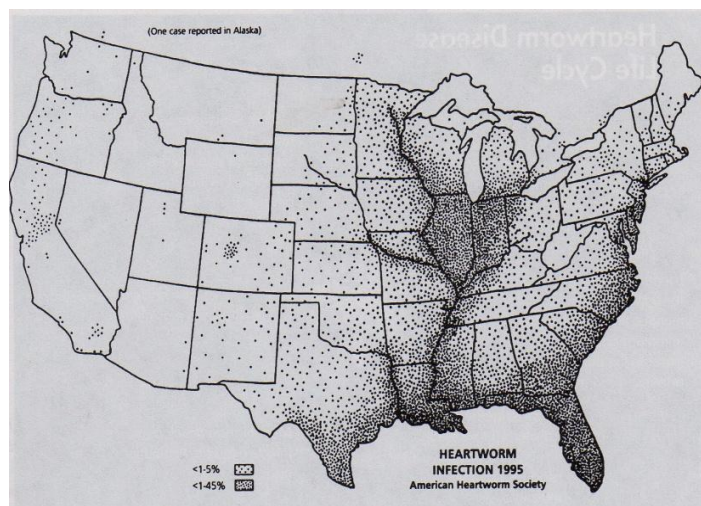


Figura 4 – Mapa de casos identificados nos EUA de dirofilariose pulmonar em humanos por *D. immitis*. (1995) [28]

A dirofilariose é uma das principais doenças no cão, transmitida por mosquitos, visto apresentar um carácter patogénico para canídeos e felídeos, sendo por vezes zoonótica. (Figura 3). O primeiro caso de dirofilariose em humanos nos Estados Unidos da América foi observado num cadáver de uma mulher em 1941, desde então vários casos têm sido reportados em 48 dos seus estados (Figura 4).^[37] Os casos de dirofilariose pulmonar em humanos (Figura 5) ocorrem predominantemente em regiões onde a prevalência da dirofilariose canina é superior a 40%. Na Madeira a prevalência estimada em cães é de 30%, desde de 1991, pelo que é importante actualizar esta estimativa e avaliar quais os conselhos onde possivelmente tem maior expressão para poder actuar em conformidade na prevenção da dirofilariose canina, poder estabelecer possíveis factores de risco que a influenciem, assim como definir estratégias de saúde pública eficazes.

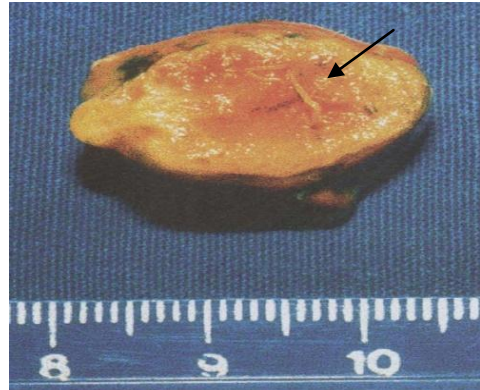


Figura 5 – Secção transversal de um nódulo pulmonar humano com um verme no interior (seta).^[33]

DIROFILARIOSE CANINA

A dirofilariose canina é uma infestação das artérias pulmonares e, em casos de maior severidade, do lado direito do coração dos cães, pelo nemátode *Dirofilaria immitis* (Figura 6). A dirofilariose canina, a dado momento, pode provocar sintomatologia e sinais clínicos observáveis, ao que se denomina doença do verme do coração. Assim a dirofilariose e a doença do verme do coração não são sinónimos, visto que a dirofilariose pode ser assintomática; assim como é possível a *D. immitis* ter sido erradicada, contudo a sua sintomatologia associada permanecer por um período de tempo. [28]

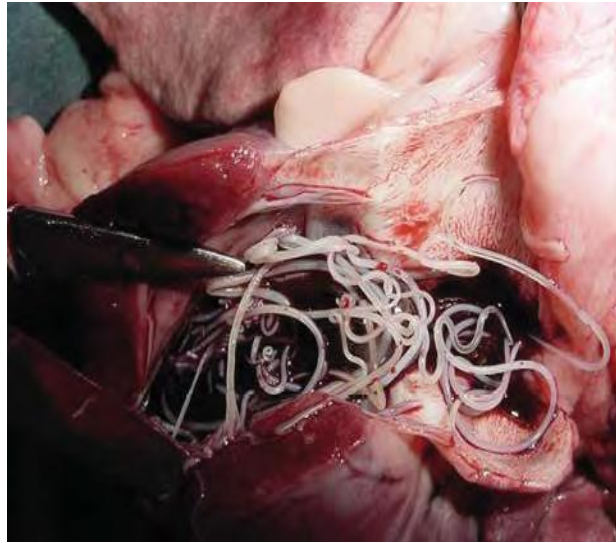


Figura 6 – Vermes adultos de *D. immitis* alojados no átrio direito do coração. [44]

Transmissão

A *Dirofilaria immitis* pode ser transmitida ao cão, hospedeiro definitivo, por mais de 60 espécies de mosquitos que agem como vector e hospedeiro intermediário obrigatório na transmissão deste nemátode, consoante a localização geográfica. [28] Esta transmissão depende essencialmente de três factores: da população canina, da presença e população dos vectores e das condições ambientais de temperatura, precipitação e humidade da região. As condições ambientais determinam a abundância dos vectores visto condicionar o seu desenvolvimento óptimo, que em climas tropicais a temperados dá-se à temperatura de 25 °C a 27 °C. [15] Actualmente, na ilha da Madeira, existem seis espécies de mosquitos como possíveis vectores: *Aedes aegypti*, *Culex hortensis maderensis*, *Culex pipiens L* (Figura 7), *Culex theileri*, *Culiseta longiareolata (Macquart)* e *Ochelerotatus eatoni*. [2];



Figura 7 – *Culex pipiens* [17]

[41] Contudo, em 2006 a espécie *Culex theileri* foi

identificada como possível vector natural na transmissão da dirofilariose na ilha da Madeira, devido a comprovação de presença de larvas de *D. immitis* nos túbulos de *Malpighi* e na cabeça desta espécie de mosquito. [41]

A transmissão e infestação por *D. immitis* são predispostas por vários factores de risco. O sexo dos cães parece ser um desses factores, em que o macho é mais afectado que a fêmea numa proporção de 2 a 4 para 1. [28] Este facto pode ser explicado pela sua maior exposição ao vector (cães vadios, de caça e de desporto) segundo alguns autores. [38] Os animais de grande porte, que habitam no exterior das habitações apresentam um risco mais elevado comparativamente aos que vivem no interior das habitações. [9] Os cães com idades compreendidas entre 4 a 7 anos são habitualmente mais afectados, contudo em regiões endémicas é possível verificar-se em animais mais jovens. [28] A raça e o tipo de pelagem não demonstraram ter influência no risco de infestação, pelo facto de que os mosquitos escolhem habitualmente áreas de pouco pêlo para a sua alimentação. [28]; [38]

Ciclo de vida

O mosquito começa por ingerir microfilárias (MF), o primeiro estadio larvar (L_1), que se encontram no sangue do hospedeiro definitivo, aquando da sua alimentação. No interior do mosquito a L_1 desenvolve-se e muda para L_2 e mais tarde para L_3 , a sua forma infectante. [34] A forma infectante é inoculada pelo mosquito aquando da alimentação seguinte de sangue no hospedeiro definitivo, migra a nível subcutâneo, muda para L_4 em 9 a 12 dias e volta mudar de L_4 a L_5 em 50 a 70 dias após inoculação. [28] A forma juvenil do verme L_5 penetra no sistema vascular por volta dos 100 dias pós-infestação e migra preferencialmente para artérias pulmonares periféricas do lobo caudal do pulmão, onde fica a maturar durante 190-285 dias pós-inoculação e se desenvolve na forma adulta sexualmente madura, capaz de produzir microfilárias (L_1) e libertá-las na circulação sanguínea

Host	Days postingestion	Days postinfestation
Mosquito		
L_1 to L_3	10-14 (optimal conditions)	
Dog		
L_3 to L_4 (body tissues)		2-12
L_4 to L_5 (body tissues)		50-70
L_5 (pulmonary arteries)		70-110
L_1 (microfilariae) produced		190 minimum

(Figura 8). [28] As microfilárias são a forma infectante dos

Figura 8 – Tempo de maturação larvar durante o ciclo de vida de *D. immitis*. [28]

mosquitos e contribuem para continuação do ciclo de vida da *D. immitis*. Estas podem igualmente passar das mães para os fetos, o que resulta em microfiliária nos cachorros, contudo as larvas não se conseguem desenvolver em adultos sem efectuar as mudas no hospedeiro intermediário – mosquito. [28]

Diagnóstico

O teste de cães em consulta de rotina com testes de detecção de microfilárias em circulação ou testes serológicos de detecção de antígeno do tracto reprodutivo de fêmea de *D. immitis* é a forma mais comum de identificação de animais com infestação pelo verme do coração. [28] De forma menos comum, os animais são apresentados à consulta com sintomatologia sugestiva de doença do verme do coração, na qual é feito um exame físico cuidadoso, testes de sangue para identificação do nemátode (serologia), detecção e diferenciação de microfilárias, radiografia torácica e ecocardiografia para determinar a presença e severidade da doença do verme do coração. [28]



Em casos extremos poderá ser feita necrópsia para determinar ou confirmar o diagnóstico. [28]

Figura 9 – Técnica de Knott modificada. (fotografia original)

As técnicas de detecção de microfilárias incluem a gota a fresco, [29] e testes de concentração como a técnica de Knott modificada [35] (Figura 9) e filtração em membrana de policarbonato. [10] Após a detecção das microfilárias é possível a identificação como *D. immitis* com base em critérios de motilidade que tomam entre os eritrócitos na gota a fresco (movimento serpentiforme) e morfológicos: tamanho, forma da extremidade posterior e anterior (Figura 10). Os cães podem, contudo, infestar-se com outro parasita que produz igualmente microfilárias na circulação sanguínea, denominado *Dipetalonema reconditum* (*Acanthocheilonema reconditum*). A diferenciação entre estas espécies é importante, habitualmente, é feita através da técnica de diferenciação histo-química entre as microfilárias de *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum* baseado na coloração das microfilárias pela fosfatase ácida, pois a dirofilariose em cães pode resultar em doença e morte enquanto que a infestação por *Dipetalonema reconditum* é transitória e apatogénica. [30] Além disso, no caso de *D. immitis*, há riscos de transmissão ao homem, tendo como resultado a dirofilariose pulmonar humana, sendo considerada uma zoonose. [40]

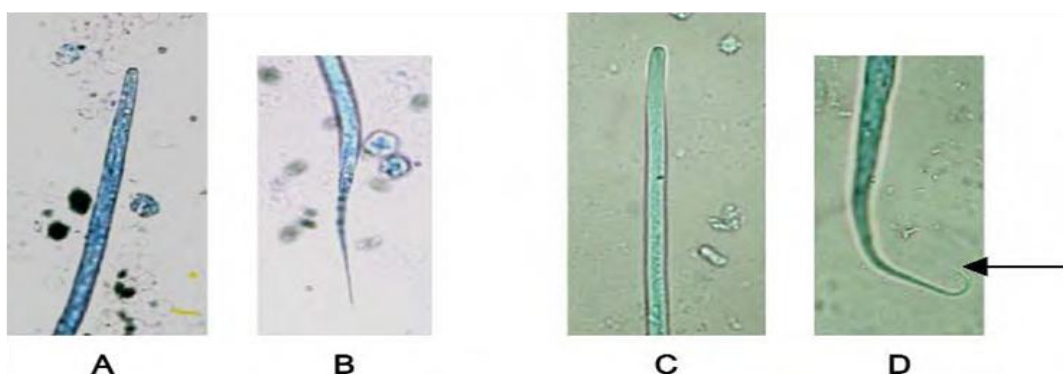


Figura 10 – Extremidade anterior e posterior de microfilárias de *D. immitis* (A e B) e de *D. reconditum* (C e D) obtidas pela técnica de Knott modificada. [16]

A técnica molecular utilizando a reacção em cadeia da polimerase (PCR) também é usada como método espécie-específico de diagnóstico da dirofilariose canina ^[36], apesar de mais dispendiosa.

As técnicas de imunodiagnóstico podem ser por pesquisa de anticorpos ou antígenos circulantes no soro sanguíneo. Os testes de detecção de antígeno específico da fêmea adulta de *D. immitis* são usados com frequência e sucesso nas clínicas veterinárias (Figura 11), assim como nos laboratórios de referência pela sua rapidez e sensibilidade, pois a maioria dos testes detecta infestação com um ou mais nemátodes fêmeas com pelo menos sete a oito meses de idade, no entanto não



Figura 11 – Teste imunológico rápido efectuado neste estudo. (fotografia original)

detectam infestações com menos de cinco meses. Os testes de detecção de anticorpos caíram em desuso com desenvolvimento dos testes de detecção de antígeno, visto que detectam a resposta imunológica a exposição ao nemátode, mas não necessariamente a existência de doença actual. Estas técnicas de imunodiagnóstico foram desenvolvidas com o principal objectivo de detectar as formas ocultas da infestação, em que existem nemátodes adultos mais ainda não suficientemente maduros para produzir microfíliarias. ^[23]

Sintomatologia

Numa fase precoce da doença do verme do coração, o cão apresenta-se assintomático ou com ligeiros sinais clínicos inespecíficos. Com a evolução da doença no tempo surge tosse, que vai evoluindo para tosse crónica, surgem sons anormais ligeiros à auscultação pulmonar, surge diminuição da tolerância ao exercício e perda de condição corporal. Numa fase já severa de doença a tosse torna-se intensa, pode ocorrer hemoptise, os animais tornam-se intolerantes ao exercício, apresentam anorexia, caquexia como na Figura 12, surge febre, dispneia, taquicardia, auscultação de sons pulmonares e cardíacos anormais, hepatomegália, icterícia, ascite, síncope e síndrome da veia cava caudal. ^{[23]; [28]; [34]} A sintomatologia depende do grau de infestação e da localização dos nemátodes, podendo culminar na morte se não for tratada.



Figura 12 – Caquexia num Pointer (fotografia original)

Distribuição e prevalência

A dirofilariose tem uma distribuição mundial pelas zonas de clima tropical e subtropical, América do norte e do sul, África, Austrália, sul da Ásia e Japão e sul da Europa (Portugal, Espanha, sul da França, Itália, Grécia e Turquia). Na Europa a prevalência de cães infectados varia de 1% em França, 2% em Espanha, 6-25% em Itália e 14% em Portugal, contudo um número crescente de casos têm sido diagnosticados em países no norte da Europa, como Áustria, Alemanha e Holanda em cães que foram importados dos países mediterrâneos, com excepção da região de Canton of Tessin na Suíça em que os animais positivos parecem ter adquirido uma infestação autóctone (Figura 13). [7]; [13]; [14]; [15]

Em Portugal a dirofilariose distribui-se maioritariamente no sul de Portugal continental com uma prevalência que varia entre 12% no Algarve, 16,5 % no Alentejo a 16,7% no Ribatejo Oeste, sendo bastante inferior no norte e centro do país, regiões Entre Douro e Minho, Trás-os-Montes,

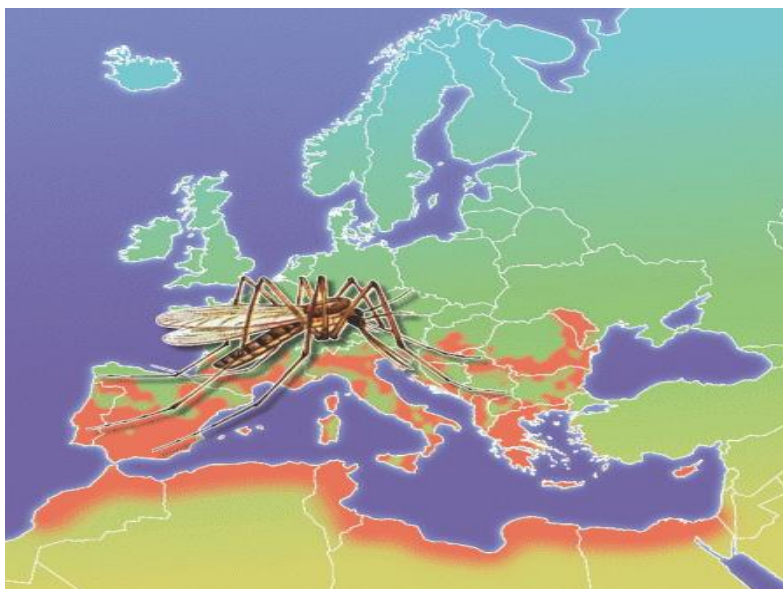


Figura 13 – Distribuição da *Dirofilaria immitis* na Europa [14]

Beira Litoral e Beira Interior. [31] Na região autónoma da Madeira a prevalência estimada é de 30% nos cães testados para microfíliarias de *D. immitis*, sendo a mais elevada do país. [14]; [38]

METODOLOGIA

Descrição da área geográfica

O arquipélago da Madeira, parte integrante do território Português, está situado a 978 km a sudoeste de Lisboa, no Oceano Atlântico. É constituído por duas ilhas habitadas, a ilha da Madeira com 736 km² e a ilha de Porto Santo com 43 km².^[20] A população residente é de 245.011 habitantes (Censo 2001)^[24], no entanto cerca de 75% da população habita em apenas 35% do território, designadamente na costa sul da ilha da Madeira (Funchal, Santa Cruz, Câmara de Lobos e Machico) onde se desenvolve a maior parte da actividade económica e se localiza grande parte das unidades hoteleiras.^[21] A ilha da Madeira é constituída por dez concelhos: Calheta, Câmara de Lobos, Funchal, Machico, Ponta do Sol, Porto Moniz, Ribeira Brava, Santa Cruz, Santana, São Vicente (Figura 14).



Figura 14 - Mapa dos concelhos da ilha da Madeira^[22]

O clima no arquipélago da Madeira é ameno, tanto no Inverno como no Verão, excepto nas zonas mais elevadas da ilha da Madeira, onde as temperaturas são mais baixas.^[22] A temperatura média anual do ar varia entre os 17,5 °C no litoral da vertente norte, mais alta na vertente sul (19 °C), e os 9 °C no planalto do Paul da Serra (1400 m de altitude) e nos picos mais altos da cordilheira central da Ilha.^[26] A média anual da humidade relativa varia entre os 55%, junto à costa, até aproximadamente os 90%, na zona dos nevoeiros.^[26] No entanto, o clima da Madeira e do Porto Santo são influenciados por factores regionais que determinam a existência de muitos microclimas, de diferentes características entre si na Madeira, e um clima quase único e imutável no Porto Santo.^[18]

Na Ilha da Madeira, estes microclimas são influenciados pelo relevo acentuado, desde a costa mais baixa até ao ponto mais alto de 1862 m (Pico Ruivo), pela orientação este-oeste da cordilheira central e dos planaltos, com altitudes superiores a 1200 m, perpendicular aos ventos predominantes de nordeste e pela exposição à radiação solar em ambas as vertentes; que assim determinam uma costa sul protegida e

soalheira (Funchal, Ponta do Sol, Ribeira Brava e Santa Cruz) e uma costa norte mais exposta, com uma insolação reduzida (Porto Moniz, Santana e São Vicente), excepto em algumas localidades junto ao litoral como Ponta Delgada - concelho de São Vicente (Figura 15). [22]

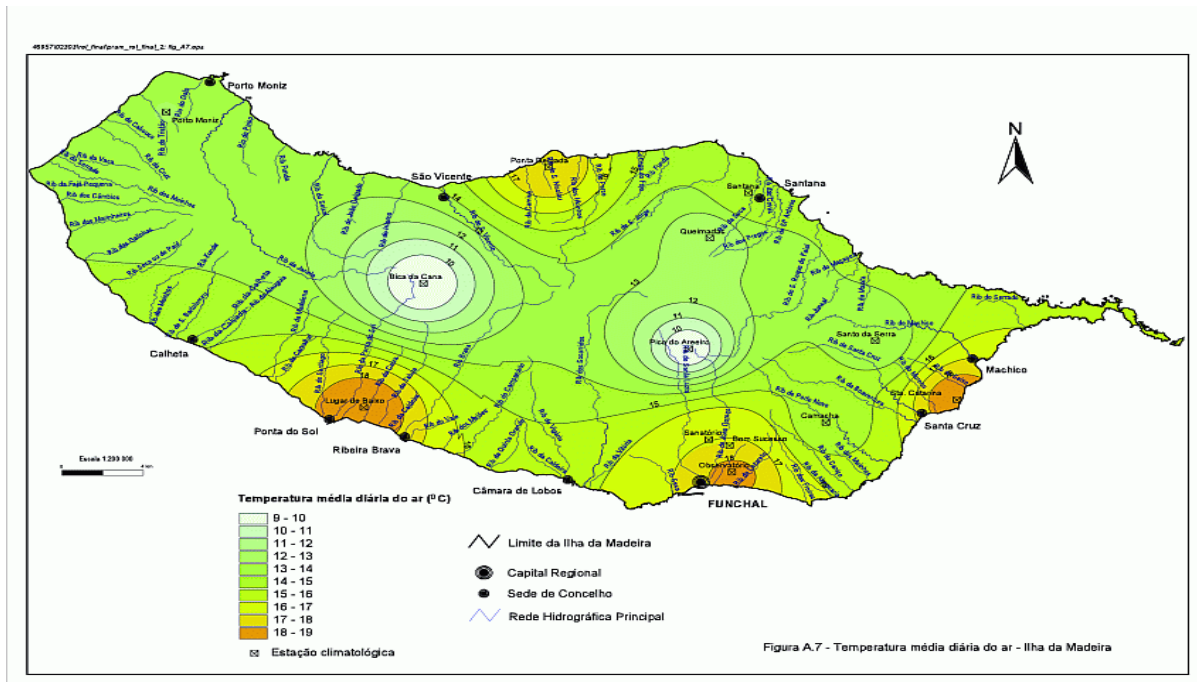


Figura 15 - Temperatura média diária do ar, na ilha da Madeira. [18]

População alvo

A população canina incluída neste estudo era formada por cães domésticos da Madeira, de ambos os géneros, com idade igual ou superior a nove meses, sem raça definida ou de variadas raças, e com diferentes pesos, pelagens, habitats, com ou sem sintomas e sem profilaxia contra a dirofilariose à data da colheita das amostras sanguíneas.

Amostragem

A recolha de informação sobre os animais e a colheita de amostras foram realizadas nas três clínicas do grupo Vetmédis no Funchal, em Machico e em Câmara de Lobos e na SPAD no Funchal, de Dezembro 2009 a Março de 2010.

O tamanho da amostra foi calculado tendo em conta a prevalência estimada (p) de 30% para região da Madeira, [14]; [38] precisão relativa de 4,75% (d), nível de confiança de 95,25% ($z = 1,67$) e o critério utilizado pela Organização Mundial de Saúde, de que a população canina pode ser estimada em 10% da população humana. [46]

A população humana na Madeira em 2001, segundo instituto nacional de estatística com base nos Censos de 2001, era de 245.011 habitantes, pelo que a população canina pode ser estimada em 10% da população humana, assim estima-se que seja de 24.501 cães (N).

Deste modo, a base de cálculo utilizada foi a seguinte: $n = z^2 \times [(p \times (1-p)) / d^2]$, em que a amostra (n) é de 260 animais. Utilizando a correcção usada para populações finitas, quando a dimensão inicial da amostra (n) é menor que 10% da população:

$n^* = 1 / (1/n) + (1/N)$, a amostra final (n*) é de 257 cães.

Assim, neste estudo foram examinados 257 cães no total (n*), dos quais 130 do género masculino e 127 feminino. Os animais foram eleitos de forma não aleatória por conveniência, devido a questões de disponibilidade e de recursos económicos, foram eleitos aqueles animais que foram levados, pelos seus proprietários, às clínicas onde foram recolhidas amostras. Contudo, as clínicas foram eleitas de forma a ter a maior abrangência possível do território regional, visto que o grupo Vetmédis se faz representar em três dos onze concelhos, além de que recebe animais de todos os concelhos, embora em proporções diferentes. Após a entrada destes animais na clínica, foram eleitos de forma aleatória e consecutiva à sua entrada na clínica para consulta/cirurgia, obedecendo aos critérios de selecção da população alvo. Informações sobre raça, pelagem, idade, peso, sexo, habitat, localidade, sintomatologia e profilaxia foram obtidas para cada cão através de um inquérito ao proprietário, com objectivo de verificar os factores de interacção e influência sobre a prevalência da dirofilariose, além da observação de grupos e locais mais afectados.

Método de colheita

As amostras de sangue foram obtidas através da punção da veia jugular, cefálica ou safena de todos os animais, depois cada amostra foi transferida para dois tubos de 1ml cada contendo anticoagulante (EDTA). Após a colheita, as amostras foram numeradas consoante ordem de processamento e foram submetidas a duas técnicas de diagnóstico parasitológico (gota a fresco e técnica de Knott modificada) e ao teste imunológico Witness® *Dirofilaria* (Synbiotics).

O primeiro tubo de 1ml de sangue, de cada amostra, foi utilizado para preparar duas lâminas para a observação microscópica a fresco, entre lâmina e lamela, com aumento de 40x e para retirar uma gota para efectuar o teste imunológico rápido.

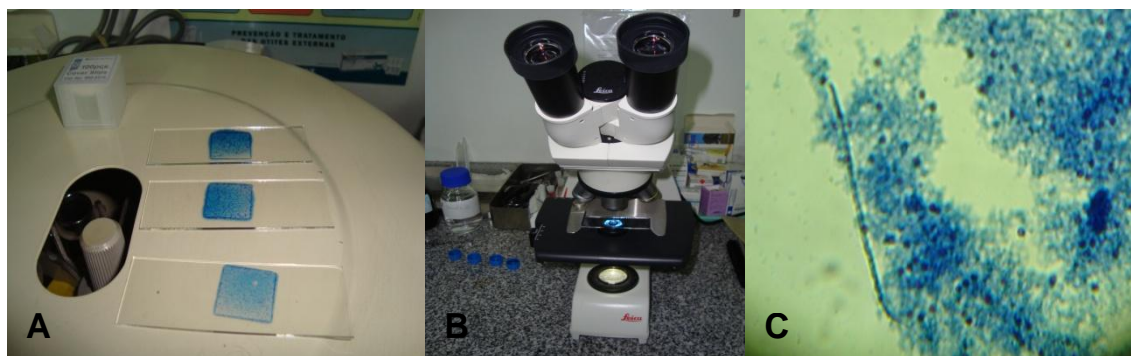


Figura 16 - Técnica de Knott modificada: preparação das lâminas (A), observação ao microscópio (B) e identificação de microfilaria *D. immitis* (C). (fotografias originais)

O outro tubo de 1ml de sangue foi utilizado para técnica de Knott modificada. Após processamento desta técnica foram preparadas três lâminas de cada amostra para observação ao microscópio, com aumento de 40x, para detecção de microfilárias e aumento de 100x para identificação da espécie (Figura 16).

A técnica da gota a fresco entre lâmina e lamela e a técnica de Knott modificada foram realizadas com o propósito de identificar os animais com microfilárias na circulação sanguínea periférica e identificação específica das microfilárias (MF) baseada na motilidade, bem como na morfologia da extremidade anterior e posterior destas, nas respectivas técnicas (Tabela 1).

Na gota a fresco os animais foram considerados positivos quando observada pelo menos uma microfilária *D. immitis* em duas lâminas e foram considerados negativos quando nas duas lâminas não foram encontradas microfilárias. Na técnica de Knott modificada foram considerados positivos os cães que apresentavam pelo menos uma microfilária em três lâminas e negativos os cães que não apresentavam microfilárias nas três lâminas observadas.

Tabela 1 – Critérios de diferenciação entre microfilárias de *D. immitis*, *D. repens* e *D. reconditum*.^{Adaptado [11] e de [16]}

Critério	<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>Dirofilaria repens</i>	<i>Dipetalonema reconditum</i>
Motilidade	Lenta, movimento ondulantes e serpentina	Movimento errático	Rápida e movimento errático
Comprimento (µm)	290-330	300-360	260-283
Largura (µm)	5-7	6-8	4
Extremidade anterior	Ovalada	Achatada	Achatada
Extremidade posterior	Recta com cauda comprida e pontiaguda	Curta e filiforme	Curva com cauda em forma de gancho
Evidência da fosfatase ácida	Poros anal e excretor	Poros anal	Distribuição difusa

O teste imunológico apresenta-se em forma de kit rápido para diagnóstico individual, baseado na técnica de imunomigração rápida, usando anticorpos dirigidos contra epítomos (extremidades) específicos de antígeno do aparelho reprodutor feminino do verme adulto de *D. immitis*. Os testes foram considerados positivos e negativos de acordo com o critério descrito na bula (Figura 17) do respectivo teste Witness® Dirofilaria (Synbiotics). Este teste foi utilizado em 86 dos 257 animais examinados, a fim de verificar a ocorrência de dirofilariose clínica e dirofilariose oculta (Figura 18). Os resultados do processamento das amostras foram registados junto da informação dos animais, num campo próprio e inseridos numa base de dados (Microsoft Office Excel 2007).



Figura 18 – Teste imunológico Witness® Dirofilaria (Synbiotics) (Fotografia original)

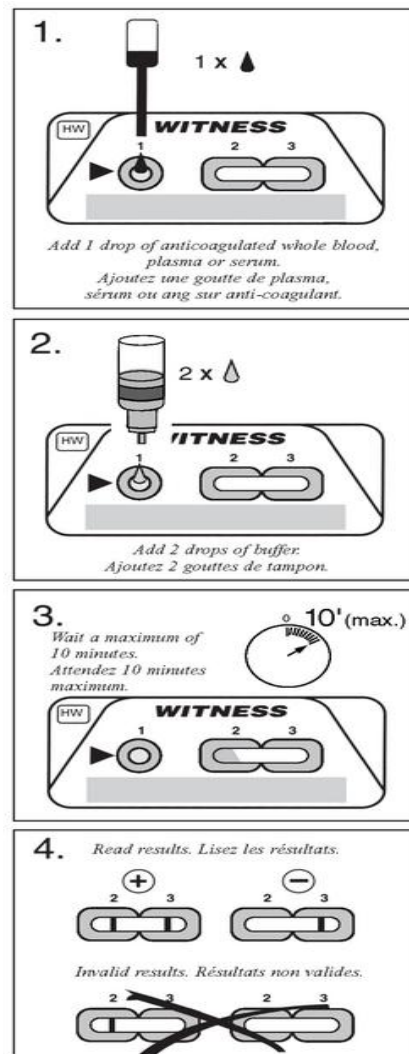


Figura 17 – Instruções de uso do kit Witness® Dirofilária (Synbiotics)

Análise estatística

O teste qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para análise de significância estatística das diferenças encontradas na prevalência da infecção, nos principais conselhos da costa sul da ilha da Madeira avaliados, bem como para comparação de frequência da dirofilariose entre os géneros, idade, raça, tipo pelagem, habitats e porte dos animais infectados (Anexo 2). O programa utilizado foi Microsoft Office Excel 2007.

RESULTADOS

No presente estudo foram avaliados um total de 257 cães, cujas amostras foram processadas, simultaneamente, pela técnica da gota fresca e técnica de Knott modificada. A técnica da gota fresca tem uma baixa sensibilidade pelo que é frequente os falsos negativos. Assim sendo, para cálculo da prevalência na amostra foram utilizados os dados da técnica de Knott modificada, devido a sua maior sensibilidade e especificidade. O teste imunológico rápido foi efectuado em apenas 86 animais, nos quais detectou todos os cães que apresentaram microfilárias na técnica de Knott modificada e nenhum animal a mais, pelo que não se observaram possíveis infestações ocultas (Tabela 2).

Tabela 2 – Frequências absoluta e relativa das diferentes técnicas utilizadas no estudo.

Teste	Examinados	Positivos		IC 95,25%
	n	n	%	
Gota Fresca	257	26	10,12	8,45 – 11,79
Knott modificada	257	30	11,67	10,00 – 13,34
Witness®	86	9	10,46	8,79 – 12,13

Dos 257 animais testados, 130 eram machos, dos quais 21 foram positivos e 127 eram fêmeas, das quais nove foram positivos (Gráfico 1). A diferença da prevalência da dirofilariose entre os animais do género masculino e entre os animais do género feminino foi estatisticamente significativa ($\chi^2 = 5,43$; $p = 0,020$) como se pode verificar na Tabela 3.

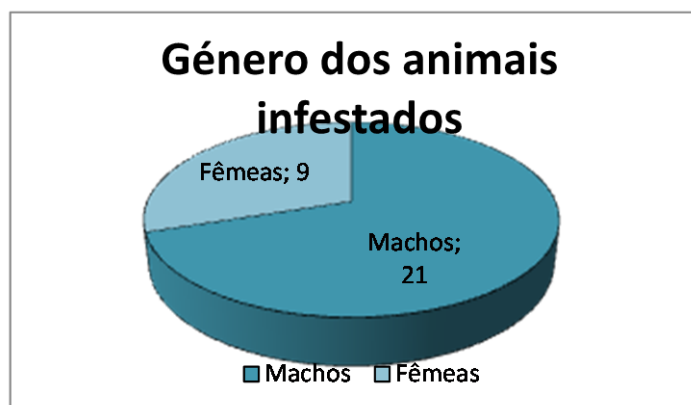


Tabela 3 – Prevalência da

dirofilariose canina em ambos os géneros.

Gráfico 1 – Género dos animais infestados por *D. immitis*

Género	Examinados	Positivos		IC 95,25%
	n	n	%	
Masculino	130	21	16,15	14,48 – 17,82
Feminino	127	9	7,09	5,42 – 8,76
Total	257	30	11,67	10,00 – 13,34

No que diz respeito à localização dos cães examinados (n = 257), analisou-se do concelho do Funchal 164 cães, dos quais 17 foram positivos na detecção de MF de *D. immitis*, de Machico 41 cães em que quatro foram positivos, de Santa Cruz 21 cães com apenas um positivo, de Câmara de Lobos 20 cães sendo seis positivos, de São Vicente quatro cães sem animais positivos, da Ribeira brava três cães com nenhum cão positivo, da Ponta do Sol dois animais um dos quais positivo, do Porto Moniz um único cão que foi negativo, do Porto Santo um cão que foi positivo e da Calheta e de Santana não foram analisados animais (Gráfico 2).

Sendo os concelhos da vertente sul da ilha da Madeira, Câmara de Lobos, Funchal, Machico e Santa Cruz, os mais populacionais, estes foram considerados na avaliação da diferença da prevalência da dirofilariose entre áreas geográficas distintas, de forma a poder verificar-se a possível relação existente (Tabela 4). A diferença encontrada entre estas prevalências foi estatisticamente significativa ($\chi^2 = 9,90$; p = 0,019).

Tabela 4 – Prevalência da dirofilariose canina nos concelhos da região da Madeira

Concelhos da madeira	Cães examinados	Cães positivos		IC 95,25%
		n	%	
Câmara de Lobos	20	6	30,00	28,33 – 31,67
Funchal	164	17	10,36	8,69 – 12,03
Machico	41	4	9,76	8,09 – 11,43
Santa Cruz	21	1	4,76	3,09 – 6,43
Outros	11	2	18,18	16,51 – 19,85
Total	257	30	11,67	10,00 – 13,34

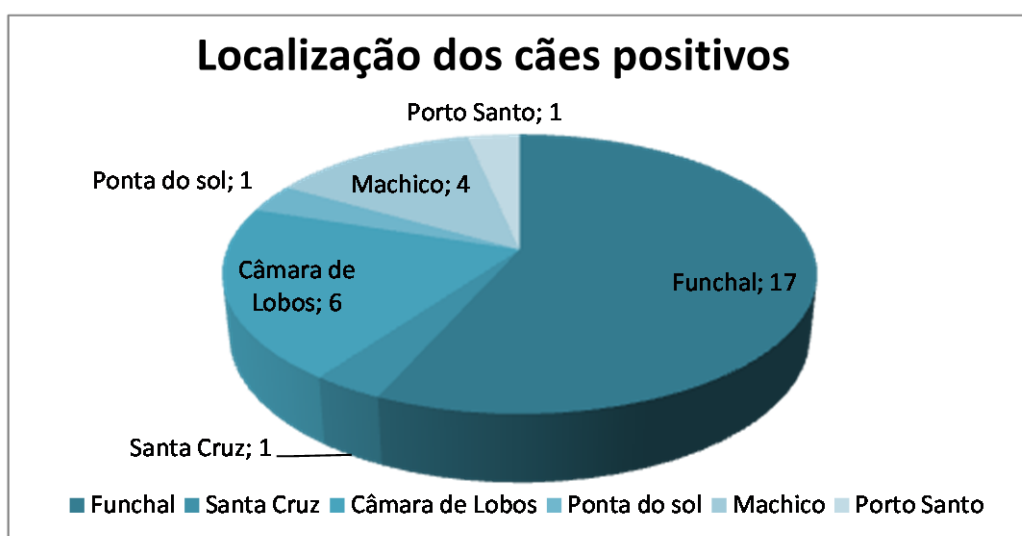
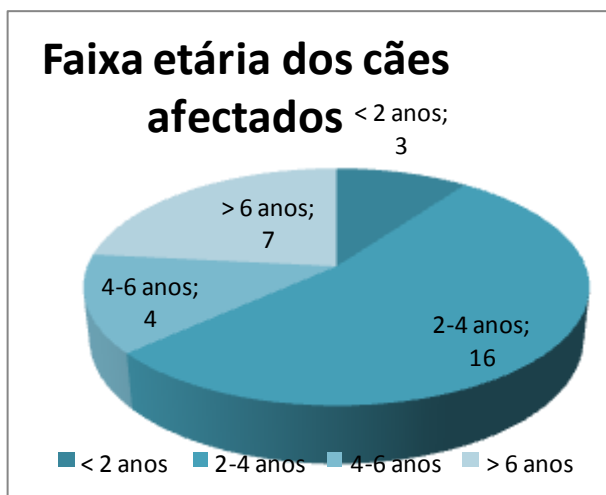


Gráfico 2 – Localização dos animais positivos à dirofilariose canina.

Relativamente à idade dos cães examinados (n=257), estes foram agrupados em quatro faixas etárias: a primeira faixa composta de cães com idade inferior a dois anos, a segunda faixa com cães entre os dois e os quatro anos, terceira faixa com cães dos quatro aos seis anos e uma última faixa composta por cães de idade superior a seis anos.



Assim na primeira faixa etária observou-se três positivos, na

Gráfico 3 – Faixas etárias afectadas pela dirofilariose canina.

segunda 16 positivos, na terceira quatro positivos e na última faixa sete positivos (Gráfico 3). A prevalência da dirofilariose canina foi estimada para as quatro faixas, tal como consta na tabela 5, porém a diferença encontrada não é estatisticamente significativa ($\chi^2 = 4,72$; $p = 0,194$).

Tabela 5 - Prevalência da dirofilariose canina consoante a faixa etária

Faixa Etária	Cães examinados	Cães positivos		IC 95,25%
		n	%	
Inferior a 2 anos	67	3	4,48	2,81 – 6,15
Entre 2 – 4 anos	110	16	14,55	12,88 – 16,22
Entre 4 – 6 anos	23	4	17,39	15,72 – 19,06
Superior a 6 anos	57	7	12,28	10,61 – 13,95
Total	257	30	11,67	10,00 – 13,34

Os cães analisados (n = 257) foram agrupados consoante o seu peso em cinco categorias de porte: porte Mini para cães que pesam entre um e quatro kg), Pequeno para cães que pesam dos cinco aos dez kg, porte Médio para os cães que pesam de 11 a 25 kg, porte Grande para animais com peso entre os 26 e os 60 kg e porte Gigante para cães cujo peso seja maior do que 60 kg. Nos animais de porte Mini foi identificado um positivo, nos de porte Pequeno oito positivos, nos de porte Médio dez positivos, nos de porte Grande nove positivos e nos de porte Gigante dois positivos (Gráfico 4). Na tabela 6 é possível verificar a estimativa da prevalência para os vários grupos consoante o porte dos animais analisados (excepto para o porte gigante, devido ao seu reduzido numero amostrado), sendo que a diferença encontrada entre estes não é estatisticamente significativa ($\chi^2 = 2,47$; $p = 0,481$).

Tabela 6 – Prevalência nos grupos de animais de acordo com seu peso.

Porte	Cães examinados	Cães positivos		IC 95,25%
		n	%	
Mini (1 – 4 kg)	19	1	5,26	3,59 – 6,93
Pequeno (5 – 10kg)	85	8	9,41	7,74 – 11,08
Médio (11 – 25 kg)	96	10	10,41	8,74 – 12,08
Grande (26 – 60 kg)	55	9	16,36	14,69 – 18,03
Gigante (> 60 kg)	2	2	—	—
Total	257	30	11,67	10,00 – 13,34

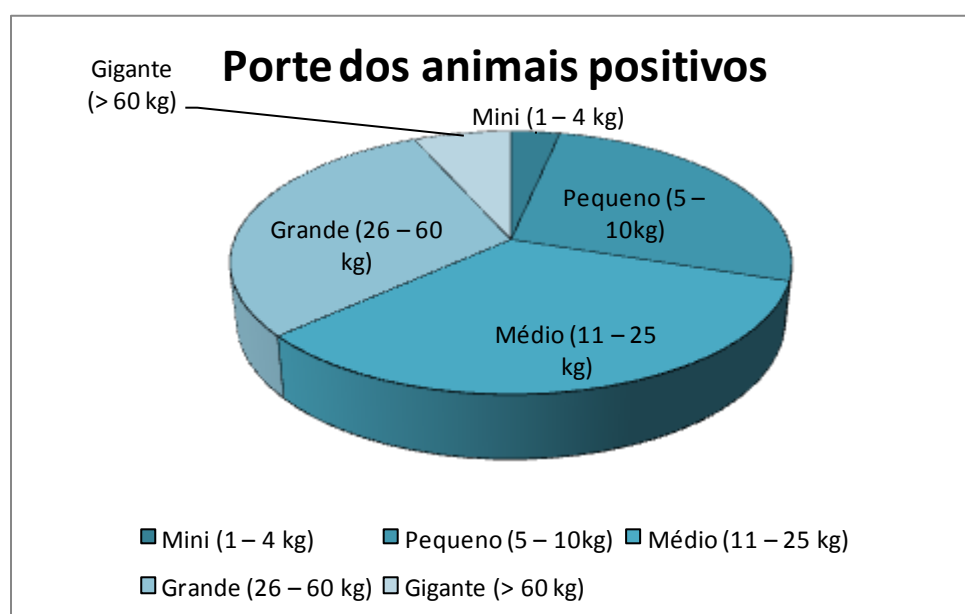


Gráfico 4 – Porte dos animais afectados pela dirofilariose canina.

No que respeita ao habitat dos cães analisados nesta amostra (n = 257), estes foram agrupados em animais que vivem exclusivamente no exterior das habitações, animais que vivem exclusivamente no interior das habitações e animais que vivem em ambos os ambiente habitualmente. Analisando os animais positivos observou-se que 19 animais habitavam no exterior das habitações, um animal habitava no interior das habitações e dez habitavam ambos os ambientes (Gráfico 5). A prevalência da dirofilariose foi estimada para cada um destes habitats como se pode verificar na tabela 7, sendo que a diferença entre estas não foi estatisticamente significativa ($X^2 = 4,04$; $p = 0,132$).

Tabela 7 – Prevalência da dirofilariose canina nos diferentes habitats dos cães analisados.

Habitat	Cães examinados	Cães positivos		IC 95,25%
		n	%	
Exterior	164	19	11,59	9,92 – 13,26
Interior	30	1	3,33	1,66 – 5,00
Ambos	63	10	15,87	14,20 – 17,54
Total	257	30	11,67	10,00 – 13,34

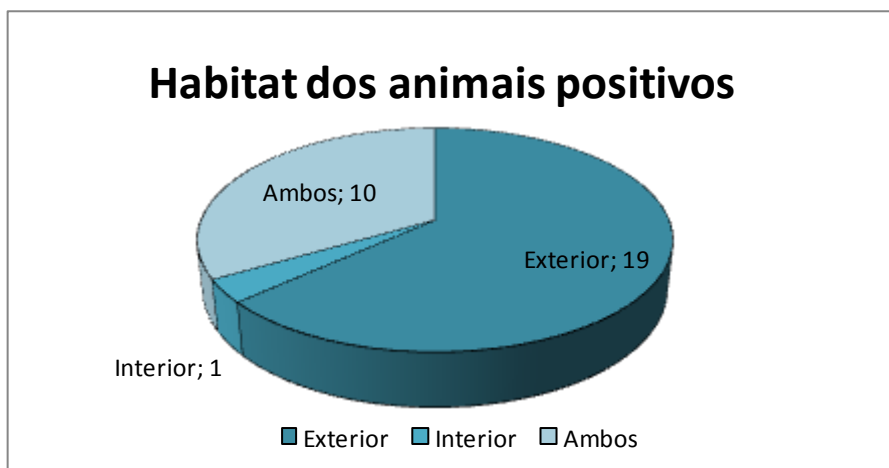


Gráfico 5 – Habitat dos animais afectados pela dirofilariose canina.

Em relação à pelagem dos 257 animais testados, estes foram agrupados em pelagem comprida e em pelagem curta. Dos 153 cães de pêlo comprido, sendo que desses 12 foram positivos para *D. immitis* e dos 104 cães de pêlo curto 18 foram igualmente positivos (Gráfico 6). Para ambas as pelagens foram estimadas as prevalências na amostra (tabela 8), sendo que a diferença observada é significativa estatisticamente ($X^2 = 5,66$; $p = 0,017$).

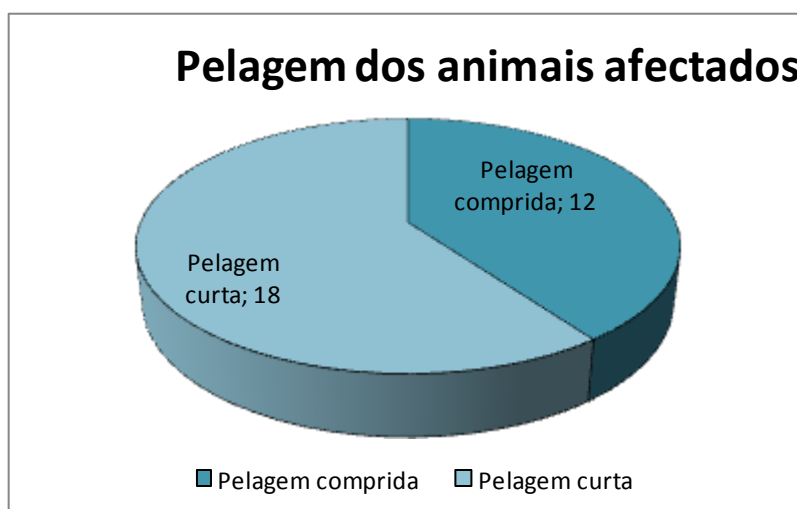


Gráfico 6 – Pelagem dos animais afectados por *D. immitis*

Tabela 8 – Prevalência da dirofilariose canina consoante a pelagem apresentada pelos animais.

Pelagem	Examinados	Positivos		IC 95,25%
	n	n	%	
Comprida	153	12	7,84	6,17 – 9,51
Curta	104	18	17,31	15,64 – 18,98
Total	257	30	11,67	10,00 – 13,34

Nesta amostra (n=257) foram analisados animais de 34 raças diferentes, em que 133 animais eram de raça indeterminada e 124 de raça pura. Analisando os cães positivos à *D. immitis*, de raça indeterminada foram 13 positivos e de raça pura 17 positivos. Na Tabela 9 podemos observar as prevalências de dirofilariose canina estimadas para os dois grupos: animais de raça indeterminada e de raça pura, assim como a discriminação das raças puras dos animais. No entanto, a diferença da prevalência entre estes grupos, estatisticamente, não é significativa ($X^2 = 1,36$; $p = 0,243$).

Tabela 9 – Raça dos animais avaliados e afectados por *D. immitis*

	Examinados	Positivos		IC 95,25%
	n	n	%	
Raça Indeterminada	133	13	9,77	11,44-8,10
Raça determinada	124	17	13,71	15,38-12,04
Labrador retriever	11	2	18,18	_____
Golden retriever	10	1	10,00	_____
Boxer	8	1	12,50	_____
Caniche	7	1	14,28	_____
Pastor Alemão	6	2	33,33	_____
Dálmata	5	2	40,00	_____
Rotweiler	5	1	20,00	_____
São Bernardo	4	1	25,00	_____
Shar pei	3	1	33,33	_____
Beagle	2	1	_____	_____
Chowchow	2	1	_____	_____
Dogue de Bordéus	1	1	_____	_____
Pointer	1	1	_____	_____
Podengo	1	1	_____	_____
Outras	58	0	_____	_____
Total	257	30	11,67	10,00 – 13,34

DISCUSSÃO

Este estudo transversal (cross-sectional study), foi efectuado com uma amostra total de 257 cães, representativa da população canina que habitualmente é assistida em clínicas privadas (Vetmédis e SPAD) e que não efectuava profilaxia para *Dirofilaria immitis* até à data da sua elaboração do estudo.

Na amostra analisada, a prevalência de dirofilariose canina foi estimada em 11,67% (IC 95,25%: 10,00-13,34), sendo esta manifestamente inferior à prevalência estimada anteriormente (30%) para a região descrita na bibliografia.^{[14]; [38]} Este facto dever-se-á a que o valor indicado neste estudo refere-se à população canina assistida por clínicas privadas e o valor indicado na bibliografia refere-se à população canina em geral. Na população canina em geral, além dos animais assistidos, são incluídos animais que têm dono mas que por variados motivos sociais e económicos não são levados ao veterinário e animais errantes, nos quais muito provavelmente a prevalência será maior, visto que a maior parte está mais exposta ao vector, vive em piores condições e têm condições físicas e de nutrição débeis.

Provavelmente, na população canina que tem assistência veterinária, a prevalência é mais baixa porque estes têm condições de bem-estar, alimentação, cuidado e segurança melhores. Além disso, a grande parte da população canina que tem assistência veterinária habitual, os proprietários estão mais sensibilizados para o risco e gravidade desta doença, para a importância do mosquito enquanto vector e para a necessidade de prevenção, visto que nos últimos anos houve grande esforço por parte dos clínicos no rastreamento dos animais, tratamento e prevenção da doença. É também importante, o empenho no controlo dos reservatórios naturais (cães vadios em circuitos errantes), nomeadamente ao nível da gestão no canil que é efectuada pela SPAD em que animais errantes, sem identificação, nos quais é detectada a infestação por *D. immitis* são eutanasiados com intuito de diminuir os reservatórios naturais desta doença que se propaga entre a população canina, assim como pode ocasionalmente afectar a população humana. Desta forma ao promover o tratamento e controlo na população canina assistida e a redução nos animais errantes, estamos a reduzir o reservatório de dirofilariose. Deste modo, a infestação é controlada de forma indirecta em toda a população, nomeadamente naquela aqui em estudo, que é assistida e não efectuava a profilaxia.

Neste estudo foi observada uma diferença significativa na prevalência da dirofilariose canina entre os géneros dos animais, em que a prevalência nos cães machos é 2,3 vezes maior que nos cães fêmeas (prevalência nos machos – 16,15%; prevalência nas fêmeas – 7,09%). Este resultado está de acordo com relatos na bibliografia que mencionam que os cães machos são duas a quatro vezes mais afectados que os fêmeas.^{[4]; [5]; [28]; [45]} Alguns factores como o estado fisiológico do animal, a idade e a

exposição aos vectores podem estar relacionados com a menor prevalência da infestação entre as fêmeas. ^{[38]; [39]} Porém existem relatos na bibliografia que indicam que não existe diferença significativa na prevalência da infestação entre os sexos dos animais. ^{[1]; [3]; [12]; [32]; [39]; [42]}

Observou-se, igualmente, nesta amostra uma diferença significativa na prevalência da dirofilariose canina entre as pelagens dos cães afectados, em que a prevalência nos cães de pelagem curta é 2,2 vezes maior que nos cães de pelagem comprida (prevalência nos cães de pelagem curta – 17,31%; prevalência nos cães de pelagem comprida – 7,84%). Este facto entra em acordo com estudos anteriores, em que são encontradas prevalências superiores em animais de pelagem curta, ^[4] no entanto, existem também estudos nos quais a raça e o tipo de pelagem não demonstraram ter influência no risco de infestação por *Dirofilaria immitis*, pelo facto de que os mosquitos escolhem habitualmente áreas de pouco pêlo para a sua alimentação. ^{[2]; [28]; [38]}

Em relação a raça dos cães, neste estudo não foi observada diferença significativa na prevalência da dirofilariose entre animais de raça pura ou de raça indeterminada, concordando com os dados de alguns estudos, ^{[3]; [4]; [28]} contudo existem estudos que indicam uma maior taxa de infestação nos cães de raça pura ^[27] e outros que encontraram maior parasitismo (44%) em cães sem raça definida (SRD). ^[43] Posto isto, pode observar-se que nesta amostra, ser de raça pura ou de raça indeterminada não influencia a prevalência da dirofilariose, visto que em ambos os grupos existem animais de pelagem curta e comprida, ou seja, mais do que a raça o que é verdadeiramente determinante é a pelagem característica da raça.

Relativamente à localização, era espectável uma diferença na prevalência entre os diferentes concelhos da região devido à existência de microclimas, em que Funchal, Ponta do Sol, Ribeira Brava e Santa Cruz eram aqueles onde se esperava prevalências maiores, visto que estes possuem as temperaturas médias mais elevadas (18-19 °C), sendo estas mais próximas das condições óptimas para o desenvolvimento dos vectores (25-27 °C). Nesta amostra, ao analisar as prevalências nos concelhos da vertente sul da ilha da Madeira, observou-se uma diferença significativa entre estes, porém o concelho com maior prevalência foi o de Câmara de Lobos (30%), sendo que este não se encontra na zona de temperaturas médias mais elevadas e o concelho com menor prevalência foi o de Santa Cruz (4,76%), sendo este um dos que possui temperaturas médias mais elevadas. Estas observações parecem indicar que, nesta amostra, os factores ambientais não têm um papel determinante na diferença encontrada nas prevalências entre concelhos na região. Provavelmente, a população do vector natural (*Culex theileri*) na Madeira estará plenamente adaptada à variabilidade do clima da região, sendo esta capaz de se desenvolver plenamente em

temperaturas de 15 a 17 °C, mantendo assim uma densidade populacional de mosquitos suficiente e capaz de transmitir a dirofilariose.

Além dos factores ambientais e da presença e densidade da população de vectores, outros factores influenciam a transmissão da dirofilariose canina, tais como: a densidade da população canina, o tipo de organização populacional rural ou urbana onde os animais vivem, os recursos socioeconómicos dos seus proprietários e o conhecimento e sensibilização sobre a patologia.

No que diz respeito a densidade da população canina, usando o critério da OMS ^[46], estimou-se que esta seja de 69 cães/km² em Câmara de Lobos (10% de 694 habitantes/km²), de 129 cães/km² no Funchal (10% de 1293 habitantes/km²), de 31 cães/km² em Machico (10% de 315 habitantes/km²) e de 45 cães/km² em Santa Cruz (10% de 455 habitantes/km²). ^[24] Deste modo, provavelmente, Câmara de Lobos teve uma maior prevalência porque a densidade canina é grande comparando com os restantes conselhos (excepto o Funchal – capital do arquipélago), porque é uma cidade com características ainda bastantes rurais, com população humana de baixos recursos económicos e baixa escolaridade, distribuída por bairros sociais que concentra em pequenos núcleos grande parte da sua população e o acesso aos cuidados veterinários limitado e pouco comum, visto que nesta cidade até a pouco tempo não havia nenhuma clínica ou consultório médico-veterinário (Vetmédic abriu a Dezembro de 2009) e que parte da população ainda não está sensibilizada para os cuidados de saúde dos animais de companhia.

Na amostra em estudo, foi estimada a prevalência de dirofilariose canina entre os diferentes grupos etários, sendo que as diferenças encontradas não foram estatisticamente significativas, tal como foi referido em alguns dos estudos. ^{[3]; [4]} Na bibliografia existem, igualmente, referências de que o risco de infestação por *D. immitis* aumenta com a idade, tais como Kienle & Kittleson (1998) que referem que os animais entre os quatro e sete anos são habitualmente mais afectados, Song *et. al* (2003) que referem que os animais com mais de seis anos foram aqueles em que observaram maior prevalência, entre outros que referem que quanto maior a idade maior a prevalência observada. ^{[1]; [8]} Os dados obtidos no estudo vão de encontro a estas referências, visto que a prevalência é maior nesta mesma faixa etária, no entanto não é suficientemente maior que nos restantes para poder ser considerada significativa.

No que respeita ao porte (mini, pequeno, médio, grande e gigante) e ao habitat (interior, exterior ou ambos) dos animais afectados pela dirofilariose canina, nesta amostra não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Na bibliografia é referido que os cães de grande porte e que vivem no exterior das habitações apresentam um risco acrescido em relação aos cães de pequeno porte e que vivem no interior. ^{[9]; [28]} Assim como é referido por Appleton & Arlian (1979) que o

habitat influencia mas o tamanho do animal não. Os dados obtidos neste estudo não permitem apoiar as evidências referidas por estes autores.

Relativamente aos meios de diagnóstico usados na detecção da infestação por *D. immitis*, no presente estudo foram utilizados três testes para detecção de infestação por *D. immitis*: o teste imunológico rápido para detecção dos vermes adultos e a técnica da gota fresca e a técnica de Knott modificada para detecção de microfilárias. O teste imunológico rápido foi efectuado em apenas 86 dos 257 analisados. Nos 86 animais avaliados, o

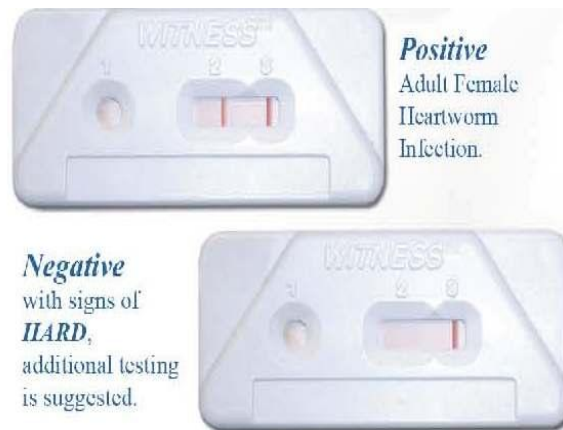


Figura 19 – Exemplo do aspecto de teste Witness® Dirofilária (Synbiotics) positivo e negativo.

resultado foi consistente com o resultado da técnica de Knott modificada (negativo em ambos ou positivo em ambos), o que significa que neste grupo de animais não foram detectadas infestações ocultas, porém estas poderiam existir na restante amostra pelo que seria necessário efectuá-lo em toda a amostra para poder tirar conclusões. Desses animais testados (n=86), nove foram positivos a dirofilariose, o que revela uma prevalência de 10,46%, aparentemente semelhante a obtida na totalidade da amostra (11,67%), o que faz acreditar na consistência das observações. A técnica da gota fresca e técnica de Knott modificada foram utilizadas simultaneamente em toda amostra (n=257), na qual se observou 26 e 30 animais positivos, respectivamente. Esta diferença nos resultados dever-se-á à baixa sensibilidade da técnica da gota fresca e uma vez que a técnica de Knott modificada é mais sensível e específica que a anterior, tratar-se-á de falsos negativos.

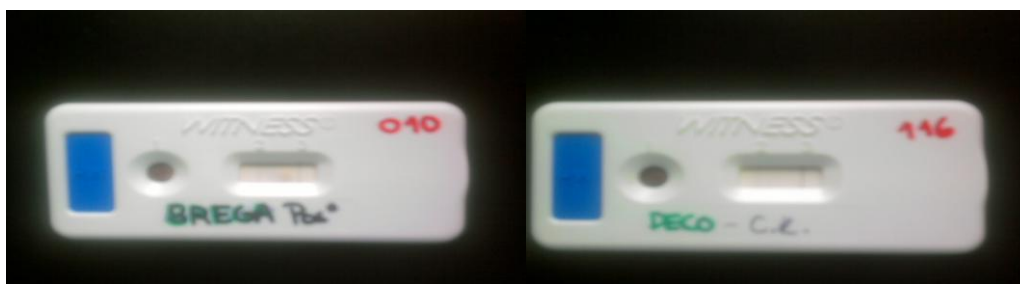


Figura 20 – Testes rápidos com resultado positivo (fotografia Original)

Este estudo, contudo, apresenta algumas limitações na extrapolação dos seus resultados para a totalidade da população canina da Madeira. Ao nível dos testes utilizados ficou limitada, visto que não foi possível utilização do teste imunológico rápido em todos os animais, devido aos custos associados, pelo que as comparações

de sensibilidade e especificidade entre este teste e os testes de detecção de microfilárias em circulação não são lícitas.

Ao nível dos resultados, estes são lícitos de análise, observações e conclusões para a população alvo da qual foi retirada uma amostra representativa para análise com precisão relativa de 4,75% e intervalo de confiança (IC) de 95,25%. No entanto, a extrapolação para população total, fica limitada na sua exactidão porque este estudo contém um viés do tipo sistemático não observacional (inclusão, exclusão e omissão), devido há utilização de uma amostragem não aleatória. Este viés seria controlado com utilização de amostragem aleatória e recolha proporcional em todos os concelhos, visto que a distribuição de animais não é semelhante entre estes.

Futuramente, seria útil a elaboração de estudos, nesta região da Madeira. Estudos que completassem a totalidade da população canina madeirense, tais como cães domésticos sem assistência veterinária habitual, cães errantes (abandonados) e cães selváticos. Estudos que utilizassem uma amostragem completamente aleatória e proporcional, de forma a esclarecer efectivamente a existência de diferenças entre os vários concelhos e identificar grupos de risco, para se orientar e focar as campanhas de sensibilização, rastreamento e prevenção da dirofilariose. Ainda estudos na ilha de Porto Santo, visto que esta ilha tem um clima diferente e específico em relação ao restante arquipélago e surge hipótese de que possa haver elevados índices de dirofilariose canina, pela observação ocasional dos clínicos, pelo que seria de interesse o seu esclarecimento.

CONCLUSÃO

Por se tratar de uma doença de difícil diagnóstico, devido a existência de muitos animais assintomáticos que actuam como reservatórios naturais, de carácter endémico na região da Madeira e de carácter zoonótico, a Dirofilariose Canina tem-se tornado num grande desafio dentro da prática da Medicina Veterinária, nomeadamente de saúde pública e principalmente nesta região do território português.

Demonstrou-se que a prevalência estimada de Dirofilariose canina na população alvo do estudo, actualmente é 11,67% (IC 95,25%: 13,34-10,00). Esta diminuiu nos últimos anos, o que pode revelar que o empenho no rastreamento e tratamento dos animais afectados, eliminação dos reservatórios naturais e aplicação de medidas preventivas eficazes, tem sortido efeitos na melhoria do bem-estar animal, assim como na saúde pública da região. Ao nível da localização, observou-se que os cães de Câmara de Lobos são 3 a 6 vezes mais afectados que os cães do Funchal, Machico e Santa Cruz. Pelo que é desejável concentrar as campanhas de sensibilização e controlo junto da população deste concelho.

A transmissão e infestação por *Dirofilaria immitis* são influenciadas por vários factores de risco. O género e a pelagem parecem ser factores de risco, em que os cães machos são afectados 2,3 vezes mais que as cadelas e que os cães de pêlo curto são mais afectados que os de pêlo comprido numa proporção de 2,2 para 1.

A idade, o porte, o habitat e a raça não demonstraram terem influência significativa sobre a prevalência da dirofilariose canina, neste estudo.

Deste modo, conclui-se que os métodos de controlo e tratamento têm sido produtivos, pelo que devem ser mantidos e cada vez mais incentivados junto dos proprietários dos animais, principalmente junto dos grupos de risco identificados neste estudo. Deveriam fazer-se estudos com maior exactidão para correlacionar esta prevalência com a localização nos diferentes concelhos da Madeira, visto que esses dados ajudariam a focar as campanhas de sensibilização e prevenção e melhorar actuação no controlo dos reservatórios naturais. Também se deveria avaliar a Dirofilariose Felina na região da Madeira, que continua sub-diagnosticada, apesar de os gatos apresentarem uma quantidade de microfírias *D. immitis* em circulação periférica diminuta que dificulta o diagnóstico. Visto que os felídeos não são hospedeiros preferenciais, contudo são igualmente afectados e constituem um foco de disseminação da doença para cães e humanos.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Ahid SMM, Lourenço-de-Oliveira R, Saraiva L Q (1999) "Dirofilariose canina na ilha de São Luís, Nordeste do Brasil: Uma zoonose potencial" **In Cadernos de Saúde Pública** 15, 405-412
- [2] Almeida AG, Gonçalves Y, Novo M, Sousa C, Melim M, Grácio JS (2007) "Vector monitoring of *Aedes aegypti* in the Autonomous Region of Madeira, Portugal." **In Eurosurveillance**, disponível em <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3311>
- [3] Almeida MAO, Barros MTG, Santos EP, Ayres MCC, Guimarães JE (2001) "Parasitismo de cães por microfilárias de *Dirofilaria immitis*: influência da raça, sexo e idade." **In Revista Brasileira Saúde Animal** 2 (3), 59-64
- [4] Appleton GL & Arlian LG (1979) "Canine filariasis in southwestern Ohio" **In Ohio Journal Sciences** 79 (3), 136
- [5] Alves LC, Silva LVA, Faustino MAG, Mc-Call JW, Supakonder JP, Labarthe NW, Sanchez M, Caires O (1999) "Survey of canine heartworm in the city of Recife, Pernambuco, Brazil" **In Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 94, 587-590
- [6] Asimacopoulos PJ, Katras A, Christie B (1992) "Pulmonary dirofilariasis. The largest single-hospital experience." **In Chest** 102, 851-855
- [7] Atkins C (2005) "Canine Heartworm Disease" **in Stephen EJ, Feldman EC, Textbook of Veterinary Internal Medicine** 2, 1118-136
- [8] Beugnet F, Rous V, Leus M, Chardomet L, (1994) "Effect of age in cardiopulmonary canine dirofilariasis. Choice of date for commencement of chemoprophylaxis." **In Revue de Medecine Veterinaire** 145, 59-64
- [9] Calvert CA, Thomason J (2008). "Heartworm Disease" **in Saunders & Elsevier Inc, Manual of canine and feline cardiology**, 4th Ed, 183-199
- [10] Chularerk P, Desowitz RS (1970) "A simplified membrane filtration technique for the diagnosis of microfilaraemia" **In Journal of Parasitology** 53, 623-624
- [11] Deplazes, P (2006) "Helminthosen von Hund und Katze" **in Schnieder, Veterinärmedizinische Parasitologie**, 6th ed, 444-520
- [12] Falls RK, Platt TR (1982) "Survey for heartworm, *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* (Nematoda: Filarioidea) in dogs from Virginia and North Carolina" **In American Journal of Veterinary Research** 43, 738-739
- [13] Ferasin L, Knight D (2005) "Filarial infections" **in Shaw SE & Day MJ Arthropodborne Infectious Diseases of the Dog and Cat** 51-61
- [14] Genchi C, Rinaldi L, Cascone C, Mortarino M, Cringoli G (2005). "Is heartworm disease really spreading in Europe?" **In Veterinary Parasitology** 133, 137-148

- [15] Genchi C, Rinaldi L, Mortarino M, Genchi M, Cringoli G (2009). "Climate and *Dirofilaria* infection in Europe", In Elsevier disponível em www.elsevier.com/locate/vetpar
- [16] Genchi C, Venco L, Genchi M (2000) "Guideline for the laboratory diagnosis of canine and feline *Dirofilaria* infections" In ***Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections**, 139-144
- [17] <http://lod.geospecies.org/ses/pZDDU.html>
- [18] <http://madeira-gentes-lugares.blogspot.com/2007/06/clima-do-arquipelago-da-madeira.html>
- [19] <http://www.flintvetclinic.com/Canine/Parasites.htm>
- [20] <http://www.gov-madeira.pt/madeira/conteudo/displayconteudo.do2?numero=263#localizacao>
- [21] <http://www.gov-madeira.pt/madeira/conteudo/displayconteudo.do2?numero=263#populacao>
- [22] <http://www.gov-madeira.pt/sra/geomedia/cartasolos>
- [23] <http://www.heartwormsociety.org>
- [24] <http://www.ine.pt>
- [25] <http://www.ivis.org>
- [26] <http://www.meteo.pt>
- [27] KAN SP *et al.* (1977) "Survey of dirofilariasis among dogs in Seremban, Malaysia." In **Veterinary Parasitology** 3, 177-181
- [28] Kittleson MD, Kienle RD (1998) "Small animal cardiovascular Medicine" In **Mosby**
- [29] Knight DH (1977) "Heartworm heart disease" In **Advances of Veterinary Sciences and Comparative Medicine** 21, 107-149
- [30] Knight, DH (1987) "Heartworm infection" In **Veterinary Clinics of North America Small Animals Practice** 17, 1463 -1518
- [31] Labarthe NV, Araújo AM, Bordin EL, Larsson ME, Guerrero J (1992) "Update on the distribution of *Dirofilaria immitis* in dogs in Brazil" In **XVII WSAVA World Congress, Proceedings** 287-289
- [32] Meriem-Hind B & Mohamed M (2009) "Prevalence of canine *Dirofilaria immitis* infection in the city of Algiers, Algeria" In **African Journal of Agricultural Research** 4 (10), 1097-1100, disponível em <http://www.academicjournals.org/AJAR>
- [33] Milanez de Campos JR, Barbas CSV, Filomeno LTB, Fernandez A, Minamoto H, Barbas Filho JV, Janete FB (1997) "Human Pulmonary Dirofilariasis: Analysis of 24 Cases From Sao Paulo, Brazil" In **Chest** 112, 729-733
- [34] Nelson RW, Couto CG (2009) "Heartworm disease" in **Mosby-Elsevier, Small Animal Internal Medicine**, 4th Ed, 10, 169-183

- [35] Newton WL, Wright WH (1956) "The occurrence of a dog filarial other than *Dirofilaria immitis* in the United States" **In Journal of Parasitology** 42, 246-258
- [36] Nicolas L, Scoles GA (1997) "Multiplex polymerase chain reaction for detection of *Dirofilaria immitis* (Filarioidea: Onchocercidae) and *Wuchereria bancrofti* (Filarioidea: Dipetalonematidae) in their common vector *Aedes polynesiensis* (Diptera: Culicidae)" **In Journal of Medical Entomology** 34, 741-744
- [37] Nissen M D (2006) "Dirofilariosis", disponível em <http://emedicine.medscape.com/article/236698-overview>
- [38] Pereira da Fonseca IM, Carvalho LM, Carvalho SP, Carvalho-Varela M (1991) "Prevalência da Dirofilariose na população canina Portuguesa. I. Detecção de Microfilárias Sanguíneas" **In Veterinária Técnica** 36-38
- [39] Perez-Sanchez R, Gomez-Bautista M, Grandes AE (1989) "Canine filariasis in Salamanca (Northwest Spain)" **In Annals of Tropical Medicine and Parasitology** 83, 143-150
- [40] Rodrigues-Silva R, Moura H, Dreyer G, Rey L (1995) "Human pulmonary dirofilariosis: A review" **In Revista do Instituto de Medicina Tropical** 35, 523-530
- [41] Santa-Ana M, Khadem M, Capela R (2006) "Natural infection of *Culex theileri* (Diptera: Culicidae) with *Dirofilaria immitis* (Nematoda: Filarioidea) on Madeira Island, Portugal" **In Journal of Medical Entomology** 43, 104-106
- [42] Song KH, Lee SE, Hayasaki M, Shiramizu K, Kim DH, Cho KW (2003) "Seroprevalence of canine dirofilariosis in South Korea" **In Veterinary Parasitology**
- [43] Souza NE et al. (1997) "Prevalência de *Dirofilaria immitis* em cães no município de Belém-Pará, com base na microfilaremia." **In Revista Brasileira Parasitologia Veterinária** 6, n.1, 83-86
- [44] Venco L (2000) "Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs" **In *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections** 119-125
- [45] Wallenstein WL, Tibola BJ (1960) "Survey of canine filariasis in a Maryland area – Incidence of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema*" **In Journal of the American Veterinary Medicine Association** 137, 712-716
- [46] WHO Expert Committee on Rabies (1994) **Eighth Report, WHO Technical Report Series** 824, Geneva, World Health Organization Geneva, World Health Organization

ANEXOS

Anexo 1 – Inquérito utilizado no estudo transversal da dirofilariose canina na Ilha da Madeira

Inquérito Dirofilariose na Ilha da Madeira													
Código	Exemplo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Nome	Boby												
Pelagem	<input checked="" type="checkbox"/> curt	long	curt	long	curt	long	curt	long	curt	long	curt	long	curt
Raça	SRD												
Peso (kg)	10												
Idade	2 anos												
Género	<input checked="" type="checkbox"/> F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Cidade	Funchal												
Local	Monte												
Habitat *	<input checked="" type="checkbox"/> S	Ext	Int	Ext	Int	Ext	Int	Ext	Int	Ext	Int	Ext	Int
Sintomas	<input checked="" type="checkbox"/> S	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N
Profiáxia	<input checked="" type="checkbox"/> S	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N

Legenda: long- longa, curt- curta, M- macho, F- fêmea, Ext- exterior, Int- interior, S- sim, N- não, P- positivo, N- negativo.
*quando for ambos colocar duas X, em interior e exterior

Data	01-Jan-09												
Testes:													
Witness®	<input checked="" type="checkbox"/> N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
Gota fresca	<input checked="" type="checkbox"/> P	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
knott	<input checked="" type="checkbox"/> N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N

Sara Pereira 2009/2010

Figura 21 – Inquérito usado no estudo transversal da dirofilariose canina na ilha da Madeira (imagem original extraída do ficheiro em pdf).

Anexo 2 – Análise estatística dos dados através de Microsoft Office Excel 2007.

Obtido	Funchal	Santa Cruz	Machico	Câmara de lobos	Total
Positivo	17	1	4	6	28
Negativo	147	20	37	14	218
Total	164	21	41	20	246

Grau de certeza com que se rejeita a hipótese de serem independentes	
Valor p	0,0193698
X ²	9,9074108

Esperado	Funchal	Santa Cruz	Machico	Câmara de lobos
Positivo	19	2	5	2
Negativo	145	19	36	18

Grau de certeza com que se rejeita a hipótese de serem independentes	
Valor p	0,0197431
X ²	5,434472

Obtido	Macho	Fêmea	Total
Positivo	21	9	30
Negativo	109	118	227
Total	130	127	257

Esperado	Macho	Fêmea
Positivo	15	15
Negativo	115	112

Grau de certeza com que se rejeita a hipótese de serem independentes	
Valor p	0,1937195
X ²	4,7171533

Obtido	<2 anos	2-4anos	4-6anos	>6 anos	Total
Positivo	3	16	4	7	30
Negativo	64	94	19	50	227
Total	67	110	23	57	257

Esperado	<2 anos	2-4anos	4-6anos	>6 anos
Positivo	8	13	3	7
Negativo	59	97	20	50

Grau de certeza com que se rejeita a hipótese de serem independentes	
Valor p	0,4808393
X ²	2,4694398

Obtido	Mini 1-4 kg	Pequeno 5-10 kg	Médio 11-25 kg	Grande 26-60 kg	Total
Positivo	1	8	10	9	28
Negativo	18	77	86	46	227
Total	19	85	96	55	255

Esperado	Mini 1-4 kg	Pequeno 5-10 kg	Médio 11-25 kg	Grande 26-60 kg
Positivo	2	9	11	6
Negativo	17	76	85	49

Obtido	1- Exterior	2- Interior	3- Ambos	Total
Positivo	19	1	10	30
Negativo	145	29	53	227
Total	164	30	63	257

Grau de certeza com que se rejeita a hipótese de serem independentes	
Valor p	0,1324843
X ²	4,0425824

Esperado	1- Exterior	2- Interior	3- Ambos
Positivo	19	4	7
Negativo	145	26	56

Obtido	1-Comprido	2-Curto	Total
Positivo	12	18	30
Negativo	141	86	227
Total	153	104	257

Grau de certeza com que se rejeita a hipótese de serem independentes	
Valor p	0,0173762
X ²	5,657971

Esperado	1-Comprido	2-Curto
Positivo	18	12
Negativo	135	92

Obtido	Raça	Indeterminada	Total
Positivo	17	13	30
Negativo	107	120	227
Total	124	133	257

Grau de certeza com que se rejeita a hipótese de serem independentes	
Valor p	0,2428286
X ²	1,3640984

Esperado	Raça	Indeterminada
Positivo	14	16
Negativo	110	117

Hipóteses	H0	São independentes
	H1	Não são independentes
$\alpha = 0,0475$		

Figura 22 – Teste do Qui-quadrado na análise estatística dos dados dos resultados (imagem original extraída do ficheiro em pdf).