

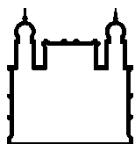
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado *Stricto sensu* em Medicina Tropical

**POTENCIAL ZONÓTICO POR *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) Raillet & Henry,
1911 NA BAIXADA FLUMINENSE DO RIO DE JANEIRO**

VIVIANE MARQUES DE ANDRADE VIEIRA

Rio de Janeiro
Janeiro de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

VIVIANE MARQUES DE ANDRADE VIEIRA

**POTENCIAL ZONÓTICO POR *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) Raillet & Henry,
1911 NA BAIXADA FLUMINENSE DO RIO DE JANEIRO**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador (es): Prof. Dr. Antonio Henrique Almeida de Moraes Neto
Prof. Dr. Gilberto Salles Gazêta

RIO DE JANEIRO

Janeiro de 2019

Marques de Andrade Vieira, Viviane .

Potencial zoonótico por *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) Raillet & Henry, 1911 na Baixada Fluminense do Rio de Janeiro / Viviane Marques de Andrade Vieira. - Rio de Janeiro, 2019.

xv, 78f. f.; il.

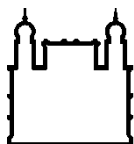
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2019.

Orientador: Antonio Henrique Almeida de Moraes Neto.

Co-orientador: Gilberto Salles Gazêta.

Bibliografia: f. 45-53

1. Filarioses canina. 2. *Dirofilaria immitis*. 3. *Acanthocheilonema reconditum*. 4. zoonose. 5. promoção da saúde. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: VIVIANE MARQUES DE ANDRADE VIEIRA

**POTENCIAL ZONÓTICO POR *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) Raillet & Henry,
1911 NA BAIXADA FLUMINENSE DO RIO DE JANEIRO**

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Antonio Henrique Almeida de Moraes Neto
Prof. Dr. Gilberto Salles Gazêta**

Aprovada em: 29/01/2019

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Júnior - Presidente - Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brazil - Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Prof. Dra. Norma Vollmer Labarthe - PPGBios- Fiocruz

**Prof. Dra. Maria Inês Doria Rossi - Instituto de Ciência e tecnologia em Biomodelos
(ICTB) /Fiocruz**

**Prof. Dr. Eduardo José Lopes Torres - Faculdade de Ciências Médicas
(UERJ)**

Rio de Janeiro, 29 de janeiro de 2019.

À minha família querida, Marcus Fabricio, João, Sonia, Beatriz e Juliane: porto seguro, bênçãos em minha vida! Ao meu eterno mestre e pai científico Nicolau Maués Serra-Freire (in memoriam), que sempre me motivou a continuar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus, pelas suas beneficências em minha vida, por seu amor incondicional, pelo sustento e amparo durante o andamento desse projeto de pesquisa. Obrigada por realizar meu sonho de fazer o mestrado!

Ao meu esposo Marcus Fabricio Vieira, que me apoia desde o início, pelo amor e cuidado comigo, na esperança de que cresceremos juntos. Amo-te, príncipe!!! Aos meus pais, João e Sonia pelo amor e cuidado, por sentirem orgulho da mulher que me tornei, por orarem sempre por mim. Às minhas irmãs queridas Beatriz e Juliane que admiram meu trabalho, me incentivam, me motivam, pela união que nos move.

À minha Igreja Assembleia de Deus Central em Saracuruna (ADCES), em especial à minha liderança espiritual pastor Jonatas Leal e pastora Jaqueline Leal, por admirarem minha profissão, pelo carinho e incentivo aos meus estudos durante o processo do mestrado.

Ao meu orientador, Dr. Antonio Henrique Almeida de Moraes Neto, que me abraçou como orientada (quando me sentia perdida), aceitou o projeto com seriedade e admiração, pelo apoio em todos os âmbitos que precisei, pelo encorajamento que me deu durante o desenvolvimento da pesquisa e por sempre perguntar se eu estava bem. Espero que nossa parceria renda frutos para que com louvor apresentemos à sociedade científica e à comunidade do estudo um ótimo trabalho! Obrigada de coração!!

Ao meu co-orientador Dr. Gilberto Salles Gazêta, pela grande parceria, pelo engajamento, pelas ideias maravilhosas durante o desenvolvimento da prática do projeto, por me fazer pensar como cientista, além da vida acadêmica.

À Nicole Moura, amiga que o PROVOC/Fiocruz me deu, pela amizade, risadas, desabafos e conselhos. Pelo auxílio e ensinamento sobre a Técnica Molecular para que este projeto tivesse continuidade. Aos demais amigos queridos do LIRN: Vinicius Vizzoni, Tayra Sato, Michelin Albuquerque, Michel Valim (“grande Michel!!!”), Roberta, Marcelo Santiago, pela linda amizade que nos une e pelos conselhos!!

À Morgana Camacho pela irmandade, pelos desabafos, pelo apoio, por me fazer acreditar em mim. Obrigada, minha querida por tudo que tens feito por mim! Tenha certeza que é recíproco!!

A toda equipe do LITEB. À Fátima Alencar pela amizade, conversos bons e incentivos, ao Julio Bordignon por ser solícito com toda ajuda que precisei com o Comitê de Ética em pesquisa com seres humanos-CEP, à Milena Enderson que me incentiva desde o início do projeto. À Aline Monteiro, amiga e parceira para todas as horas, pela amizade que nos move e à minha pupila “Jovens Talentos para a Ciência da FAPERJ” Larissa Ribeiro a quem tive o prazer de co-orientar e compartilhar um pouco do projeto de dirofilariose canina.

À minha turma de Medicina Tropical 2017-2018, em especial à Flavia Freitas, Priscila Pinho, Igor Falco, Daniel Fuser, Mariana Nabuco e Carolina, amigos *forever!!!* Obrigada por tudo pessoal, nos unimos e vencemos nesta grande jornada da vida, enfrentamos vários desafios a nós dados e vencemos!! À Érica Tex, pela amizade, pela ajuda ao pensar nos testes estatísticos e por rirmos e desabafarmos juntas em todas as dificuldades enfrentadas durante o mestrado, sempre apoiando uma à outra.

À coordenação do Curso de Pós-graduação em Medicina Tropical, em especial a Dra. Martha Mutis por todo ensinamento durante o curso e pelo apoio prestado e à Livia sempre solícita e por toda ajuda que precisei durante o andamento do projeto de pesquisa.

A todos os colegas da Fiocruz, colaboradores que me auxiliaram: Dra. Rosany Bchner (ICICT/Fiocruz) que me recebeu com muita atenção para elaborarmos as análises estatísticas para que os resultados se efetivassem; ao Anselmo Rocha Romão (ICICT/Fiocruz) que se disponibilizou a elaborar os mapas da região estudada. A Dra. Norma Labarthe por toda orientação com o CEUA e com as correções de grande valia para futura publicação e à Dra. Maria Inês pelas orientações na *Biomol* e disponibilidade em me receber, sempre!

As minhas amigas veterinárias Nathalia Stumpf, Suzana Bento e Valeria Moreira, amigas de plantão e por colaborarem também cedendo gentilmente as suas clínicas veterinárias para que as coletas pudessem ser feitas!

A toda equipe do Laboratório Laborlife Ltda., pela excelência na colaboração com meu trabalho me cedendo amostras de sangue dos cães para o estudo, em especial à Priscila Fernandes, sempre solicita em me treinar na técnica de Knott modificado e a Estephanie Nunes sempre disposta a enviar as informações que eu precisava.

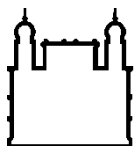
A toda banca examinadora, pela aceitação em avaliar este trabalho prontamente. Tenho certeza que toda crítica e sugestões serão bem-vindas para melhoria do projeto e preparação para a continuidade no doutorado, deste trabalho que aprendi a amar!

Gostaria de expressar minha eterna gratidão às contribuições que dois mestres me deixaram: Dr. Nicolau Maués Serra-Freire (*In memoriam*) que me deixou o legado da Hierarquia do Saber (quanta saudade sinto, pela segurança que me passava, pelos conselhos, desabafos e boas risadas!!) durante os 12 anos que passamos juntos e ao Dr. Jonimar Pereira Paiva (*In memoriam*), professor querido da graduação, que aprendi a admirar e pela colaboração doando gentilmente helmintos adultos de *Dirofilaria immitis* para meu controle positivo na técnica molecular (como sinto sua falta, querido professor!!).

À Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ por ter aberto as portas para mim desde a Iniciação Científica (PROVOC/PIBIC) e o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo auxílio financeiro.

“O justo olha pela vida dos seus animais...”.

Provérbios 12.10



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

POTENCIAL ZONÓTICO POR *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) Raillet & Henry, 1911 NA BAIXADA FLUMINENSE DO RIO DE JANEIRO

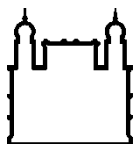
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Viviane Marques de Andrade Vieira

Dirofilaria immitis é o bioagente patogênico da dirofilariose, agravo frequente à saúde dos cães, principalmente em áreas costeiras de regiões tropicais e subtropicais. A dirofilariose humana é uma zoonose considerada acidental, presente em diferentes países, inclusive no Brasil. O objetivo deste estudo foi analisar a ocorrência da infecção canina por filariídeos nos municípios de Magé, Duque de Caxias, Guapimirim e Nova Iguaçu, na Baixada Fluminense, Estado do Rio de Janeiro. O estudo foi desenvolvido a partir de amostras de sangue de cães nascidos, criados e atendidos em serviços veterinários. Amostras diagnosticadas como positivas após análise pelos testes laboratoriais foram submetidas à PCR-Multiplex e sequenciamento, para identificação específica. Em todos os municípios estudados foram detectados cães infectados. A frequência geral em relação aos casos positivos de cães microfilarêmicos foi de 76,9% (113/147) e deste total, 100 amostras (88,5%) amplificaram o fragmento do gene 12S. As maiores frequências de animais parasitados das amostras do laboratório de patologia clínica foram observadas em Magé (51%; 51/100) e Duque de Caxias (40%; 40/100) ($p < 0,00$; $\chi^2 = 23,7$; OR=8,71). Cães machos foram os mais parasitados (62,3%; $\chi^2 = 1,26$; $p = 0,25$), a faixa etária entre 1 a 6 anos foi a mais acometida (62,1%; $\chi^2 = 1,96$; $p = 0,16$), e a chance de um animal de porte grande ser parasitado é 3,6 vezes maior em relação a um cão de porte médio (63,6%; $\chi^2 = 7,47$; $p = 0,02$; OR=3,64). Das amostras submetidas à reação de sequenciamento, 93,6% (73/78) foram identificadas como *D. immitis* e 6,4% (5/78) como *Acanthocheilonema reconditum*. A alta frequência e a consideração de que as áreas onde vivem os cães com *D. immitis* são ambientes naturais para criadouros dos vetores culicídeos, permitem inferir sobre o estabelecimento e a manutenção do ciclo enzoótico na região analisada, sinalizam sua vulnerabilidade para a ocorrência do ciclo epidêmico e apontam para a possibilidade de ocorrência de casos humanos. O estudo permitiu caracterizar e determinar a ocorrência de filarioses caninas na região e possibilitou a avaliação de risco para a população humana e orientações de medidas integradas de prevenção.

Palavras-chave: *Filarioses canina*; *Dirofilaria immitis*; *Acanthocheilonema reconditum*; zoonose; promoção da saúde



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ZOONOTIC POTENTIAL OF *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) Haillet & Henry, 1911 AT BAIXADA FLUMINENSE, RIO DE JANEIRO

ABSTRACT

THESIS ON TROPICAL MEDICINE

Viviane Marques de Andrade Vieira

Dirofilaria immitis is the pathogenic bioagent of dirofilariasis, a frequent health problem to dogs, mainly in coastal areas of tropical and subtropical regions. Human dirofilariasis is a zoonosis considered to be accidental, present in different countries, including Brazil. The aim of this study was to analyze the occurrence of the canine infection caused by filarids in Magé, Duque de Caxias, Guapimirim and Nova Iguaçu municipalities, located at Baixada Fluminense, Rio de Janeiro. This study included blood samples of dogs who were born, raised and treated at veterinary services. Samples diagnosed as positive after laboratorial tests were submitted to Multiplex-PCR and DNA sequencing for specific identification. Infected dogs were found in all studied municipalities. General frequency related to the positive microfilaremic dogs was 76.9% (113/147) and of these, 100 samples (88.5%) amplified the gene fragment 12S. The highest frequencies obtained from samples analyzed at the clinical pathology laboratory were from Magé (51%; 51/100) and Duque de Caxias (40%; 40/100) ($p < 0,00$; $\chi^2 = 23,7$; $OR = 8,71$). Male dogs were the most parasitized (62,3%; $\chi^2 = 1,26$; $p = 0,25$), 1 to 6 years age group was the most affected (62,1%; $\chi^2 = 1,96$; $p = 0,16$) and the chance of a large-sized dog of being parasitized is 3.6 times higher when compared to the chance of a medium-sized dog (63,6%; $\chi^2 = 7,47$; $p = 0,02$; $OR = 3,64$). Of the samples submitted to sequencing, 93.6% (73/78) were identified as *D. immitis* and 6.4% (5/78) as *Achantocheilonema reconditum*. The high frequencies observed and the fact that the areas where the infected dogs live are natural environments for Culicidae vectors' reproduction, allow to infer about the presence and maintenance of the enzootic cycle at the analyzed region, signalize for its' vulnerability related to the epidemic cycle and suggest the possibility of the occurrence of human cases. This study allowed characterizing and determining the occurrence of canine filariasis at the region, evaluating the risk for the human population and guidance related to prevention.

Keywords: Canine Filariasis; *Dirofilaria immitis*; *Acanthocheilonema reconditum*; Zoonosis; Health Promotion

ÍNDICE

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Filarioses caninas.....	1
1.1.1 <i>Agente etiológico</i>	1
1.1.2 <i>Classificação taxonômica</i>	2
1.1.3 <i>Epidemiologia da dirofilariose canina</i>	2
1.1.4 <i>Potencial zoonótico de <u>Dirofilaria immitis</u></i>	4
1.1.5 <i>Hospedeiro intermediário</i>	4
1.1.6 <i>Ciclo biológico de <u>D. immitis</u> em cães</i>	6
1.1.7 <i>Controle e profilaxia</i>	8
1.2 Dirofilariose Humana.....	8
1.3 Justificativa.....	10
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo Geral.....	13
2.2 Objetivos Específicos.....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Área de estudo.....	14
3.1.1 <i>Identificação da área de estudo</i>	15
3.2 População amostral.....	15
3.3 Delineamento do estudo.....	16
3.4 Considerações éticas.....	16
3.5 Questionário sobre Conhecimentos, Atitudes e Práticas (CAP) acerca da dirofilariose.....	16
3.6 Coletas das amostras de sangue dos cães.....	17
3.7 Pesquisa do Bioagente.....	18
3.8 Extração de DNAg.....	19
3.9 Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex (PCR-Multiplex)	19
3.10 Sequenciamento.....	20
3.11 Análise das sequencias.....	20
3.12 Análise estatística.....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1 Distribuição de frequência de coleta das amostras de sangue dos cães.....	22
4.2 Conhecimentos, atitudes e práticas dos tutores dos animais cadastrados acerca da dirofilariose canina.....	28
4.3 Detecção e caracterização molecular das amostras de filarídeos.....	33
4.3.1 <i>Análise estatística dos fatores de risco</i>	35
4.3.2 Análise das sequencias.....	37
4.3.3 <i>Análise filogenética</i>	40
5 CONCLUSÕES.....	43
6 PERSPECTIVAS.....	44
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

8 APENDICES	
APÊNDICE 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	54
APÊNDICE 2 Carta de solicitação.....	56
APÊNDICE 3 Questionário sobre Conhecimentos, Atitudes e Práticas (CAP).....	57
APÊNDICE 4 Termo de Confidencialidade e Sigilo.....	58
APÊNDICE 5 Ficha de coleta.....	59
APENDICE 6 Análise dos alinhamentos- Amostras de Duque de Caxias.....	60
APENDICE 7 Análise dos alinhamentos- Amostras de Guapimirim.....	63
APENDICE 8 Análise dos alinhamentos- Amostras de Magé.....	64
APENDICE 9 Análise dos alinhamentos- Amostras de <i>A. reconditum</i>	67
9 ANEXOS	
ANEXO 1 Termo de Anuência Laborlife.....	68
ANEXO 2 Termo de Anuência LITEB.....	69
ANEXO 3 Termo de Anuência Clínica Veterinária Nova Campina.....	70
ANEXO 4 Termo de Anuência Consultório Veterinária Taquara.....	71
ANEXO 5 Termo de Anuência LIRN.....	72
ANEXO 6 Licença da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz.....	73
ANEXO 7 Licença do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres humanos.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Distribuição geográfica de diferentes espécies de <i>Dirofilaria</i> em animais no mundo	3
Figura 2 Ciclo de <i>Dirofilaria immitis</i> em cão. Adaptado de AHS (2014)	7
Figura 3 Área de estudo na Baixada Fluminense, Estado do Rio de Janeiro. Fonte: Google Earth	14
Figura 4 Animais atendidos nos estabelecimentos veterinários da Baixada Fluminense, RJ no período de março a dezembro de 2018.	17
Figura 5 Mapa das cidades de Duque de Caxias e Magé, localizadas na Baixada Fluminense, RJ, evidenciando os pontos de maior frequência de coleta das amostras de sangue dos cães atendidos nos estabelecimentos veterinários. Fonte: IBGE (2010)	24
Figura 6 Detecção de microfilárias durante a triagem das amostras de sangue dos cães provenientes da Baixada Fluminense, RJ	28
Figura 7 Gel de agarose a 2% evidenciando amplificação de fragmento do gene <i>12S</i> de nematoides filariais em amostras de sangue de cães atendidos em serviços veterinários na Baixada Fluminense, Estado do Rio de Janeiro.	34
Figura 8 Filodendograma da comparação das sequências parciais do gene <i>12S</i> rDNA, utilizando o método <i>Neighbor-Joining</i> e distâncias evolutivas determinadas pelo algoritmo Kimura 2 parâmetros.	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Oligonucleotídeos utilizados para identificação genotípica de espécies de <i>Dirofilaria</i> sp.....	20
Tabela 2 Distribuição de frequência de coleta das amostras de sangue dos cães provenientes das duas clínicas veterinárias do município de Duque de Caxias e Nova Iguaçu na Baixada Fluminense, Rio de Janeiro ($n=36$), no período de março a julho de 2018.....	22
Tabela 3 Distribuição de frequência das amostras de sangue dos cães positivos para microfíliarias procedentes do Laborlife, por bairros dos municípios de Duque de Caxias, Magé, Nova Iguaçu e Guapimirim na Baixada Fluminense, Rio de Janeiro ($n= 111$), no período de março a dezembro de 2018.....	23
Tabela 4 Frequência das características fenotípicas e faixa etária dos caninos positivos para microfíliarias, provenientes das amostras de sangue recebidas do laboratório Laborlife, Rio de Janeiro ($n=111$) no período de março a dezembro de 2018.....	25
Tabela 5 Frequência das características fenotípicas e faixa etária dos caninos positivos para microfíliarias, provenientes das coletas de sangue de clínica e consultório veterinário na Baixada Fluminense, Rio de Janeiro ($n=36$) no período de março a dezembro de 2018.....	26
Tabela 6 Frequência dos casos de caninos microfilarêmicos por municípios da Baixada Fluminense, de amostras processadas no Laboratório Laborlife no período de março a dezembro de 2018 ($n=111$).....	27
Tabela 7 Respostas dos tutores ($n=18$) ao questionário sobre conhecimentos, atitudes e práticas acerca da dirofilariose canina, aplicado nas clínicas veterinárias em Duque de Caxias na Baixada Fluminense, Rio de Janeiro, no período de março a julho de 2018.....	31
Tabela 8. Frequência das práticas realizadas pelos tutores em relação aos cães atendidos ($n=36$), relatadas nos questionários aplicados nas clínicas veterinárias em Duque de Caxias na Baixada Fluminense, Rio de Janeiro, no período de março a julho de 2018.....	32
Tabela 9. Distribuição por localidades da Baixada Fluminense, RJ dos casos positivos confirmados pela técnica PCR-Multiplex das amostras de sangue provenientes do laboratório de patologia clínica Laborlife, no período de março a dezembro de 2018.....	33
Tabela 10. Tabela 10 Análise estatística das variáveis das amostras positivas dos cães da Baixada Fluminense, Rio de Janeiro analisadas pelo Laboratório de patologia clínica Laborlife e confirmadas pela técnica da PCR-Multiplex, no período de março a dezembro de 2018.....	36
Tabela 11 Espécies de filarias detectadas por análise de sequências de nucleotídeos de fragmento do gene 12S em amostras de sangue coletadas em cães atendidos em serviços veterinários na Baixada Fluminense, Estado do Rio de Janeiro, no período de março a dezembro de 2018.....	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius

µL – Microlitro

µM – Micromolar

DNAg – *Desoxyribonucleic Acid genomic*- Ácido Desoxirribonucléico genômico

dNTP – *Deoxynucleotides triphosphates* – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay* – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

h – Hora

min – Minuto

ml – Mililitro

mm – Milímetros

pb – Pares de base

PCR - Polymerase Chain Reaction- Reação em Cadeia da Polimerase

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

U – Unidade

rpm – Rotação por minuto

1 INTRODUÇÃO

1.1 Filariose caninas

1.1.1 Agente etiológico

A dirofilariose é uma doença cujo agente biológico é o filarídeo do gênero *Dirofilaria*, capaz de infectar mais de 30 espécies de hospedeiros vertebrados. O gênero inclui duas espécies de importância médica veterinária: *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) Railliet e Henry, 1911, e *Dirofilaria repens* (Railliet e Henry, 1911). *D. immitis* acomete com maior frequência os cães (*Canis lupus familiaris* Linnaeus 1758) em relação aos gatos (*Felis catus* Linnaeus 1758) domésticos e animais silvestres. Em humanos (*Homo sapiens* Linnaeus 1758) e gatos domésticos, a infecção é acidental (Acha e Szyfres 2003).

D. immitis é vulgarmente conhecido como o “verme do coração” (“Heartworm”) por alojar-se nas artérias pulmonares e câmaras direitas do cão. *D. repens* causa dirofilariose subcutânea em cães, gatos e é patogênica para o homem, havendo registros na Ásia, África e Europa (CDC 2012; Acha e Szyfres 2003).

1.1.2 Classificação taxonômica – Anderson (2000):

Filo Nematoda

Classe Secernentea

Ordem Spirurida

Subordem Spirurina

Superfamília Filarioidea (Weiland, 1858) Stiles 1907

Família Onchocercidae Leiper, 1911

Subfamília Dirofilarinae Sandground, 1921

Gênero *Dirofilaria* Railliet & Henry, 1911

Espécie *D. immitis* (Leidy, 1856) Railliet & Henry, 1911

1.1.3 Epidemiologia da dirofilariose canina

A dirofilariose é considerada uma zoonose pela Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 1979 (OMS 1979), sendo umas das filarioses que acometem os humanos acidentalmente. A expansão global da área endêmica nos últimos anos tem sido constatada através do aumento da distribuição geográfica da parasitose em humanos e em animais não humanos, caracterizando-a como reemergente (Rodrigues-Silva et al. 2004; Simón et al. 2012). No entanto, apesar da importância médica atribuída à doença, a dirofilariose ainda é negligenciada pelas políticas públicas dos países nos quais há elevada prevalência. Regiões litorâneas tropicais e subtropicais são consideradas enzoóticas para ocorrência de *D. immitis* devido ao clima caracterizado por elevadas temperaturas e umidade, pois estão relacionadas à ocorrência de culicídeos vetores (Klinge et al. 2011).

A distribuição de *D. immitis* é global (Cirio 2005; McCall et al. 2008), com registros na África, Austrália, Europa e parte da região mediterrânea (Marquardt et al. 2000; Ciucã et al. 2016), América do Sul, América do Norte e Ásia (Wang et al. 2016). A maior prevalência encontra-se nos EUA (Schmidt e Roberts 1996), América do Sul (Argentina, Colômbia, Brasil, Peru e Venezuela), Japão, Austrália e Itália, sem ocorrência documentada no Canadá e Alaska (CVBD 2014).

Em áreas endêmicas a prevalência é considerada alta em cães (40 a 70%) e baixa nos gatos (1 a 4%) (Acha e Szyfres 2003). Bendas et al. (2017) em recente revisão da literatura sobre a ocorrência da dirofilariose em países da América do Sul e México constataram que o Chile foi o único país em que não se encontrou *D. immitis* pelos testes de Knott modificado e pela técnica molecular e a maior prevalência foi detectada no México (59,8%) (Caro-Gonzalez et al. 2011 apud Bendas et al. 2017). Desta forma, os valores de prevalência podem mudar a depender do teste diagnóstico utilizado.

A prevalência no Brasil ao longo dos anos decresceu de 7,9 % em 1988 para 2% em 2001, devido às medidas educativas apresentadas aos tutores por médicos veterinários quanto à quimioprofilaxia com a utilização de fármacos para tratamento da dirofilariose canina (Costa et al. 2004; Silva e Langoni 2009), porém sabe-se que devido às mudanças climáticas recentes, o panorama epidemiológico tem-se alterado com o aumento de casos frequentes (Meireles et al. 2014). Labarthe et al. (2014)

avaliaram a prevalência da infecção em cães da região litorânea do Brasil (que no passado eram enzoóticas) e constataram que na região Sudeste, especificamente na região oceânica de Niterói (Rio de Janeiro) ocorre uma soroprevalência de 58,6% e no Guarujá (São Paulo) cerca de 2,8%, já no Paraná em Guaraqueçaba foi de 31,8% e no Nordeste (Pernambuco) 49,5%, na Ilha de Itamaracá.

A alta prevalência de cães errantes infectados por *D. immitis* representa fator de risco para a saúde pública (Garcez et al. 2006; Martínez et al. 2015; Wang et al. 2016), pois o cão é o principal hospedeiro do parasito, e por sua grande mobilidade entre áreas endêmicas contribui para a manutenção da transmissão e consequente aumento do número de casos (Labarthe et al. 2003). Os gatos são considerados hospedeiros acidentais e a susceptibilidade é mais baixa em relação ao cão, pois a microfilaremia é rara e transitória, pela ação do sistema imune destes felinos (Nelson 2012; AHS 2014). Estudos demonstraram que a ocorrência de dirofilariose felina está relacionada à prevalência de dirofilariose canina em regiões endêmicas (Venco et al. 2011; Pereira et al. 2018) e não litorâneas (Branco et al. 2009).

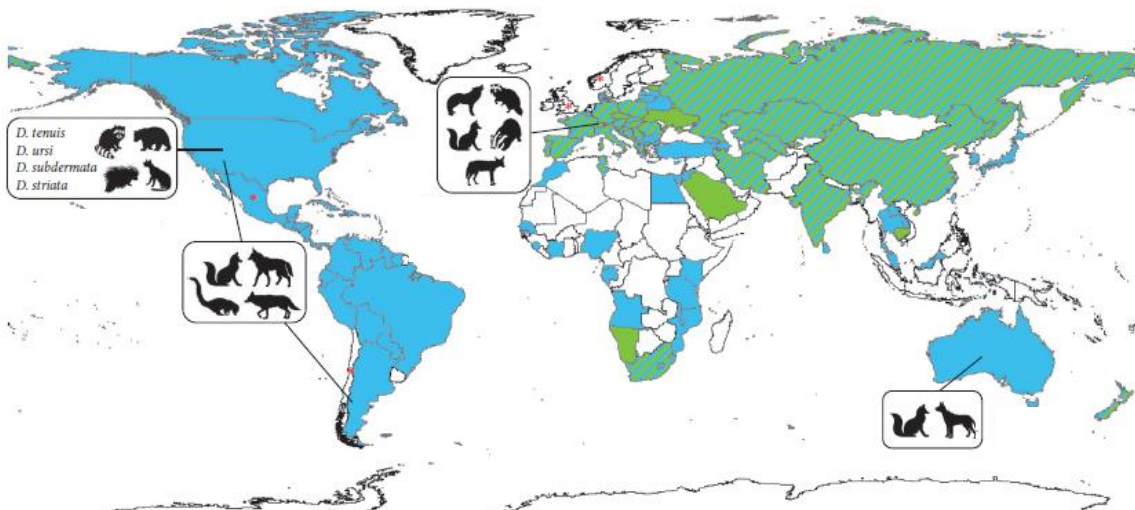


Figura 1 Distribuição geográfica de diferentes espécies de *Dirofilaria* em animais no mundo.

■ *D. immitis* ■ *D. repens* ■ *D. immitis e D. repens*

□ Ausência de informação

(*) Casos esporádicos de infecção subcutânea

Fonte: Adaptado de Simón et al. (2017)

1.1.4 Potencial zoonótico de Dirofilaria immitis

A ocorrência ou manutenção do potencial zoonótico de um parasito em uma determinada localidade está relacionada à existência de fatores ambientais intrínsecos à região geográfica e populacionais e comportamentais dos cães e tutores. De acordo com Silva e Langoni (2009) a manutenção da transmissão de *Dirofilaria* spp. está associada às condições geográficas e climáticas, à ação antrópica e ao aumento da densidade populacional de animais domésticos errantes e da fauna de insetos da família Culicidae.

O crescimento urbano desordenado tem contribuído para a criação de ilhas de calor urbana (ICU), onde construções civis retêm o calor durante o dia e favorecem o microambiente para desenvolvimento das microfilárias nos insetos vetores condicionando à transmissão, bem como outros aspectos envolvidos para as condições de disseminação: o cão deve estar microfilarêmico para que haja a transmissão, tornando-se a fonte de infecção, enquanto os vetores devem apresentar elevada abundância, possuírem comportamento zoofílico e competência vetorial de desenvolver as microfilárias, além de fatores abióticos como temperatura e umidade podem contribuir na longevidade de algumas espécies (Rey 2008; Ledesma e Harrigton 2011; AHS 2014).

Há regiões em que a prevalência não é significativa, sendo a intensidade da transmissão baixa em casos onde a microfilaremia pode estar ausente, mas a transmissão ainda pode ocorrer. Viagens frequentes de cães microfilarêmicos para regiões indenes condicionam que os culicídeos susceptíveis locais sejam fontes de infecção nessa região, estabelecendo novo foco da doença (Labarthe et al. 2002).

1.1.5 Hospedeiro Intermediário

Os dípteros da família Culicidae (Nematocera: Diptera) possuem grande importância na transmissão de agentes patogênicos como viroses, protozooses e helmintoses e no Brasil, 500 espécies foram descritas até o momento onde cerca de 20 ou mais estão envolvidas na transmissão de bioagentes patogênicos para o homem e animais não humanos (Lozovei 2011). Para atuarem como transmissores

os culicídeos devem ser susceptíveis à infecção por microfilárias L₁, permitindo seu desenvolvimento de estádios L₁ a L₃ (microfilárias) e a capacidade de atuarem como vetores, ou seja, atuando como hospedeiro intermediário (Neves et al. 2011). Cerca de 70 espécies de mosquitos já foram descritas como potenciais vetores da dirofilariose canina, entre eles os gêneros *Aedes*, *Culex*, *Anopheles*, *Mansonia*, *Psorophora*, *Ochlerotatus*, *Armigeres* e *Coquillettidia* (Rodrigues-Silva et al. 1995; Cirio 2005; Simsek et al. 2016).

A fauna culicídica foi descrita no bairro de Engenho Novo - RJ, onde as espécies *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), *Culex quinquefasciatus* Say 1823, *Aedes (Ochlerotatus) scapularis* (Rondani, 1848) e *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) foram encontradas infectadas pelo filarídeo (Branco et al. 2009). *Ae. albopictus* foi registrada pela primeira vez no território brasileiro por Forattini (1986), e sugeriu que esta espécie pode coexistir com *Ae. aegypti* em ambientes antrópicos. Serrão et al. (2000) mencionaram que *Ae. aegypti* pode vir a ser um vetor potencial para infecção por *D. immitis* no Rio de Janeiro, no entanto, ainda segundo os autores, este inseto apresenta baixo índice de eficiência vetorial. Ribeiro et al. (2009) realizaram estudo semelhante e confirmaram experimentalmente que *Ae. aegypti* é um vetor susceptível para *D. immitis*. Esta espécie é a principal transmissora de arboviroses como Dengue, Zika, Chikungunya e Febre amarela urbana (Rodríguez-Morales 2016); possuem hábito diurno e as fêmeas depositam os ovos em recipientes onde haja água rica em matéria orgânica (Rey 2008). As espécies *Oc. taeniorhynchus* e *Oc. scapularis*, como vetores primários (Labarthe e Guerrero 2005), *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. declarator*, *Cx. saltanensis* e *Wy. bourrouli* também foram descritas como potenciais vetores de *D. immitis* (Lourenço-de-Oliveira e Deane 1995; Labarthe et al. 1998). *Cx. quinquefasciatus* é o vetor de *Wulchereria bancrofti* (Cobbold, 1877) Seurat, 1921 agente da filariose linfática popularmente conhecida como elefantíase (Rey 2008). Este inseto é considerado vetor secundário de *D. immitis* (Labarthe et al. 1998), possui hábito crepuscular, alta capacidade de voo e habita o ambiente intradomiciliar com característica antropofílica. Como os ovos são depositados em água rica em matéria orgânica, locais com ausência de saneamento básico são criadouros propícios para o desenvolvimento do ciclo vital e manutenção da transmissão (Rey 2008). Paiva (2009) num estudo realizado na região da Baixada

Litorânea do Rio de Janeiro, detectou que as espécies mais frequentemente capturadas foram *Ae. taeniorhynchus*, *Cx. quinquefasciatus* e *Oc. scapularis* (71,32%).

Estes insetos são holometábolos, e passando pelos três primeiros estágios biológicos de ovo, larva e pupa, a imprescindibilidade da água condiciona o desenvolvimento e manutenção do ciclo. Os dípteros dependem de fatores obrigatórios para tornarem-se competentes à infecção. As fêmeas são hematófagas e necessitam dos nutrientes do sangue do hospedeiro para maturação dos ovos, associado à sua longevidade que mantém a propagação do bioagente patogênico em determinada região, muitas vezes indenes para ocorrência de determinada doença. Influências do clima e alterações no habitat podem contribuir para a manutenção ou a dispersão da espécie em determinada região (Lozovei 2011).

1.1.6 Ciclo biológico de *Dirofilaria immitis* em cães

O ciclo de vida de *D. immitis* é heteroxeno, e ocorre quando um culicídeo susceptível faz o repasto sanguíneo num hospedeiro microfilarêmico ingerindo as larvas de primeiro estágio (L₁) ou microfílias, que migram até os túbulos de Malpighi e desenvolvem-se para L₂ e para L₃ (larva infectante). As L₃ migram da luz dos túbulos pela hemocele à probóscide, onde se tornam aptas para a transmissão, sendo o tempo necessário para maturação das larvas de 10 a 14 dias (temperatura de 27 °C e umidade relativa de 80%) AHS (2014).

Após esse período, quando o díptero realiza um novo repasto sanguíneo, as L₃ rompem o labro e penetram na pele por solução de continuidade (numa gota de hemolinfa) e migram, mudando para L₄ durante a migração até as artérias pulmonares, num período de 9 a 12 dias pós-infecção. De 50 a 70 dias pós-infecção ocorre a última muda de L₄ para L₅ e no dia 67 os helmintos imaturos (L₅), medindo de 2,5 cm a 3,8 cm, chegam aos vasos pulmonares ocasionando ação traumática entre 90 a 120 dias. Os helmintos adultos parasitam as artérias pulmonares e se houver uma intensidade parasitária alta pelo refluxo sanguíneo migram para o coração, onde ocorre a reprodução sexuada e as fêmeas com 120 dias pós-infecção liberam microfílias (L₁) para a corrente sanguínea e o culicídeo fará um

novo repasto sanguíneo recomeçando assim o ciclo. O ciclo de vida é longo e o período patente varia de 7 a 9 meses (Ibid).

O dimorfismo sexual é acentuado. As fêmeas medem de 25 a 31 cm e os machos medem de 12 a 20 cm de comprimento. As microfilárias medem em média 308 µm (295-325 µm) de comprimento e até 7µm de diâmetro, apresentando menor motilidade em relação a outras espécies (Urquhart 1998). Estudos de morfometria e morfologia têm sido realizados reportando a variedade de tamanhos de microfilárias avaliadas, bem como a realização de estudo de redescrição morfológica por microscopia de varredura (Ciocan et al. 2010; Furtado et al. 2010; Magnis et al. 2013) para adequada identificação dos caracteres taxonômicos.

Os adultos podem viver no hospedeiro por mais de sete anos e as microfilárias por cerca de 2 anos, mantendo assim a microfilaremia. Iônica et al. (2017) avaliaram a periodicidade de *D. immitis* e *D. repens* em cães naturalmente co-infectados e mostraram que o período de maior microfilaremia foi entre cinco e nove da manhã.

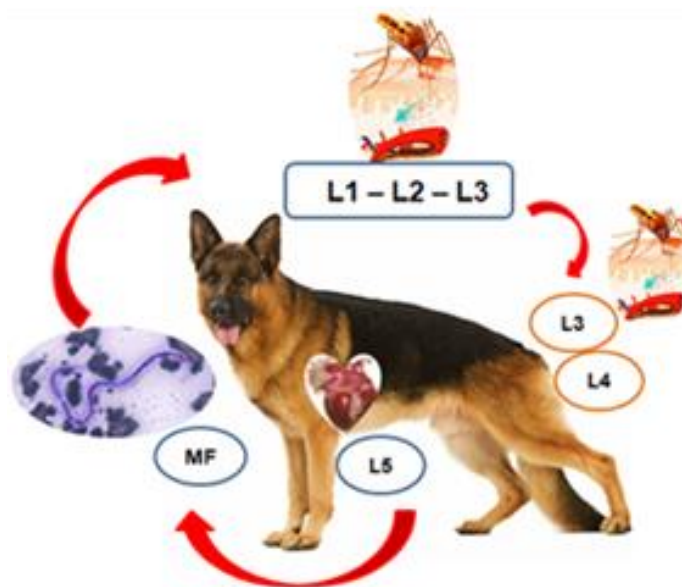


Figura 2 Ciclo de *Dirofilaria immitis* em cão. Adaptado de AHS (2014)

MF= microfilária; **L1**=larva de 1º estágio; **L2**= larva de 2º estágio; **L3**= larva de 3º estágio; **L4**=larva de 4º estágio; **L5**= adulto jovem (forma imatura)

1.1.7 Controle e profilaxia

A fim de reduzir a morbidade da doença e sua transmissão, algumas medidas podem ser associadas e implantadas. A prevenção à base de ivermectina pode começar a ser realizada desde filhote para os cães, bem como as orientações do Médico Veterinário sobre frequentar áreas endêmicas com risco para a saúde do cão. O controle de cães microfilarêmicos se realiza com fármacos da classe das lactonas macrocíclicas sendo recomendado associar doxiciclina (tetraciclina), de acordo com AHS (2014). O uso da doxiciclina atuará no endossimbionte *Wolbachia* sp., afetando diretamente o helminto em sua reprodução e desenvolvimento, interrompendo o ciclo de transmissão, principalmente os estádios de L₃ e L₄ (AHS 2014).

O tratamento é prolongado, contudo auxilia na redução da transmissão e requer do tutor visitas frequentes com o cão ao consultório para realização de avaliação clínica, além dos exames complementares, principalmente knott modificado associado ao teste rápido para o acompanhamento do quadro clínico.

Além do controle farmacológico, programas integrados auxiliam no combate ao vetor visando à erradicação, mas podem alcançar um alto custo econômico e ambiental com o uso de piretróides, saneamento com rede de drenagem de águas pluviais, o controle químico com drogas que são capazes de inibir o crescimento dos insetos, bem como o controle biológico. Também, a conscientização nos domicílios com telagem das casas e uso de mosquiteiros, impregnados ou não com piretróides podem ser úteis (Rey 2008).

1.2 Dirofilariose Humana

Dos filarídeos em geral, apenas oito espécies são parasitos de seres humanos como *Wuchereria bancrofti* (Cobbold, 1877), *Brugia malayi* (Brug, 1927), *B. timori* Partono, Dennis, Atmosoedjono, Oemijeti and Cross, 1977, *Onchocerca volvulus* (Leuckart, 1893), *Loa Loa* (Cobbold, 1864), *Mansonella ozzardi* (Manson, 1897), *Mansonella perstans* (Manson, 1891) e *M. streptocerca* (Macfie and Corson, 1922). Entre os filarídeos capazes de infectarem acidentalmente o homem,

encontram-se *D. immitis*, *D. repens*, *D. tenuis* e *D. ursi*, *D. subdermata* que envolvem animais domésticos e silvestres no ciclo de transmissão, sendo considerado como zoonose reemergente ao redor do mundo (Cabrera et al. 2018).

O parasitismo é considerado acidental para humanos, uma vez que o ciclo do helminto não se completa. Ao fazer o repasto sanguíneo em humanos o culicídeo infectado com a L₃ de *D. immitis* propicia a infecção e após migração faz o ciclo errático do tecido subcutâneo para o coração e chega ao parênquima pulmonar gerando nódulos o qual é formado quando ocorre a morte do parasita e este é embolizado causando a Dirofilariose Pulmonar Humana.

Campos et al. (1997) reportaram a ocorrência de 27 casos de dirofilariose pulmonar em São Paulo, Brasil. Os sintomas são raros, muitas vezes assintomáticos e quando ocorrem produzem dor retroesternal, tosse e hemoptise, sibilo, febre, fadiga, síncope e emagrecimento (Neto et al. 1993; Klinge et al. 2011). Pode haver um ou mais nódulos de forma esférica, podendo chegar até quatro centímetros de diâmetro, envolto por fibrina. Mediante aos sintomas apresentados o médico pode solicitar exame radiográfico de tórax associado à tomografia computadorizada, porém vem sendo confundido no diagnóstico clínico como nódulo tumoral, e para um diagnóstico diferencial, a fim de elucidar a etiologia realiza-se a biópsia excisional ou transbrônquica para confirmação através da histopatologia (Cavallazzi et al. 2002). Entretanto, como consequência trazem injúria ao paciente por ser um procedimento invasivo.

Há ocorrência documentada de dirofilariose ocular ocasionada por *D. repens* e *D. immitis* como descreveram Otranto et al. (2009) e Mirahmadi et al. (2017), relatando sintomas como hiperemia conjuntival, blefaroespasma, fotofobia e até mesmo edema de córnea. Há relatos em outras partes do corpo como vasos mesentéricos e cordão espermático (Klinge et al. 2011). As espécies *Dirofilaria ursi*, *D. tenuis*, *D. subdermata* parasitam o tecido subcutâneo de humanos (Cirio 2005; Silva e Langoni, 2009; Otranto et al. 2009).

D. repens é a espécie de maior ocorrência na Europa (Itália, França, Grécia e Ucrânia) causando nódulo subcutâneo (granuloma focal), porém pode fazer o ciclo errático e parasitar o pulmão (CVBD 2014; Benzaquen et al. 2015). Essa espécie foi descrita parasitando o tecido subcutâneo da perna (coxa) de uma mulher em Israel, onde o exame hematológico mostrou elevada eosinofilia (7,7%) (Govrin-

Yehudain et al. 2017). Um segundo relato de caso foi reportado na Romênia em uma mulher, onde esta relatou dor, febre e artralgia com nódulo localizado na região temporal da cabeça e como tratamento foi prescrito Dietilcarbamazina (DEC), sendo o teste sorológico após o tratamento resultado negativo para a infecção (Gheorghita et al. 2017).

Desde a descoberta da DEC em 1947, com ação antifilarial (Dreyer e Norões 1997), este fármaco tem sido usado em tratamentos de filarioses linfáticas (*W. bancrofti*, *B. malayi* e *B. timori*), associado com outros fármacos como albendazol, porém com risco de efeitos adversos (Supali 2002), a fim de reduzir e prevenir a morbidade bem como a Ivermectina a qual possui efeito microfilaricida prolongado (Rey 2008). Na ocorrência da dirofilariose subcutânea e ocular humana não há indicação de tratamento na literatura médica com anti-helmíntico sendo recomendada a remoção cirúrgica seguida da identificação morfológica e/ou molecular do parasita, já que os nódulos são delimitados e o nematoide não consegue desenvolver o ciclo de vida, sendo a doença considerada de caráter benigno (Mirahmadi et al. 2017).

1.3 Justificativa

A estreita relação entre humanos e cães de guarda e de companhia, pode facilitar a disseminação de agentes infecciosos e parasitários dos cães para os humanos (Thrusfield 2004; Clarke et al. 2014). Martínez et al. (2015), destacaram a importância dos bioagentes patogênicos hemotrópicos (*Babesia* spp., *Rickettsia* spp. e *Borrelia* spp.) ocasionando diversas enfermidades para a saúde pública, incluindo a *D. immitis* bioagente da dirofilariose canina.

As políticas públicas e programas de controle relacionados aos vetores de arboviroses (Dengue, Zika, Chikungunya e febre amarela) têm contribuído para a conscientização da população sobre a importância do controle dos culicídeos na transmissão de bioagentes patogênicos, o que tem contribuído para a redução da prevalência de dirofilariose canina nos últimos anos, bem como o uso preventivo de medicamentos à base de Ivermectina e de Doxiciclina, todavia há locais onde esses

programas não são efetivos pela ausência de uma investigação epidemiológica eficaz (Garcez 2006; Labarthe et al. 2014).

Segundo dados do IBGE (2010), a região da Baixada Fluminense do Estado do Rio de Janeiro compreende áreas de vegetação de Mata Atlântica onde estão inseridas reservas ambientais bem como parques e áreas de proteção ambiental em alguns municípios como Duque de Caxias, Nova Iguaçu, Guapimirim e Magé. Esses locais têm em comum a formação de coleções de água propícias para a formação de criadouros dos mosquitos vetores da microfíliar, tornando-se potenciais ambientes de infecção. Casos frequentes de dirofilariose canina têm sido observados para alguns bairros desses municípios no contexto do atendimento clínico veterinário, quando os animais apresentam sinais clínicos da doença, e empregando testes laboratoriais de rotina (teste rápido - hematológico a fresco para pesquisa de microfíliar) e teste de Knott modificado (dados não publicados/comunicação pessoal). Curiosamente, apesar de diagnóstico positivo para *D. immitis* invariavelmente alguns desses cães apresentam manifestação subclínicas e histórico de não terem frequentado a região endêmica da Baixada Litorânea (Niterói, RJ) o que suscita a necessidade de estudos acerca da dinâmica de transmissão nessas localidades. Visto que temos constatado alguns relatos de dirofilariose canina na Baixada Fluminense, mais especificamente em alguns municípios próximos à reservas ambientais, tais como Magé, Duque de Caxias, Guapimirim e Nova Iguaçu, questionou-se se a transmissão estaria ocorrendo com elevada frequência nesta região, o que representaria aumento do potencial zoonótico.

Para avaliar esta questão foram formuladas as seguintes hipóteses:

Hipótese alternativa: A infecção canina por filarídeos apresenta alta frequência nos municípios de Magé, Duque de Caxias, Guapimirim e Nova Iguaçu, na região da Baixada Fluminense, RJ representando alto potencial zoonótico.

Hipótese nula: A infecção canina por filarídeos apresenta baixa frequência nos municípios de Magé, Duque de Caxias, Guapimirim e Nova Iguaçu, na região da Baixada Fluminense, RJ, representando baixo potencial zoonótico.

A investigação dos casos de infecção por microfilárias em cães fez-se necessária para levantar a situação local e um estudo de frequência para obter melhor entendimento de possíveis casos de transmissão para humanos que podem estar ocorrendo nesses municípios da Baixada Fluminense, RJ.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a ocorrência da infecção canina por filarídeos nos municípios de Magé, Duque de Caxias, Guapimirim e Nova Iguaçu, na Baixada Fluminense, estado do Rio de Janeiro.

2.2 Objetivos Específicos

i) Detectar a circulação de filarídeos entre cães domésticos com base em técnicas laboratoriais de rotina a partir de amostras sanguíneas de caninos atendidos em serviços veterinários;

ii) Determinar a frequência de animais microfilarêmicos nas localidades;

iii) Avaliar o conhecimento, atitudes e práticas de tutores de animais acerca da dirofilariose canina em Duque de Caxias;

iv) Caracterizar através de técnicas moleculares as espécies de filarídeos circulantes em cães;

v) Analisar os fatores de risco para a infecção canina por *Dirofilaria* sp.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

O estudo foi realizado na Baixada Fluminense (Área total de 43,696 Km²), Estado do Rio de Janeiro, nos municípios de Nova Iguaçu (22° 45'33"S; 43° 27'04"W), Magé (22° 39'10"S; 43° 02'26"W), Guapimirim (22° 32'14"S; 42° 58'55"W) e Duque de Caxias (22° 47'08"S; 43° 18'42"W) (Figura 3), por ser uma região com casos de infecções caninas, diagnosticadas pelos médicos veterinários que atendem em clínicas nos bairros desses municípios, além de compreender uma vasta área de reserva ambiental, estações ecológicas e parques, considerados ambientes propícios para criadouro dos culicídeos vetores das microfilárias. .

A região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro mantém 36,07% da área conservada estadual, onde 10,96% representa áreas de reserva ambiental dentre os 13 municípios da Baixada Fluminense (IBGE 2010), como: o Parque Municipal da Taquara e a Reserva Biológica Municipal do Parque Equitativa, em Duque de Caxias, o Parque Nacional da Serra dos Órgãos e a Área de Proteção Ambiental em Guapimirim, além da Reserva Biológica Federal do Tinguá em Nova Iguaçu, abrangendo inclusive, parte de Duque de Caxias.

As coletas foram realizadas no período de março a dezembro de 2018.



Figura 3 Área de estudo na Baixada Fluminense, Estado do Rio de Janeiro. A - Parque Municipal da Taquara, Duque de Caxias; B – Parque Municipal do Parque Equitativa, Duque de Caxias; C – Praia de Mauá, Magé e D – Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Guapimirim. Fonte: Google Earth

3.1.1 Identificação da área de estudo

Para delimitação dos bairros dos municípios foi utilizado a ferramenta *Dissolve* do Sistema de Informação Geográfica (SIG), ArcGis 10.4, tendo como referência a base de dados do setor censitário do ano de 2010 do IBGE, e para elaboração do mapa do município de Magé, foi realizado um recorte por localidade, através do Cadastro Nacional de Endereços para Fins Estatísticos (CNEFE).

3.2 População amostral

A amostra foi composta por animais de companhia, os cães (*Canis lupus familiaris*) domiciliados, criados ou mantidos no espaço geopolítico do Estado do Rio de Janeiro, nos municípios de Nova Iguaçu, Magé, Guapimirim e Duque de Caxias, na região metropolitana da Baixada Fluminense (Figura 4). As amostras de sangue dos cães foram obtidas de:

a) Coletas em dois estabelecimentos veterinários (clínica e consultório) que aceitaram participar do estudo. Foram realizadas coletas de sangue dos animais submetidos ao atendimento veterinário, com consentimento dos tutores responsáveis que responderam um questionário sobre Conhecimentos, Atitudes e Práticas (CAP) (adaptado de Moraes Neto et al. 2010) (Apêndice 4) acerca da dirofilariose canina, caracterizando-se a amostra de conveniência.

b) Laboratório de patologia clínica veterinária, através de parceria entre as equipes do Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos (LITEB/IOC/FIOCRUZ), do Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses (LIRN/IOC/FIOCRUZ) e do Laboratório de Análises Clínicas Laborlife Ltda. As amostras de sangue de cães eram provenientes de municípios da Baixada Fluminense, recebidas pelo Laboratório Laborlife que apresentaram resultado positivo para microfilárias por método de concentração e hemograma e foram encaminhadas ao LITEB e ao LIRN, sendo analisadas no estudo.

Todos os estabelecimentos receberam uma carta de solicitação e termo de anuência (Apêndice 2; Anexos 1, 2, 3 e 4), ao concordarem em participar do estudo.

3.3 Delineamento do estudo

O estudo foi do tipo descritivo, observacional, transversal, não aleatório por conveniência. O tamanho amostral foi calculado através do software estatístico Epi Info 7.2, obtendo-se um n amostral de 142 amostras, com intervalo de confiança de 95%.

3.4 Considerações éticas

O presente estudo envolveu coleta e recebimento de material biológico de animais e o protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do IOC (CEUA-IOC; L-003/2018) (Anexo 6) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do IOC (CEP CAAE: 82490118.1.0000.5248) (Anexo 7), pela participação dos tutores, no acompanhamento do seu animal, cadastrados mediante o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 1). Foi garantida a confidencialidade sobre os dados pessoais dos participantes da pesquisa, e respeitada a voluntariedade do tutor e o bem-estar do animal durante a coleta das amostras de sangue, sendo mantido o anonimato (Apêndice 5).

3.5 Questionário sobre Conhecimentos, Atitudes e Práticas (CAP) acerca da dirofilariose

O questionário sobre CAP acerca da dirofilariose canina foi aplicado aos tutores dos animais, os quais respondiam perguntas que abordavam noções sobre a etiologia e a prevenção (Apêndice 3), para que fossem avaliados possíveis fatores de risco associados à transmissão da doença. Os tutores, mesmo com mais de um cão, responderam sobre os conhecimentos da doença somente uma vez, porém sobre as práticas com seus animais, foi realizada a análise de frequência de resposta de cada animal.

3.6 Coletas das amostras de sangue dos cães

a) Clínicas e consultórios veterinários

Para a coleta de sangue em consultório e clínica veterinária, foi realizada a contenção física do cão em decúbito lateral ou em estação, com colocação de flocina, e antissepsia com álcool 70% no local da punção (Figura 5). O sangue foi coletado por punção das veias cefálica, jugular ou safenas lateral ou média, respeitando o porte do animal e suas condições clínicas) e em seguida foram acondicionadas em tubo contendo EDTA e armazenadas sob refrigeração a 8 °C até a realização da triagem pela técnica de Knott modificado. Os tubos das amostras de sangue foram identificados com data da coleta, coletor, procedência e nome do animal, registrados em seguida na ficha de coleta, com estas mesmas informações (Apêndice 4).

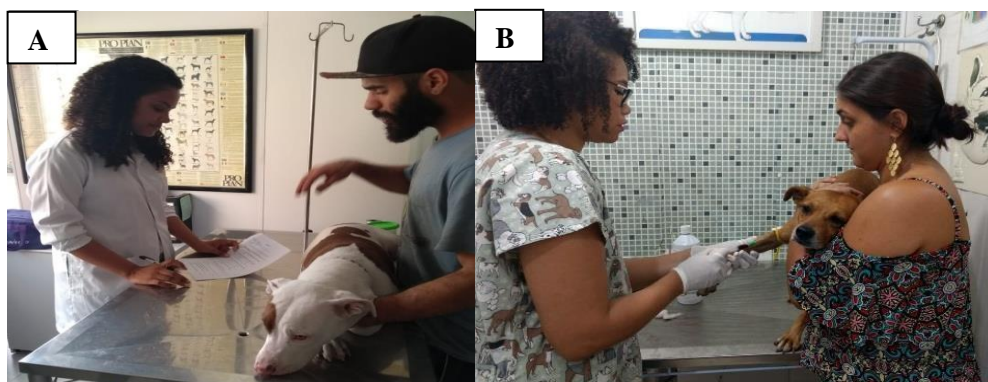


Figura 4 Animais atendidos nos estabelecimentos veterinários da Baixada Fluminense, RJ no período de março a dezembro de 2018. A- Aplicação do questionário sobre CAP ao tutor acerca da dirofilariose canina e preenchimento da ficha clínica do animal. B- Contenção e coleta de amostra de sangue do cão em consultório veterinário.

b) Laboratório de patologia clínica veterinária

O laboratório de patologia clínica veterinária Laborlife Ltda, recebia amostras biológicas diversas de estabelecimentos veterinários do Grande Rio para análise de parâmetros hematológicos. Através da parceria estabelecida, amostras submetidas aos exames complementares de hemograma e teste de concentração

positivas para microfilárias de animais atendidos na Baixada Fluminense, foram selecionadas para o estudo e armazenadas à -20°C, até serem transportadas ao LITEB e ao LIRN. Estas amostras também continham as informações relevantes sobre os animais nas requisições preenchidas pelos médicos veterinários solicitantes do exame em suas respectivas clínicas e consultórios, como: nome, idade, sexo, raça, procedência e data de coleta da amostra.

c) Transporte e conservação do Material

As amostras biológicas foram transportadas dos estabelecimentos de serviços veterinários para o LITEB e o LIRN de acordo com o manual de vigilância sanitária (ANVISA 2015) em caixa isotérmica com refrigeração por gelo químico reutilizável (2 a 8 °C) até 24 horas após a coleta, sendo processadas até 48 horas e armazenadas a – 20 °C, até a extração de DNAg.

3.7 Pesquisa do Bioagente

As amostras de sangue coletadas nas duas clínicas veterinárias foram submetidas ao teste de concentração de Knott (Knott 1936) modificado por Newton e Wright (1956), para pesquisa de microfilárias, onde era pipetado 1 ml de sangue e adicionava-se 9 ml de formalina a 2%, centrifugando a 1500 rpm, por 5 min. Descartava-se em seguida o sobrenadante e adicionava-se corante Wright, pipetando uma gota (50µL) entre lâmina e lamínula (24 X 32 mm), visualizando em seguida no microscópio óptico (Nikon Eclipse e200; objetiva de 40X). Foi utilizado o teste imunológico (ELISA) *Snap* 4DX plus (IDEXX®) e o teste imunocromatográfico (Alere®) de acordo com o manual do fabricante, quando o veterinário solicitava no plantão para confirmação do diagnóstico clínico do animal (Figura 6).

As amostras que foram recebidas do Laborlife e já triadas pelos métodos de Knott modificado e pesquisa de microfilárias em hemograma foram encaminhadas

para o LITEB e o LIRN/IOC/FIOCRUZ (Anexo 5), e armazenadas a -20°C para posterior realização dos ensaios moleculares.

3.8 Extração de DNAG

As amostras de sangue total foram removidas do freezer e mantidas à temperatura ambiente até o completo descongelamento, quando a extração de DNA genômico (DNAG) foi realizada utilizando *QIAamp® DNA Blood Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Alemanha) seguindo recomendações do fabricante. Os DNAG extraídos foram quantificados em espectrofotômetro (NanoDrop® 2000) e armazenados a -20°C.

3.9 Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex (PCR-Multiplex)

As Reações em Cadeia pela Polimerase Multiplex (PCR-Multiplex) para pesquisa de filarídeos foram realizadas utilizando dois pares de oligonucleotídeos iniciadores na mesma reação (Tabela 1), sendo um par para detecção do gene 12S rDNA de nematoides filarídeos (12SF e 12SR), um específico para *D. immitis* (12SF2B) e um específico para *D. repens* (12SR2), conforme protocolo previamente estabelecido (Simsek e Ciftci 2016). O preparo das soluções e as condições das corridas de PCR foram adequados para cada tipo de gene pesquisado (Casiraghi et al. 2004; Gioia et al. 2010). Como controle positivo, foi utilizado DNAG de adulto (uma fêmea e um macho) de *D. immitis* (cão macho, procedente de necropsia), cedido pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/UFRRJ) e como controle negativo água deionizada. Para a visualização do fragmento de DNA amplificado, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2%, coradas por brometo de etídeo e observadas em luz ultravioleta (Sambrook e Russel 2001).

Tabela 1 Oligonucleotídeos utilizados para identificação genotípica de espécies de *Dirofilaria* sp.

Gene Alvo	Oligonucleotídeo Iniciador	Sequência 5'- 3'	Tamanho do Fragmento
12S rDNA (nematoides filariais)	12SF 12SR	GTTCCAGAATAATCGGCTA ATTGACGGATG(AG)TTTGTACC	500 pb *
12S rDNA (<i>Dirofilaria immitis</i>)	12SF2B	TTTTTACTTTTTTGGTAATG	204 pb **
12S rDNA (<i>Dirofilaria repens</i>)	12SR2	AAAAGCAACACAAATAA(CA)A	327 pb **

Fonte: Casiraghi et al. (2004); **Gioia et al. (2010)

3.10 Sequenciamento

O produto da PCR foi purificado utilizando o *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up TM System Protocol Kit* (Promega, Madison, EUA), seguindo as orientações do fabricante, e submetidas à reação de sequenciamento utilizando *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1* (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA). As seqüências foram lidas por sequenciador automático *ABI 3730xl DNA analyzer* (Applied Biosystems) da Plataforma de Sequenciamento da Fundação Oswaldo Cruz.

3.11 Análise das sequencias

As seqüências obtidas foram editadas manualmente utilizando o programa *SeqMan™ II, Expert Sequence Analysis Software 5.00*© 1989-2001, do pacote DNASTAR Inc. A avaliação da similaridade das seqüências de nucleotídeos foi obtida através da análise comparativa com as seqüências existentes no banco de dados GenBank com o auxílio do programa BLASTN (National Center for Biotechnology Information 2011). Os alinhamentos das seqüências foram realizados utilizando o software Clustal Omega (European Bioinformatics Institute 2011; Larkin et al. 2007). Para visualização dos alinhamentos foi empregado o

programa Boxshade (European Molecular Biology – EMBnet 2018). Os filodendogramas foram construídos pelos métodos de Distância (Neighbor Joining) e Máxima Parcimônia com auxílio do programa MEGA 7.0 (Tamura et al. 2011), o cálculo de distância foi realizado através do algoritmo kimura 2 parâmetros. O suporte dos ramos das árvores filogenéticas foi calculado, utilizando um bootstrap de 1000 réplicas.

3.12 Análise estatística

Foram elaborados bancos de dados através do Microsoft Acces (Office 2010) para a realização da plotagem dos dados, a fim de analisar os resultados no Excell (Office 2013) realizando cálculo de frequências e Software SPSS (IBM SPSS Statistics v.19) para testar possíveis associações entre a infecção e as variáveis avaliadas, utilizando a razão de Chances (Odds Ratio-OR) e teste Qui-quadrado (Chi Squared Test - χ^2), com intervalo de confiança de 95%, onde valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos (Medronho 2009). As variáveis analisadas foram: sexo, faixa etária e porte.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Distribuição de frequência de coleta das amostras de sangue dos cães

Um total de 147 amostras de sangue foi obtido dos estabelecimentos de atendimento e serviços veterinários no período de março a dezembro de 2018, provenientes dos municípios de: Nova Iguaçu, Duque de Caxias, Magé e Guapimirim.

Magé e Duque de Caxias resultaram nos maiores números de coleta (Figura 7). Das 36 amostras de clínica veterinária em Duque de Caxias, a coleta de sangue foi mais frequente no bairro da Taquara (51,4%) (Tabela 2), e das 111 amostras obtidas do laboratório de patologia clínica (Tabela 3), o município de Duque de Caxias obteve a maior amostragem com destaque para os bairros de Santa Cruz da Serra (41,3%) e Imbarie (30,4%), respectivamente. A segunda maior frequência observada foi para o município de Magé (37,8%), com destaque para os bairros de Vila Esperança (71,4%) e Vila Vitória (17,9%). Guapimirim e Nova Iguaçu obtiveram menor número de coletas realizadas.

Tabela 2 Distribuição de frequência de coleta das amostras de sangue dos cães provenientes das duas clínicas veterinárias dos municípios de Duque de Caxias e Nova Iguaçu na Baixada Fluminense, Rio de Janeiro ($n=36$), no período de março a julho de 2018.

Área de coleta	<i>n</i>	Bairros	<i>n</i> (%)
Duque de Caxias	35	Taquara	18 (51,4)
		Imbarie	2 (5,7)
		Nova Campinas	11 (31,4)
		Saracuruna	3 (8,6)
		Barro Branco	1 (2,9)
Nova Iguaçu	1	Centro	1 (100)

Tabela 3 Distribuição de frequência das amostras de sangue dos cães positivos para microfilárias procedentes do laboratório Laborlife, nos bairros dos municípios de Duque de Caxias, Magé, Nova Iguaçu e Guapimirim na Baixada Fluminense, Rio de Janeiro ($n= 111$), no período de março a dezembro de 2018.

Área de coleta	<i>n</i>	Bairros	<i>n</i> (%)
Duque de Caxias	46	Taquara	2 (4,3)
		Santa Cruz da Serra	19 (41,3)
		Imbarie	14 (30,4)
		Nova Campina	2 (4,3)
		Centro	4 (8,7)
		Éden	2 (4,3)
		Capivari	1 (2,2)
		Figueira	1 (2,2)
		Vila Sape	1 (2,2)
Magé	56	Vila Esperança	40 (71,4)
		Vila Vitória	10 (17,9)
		Piabetá	4 (7,1)
		Centro	1 (1,8)
		Flexeiras	1 (1,8)
Guapimirim	7	Centro	5 (71,4)
		Parada Modelo	2 (28,6)
Nova Iguaçu	2	Centro	1 (50,0)
		Caonze	1 (50,0)

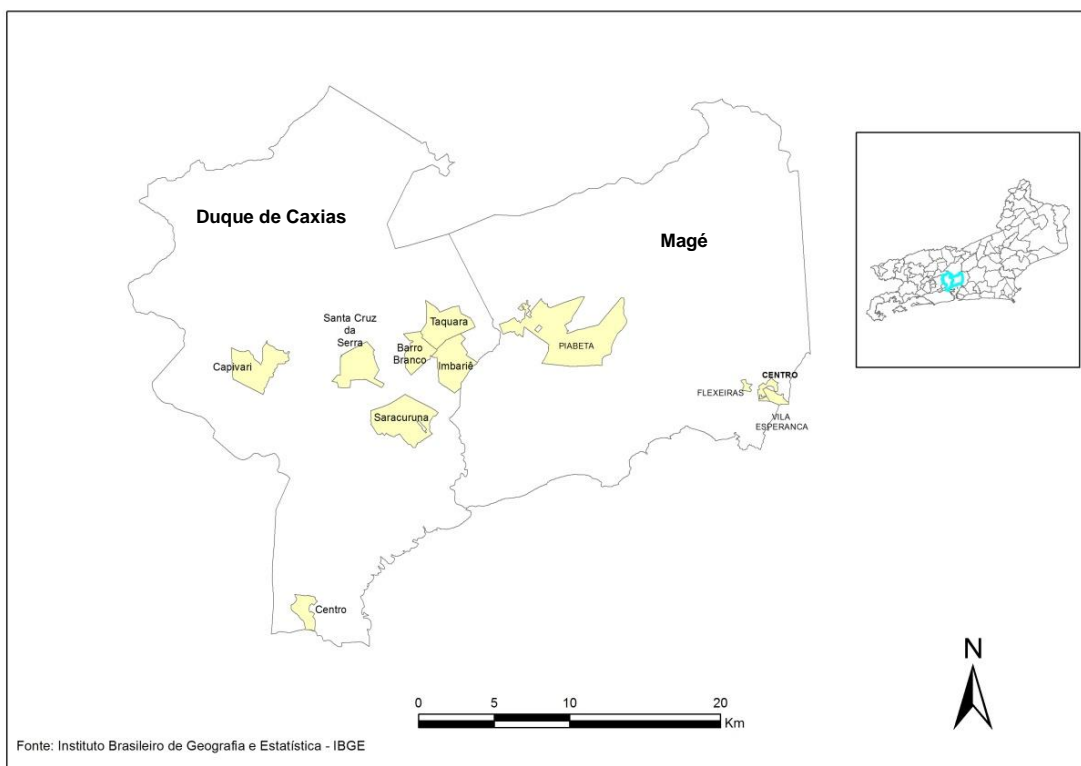


Figura 5 Mapa das cidades de Duque de Caxias e Magé, localizadas na Baixada Fluminense, RJ, evidenciando os pontos de maior frequência de coleta das amostras de sangue dos cães atendidos nos estabelecimentos veterinários. Fonte: IBGE (2010)

As análises das características biométricas foram realizadas mediante caracterização do sexo, faixa etária, raça e porte dos animais.

Das amostras positivas provenientes do Laboratório Laborlife, foi constatado que 60,4% dos cães machos e 39,6% das fêmeas estavam microfilarêmicos. Houve predominância no parasitismo da faixa etária entre 1 a 6 anos (45%), e do porte grande (17,1%). Das raças avaliadas, os cães sem raça definida (SRD) (22,5%) foram os mais parasitados, assim como Labrador (9%) e Pit Bull (6,3%). Houve dificuldade na obtenção de dados sobre a raça dos cães, pois 36% foram de animais cuja raça não era informada, devido a algumas requisições de exame hematológico não estarem preenchidas por completo pelos médicos veterinários requisitantes (Tabela 4).

Tabela 4 Frequência das características fenotípicas e faixa etária dos caninos positivos para microfilárias, provenientes das amostras de sangue recebidas do laboratório Laborlife, Rio de Janeiro ($n=111$) no período de março a dezembro de 2018.

Categoria	Características/ Faixa etária	n (%)
Sexo	Macho	67 (60,4)
	Fêmea	44 (39,6)
Faixa etária	6 meses a 11 meses	2 (1,8)
	1 ano a 6 anos	50 (45,0)
	7 anos a 14 anos	30 (27,0)
	Não informado	29 (26,1)
Porte	Pequeno (até 5kg)	14 (12,6)
	Médio (5-15 kg)	13 (11,7)
	Grande (15-30 kg)	19 (17,1)
	Não informado	65 (58,6)
Raça	SRD	25 (22,5)
	Labrador	10 (9,0)
	Pit Bull	7 (6,3)
	Chow Chow	2 (1,8)
	Pinscher	5 (4,5)
	Rottweiler	5 (4,5)
	Pastor Alemão	3 (2,7)
	Pastor Canadense	1 (0,9)
	Poodle	2 (1,8)
	Cocker Spaniel	2 (1,8)
	Shih Tzu	1 (0,9)
	Yorkshire Terrier	1 (0,9)
	Basset Hound	1 (0,9)
	Beagle	1 (0,9)
	Border Collie	1 (0,9)
	Boxer	1 (0,9)
	Daschund	1 (0,9)
	Pug	1 (0,9)
Terrier Brasileiro	1 (0,9)	
Não informado	40 (36,0)	

Tabela 5 Frequência das características fenotípicas e faixa etária dos caninos positivos para microfilárias, provenientes das coletas de sangue de clínica e consultório veterinário na Baixada Fluminense, Rio de Janeiro ($n=36$) no período de março a dezembro de 2018.

Categoria	Características/ Faixa etária	n (%)
Sexo	Macho	24 (66,7%)
	Fêmea	12 (33,3%)
Faixa etária	6 meses a 11 meses	4 (11,1%)
	1 ano a 6 anos	18 (50,0%)
	7 anos a 14 anos	8 (22,2%)
	Não informado	6 (16,7%)
Porte	Pequeno (até 5kg)	6 (16,7%)
	Médio (5-15 kg)	25 (69,4%)
	Grande (15-30 kg)	3(8,3%)
	Gigante	1(2,8%)
	Não informado	1(2,8%)
Raça	SRD	20(55,6%)
	Bulldog Francês	1(2,8%)
	Pit Bull	3(8,3%)
	Chow Chow	4(11,1%)
	Colie	1(2,8%)
	Dálmata	1 (2,8%)
	Dog Alemão	1 (2,8%)
	Husky Siberiano	1 (2,8%)
	Poodle	1 (2,8%)
	Shih Tzu	1(2,8%)
	Yorkshire Terrier	1 (2,8%)
Não informado	1 (2,8%)	

Dos animais avaliados durante a coleta de sangue na clínica veterinária, 66,7% era macho, a faixa etária de 1 a 6 anos (50%) e o porte médio (69,4%) foram as categorias mais analisadas. Os cães SRD (55,6%) foram os animais mais avaliados na categoria raça, bem como Chow Chow (11,1%) e Pit Bull (8,3%) (tabela 4).

A frequência geral em relação aos casos positivos das amostras obtidas nos quatro municípios estudados foi de 76,9% (113/147), sendo dois casos positivos na

clínica veterinária (1,76; 2/113). Das amostras provenientes do laboratório, Magé foi o município onde houve maior predominância de cães infectados com microfilárias (50,5%), em relação a Duque de Caxias (41,4%) (Tabela 5).

Tabela 6 Frequência dos casos de caninos microfilarêmicos por municípios da Baixada Fluminense, de amostras processadas no Laboratório Laborlife no período de março a dezembro de 2018 ($n=111$)

Localidades	Casos positivos	Frequência (%)
Magé	56	50,5
Duque de Caxias	46	41,4
Guapimirim	7	6,3
Nova Iguaçu	2	1,8
Σ	111	100

Das amostras de sangue provenientes do laboratório, 22,5% dos cães SRD eram portadores de microfilaremia, corroborando os achados de Leite et al. (2007) e Montoya-Alonso et al. (2017). Atualmente as campanhas de adoção são mais efetivas e cães errantes têm sido acolhidos pelas famílias, entretanto a população destes animais nas ruas ainda é numerosa, com risco de infecção e contribuindo para a manutenção do ciclo enzoótico. O peso está diretamente relacionado ao porte, determinando a manutenção da carga parasitária dos vermes adultos no coração. Outras características avaliadas de acordo com o resultado na PCR-Multiplex estão descritas no item 4.3.2.

Na análise da triagem, 64,6% (73/113) das amostras foram positivas no achado em hemograma (pesquisa de hemoparasitos), 33,7% (38/113) no teste de Knott modificado, 1,77% (2/113) no teste imunoenzimático. Nenhuma amostra foi positiva pelo teste de imunocromatografia. Das amostras coletadas em Duque de Caxias e Nova Iguaçu, das duas clínicas veterinárias, 5,5% (2/36) foi positiva na triagem pelo teste rápido (*Snap 4DX Plus*).

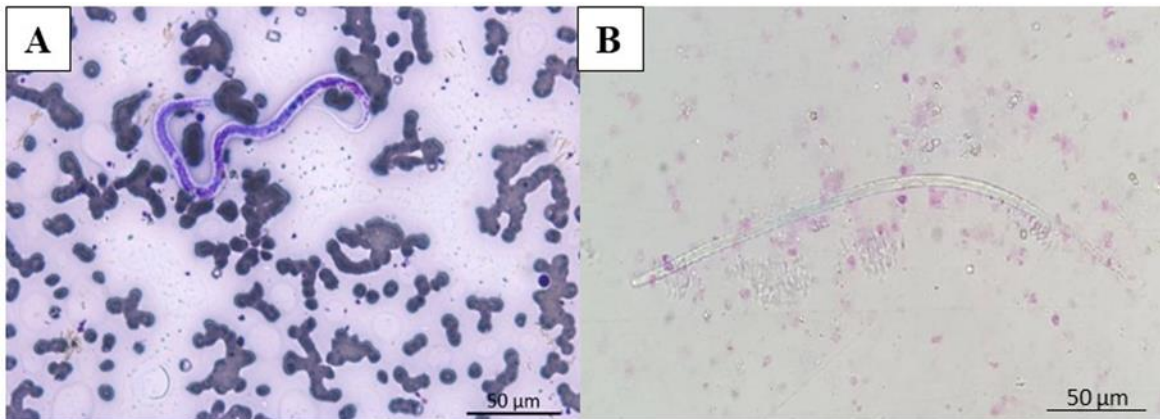


Figura 6 Detecção de microfílaras durante a triagem das amostras de sangue dos cães provenientes da Baixada Fluminense, RJ. A- Achado de microfílaría em hemograma (Pesquisa de hemoparasitos). B- Detecção de microfílaría através da Técnica de Knott modificada. Microscópio óptico Zeiss Axio Scope A.1 (Câmera fotográfica Zeiss Axio CamMRc/ Programa ZENS lite).

4.2 Conhecimentos, atitudes e práticas dos tutores dos animais cadastrados acerca da dirofilariose canina

O questionário sobre conhecimentos, atitudes e práticas (CAP) dos tutores dos animais acerca da dirofilariose canina foi aplicado a 18 tutores durante as coletas nas clínicas e consultório veterinário. A fim de facilitar o entendimento em relação às respostas dos mesmos, quanto para avaliar o conhecimento sobre a doença e das práticas de rotina realizadas com seus animais para análise, os resultados sobre o questionário CAP foram divididos em duas tabelas (Tabelas 6 e 7) e as frequências das respostas foram avaliadas, categorizadas e quantificadas.

Na Tabela 6 a maioria dos tutores entrevistados (61,1%) respondeu que *“nunca ouviu falar sobre o verme do coração”* e, 94,4% disseram *“não sei”* quando indagados sobre como ocorre à patologia no homem. Ainda, 33,3% dos respondentes disseram que a transmissão para o animal era pela *“picada do mosquito”* enquanto 66,7% disseram que *“não sabiam como prevenir a doença nos animais”*. Estes dados são preocupantes, pois retratam a ausência de conhecimento dos tutores dos cães sobre a parasitose e forma de transmissão, o que reporta a necessidade dos médicos veterinários orientarem acerca das práticas de prevenção durante a consulta clínica, considerando o histórico do paciente e o melhor protocolo para o tratamento destes animais.

Em relação à rotina das práticas com os cães, 47,2% disseram que seus cães “tomam remédio de verme a cada três meses”, 75% vivem no ambiente peridomiciliar, 83,3% convivem com outros animais, 83,3% nasceram na região do estudo, 94,4% não realizaram nenhuma viagem recente e 83,3% não apresentavam sintomas clínicos que poderiam ser característicos da dirofilariose, sendo estes resultados semelhantes a achado de Movilla et al. (2016). É possível que a prevenção esteja sendo realizada corretamente, dependendo da base farmacológica utilizada, pois se for prescrita uma das lactonas macrocíclicas, a profilaxia poderá até mesmo evitar a reinfecção, sendo recomendada a prevenção durante todo o ano na área endêmica. O ambiente de vivência do cão também pode favorecer a infecção, pois animais que vivem em ambiente peridomiciliar podem infectar-se mais facilmente, e a convivência com outros animais pode ser responsável pela epizootia dos casos. As condições socioeconômicas e ambientais também favorecem à infecção.

Portanto, é necessário dar continuidade ao estudo, aumentar o número de amostras e investigar se os casos de autoctonia podem estar ocorrendo na região da Baixada Fluminense, RJ, visto que, dos 36 animais atendidos nos estabelecimentos veterinários, a maioria nasceu na região e dois caninos estavam positivos pelo teste rápido, sugerindo que os cães considerados negativos na triagem pelo teste de Knott modificado, poderiam estar apresentando infecção oculta.

Os estudos sobre a entomofauna na região da Baixada Fluminense são escassos. Correa et al. 2014 realizaram um estudo no Parque Municipal de Nova Iguaçu, RJ onde foram identificadas 16 espécies de 9 gêneros de culicídeos adultos, dentre eles: *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Oc. scapularis* e *Culex* sp., todos de importância médica veterinária na transmissão de arboviroses e microfilárias. Neste mesmo município Lourenço-de-Oliveira et al. (2002) identificaram *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, num estudo de isolamento do vírus Dengue. Guimarães e Arlé (1984) identificaram 44 espécies de culicídeos relatando o encontro de *Culex* sp., *Oc. scapularis* e *Oc. taeniorhynchus* no Parque Nacional da Serra dos Órgãos (localizado na Serra de Teresópolis-RJ) que abrange parte do município de Magé e Guapimirim e possui 20.020,75 hectares (ICMBio- <http://www.icmbio.gov.br>). Um levantamento da fauna entomológica de culicídeos na região da Baixada

Fluminense, RJ deve ser realizado nas áreas de reserva a fim de identificar quais espécies de vetores das microfilárias de *D. immitis* podem estar ocorrendo na região, bem como avaliar a densidade populacional, as condições do ambiente e a distribuição sazonal. É necessário aplicar o mapeamento de áreas endêmicas na região, visando às áreas de foco da doença, o que pode ajudar a entender a circulação do parasita e todas as características que condicionam a manutenção do ciclo enzoótico.

Venco (2011) e Carlos et al. (2007) mostraram a importância da conscientização da população sobre as medidas profiláticas integradas orientada pelos médicos veterinários aos tutores, abarcando vigilância epidemiológica ativa, saneamento ambiental e educação em saúde. Igualmente, se faz necessário assegurar o acesso à informação sobre a doença e seus possíveis fatores de risco para a saúde humana, visando assim à promoção da saúde.

Tabela 7 Respostas dos tutores ($n=18$) ao questionário sobre conhecimentos, atitudes e práticas acerca da dirofilariose canina, aplicado nas clínicas veterinárias em Duque de Caxias na Baixada Fluminense, Rio de Janeiro, no período de março a julho de 2018.

Aspecto avaliado	Respostas	n (%)
<i>Já ouviu falar sobre verme do coração?</i>	Sim	7 (38,9)
	Não	11 (61,1)
<i>Você sabe o que essa doença causa no animal?</i>	Sim	4 (22,2)
	Não	14 (77,8)
<i>Se sim, o que causa?</i>	Óbito	1 (25,0)
	Parada cardíaca	1 (25,0)
	Não respondeu	2 (50,0)
<i>Você sabe o que essa doença causa no homem?</i>	Sim	1 (5,6)
	Não	17 (94,4)
<i>Se sim, o que?</i>	Falta de ar	1 (100)
<i>Sabe como ocorre a transmissão para o animal?</i>	Sim	6 (33,3)
	Não	12 (66,7)
<i>Se sim, como?</i>	Picada de mosquito	5 (83,3)
	Não respondeu	1 (25)
<i>Sabe como ocorre a transmissão para o homem?</i>	Sim	3 (16,7)
	Não	15 (83,3)
<i>Se sim, como?</i>	Picada de mosquito	3 (100)
<i>Você sabe como se previne essa doença o animal?</i>	Sim	6 (33,3)
	Não	12 (66,7)
<i>Se sim, como?</i>	Coleira repelente	1 (16,6)
	Vacina e vermífugo	3 (50,0)
	Vermífugo	2 (33,3)

Tabela 8 Frequência das práticas realizadas pelos tutores em relação aos cães atendidos (n=36), relatadas nos questionários aplicados nas clínicas veterinárias em Duque de Caxias na Baixada Fluminense, Rio de Janeiro, no período de março a julho de 2018.

Aspecto avaliado	Respostas	n (%)
<i>Qual a última vez que o cão tomou preventivo para verme do coração?</i>	Há 3 meses	17 (47,2)
	Há 6 meses	8 (22,2)
	Há mais de um ano	1 (2,8)
	Não sabe	10 (27,8)
<i>Onde vive o cão?</i>	Dentro de casa	9 (25,0)
	Fora de casa	27 (75,0)
<i>Seu cão vive com outro animal?</i>	Sim	30 (83,3)
	Não	6 (16,7)
<i>Se sim, com qual?</i>	Cão	21 (70,0)
	Gato	3 (10,0)
	Cão e Gato	6 (20,0)
<i>Seu cão nasceu aqui na região?</i>	Sim	30 (83,3)
	Não	6 (16,7)
<i>Fez alguma viagem recente?</i>	Sim	1 (2,8)
	Não	34 (94,4)
	Não sabe	1 (2,8)
<i>Se sim, pra onde?</i>	Região dos lagos	1 (100)
<i>Seu animal tem tosse, cansaço?</i>	Sim	5 (13,9)
	Não	30 (83,3)
	Não sabe	1 (2,8)
<i>Se sim, o que?</i>	Cansaço	2 (40,0)
	Tosse	3 (60,0)

4.3 Detecção e caracterização molecular das amostras de filarídeos

Foram realizadas reações de PCR-Multiplex para detecção de espécies de filarídeos em 111 amostras do Laborlife e de duas amostras de clínica veterinária, no teste rápido (ELISA), totalizando 113 amostras positivas analisadas. Deste total, 100 amostras (88,5%) amplificaram o fragmento do gene 12S. Magé apresentou a maior frequência (51%) quando comparado a Duque de Caxias (40%) (Tabela 9).

A Figura 9 apresenta foto do gel obtido de corrida de PCR (utilizando os conjuntos de oligonucleotídeos para detecção do 12S) do DNAg extraído de 12 amostras, provenientes dos municípios investigados. As amostras 126, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191 e 192 apresentaram resultado positivo para o 12S.

A espécie *D. repens* não foi detectada nos municípios estudados da Baixada Fluminense.

Tabela 9 Distribuição por localidades da Baixada Fluminense, RJ dos casos positivos confirmados pela técnica PCR-Multiplex das amostras de sangue provenientes do laboratório de patologia clínica Laborlife, no período de março a dezembro de 2018.

Localidades	Casos positivos	Frequência (%)	OR (IC)
Magé	51	51,0	
Duque de Caxias	40	40,0	*8,71 (3,36-22,56)
Guapimirim	6	6,0	
Nova Iguaçu	3	3,0	
Σ	100	100	

*OR= Odds ratio (valor referente às cidades de Magé e Duque de Caxias); IC= Intervalo de Confiança; p -valor<0,00; χ^2 =23,7

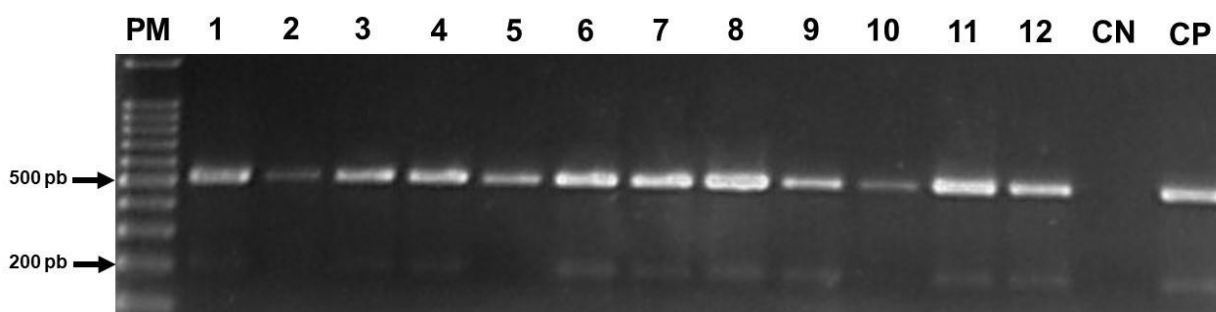


Figura 7 Gel de agarose a 2% evidenciando amplificação de fragmento do gene 12S de nematoides filarídeos em amostras de sangue de cães atendidos em serviços veterinários na Baixada Fluminense, Estado do Rio de Janeiro. PM: Marcador de Peso Molecular de 100 pb com destaque para as bandas formadas de 200 e 500 pb. Amostras positivas para o 12S: 1 (126), 2 (182), 3 (183), 4 (184), 5 (185), 6 (186), 7 (187), 8 (188); 9 (189), 10 (190); 11 (191), 12 (192). CN: Controle negativo; CP: Controle positivo (DNAg extraído de *Dirofilaria immitis* adulto).

No município de Magé a população da última estimativa do IBGE (2010) chegou a 243.657 habitantes, com 63,2% dos domicílios apresentando esgotamento sanitário adequado. A Praia de Mauá é uma localidade de Magé onde os moradores praticam atividades de pesca justificando-se que seja um ambiente natural para criadouro dos dípteros culicídeos vetores, porém é impróprio para banho, pela poluição no mar. Duque de Caxias foi a segunda cidade com maior frequência, sendo o bairro da Taquara o local onde mais cães foram avaliados (30,4%). Nesse bairro há áreas de reserva ambiental, como o Parque Municipal da Taquara, frequentado por pessoas para prática de lazer e atividades ecológicas. Segundo dados do IBGE (2010), estimou-se que em 2018 a população humana neste município era de 914.383 pessoas, indicando que 85,3% dos domicílios possuem esgotamento sanitário adequado. A outra parcela está sujeita a ausência de saneamento básico, estando vulnerável às doenças infecciosas e parasitárias.

Os dados apresentados são de suma importância, pois chamam a atenção para o possível risco de infecção humana por *D. immitis*, espécie detectada pela ferramenta molecular. Nosso estudo demonstrou uma frequência elevada para os municípios de Magé e Duque de Caxias (tabela 9), com possível potencial risco de exposição para casos humanos, pelo perfil ecoepidemiológico que a região apresenta. A diferença entre as frequências destas cidades foi estatisticamente

significativa ($p < 0,05$; $\chi^2 = 23,7$), onde há oito vezes mais chance de infecção por microfilárias em Magé em relação à Duque de Caxias (OR = 8,71). Labarthe et al. (2014) realizaram um levantamento nas regiões costeiras de Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Bahia, Pernambuco e Rio de Janeiro constatando uma prevalência geral de 23,1%.

Apesar de a dirofilariose ser considerada uma doença endêmica para a região costeira há relatos em que esta ocorre fora do litoral. Brito et al. (2001), visando comprovar a autoctonia, diagnosticaram *D. immitis* no Centro de Maceió (1,8%), Alagoas, porém com prevalência maior para a região litorânea (3,7%). No Rio de Janeiro em Seropédica na Baixada Fluminense foi confirmado dois casos autóctones em cães por *D. immitis* pelo teste 4DX *plus* (Pedroso et al. 2017).

Nos municípios e bairros estudados os focos de infecção podem estar se formando devido às áreas limítrofes da Baixada Fluminense (Guerra 1993) e fatores abióticos (temperatura do ambiente, afluentes e fontes hídricas) e bióticos (vegetação) das localidades de reserva, favorecendo a manutenção do criadouro dos culicídeos vetores, sua dispersão e transmissão com frequência devido a grande pela mobilidade dos cães microfilarêmicos, oriundos possivelmente de regiões endêmicas.

As técnicas moleculares são formas de diagnóstico mais específico na detecção e diferenciação entre espécies de filarídeos que possam ocorrer em uma determinada região. Casos de detecção molecular para *D. immitis* foram relatados no Norte da Argélia e na costa do mediterrâneo (Tahir et al. 2017), confirmando autoctonia nessa localidade.

4.3.1 Análise estatística dos fatores de risco

Foi possível comparar a frequência das características fenotípicas dos cães infectados (Tabela 10). Os resultados mostram a frequência em relação às categorias sexo e faixa etária, com o destaque para os cães machos (62,6%; $p > 0,05$) e faixa etária entre 1 e 6 anos (62,1%; $p > 0,05$).

Tabela 10 Análise estatística das variáveis das amostras positivas dos cães da Baixada Fluminense, Rio de Janeiro analisadas pelo Laboratório de patologia clínica Laborlife e confirmadas pela técnica da PCR-Multiplex, no período de março a dezembro de 2018.

Categorias	Casos Positivos	Total	%	Análise estatística
Sexo				
Macho	53	85	62,3	$\chi^2=1,26$; <i>p</i> -valor = 0,25
Fêmea	38	53	61,8	
Faixa etária				
1 ano a 6 anos	41	66	62,1	$\chi^2=1,96$; <i>p</i> -valor = 0,16
7 anos a 14 anos	28	37	75,6	
Porte				
Pequeno	12	19	63,1	$\chi^2=7,47$; <i>p</i> -valor = 0,02 *OR=1,02 **OR=3,64
Médio	12	37	32,4	
Grande	14	22	63,6	

*OR=Portes: Grande e pequeno; **OR= Portes: Grande e Médio

$\alpha=5\%$; IC=95%

Neste estudo os cães machos foram os mais parasitados, corroborando com os achados de Brito et al. (2001), Almeida et al. (2001) e Ferreira et al. (2004), os quais justificaram que os animais podem conviver mais facilmente em ambientes peridomiciliares atuando como cães de guarda, ficando expostos aos vetores culicídeos. Os animais na faixa etária de 1 a 6 anos foram os mais parasitados corroborando com os achados de Serrão et al. (2001) que observaram que 36% dos animais parasitados em Itacoatiara (Niterói) estavam entre 2 a 4 anos, porém sem significância estatística, concordando com o estudo de Argolo et al. (2018). Justifica-se que esta faixa etária observada é a que mantém a microfilaremia circulante, contribuindo para a manutenção do ciclo biológico deste filarídeo naquela região. Além disso, nossos resultados mostraram que a chance de um animal de porte grande ser parasitado na localidade é 3,6 vezes maior ($p=0,02$), em relação a um cão de porte médio.

O encontro de cães infectados corrobora a hipótese de que outras espécies de animais possam estar sendo acometidas, principalmente em áreas de proximidade de reservas ecológicas e ambientes ruralizados, onde vivem outros cães e gatos domésticos e animais silvestres, pois se houver infecção para os felinos, estima-se que a prevalência representa de 5 a 20% em relação à população dos cães (Venco et al. 2011). A importância de realizar um estudo de monitoramento

da prevalência na população de cães, com o controle quimioprolático pode diminuir os riscos de infecção para humanos na região (Wang et al. 2016).

4.3.2 Análise das sequencias

As amostras positivas na PCR-*Multiplex* e purificadas foram submetidas à reação de sequenciamento e 93,6% (73/78) identificadas como *D. immitis* e 6,4% (5/78) identificadas como *A. reconditum*. A Tabela 11 resume o resultado da análise comparativa das sequências obtidas com cepas de *Dirofilaria* sp. depositadas no banco de dados do GenBank, utilizando a ferramenta BLAST e evidenciando as respectivas identidades. Além disso, as amostras 21, 176, 177, 185 e 198 apresentaram sequência com 98 e 99% de identidade com sequências de *A. reconditum*.

Tabela 11 Espécies de filárias detectadas por análise de sequências de nucleotídeos de fragmento do gene 12S em amostras de sangue coletadas em cães atendidos em serviços veterinários na Baixada Fluminense, Estado do Rio de Janeiro, no período de março a dezembro de 2018.

Localidade	Cadastro da Amostra	Identidade
Duque de Caxias	12	<i>Dirofilaria immitis</i> 148/148 - 100% (MH051846)
	22	<i>Dirofilaria immitis</i> 328/328 - 100% (MF059093)
	27	<i>Dirofilaria immitis</i> 458/458 - 100% (KF707482)
	69	<i>Dirofilaria immitis</i> 342/342 - 100% (MF059093)
	72	<i>Dirofilaria immitis</i> 425/425 - 100% (KF707482)
	75	<i>Dirofilaria immitis</i> 365/365 - 100% (KU885998)
	76	<i>Dirofilaria immitis</i> 366/366 - 100% (KU885998)
	83	<i>Dirofilaria immitis</i> 359/362 - 99% (KF707482)
	87	<i>Dirofilaria immitis</i> 341/344 - 99% (EU182328)
	95	<i>Dirofilaria immitis</i> 482/482 - 100% (KF707482)
	97	<i>Dirofilaria immitis</i> 356/357 - 99% (MF059093)
	99	<i>Dirofilaria immitis</i> 484/485 - 99% (MF059093)
	101	<i>Dirofilaria immitis</i> 485/486 - 99% (MF059093)
	124	<i>Dirofilaria immitis</i> 486/486 - 100% (KF707482)
	126	<i>Dirofilaria immitis</i> 384/387 - 99% (KF707482)
	143	<i>Dirofilaria immitis</i> 322/323 - 99% (KU885998)
	146	<i>Dirofilaria immitis</i> 325/325 - 100% (KU885998)
	147	<i>Dirofilaria immitis</i> 432/433 - 99% (MF059093)
	148	<i>Dirofilaria immitis</i> 369/369 - 100% (KU885998)
	149	<i>Dirofilaria immitis</i> 364/364 - 100% (KU885998)
151	<i>Dirofilaria immitis</i> 454/455 - 99% (MF059093)	
153	<i>Dirofilaria immitis</i> 486/487 - 99% (MF059093)	
160	<i>Dirofilaria immitis</i> 477/478 - 99% (MF059093)	
164	<i>Dirofilaria immitis</i> 489/490 - 99% (MF059093)	
166	<i>Dirofilaria immitis</i> 447/447 - 100% (KF707482)	
167	<i>Dirofilaria immitis</i> 487/487 - 100% (KF707482)	
169	<i>Dirofilaria immitis</i> 483/483 - 100% (KF707482)	
171	<i>Dirofilaria immitis</i> 491/491 - 100% (KF707482)	
173	<i>Dirofilaria immitis</i> 457/458 - 99% (MF059093)	
175	<i>Dirofilaria immitis</i> 448/449 - 99% (MF059093)	
176	<i>Acanthocheilonema reconditum</i> 438/441 - 99% (AJ544853)	
186	<i>Dirofilaria immitis</i> 482/482 - 100% (KF707482)	
200	<i>Dirofilaria immitis</i> 408/408 - 100% (MH051846)	
Guapimirim	93	<i>Dirofilaria immitis</i> 488/490 - 99% (MF059093)
	100	<i>Dirofilaria immitis</i> 432/433 - 99% (MF059093)
	128	<i>Dirofilaria immitis</i> 487/487 - 100% (KF707482)
	162	<i>Dirofilaria immitis</i> 487/488 - 99% (MF059093)
	198	<i>Acanthocheilonema reconditum</i> 438/441 - 99% (AJ544853)
Nova Iguaçu	177	<i>Acanthocheilonema reconditum</i> 438/441 - 99% (AJ544853)
	188	<i>Dirofilaria immitis</i> 478/479 - 99% (MF059093)

Continua

Tabela 11 (continuação) Espécies de filárias detectadas por análise de sequências de nucleotídeos de fragmento do gene 12S em amostras de sangue coletadas em cães atendidos em serviços veterinários na Baixada Fluminense, Estado do Rio de Janeiro.

Localidade	Cadastro da Amostra	Identidade
Magé	11	<i>Dirofilaria immitis</i> 157/157 - 100% (KU885998)
	16	<i>Dirofilaria immitis</i> 147/147 - 100% (MH051846)
	21	<i>Acanthocheilonema reconditum</i> 191/194 - 98% (J544853)
	26	<i>Dirofilaria immitis</i> 456/457 - 99% (MF059093)
	70	<i>Dirofilaria immitis</i> 421/423 - 100% (KF707482)
	71	<i>Dirofilaria immitis</i> 490/490 - 100% (KF707482)
	77	<i>Dirofilaria immitis</i> 451/451 - 100% (KF707482)
	82	<i>Dirofilaria immitis</i> 394/395 - 99% (MF059093)
	84	<i>Dirofilaria immitis</i> 487/487 - 100% (KF707482)
	89	<i>Dirofilaria immitis</i> 489/491 - 99% (KF707482)
	91	<i>Dirofilaria immitis</i> 485/487 - 99% (MF059093)
	94	<i>Dirofilaria immitis</i> 492/492 - 100% (KF707482)
	96	<i>Dirofilaria immitis</i> 362/362 - 100% (MF059093)
	125	<i>Dirofilaria immitis</i> 493/493 - 100% (KF707482)
	127	<i>Dirofilaria immitis</i> 486/487 - 99% (KF707482)
	144	<i>Dirofilaria immitis</i> 457/457 - 100% (KF707482)
	145	<i>Dirofilaria immitis</i> 365/365 - 100% (KU885998)
	152	<i>Dirofilaria immitis</i> 490/491 - 99% (MF059093)
	154	<i>Dirofilaria immitis</i> 475/475 - 100% (KF707482)
	155	<i>Dirofilaria immitis</i> 452/453 - 99% (MF059093)
	156	<i>Dirofilaria immitis</i> 398/398 - 100% (KU885998)
	157	<i>Dirofilaria immitis</i> 488/488 - 100% (KF707482)
	159	<i>Dirofilaria immitis</i> 371/371 - 100% (KU885998)
	161	<i>Dirofilaria immitis</i> 473/474 - 99% (MF059093)
	163	<i>Dirofilaria immitis</i> 462/463 - 99% (MF059093)
	165	<i>Dirofilaria immitis</i> 487/488 - 99% (MF059093)
	168	<i>Dirofilaria immitis</i> 488/488 - 100% (KF707482)
	170	<i>Dirofilaria immitis</i> 453/453 - 100% (KF707482)
	174	<i>Dirofilaria immitis</i> 454/454 - 100% (MF059093)
	185	<i>Acanthocheilonema reconditum</i> 428/432 - 99% (AJ544853)
	187	<i>Dirofilaria immitis</i> 475/475 - 100% (KF707482)
	189	<i>Dirofilaria immitis</i> 229/229 - 100% (MH051846)
	191	<i>Dirofilaria immitis</i> 440/440 - 100% (KF707482)
192	<i>Dirofilaria immitis</i> 443/444 - 99% (MF059093)	
194	<i>Dirofilaria immitis</i> 483/484 - 99% (MF059093)	
197	<i>Dirofilaria immitis</i> 491/492 - 99% (MF059093)	
199	<i>Dirofilaria immitis</i> 306/306 - 100% (MH051846)	

Conclusão

4.3.3 Análise filogenética

A análise dos alinhamentos demonstrados nos Apêndices 6, 7 e 8 processados no programa “Boxshade” para melhor visualização, evidencia a elevada identidade entre as sequências relativas às amostras 22, 69, 72, 75, 76, 95, 97, 99, 101, 124, 143, 146, 147, 148, 149, 151, 153, 160, 164, 166, 167, 169, 171, 173, 175, 183, 186 e 200 (Apêndice 6, amostras de Duque de Caxias); às amostras 93, 100, 128 e 162 (Apêndice 7, amostras de Guapimirim); e às amostras 16, 70, 71, 77, 82, 84, 89, 91, 94, 125, 127, 143, 144, 145, 152, 154, 155, 156, 157, 159, 161, 163, 165, 168, 170, 174, 187, 189, 191, 192, 194, 197 e 199 (Apêndice 8, amostras de Magé). Assim, as sequências obtidas das amostras 84, 128, 167 e 188 (uma amostra de cada município investigado) foram selecionadas como representantes das demais amostras para as análises no filodendograma (Figura 10).

Da mesma forma, o alinhamento demonstrado no Apêndice 9 evidencia a elevada identidade entre as sequências relativas às amostras 21, 176, 177, 185 e 198, sendo que as sequências obtidas destas últimas quatro amostras foram selecionadas para as análises no filodendograma (Figura 10).

Para análise das sequências do 12S para nematódeos filarídeos, foram empregadas as sequências de: *Dirofilaria immitis* (AJ54483), *Dirofilaria repens* (AJ544832), *Brugia malayi* (AJ544843), *Brugia pahangi* (AJ544842), *Acantocheilonema reconditum* (AJ544853), *Dipetalonema gracile* (AJ544854), *Litomosoa westi* (AJ544854), *Litomosoides brasiliensis* (AJ544850), *Litomosoides galizai* (AJ544849), *Litomosoides sigmodontis* (AJ544848), *Litomosoides hamletti* (AJ544847), *Litomosoides yutajensis* (AJ544846), *Setaria tundra* (AJ544834), *Setaria equina* (AJ544835), *Setaria labiatopapillosa* (AJ544833), *Ochoterenella* sp. (AJ544836), *Thelazia callipaeda* (AJ544858), *Thelazia gulosa* (AJ544857), *Thelazia lacrymalis* (AJ544856) disponíveis no banco de dados do GenBank. Como grupo externo foi incluída a sequência do 12S de *Filaria martis* (AJ544855) (Figura 10).

Análises realizadas por máxima parcimônia apresentaram árvores filogenéticas com topologias semelhantes (dados não mostrados), dessa forma são demonstrados, neste estudo, os filodendogramas analisados por *Neighbor Joining*.

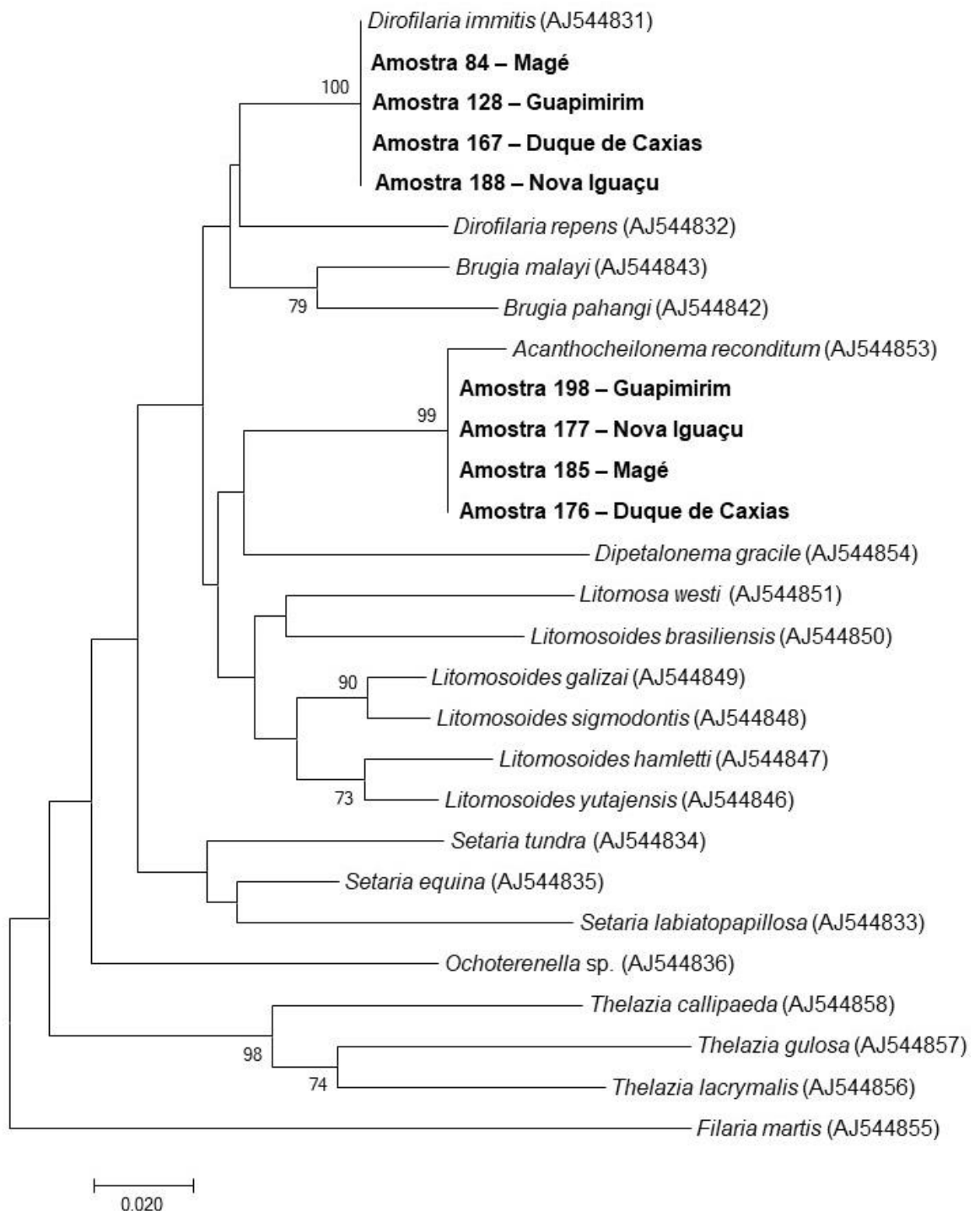


Figura 8 Filodendograma da comparação das seqüências parciais do gene 12S rDNA, utilizando o método *Neighbor-Joining* e distâncias evolutivas determinadas pelo algoritmo Kimura 2 parâmetros. Os números de acesso das seqüências no banco de dados do GenBank estão apresentados entre parênteses. Os valores de *bootstrap* superiores a 70% estão demonstrados.

O filodendograma construído pelo método de *Neighbor Joining*, a partir das sequências parciais do gene 12S (Figura 10), agrupou sequências de amostras provenientes de todos os municípios investigados com *D. immitis* (AJ544831) (bootstrap de 100%) e bem como outras sequências também provenientes de todos os municípios investigados com *A. reconditum* (AJ544853) (bootstrap de 99%).

O filarídeo *A. reconditum* pertence à subfamília Onchocerninae e tem como hospedeiro intermediário as pulgas (*Ctenocephalides felis*, *C. canis* e *Pulex irritans*) e piolhos (*Heterodoxus spiniger*) sendo descrito parasitando o tecido subcutâneo de cães domésticos, selvagens e hienas na África, Índia, Américas do Norte e do Sul (Anderson 2000). As ocorrências encontradas no Brasil são de Maceió- AL (Brito et al. 2001), Natal (Ferreira et al. 2004), Recife-PE (Ramos et al. 2016), Ilha de Marajó – PA (Argolo et al. 2018).

A importância da diferenciação entre as espécies de microfilárias no momento do diagnóstico parasitológico orienta o médico veterinário durante a prescrição do tratamento para que não ocorra intervenção desnecessária no caso de diagnóstico de *A. reconditum*, já que este não é patogênico para os animais. No entanto, esta espécie já foi descrita parasitando o olho humano (Huynht et al. 2001; John et al. 2012).

No Brasil somente *D. immitis* já foi descrita parasitando o homem (Campos et al. 1997, Cavallazi et al. 2002; Rodrigues-Silva et al. 2004).

Este é o primeiro registro da detecção e caracterização molecular de *D. immitis* e *A. reconditum* para a região da Baixada Fluminense, RJ.

5 CONCLUSÕES

- I) Foi confirmada a infecção por *Dirofilaria immitis* e *Acanthocheilonema reconditum* em cães nos municípios de Duque de Caxias, Magé, Guapimirim e Nova Iguaçu da Baixada Fluminense, RJ com a utilização de métodos de diagnóstico de rotina da clínica veterinária aliada à técnica molecular;
- II) A frequência de parasitismo por microfilárias em caninos nos municípios de Magé (50,5%) e Duque de Caxias (41,4%) apresentaram-se elevadas em relação à Nova Iguaçu (1,8%) e Guapimirim (6,3%).
- III) Há necessidade de dinamização de práticas (palestras para os tutores e divulgação de guia metodológico) com a participação dos médicos veterinários e tutores dos animais, envolvendo medidas integradas de prevenção a dirofilariose canina na localidade;
- IV) Os municípios de Magé e Duque de Caxias e o porte dos animais se mostraram como fatores de risco predisponentes à infecção e manutenção da dirofilariose canina na Baixada Fluminense, RJ.

6 PERSPECTIVAS

1) Dar continuidade ao projeto, no âmbito da Pós-Graduação, abrangendo a área de estudo para os demais municípios da Baixada Fluminense, RJ, além de realizar um levantamento da fauna entomológica das localidades, com proposta de estudar a coinfeção entre filarídeos de potencial zoonótico;

2) Elaboração de um Guia Metodológico com os médicos veterinários visando junto aos tutores dos animais à adoção de medidas integradas de prevenção relacionadas à transmissão da dirofilariose canina na localidade;

3) Redação e submissão de artigo científico em periódico indexado.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acha PN, Szyfres B. Filariasis zoonóticas. In:_____. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3. ed. Washington: OPS; 2003;284-91.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Manual de Vigilância Sanitária sobre o transporte de material biológico humano para fins de diagnóstico clínico. 2015; 47 pp.

Alho AM; Meireles J; Belo S; Carvalho LM. Dirofilariose canina e felina, uma parasitose em evolução (I). Etiologia, Biologia e Epidemiologia. Prática clínica. 2014 Mar;20-25

Almeida MAO, Barros MTG, Santos EP, Ayres MCC, Guimarães JE, Gondim LFP. Parasitismo de cães por microfilárias de *Dirofilaria immitis*: influência da raça, sexo e idade. Re Bras Saúde Prod An 2001;2(3):59-64.

American Heartworm Society (AHS). American Heartworm Society. Guidelines for the Diagnosis, Prevention, and Management of Heartworm (*Dirofilaria immitis*) Infection in Dogs and Cats. Disponível em <https://www.heartwormsociety.org/veterinary-resources/american-heartworm-society-guidelines>

Anderson RC. Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission. Oxfordshire: CABI Publishing; 2006. Xx + 650p: 1l.

Argôlo EGG, Reis T, Fontes DAT et al. Canine filariasis in the Amazon: species diversity and epidemiology of these emergent and neglected zoonoses. PLoS ONE 2018;13(7):e0200419.

Alves LC, Silva LVA, Faustino MAG, McCall JW, Supakonderj P, Labarthe NW, et al. Survey of Canine Heartworm in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. Mem Int Oswaldo Cruz 1999 sep-out; 94(5):587-90.

Bendas AJR, Mendes-de-Almeida F, Guerrero J, Labarthe N. Update on *Dirofilaria immitis* epidemiology in South America and México: literature review. Braz Jb Res Anim Sci 2017;54(4):318-29.

Benzaquen M, Brajon D, Delord M, Yin N, Bittar F, Toga I, et al. Cutaneous and pulmonary dirofilariasis due to *Dirofilaria repens*. Brit Jour Dermat 2015;173:788-79.

Branco AS, Mendes-de-Almeida F, Faria MC, Souza-Dantas M, Labarthe NV. *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) no entorno de um caso felino: um estudo sobre sua transmissão. Rev bras parasitol vet 2009 dez;18(supl. 1):14-18.

Bazzocchi C, Genchi C, Paltrinieri S, Lecchi C, Mortarino M, Bandi C. Immunological role of the endosymbionts of *Dirofilaria immitis*: the Wolbachia Surface Protein

activates canine neutrophils with production of IL-8. *Vet Parasitol* 2003 nov; 3:117(1-2):73-83. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.07.013>

Brener B, Millar PR, Mattos PBG, Uchôa F, bastos B, Lyrio IR, Aragon PL, Sudré AP. Ectopic dirofilariosis in two dogs from Rio de Janeiro state, Brazil. *Rev Inst med Trop* 2012; 54(3): 175-77.

Brito AC, Vila-Nova MC, Rocha DAM, Costa LG, Almeida WAP, Viana LS, Lopes Jr RR, Fontes G, Rocha EMM, Regis L. Prevalência da filariose canina causada por *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum* em Maceió, Alagoas, Brasil. 2001 nov-dez;17(6):1497-1504.

Cabrera, ED; Carréton E; Morchón R; Falcón-Cordón Y; Falcón-Cordón S; Simón F; Montolya-Alonso JÁ. The Canary Islands as a modelo of risk of pulmonar dirofilariasis in a hyperendemic area. *Paras Research* 2018;117:933-36.DOI 10.1007/s00436-018-57774-1.

Campos, JRM, Barbas CSV, Filomeno LTB, Fernandez A, Minamoto H; Barbas Filho JV, Jatene, FB. Human pulmonar dirofilariasis. *Chest*, 1997;112:729-733.

Carlos, RSA, Neta, ESM, Spagnol, FH, Oliveira LLS, De Brito RLL Albuquerque GR, Palmosny, NR. Frequência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* e antígenos de *Dirofilaria immitis* em cães na microrregião Ilhéus-Itabuna, Bahia, Brasil. *Rev Bras Parasitol vet*, dez 2007;16(3):117-120.

Casiraghi M, Anderson TJC, Bandi C, Bazzocchi C, Genchi C. A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. *Parasitology* 2001; 122, 93–103.

Casiraghi M, Bain O, Guerrero R, Martin C, Pocacqua V, Gardner SL, Franceschi A, Bandi C, Mapping the presence of *Wolbachia pipientis* on the phylogeny of filarial nematodes: evidence for symbiont loss during evolution. *Int J Parasitol* 2004; 34:191-203.

Casiraghi M, Bazzocchi C, Mortarino M, Ottina E, Genchi C. A simple molecular method for discriminating common filarial nematodes of dogs (*Canis familiaris*). *Vet Parasitol* 2006;141: 368-372.

Cavallazzi, RS, Cavallazzi AC, Souza IV, Cardoso JJD. Dirofilariose pulmonar humana: relato de sete casos. *Journ Pneum* 2002 Apr; 28(2):100-102.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention)/ WHO (World Health Organization), 1996. *Epi Info 6, Version 6.04. A Word Processing, Database, and Statistics Programs for Public Health*. Atlanta: CDC/Geneva: WHO.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention)/ WHO (World Health Organization),2012. Acesso em: <https://www.cdc.gov/parasites/dirofilariasis/>

Companion Vector-Bourne Diseases (CVBD). Heartworm disease. Biology. Acesso em: Abril de 2017. Disponível em: <http://www.cvbd.org/en/mosquito-borne->

diseases/heartworm-disease/pathogen/ em: <http://www.cvbd.org/en/mosquito-borne-diseases/heartworm-disease/pathogen/>

Ciocan R, Dărăbu G, Igna V. Morphometric Study of Microfilariae of *Dirofilaria* spp. on Dogs. Bull UASVM Vet Med 2010;67(2):45-49.

Chularerk, P, Desowitz, RS. A simplified membrane filtration technique for the diagnosis of microfilaraemia. Journ of Paras 1970;53:623-24.

Cirio SM. Epidemiologia e clínica de cães portadores de dirofilariose em espaços urbanos de município do litoral do Paraná e aspectos da histologia de *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) (Diptera, Culicidae). Tese [Doutorado em Ciências Biológicas]-Universidade Federal do Paraná; 2005.

Ciucă LM, Musella V, Miron LD, Maurelli MP, Cringoli G, Bosco A, Rinaldi L, Geographic distribution of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in stray dogs of eastern Romania. Geo health 2016;11(499):318-26.

Clarke LL, Ballweber LR, Allen K, Little SR, Lappin MRP. Prevalence of select vector-borne disease agents in owned dogs of Ghana. J south afric vet assoc 2014;85(1):1-2.

Correa FF, Gleiser RM, Leite PJ, Fagundes E, Santana HG, Mello CF, et al. Mosquito Communities in Nova Iguaçu Natural Park, Rio de Janeiro, Brazil. Journ Amer Mosq Control Assoc 2014;30(2):83–90.

Costa RC, Couto-Lima D, Serrão ML, Labarthe N. Na update survey of the prevalence of canine dirofilariasis ina focus área of the city of Rio de Janeiro, Brazil. (2004). Ver. Bras Parasitol Vet 13(1):13-8

Dreyer G, Norões J. Dietilcabamazina no tratamento da filariose bancroftiana. Rev Soc Bras Med Trop 1997 mai-jun;30(3):229-40.

Dissanaike AS. Zoonotic aspects of filarial infections in man. Bulletin of the Word Heath Organization 1979;157(3):349-57.

European Bioinformatics Institute. European Molecular Biology Laboratory (EMBL). Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>>. Acesso em: 06 set. 2018.

European Molecular Biology – EMBnet. BOXSHADE – Multiple alignments designer. Disponível em: <http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html>. Acesso em: 15 jan. 2019.

Ferreira DRA, Barbosa TS, Castro AU, Mariz MAS, Soares JG, Teixeira DIA, Athayde ACR. Prevalência de infecções por filariídeos em cães de microrregiões de Natal, Brasil. Ciên Anim 2004;14(2)111-15.

- Forattini OP. Identificação de *Aedes (stegomyia) albopictus* (skuse) no brasil. Rev Saude Publ 1986;20(3): 244-5.
- Furtado AP, Melo FTV, Giese EG, Santos JN. Morphological Redescription of *Dirofilaria immitis*. Journal Paras 2010 Jun 2010;96(3):499-04.
- Garcez LM, Souza NF, Mota EF, Dickson LAJ, Abreu WU, Cavalcanti VFN, Gomes PAF. Focos de dirofilariose canina na Ilha de Marajó: um fator de risco para a saúde humana. Rev soc bras med trop, 2006 jul-ago;39(4.):333-36.
- GheorghiiȚă MI, ForȚofoiu MC, Dumitrescu CI, Dumitrescu D, Camen A, Mărgăritescu C. Intramuscular human *Dirofilaria repens* infection of the temporal region-case report and review of the literature. Roma Jour Morph Embr 2017;58(2):585-92
- Gioia G, Lecova L, Genchi M, Ferri E, Genchi C, Mortarino, M. Highly sensitive multiplex PCR for simultaneous detection and discrimination of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood. Vet Parasitol 2010;172(160–163).
- Govrin-Yehudain O; Francis N; Bar-Meir E. Dirofilariasis in a Female Adult Patient in Israel. IMAJ 2017:19
- Guerra, AT. Dicionário geológico-geomorfológico. 8. ed. Rio de Janeiro: IBGE; 1993.
- Guerrero, J; Ducos, HJ; Genchi, C; Rojo, F; Gomez-Bautista, M & Varela, MC. Update on the distribution of *Dirofilaria immitis* in dogs from Southern Europa and Latin America. *Proceedings of the Heartworm Symposium '92*. Batavia: American Hookworm Society 1992:31-7.
- Guimarães AE, Arlé M. Mosquitos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, estado do Rio de Janeiro, Brasil. I- Distribuição estacional. Mem Inst Oswaldo Cruz 1984; 79(30):309-23.
- Hayasaki M, Ueno M, Ejima H, Munakata A, Tamura Y. A Possible Port of Entry into the Eye of Dog during Erratic Canine Heartworm (*Dirofilaria immitis*) Paras J Vet Med Sci 2013: 75(3):355–59.
- Huang H, Wang T, Yang G, Zhang Z, Wang C, Yang Z, Luo L, Liu L, Lan J, Huang X. Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Dirofilaria immitis* of China based on COI and 12S rDNA genes. Vet parasitol 2009;160:175-79.
- Huynht T, Thean J, Maini R. *Dipetalonema reconditum* in the human eye. Br J Ophthalmol. 2001 Nov;85(11):1391-2.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Baixada Fluminense. 2010. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil>.
- Ionica AM, Matei IA, D'amico G, Bel LV, Dumitrache MO, Modry D, Michalca AD. *Dirofilaria immitis* and *D. repens* show circadian co-periodicity in naturally co-infected dog. Parasites & Vectors 2017; 10:116.

John M, Mathew SM, Sebastian Vinod, Biswas J, M Raman. Multiple live subconjunctival *Dipetalonema*: Report of a case. Ind Journ ophthal 2012 mai-jun;60(3):228-9.

Klinge, MES, Robayo PC, Barreto CAM. *Dirofilaria immitis*: una zoonosis presente en el mundo. Vet Med Vet. jul-dici 2011;22:57-68.

Knight, DH.. Heartworm heart disease. Advances of Veterinary Sciences and Comparative Medicine 1977; 21:107-149.

Knott JA. A method for making microfilarial surveys on dog blood. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 1939; 3:191-196.

Labarthe NV, Serrão ML, Melo YL, Oliveira SJ, Lourenço-de-Oliveira, R. Potential Vectors of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) in Itacoatiara, Oceanic Region of Niterói Municipality, State of Rio de Janeiro, Brazil Faculdade de Veterinária, Centro de Ciências Médicas, Univers Mem Inst Oswaldo Cruz 1998 Jul-Aug;1993(4):425-32.

Labarthe NV, Alves LC, Serrão ML. Dirofilariose em pequenos animais domésticos e como zoonose. In: Almosny NRP. Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinaria Ltda; 2002. 111-135.

Labarthe NV, Pereira Campos MC, Barbarini O, Mckee W, Coimbra CA, Hoskins J. Serologic Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. Veterinary Therapeutics: Rese in applied vete med 2003;4(1):67-73.

Labarthe N; Guerrero J. Epidemiology of heartwormn: What is happening in South América and México. Vet Paras 2005;133:149-56.

Labarthe NV, Paiva JP, Reifur L, Mendes-de-almeida, Merlo A, Pinto CJC; Juliani PS, Almeida MAO, Alves LC. Updated canine infection rates for *Dirofilaria immitis* in areas of Brazil previously identified as having a high incidence of heartworm-infected dogs. Paras & vect 2014;7(493):2-8.

Larkin MA, Blackshield G, Brown NP, Chenna R, Mcgettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm ALR, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2. Bioinformatics 2007;23(21):2947-48.

Larsson MHMA, Preterote M, Mirandola RMS. Diagnóstico de Dirofilariose oculta pelo teste de ELISA, em cães do Estado de São Paulo. Braz J ve Res Anim Sci 1992;29(1):93-6.

Ledesma N, Harrington L. Mosquito Vectors of Dog Heartworm in the United States: Vector Status and Factors Influencing Transmission Efficiency. Topic Comp Ani Med 2011;26(4):178-185.

Leite LC, Navarro-Silva MA, Luz E, Molinari HP, Círio SM, Marinoni LP, Diniz JMF, Leite SC, Lunelli D, Scalet WR. Prevalência de *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) em

cães do canil Municipal de Guaratuba, Paraná, Brasil. *Estud Biol* 2007 jan-mar; 29(66):73-9.

Lent H, Freitas JFT. Dirofilariose subcutânea dos cães no Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1937;32:443–448.

Lourenço de Oliveira R, Deane L. Presumed *Dirofilaria immitis* infections in wild-caught *Aedes taeniorhynchus* and *Aedes scapularis* in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1995; 90(30):387-388.

Lourenço de Oliveira et al. Dengue Virus type 3 Isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguaçu, state of Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 2002 97(6):799-800.

Lozovei AL. Culicidae (Mosquitos). In: Marcondes CB. *Entomologia Médica e Veterinária*. 2ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2011;107-130p

Magnis J, Lorentz S, Guardone I, Grimm F, Magi M, Naucke TJ, Deplazes P. Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. *Paras Vect* 2013;6:1-5.

Marquardt WC; Demaree RS; Griever RB. *Parasitology and vector*. Harcourt Academia Press. Biology: 2ed. 2000.

Martínez EG, Guilarte DV, Toledo J, Simoni Z, Diaz A, Henriquez A, Nieves M, Diaz MT. Hallazgo de hepatozoon y otros hemotrópicos em caninos domésticos del municipio Sucre, estado Sucre, Venezuela. *bol malar y saludamb* 2015 ene-juli; LV(1):94-104.

McCall JW, Genchi C, Kramer LH, Guerrero J, Venco L. Heartworm Disease in Animals and Humans. In: *Advances in Parasitology* 2008: 193–285.

McCown ME, Monterroso VH, Cadorna W. Monitoreo de *E. canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, y *Dirofilaria immitis* em perros de três ciudades em Colombia. *Ver med vet y zootecnia julio-diciembre* 2015;10(2).

Meireles J, Paulos F, Serrão I, Dirofilariose em cães e gatos. *Vet. Port. Ciênc. Vet*. 2014; 109 (70-78).

Mirahmadi H, Malek A, Hasanzadeh R, Ahoo MB, Mobed I, Rostam A. Ocular dirofilariosis by *Dirofilaria immitis* in a child in Iran: A case report and review of the literature. *Paras Inter* 2017;66(1):978-81.

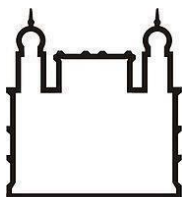
Montenegro VM, Bonilla MC, Kaminsky DR, Romero-Zúñiga JJ, Siebert S, Kramer F. Serological detection of antibodies to *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Ehrlichia canis* and of *Dirofilaria immitis* antigen in dogs from Costa Rica. *Vet par* 2017;236:97-107 <disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.02.009>>.

- Montoya-Alonso JA, Morchón R, Falcón-Cordón Y, Falcón-Cordón S, Simón F, Carretón E. Prevalence of heartworm in dogs and cats of Madrid, Spain. *Paras Vect* 2017;10:354.
- Moraes Neto AHA, Pereira, APMF, Alencar MFL, Souza PR Jr, Dias RC, Fonseca JG, Santos CP, Almeida JC. Prevalence of intestinal parasites versus knowledge, attitudes, and practices of inhabitants of low-income communities of Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro State, Brazil. *Parasitol Rev* 2010;107(2):295-07.
- Movilla R, García C, Siebert S, Roura X. Contrywide serological evaluation of canine prevalence for *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* (*sensu lato*), *Dirofilaria immitis* and *Ehrlichia canis* in México. *Par vect* 2016;9(421).
- Nacional Center for Biotechnology information. BLAST Assembled RefSeq Genomes. Nucleotide Blast. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 06 set. 2018.
- Napoli et al. New insights into the biology and ecology of *Acanthocheilonema reconditum* (Spirurida: Onchocercidae). *Paras & Vetc* 2014; 7(Suppl1): 029.
- Nelson CT. Heartworm Disease. *In*: Greene CE Infectious diseases of the dog and cat. 4ed. Copyrith 2012. 865-877
- Neto VA; Amato VS; Moraes Junior ACP; Cerri GG. Dirofilariose humana adquirida no Brasil: Comunicação de um caso. *Rev Inst Med trop* 1993 set-out;35(5):457-60.
- Newton MD, Wight LM. The occurrence of a dog filariid other than *Dirofilaria immitis* in the United States. *Jour of Parasitol* 1956;42:246-58.
- Neves DP; Melo AL; Linardi PM; Vitor PWA. Parasitologia humana. 12. ed. São Paulo: Atheneu, 2011.
- Nicolas L, Scoles GA. Multiplex polymerase chain reaction for detection of *Dirofilaria immitis* (Filariidea: Onchocercidae) and *Wuchereria bancrofti* (Filaroidea: Dipetalonematidae) in their common vector *Aedes polynesiensis* (Diptera: Culicidae). *Jou of Med Entomol* 1997;34:741-44.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Zoonosis Parasitarias. Informe Técnico, 1979; 637:105-06.
- Otranto D, Diniz DG, Dantas-Torres F, Casiraghi M, Almeida INF, Santos JN, Furtado AP, Sobrinho EFA, Bain O. Human intraocular filariasis caused by *Dirofilaria* sp. nematode, Brazil. *Emerging infectious diseases*. 2011 may;17(5).
- Paiva JP. Interação entre filarídeos, vetores e *Wolbachia* Herting, 1936 um foco ativo de transmissão de *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) como modelo. [Tese de Doutorado]. Niterói: Universidade Federal Fluminense; 2009. 177 pp.
- Pampiglione S, Rivasi F, Gustinelli A. Dirofilarial human cases in the Old World, attributed to *Dirofilaria immitis* : a critical analysis. *Histopathology* 2009; 54: 192–204.

- Pereira BB; Bastos BF; Keidel L; Leles D; Brener D. Feline heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection: first case report of serological diagnosis in Brazil, confirmed by molecular assay. An Acad Bras Cienc 2018; 90 (2 Suppl. 1)
- Rey L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos acidentais. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- Ribeiro AS, Pile EA, Ahid SMM. Infecção experimental do *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) com *Dirofilaria immitis* (Nematoda: Filaridae). Acta Vet Bras 2009; 3(1): 25-29.
- Rishniw M, Barr SC, Simpsons KW, Frongillo MF, Franz M, Alpizar JLD. Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. Vet parasitol 2006; 135:303-14.
- Rodrigues-Silva R, Moura H, Dreyer G, Rey L. Human pulmonar Dirofilariasis: a review. Rev Inst Med Trop 1995;37(6):523-30.
- Rodrigues-Silva R, Guerra RJA, Almeida FB, Machado- Silva JR, Paiva DD. Dirofilariase pulmonar humana no Estado do Rio de Janeiro, Brasil: relato de um caso. Rev Soc Bras Med Trop 2004 jan-fev; 37:56-9.
- Rodríguez-Morales AJ. The arboviral burden of disease caused by co-circulation and co-infection of dengue, chikungunya and Zika in the Americas. Travel Medicine and Infectious Disease 2016;(14):177-179.
- Rossi MID, Paiva J, Bendas A, Mendes-de-Almeida F, Knackfuss F, Miranda M, Guerrero J, Fernandes O, Labarthe N. Effects of doxycycline on the endosymbiont Wolbachia in *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) naturally infected dogs. Vet Paras 2010: (174) 119–23.
- Sambrook J, Russell, DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- Schmit GD, Roberts LS. Foundations of Parasitology. Vol. I. New York: McGRAW- Hill International Edition; 1996. 701pp.
- Serrão ML, Labarthe N, Lourenço-de-Oliveira R. Vectorial Competence of *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) Rio de Janeiro Strain, to *Dirofilaria immitis* (Leidy 1856). Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2001 July;96(5):593-98.
- Silva RC, Langoni H. Dirofilariose: zoonose emergente negligenciada. Ciênc. Rur Santa Maria 2009 Ago;39(5):1614-23.
- Simón F, Siles-Lucas M, Morchón R, González-Miguel J, Mellado I, Carretón E, Montoya-Alonsoc JA .Human and Animal Dirofilariasis: the Emergence of a Zoonotic Mosaic. Clin Microb Rev 2012 Jul;25(3):507-44.
- Simón F, González-Miguel J, Diosdado A, Gómez PJ, Morchón R, Kartashev V. The Complexity of Zoonotic Filariasis Epistystem and Its Consequences: A Multidisciplinary View. BioMed Res Intern 2017 May; 10pp.

- Simsek S, Ciftci AT; Serological and molecular detection of *Dirofilaria* species in stray dogs and investigation of *Wolbachia* DNA by PCR in turkey. J arthropod-bord dis dec 2016;10(4):445-53.
- Supali T, Ismid IS, Ruckert P, F Peter. Treatment of *Brugia timori* and *Wuchereria bancrofti* infections in Indonesia using DEC or a combination of DEC and albendazole: adverse reactions and short-term effects on microfilariae. Trop Med Inter Hea 2002 oct;7(10): 894-01.
- Tahir D, Damene H, Davoust B, Parola P. First molecular detection of *Dirofilaria immitis* (Spirurida: Onchocercidae) infection in dog from Northern Algeria. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 2017;51:66-8.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher GNM; Kumar S. Mega5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molec Biol Evol 2011;28(10):2731-39.
- Thrusfield MV. Epidemiologia Veterinária. 2. Ed. São Paulo: Roca, 2004. 556p.
- Urquhart GM. Parasitologia Veterinária. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 237pp.
- Ural K, Gultekin M, Atasoy A, Ulutas, B. Spatial distribution of vector borne disease agents in dogs in aegean region, Turkey. Rev mvz cór 2014;19(2):4086-98.
- Venco L; Genchi M; Genchi C; Gatti D; Kramer L. Can heartworm prevalence in dogs be used as provisional data for assessing the prevalence of the infection in cats? Vet Paras 2011;(176):300-03.
- Wang S, Zhang N, Zhang Z, Wang D, Yao Z, Zhang H MA J, Zheng B, Ren H, Liu SP. Prevalence of *Dirofilaria immitis* infection in dogs in Henan province, Central China. Paras 2016;23(43).

APÊNDICE 1



FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos - LITEB

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar, de maneira voluntária, de uma pesquisa intitulada: **ESTUDO SOBRE A DIROFILARIOSE CANINA NA BAIXADA FLUMINENSE, RJ.**

O objetivo dessa pesquisa é identificar os casos de dirofilariose canina em animais da Baixada Fluminense, RJ, mostrando a importância dessa doença como zoonose com risco de transmissão para a saúde da população humana. A dirofilariose canina é causada por um verme conhecido como “verme do coração” que é transmitida por mosquitos (*Aedes aegypti*, o mosquito da dengue e *Culex* sp., o pernilongo). No cão pode levar a um comprometimento cardiorrespiratório e no homem acomete o pulmão (forma um nódulo que é confundido com tumor maligno).

A pesquisa contará com o Médico Veterinário responsável realizando a orientação necessária em relação ao manejo dos animais, incluindo sobre a forma de prevenção e dúvidas relacionadas ao estudo. Esse profissional irá informar ao final do estudo o resultado da pesquisa (teste diagnóstico) que foi realizado e solicitar encaminhamento para o animal realizar tratamento na própria clínica participante da pesquisa.

A pesquisa pode oferecer um certo desconforto para seu animal (riscos) devido ao procedimento de coleta de sangue (Quantidade: até um ml) como leve vermelhidão e inchaço (devido a punção pela agulha), porém o senhor (a) será orientado como cuidar do animal após o procedimento e o veterinário responsável pela coleta poderá realizar um curativo com pomada cicatrizante, caso ocorra alguma lesão de maior gravidade, sem custo algum. O senhor (a) ao acompanhar o procedimento poderá se sentir mal (tonteira ou desmaio) e neste caso iremos imediatamente parar a coleta de sangue e recomeçar assim que se sentir bem, podendo haver desistência de sua parte na participação da pesquisa com seu animal. Caso queira ver o questionário antes de assinar o termo de consentimento, basta solicitar e as questões serão mostradas ao participante, pois ao ler o senhor (a) poderá se sentir constrangido (a) com alguma pergunta. Você poderá abandonar a pesquisa com seu animal a qualquer momento sem que haja problema algum e continuar com a rotina de seu cão normalmente. Como benefícios, o senhor (a) estará colaborando com a ciência e está obtendo orientações importantes sobre a doença, bem como formas de prevenção. As informações dadas para a pesquisa são confidenciais. Durante a fase do estudo, fotos podem ser tiradas para fins de comprovação científica.

O participante não terá compensação financeira, caso aceite participar da pesquisa. Em caso de algum dano provocado diretamente pela pesquisa, a pessoa será orientada como proceder sob supervisão do responsável pelo Projeto de Pesquisa.

Rubrica do Pesquisador	Rubrica do participante da pesquisa
------------------------	-------------------------------------

Caso precise entrar em contato com os Pesquisadores responsáveis, Drs. Viviane Marques de Andrade Vieira, Antonio Henrique Almeida de Moraes Neto e Gilberto Salles Gazêta sobre a pesquisa, a fim de esclarecer alguma dúvida entre em contato pelo telefone:(21) 2562-1054 (LITEB/IOC-FIOCRUZ).

Caso tenha alguma reclamação ou problema relacionado com a ética de como está sendo conduzida a pesquisa, por favor entrar em contato com os Comitês de Ética responsáveis pela aprovação do projeto de pesquisa, descritos abaixo:

- a. Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz – CEUA FIOCRUZ/IOC. Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz Avenida Brasil, 4.036 – Pav. Arthur Neiva, Expansão/Sala 6-Manguinhos - Rio de Janeiro-RJ - CEP: 21.040-360

Telefone: (21) 2562-1056

e-mail: ceua.ioc@ioc.fiocruz.br

- b. Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEP FIOCRUZ/IOC. Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz Avenida Brasil, 4.036 - sala 705 -Manguinhos - Rio de Janeiro-RJ - CEP: 21.040-360.

Tel.:(21) 3882-9011 Fax: (21) 2561-4815

e-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Eu _____ declaro ter lido e ter esclarecido todas as minhas dúvidas acerca do termo de consentimento e aceito participar da pesquisa. Receberei uma via de igual teor desse termo de Consentimento.

Assinatura do participante da pesquisa

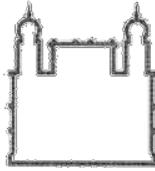
Assinatura do Pesquisador responsável

_____, de _____ de 2018.

Pagina 2 de 2

APÊNDICE 2

Apêndice 2



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos - LITEB

IOC
Instituto Oswaldo Cruz





Carta de solicitação


Eu, **Viviane Marques de Andrade Vieira**, juntamente com os pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ/Rio de Janeiro, Brasil, **Dr. Antonio Henrique Almeida de Moraes Neto** e **Dr. Gilberto Salles Gazêta** vimos através desta, buscar parceria com a Clínica Veterinária / Laboratório de Patologia Clínica para realizar o projeto “Estudo sobre a Dirofilariose canina na Baixada Fluminense, RJ” que compreenderá o período de Abril de 2018 a Janeiro de 2019. Sendo este estudo de grande importância para promoção da saúde humana e os resultados esperados constituirão dados que poderão servir de base para aplicação na saúde pública do país. Sendo assim, solicita-se a autorização da chefia da clínica Veterinária responsável/ Laboratório de Patologia Clínica, para a realização da pesquisa em pacientes caninos para dirofilariose.

Vale ressaltar que o apoio financeiro, logístico e de recursos humanos será de responsabilidade dos pesquisadores do projeto.

Rio de Janeiro, 02 de março de 2018.

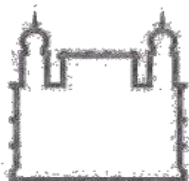

Viviane Marques de Andrade Vieira
Viviane Marques de Andrade Vieira, Médica Veterinária
CRMV-RJ 10684


Antonio Henrique Almeida de Moraes Neto
Dr. Antonio Henrique A. de Moraes Neto
Pesquisador Titular em Saúde Pública
LITEB / IOC / FIOCRUZ
MATR. SIAPE 6464028
CRB 07548-2


Gilberto Salles Gazêta
GILBERTO SALLES GAZÊTA
Médico Veterinário
CRMV-RJ 10684

Laboratório de Inovações, Ensino e Bioprodutos
FioCruz, Instituto Oswaldo Cruz, Avenida Brasil, 4365, Pavilhão Lauro Travassós Térreo Salas 16 e 18
Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
CEP: 21040-900
Tels: (21) 2562-1034 ou 1604

APÊNDICE 3



FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos - LI/TEB

FICHA DE INQUÉRITO SOBRE O CENÁRIO PRESENTE NA BAIXADA FLUMINENSE, RJ
(PREENCHIMENTO REALIZADO PELOS PESQUISADORES RESPONSÁVEIS PELA PESQUISA)

Projeto de pesquisa: ESTUDO SOBRE A DIROFILARIOSE CANINA NA BAIXADA FLUMINENSE, RJ

1. O senhor (a) já ouviu falar sobre dirofilariose (verme do coração)?

Sim Não

2. Você sabe o que essa doença pode causar no animal? E no homem?

Sim O que? _____ Não
 Sim O que? _____ Não

3. Sabe como ocorre a transmissão para o animal? E para o homem?

Sim Como? _____ Não
 Sim Como? _____ Não

4. Você sabe como se previne esta doença no animal?

Sim Como? _____ Não

5. Qual a última vez que o cão tomou remédio de verme?

Há 3 meses Há 6 meses Há mais de um ano Não sei

6. Onde vive o cão?

Dentro de casa fora de casa tem acesso a rua e/ou ao banheiro tosa

7. Seu cão vive com outro animal? Sim Qual? _____ Não

8. Seu cão nasceu aqui na região? Sim Não

9. Fez alguma viagem recente? Sim Para onde? _____
Não

10. Seu animal tem tosse, cansaço ou desmaio? Sim Não

APÊNDICE 4



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos - LITEB

IOC
Instituto Oswaldo Cruz



Termo de Confidencialidade e Sigilo

Título do Projeto: **Estudo sobre a Dirofilariose canina na Baixada Fluminense, RJ.**

Pesquisadores responsáveis: Viviane Marques de Andrade Vieira, Dr. Antonio Henrique Almeida de Moraes Neto e Dr. Gilberto Salles Gazêta

Telefones para Contato: (21) 99775-9267 (21) 2562-1054 (LITEB/IOC/Fiocruz)

Local de Coleta de Dados: Clínica Veterinária / Laboratório de Patologia Clínica Veterinária

Local e Data: Rio de Janeiro, 02 de março de 2018.

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem:

- 1- Recolher os dados dos participantes só após a permissão do projeto pelo CEUA e CEP;
- 2- A não efetuar nenhuma gravação ou cópia da documentação confidencial a que tiver acesso relacionado à tecnologia apresentada na defesa acima mencionada;
- 3- A não apropriar-se para si ou para outrem de material confidencial ou sigiloso que venha a ser disponibilizado através da defesa acima mencionada;
- 4- A não repassar o conhecimento das informações, por seu intermédio.

Viviane Marques de Andrade Vieira
Viviane Marques de Andrade Vieira
Dr.^a Viviane M. Andrade Vieira
Médica Veterinária
CRMV-RJ 10684

Antonio Henrique Almeida de Moraes Neto
Antonio Henrique Almeida de Moraes Neto
Dr. Antonio Henrique A. de Moraes Neto
Pesquisador Titular em Saúde Pública
LITEB / IOC / FIOCRUZ
MATR. SIAPE 6484026
CRB 07545-2

Gilberto Salles Gazêta
GILBERTO SALLES GAZÊTA
SIAPE 1224439-3 / FIOCRUZ 9427-6

Laboratório de Inovações, Ensino e Bioprodutos
Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Avenida Brasil, 4365, Pavilhão Lauro Travassos Térreo Salas 16 e 18
Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
CEP: 21040-900
Tels: (21) 2562-1054 ou 1604

APÊNDICE 5

FICHA N°
DATA

1 – VETERINÁRIO

NOME:

2 – PROPRIETÁRIO DO ANIMAL

NOME	TELEFONE
ENDEREÇO (RUA, N°, BAIRRO, CIDADE, ESTADO)	CEP
IDADE: ESCOLARIDADE: RENDA: OCUPAÇÃO:	

3 – ANIMAL

NOME	BAIRRO				
TEMPO DE RESIDÊNCIA	VIAGENS []				
COR PREDOMINANTE					
1 - [] BRANCA 2 - [] PRETA 3 - [] DOURADA 4 - [] MARROM 5 - [] CINZA					
PELAGEM			TIPO DE PELAGEM		
1 - [] CURTO 2 - [] MÉDIO 3 - [] LONGO			1 - [] COM SUBPÉLO 2 - [] SEM SUBPÉLO		
SEXO	IDADE	RAÇA	TOSA	TIPO DE TOSA	FREQUÊNCIA DA TOSA
MACHO / FÊMEA		[] PESO	SIM / NÃO		
FINALIDADE DO CÃO					
1 - [] GUARDA 2 - [] COMPANHIA 3 - [] OUTROS					
PREVENTIVO	FREQUÊNCIA/QUAL? / ÚLTIMA ADMINISTRAÇÃO			MICROFILÁRIA	
SIM / NÃO				POSITIVO / NEGATIVO	
QUEIXA CLÍNICA/Q UAL?					
SIM / NÃO					
PROCEDIMENTO: COLETA DE SANGUE					
QUANTIDADE: _____					

ASSINATURA DO VETERINÁRIO


```

186      181 CTTTGTGTTTTATACATTTAAAACAGATATATATTTGGCTTATGGATTTATTTTTCATGT
200      181 CTTTGTGTTTTATACATTTAAAACAGATATATATTTGGCTTATGGATTTATTTTTCATGT
          *****
22                                     241      GTTACT
69                                     241      GTTACT
72                                     241      GTTACT
75                                     241      GTTACT
76                                     241      GTTACT
95                                     241      GTTACT
97                                     241      GTTACT
99                                     241      GTTACT
101                                    241      GTTACT
124                                    241      GTTACT
143                                    241      GTTACT
146                                    241      GTTACT
147                                    241      GTTACT
148                                    241      GTTACT
149                                    241      GTTACT
151                                    241      GTTACT
153                                    241      GTTACT
160                                    241      GTTACT
164                                    241      GTTACT
166                                    241      GTTACT
167                                    241      GTTACT
169                                    241      GTTACT
171                                    241      GTTACT
173                                    241      GTTACT
175                                    241      GTTACT
183                                    241      GTTACT
186                                    241      GTTACT
200                                    241      GTTACT
          *****

```

Alinhamento realizado pelo Clustal W das sequências de nucleotídeos das amostras provenientes do município de Duque de Caxias 22, 69, 72, 75, 76, 95, 97, 99, 101, 124, 143, 146, 147, 148, 149, 151, 153, 160, 164, 166, 167, 169, 171, 173, 175, 183, 186 e 200 obtidas para o gene 12S. A apresentação do Boxshade evidencia resíduos idênticos indicados por asteriscos.

APENDICE 7

```

93      1  TATTACGATTTTTTTTGTTTTTTTGTTTTATGTTTTTTTTTGTA AAAATATTTAAATTTAT
100     1  TATTACGATTTTTTTTGTTTTTTTGTTTTATGTTTTTTTTTGTA AAAATATTTAAATTTAT
128     1  TATTACGATTTTTTTTGTTTTTTTGTTTTATGTTTTTTTTTGTA AAAATATTTAAATTTAT
162     1  TATTACGATTTTTTTTGTTTTTTTGTTTTATGTTTTTTTTTGTA AAAATATTTAAATTTAT
*****

93      61 TTATGTTTTTTTTGTAATATTGAAAATTTGGTGTTTGAACTGGATTAGTACCCAGGTAATC
100     61 TTATGTTTTTTTTGTAATATTGAAAATTTGGTGTTTGAACTGGATTAGTACCCAGGTAATC
128     61 TTATGTTTTTTTTGTAATATTGAAAATTTGGTGTTTGAACTGGATTAGTACCCAGGTAATC
162     61 TTATGTTTTTTTTGTAATATTGAAAATTTGGTGTTTGAACTGGATTAGTACCCAGGTAATC
*****

93      121 AAAATTTATTAATTCGGGAGTAAAGTTTTGTTTAAACCGAAAAAATATTGACTGACTTTA
100     121 AAAATTTATTAATTCGGGAGTAAAGTTTTGTTTAAACCGAAAAAATATTGACTGACTTTA
128     121 AAAATTTATTAATTCGGGAGTAAAGTTTTGTTTAAACCGAAAAAATATTGACTGACTTTA
162     121 AAAATTTATTAATTCGGGAGTAAAGTTTTGTTTAAACCGAAAAAATATTGACTGACTTTA
*****

93      181 GATTTTTCTTTGGAATATGTGTTTTTTTTGGAGAGCCCTCTTTTATAGTGAATTTTGTTGG
100     181 GATTTTTCTTTGGAATATGTGTTTTTTTTGGAGAGCCCTCTTTTATAGTGAATTTTGTTGG
128     181 GATTTTTCTTTGGAATATGTGTTTTTTTTGGAGAGCCCTCTTTTATAGTGAATTTTGTTGG
162     181 GATTTTTCTTTGGAATATGTGTTTTTTTTGGAGAGCCCTCTTTTATAGTGAATTTTGTTGG
*****

93      241 CGCATGTATGATTGTTTAGTTTTACTTTTTGGTAATGCTTTGTGTTTTATACATTTAA
100     241 CGCATGTATGATTGTTTAGTTTTACTTTTTGGTAATGCTTTGTGTTTTATACATTTAA
128     241 CGCATGTATGATTGTTTAGTTTTACTTTTTGGTAATGCTTTGTGTTTTATACATTTAA
162     241 CGCATGTATGATTGTTTAGTTTTACTTTTTGGTAATGCTTTGTGTTTTATACATTTAA
*****

93      301 AACAGATATATATTTGGCTTATGGATTTATTTTTTCATGTGTTACTATTGTTAATTTTCTT
100     301 AACAGATATATATTTGGCTTATGGATTTATTTTTTCATGTGTTACTATTGTTAATTTTCTT
128     301 AACAGATATATATTTGGCTTATGGATTTATTTTTTCATGTGTTACTATTGTTAATTTTCTT
162     301 AACAGATATATATTTGGCTTATGGATTTATTTTTTCATGTGTTACTATTGTTAATTTTCTT
*****

93      361 TGGATTAATTTTTAATTTTTTTGTTGAAATTGGAAAA
100     361 TGGATTAATTTTTAATTTTTTTGTTGAAATTGGAAAA
128     361 TGGATTAATTTTTAATTTTTTTGTTGAAATTGGAAAA
162     361 TGGATTAATTTTTAATTTTTTTGTTGAAATTGGAAAA
*****

```

Alinhamento realizado pelo Clustal W das seqüências de nucleotídeos das amostras provenientes do município de Guapimirim 93, 100, 128 e 162 obtidas para o gene 12S. A apresentação do Boxshade evidencia resíduos idênticos indicados por asteriscos.

187
189
191
192
194
197
199

181
181
181
181
181
181
181

```
TTTGGATTAATTTTAAATTTTTGTTGA  
TTTGGATTAATTTTAAATTTTTGTTGA  
TTTGGATTAATTTTAAATTTTTGTTGA  
TTTGGATTAATTTTAAATTTTTGTTGA  
TTTGGATTAATTTTAAATTTTTGTTGA  
TTTGGATTAATTTTAAATTTTTGTTGA  
TTTGGATTAATTTTAAATTTTTGTTGA  
*****
```

Alinhamento realizado pelo Clustal W das seqüências de nucleotídeos das amostras provenientes do município de Magé 16, 70, 71, 77, 82, 84, 89, 91, 94, 125, 127, 143, 144, 145, 152, 154, 155, 156, 157, 159, 161, 163, 165, 168, 170, 174, 187, 189, 191, 192, 194, 197 e 199 obtidas para o gene 12S. A apresentação do Boxshade evidencia resíduos idênticos indicados por asteriscos.

APÊNDICE 9

```

21          1 TTTTAATTGAATAAATGTTTAAAATTTGTTTTGTGAACTGGATTAGTACCCAGGTAATCA
176        1 TTTTAATTGAATAAATGTTTAAAATTTGTTTTGTGAACTGGATTAGTACCCAGGTAATCA
177        1 TTTTAATTGAATAAATGTTTAAAATTTGTTTTGTGAACTGGATTAGTACCCAGGTAATCA
185        1 TTTTAATTGAATAAATGTTTAAAATTTGTTTTGTGAACTGGATTAGTACCCAGGTAATCA
198        1 TTTTAATTGAATAAATGTTTAAAATTTGTTTTGTGAACTGGATTAGTACCCAGGTAATCA
          *****

21          61 AAGTTTATTAATTCGGGAGTAAAGTTGTATTTAAACCGAAAAAATATTGACTGACTTTAG
176        61 AAGTTTATTAATTCGGGAGTAAAGTTGTATTTAAACCGAAAAAATATTGACTGACTTTAG
177        61 AAGTTTATTAATTCGGGAGTAAAGTTGTATTTAAACCGAAAAAATATTGACTGACTTTAG
185        61 AAGTTTATTAATTCGGGAGTAAAGTTGTATTTAAACCGAAAAAATATTGACTGACTTTAG
198        61 AAGTTTATTAATTCGGGAGTAAAGTTGTATTTAAACCGAAAAAATATTGACTGACTTTAG
          *****

21          121 ATTTTTCTTTGGAATATGTGTTAGGAGAGCCCTCCTTATTTGTTAATTTTTTTTGGCAC
176        121 ATTTTTCTTTGGAATATGTGTTAGGAGAGCCCTCCTTATTTGTTAATTTTTTTTGGCAC
177        121 ATTTTTCTTTGGAATATGTGTTAGGAGAGCCCTCCTTATTTGTTAATTTTTTTTGGCAC
185        121 ATTTTTCTTTGGAATATGTGTTAGGAGAGCCCTCCTTATTTGTTAATTTTTTTTGGCAC
198        121 ATTTTTCTTTGGAATATGTGTTAGGAGAGCCCTCCTTATTTGTTAATTTTTTTTGGCAC
          *****

21          181 ATGTATGATTGTTT
176        181 ATGTATGATTGTTT
177        181 ATGTATGATTGTTT
185        181 ATGTATGATTGTTT
198        181 ATGTATGATTGTTT
          *****

```

Alinhamento realizado pelo Clustal W das seqüências de nucleotídeos das amostras 21, 176, 177, 185 e 198 obtidas para o gene 12S. A apresentação do Boxshade evidencia resíduos idênticos indicados por asteriscos.

ANEXO 1



TERMO DE ANUÊNCIA

Venho por meio declarar a parceria com o desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado "Estudo sobre a *Dirofilarirose* canina na Baixada Fluminense, RJ sob responsabilidade de Viviane Marques de Andrade Vieira, que será orientada pelo Prof. Dr. Antonio Henrique Almeida de Moraes Neto, do Laboratório de Inovações, Ensino e Bioprodutos (LITEB / IOC / FIOCRUZ) e co-orientada pelo Prof. Dr. Gilberto Sales Gazêta do Laboratório de Insetos Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses (LIRN/ IOC / FIOCRUZ). Este estudo contará com o nosso apoio para coleta de sangue, a fim de identificar espécies de *Dirofilaria* pela técnica de PCR.

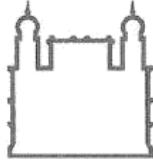
Rio de Janeiro, 26 de fevereiro de 2018

Atenciosamente,

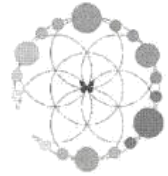
Priscila do Amaral Fernandes
Bióloga CRBio 7953/02
Diretora técnica

Telefone: 2275-2340
End: Rua Terza Guimarães, 147 Botafogo, RJ (CEP: 22280-080)

ANEXO 2



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos - LITEB



Memo. /2018-LITEB/IOC

De: Dra Andrea Henrique Pons
Pesquisador Titular em Saúde Pública
Chefe do LITEB


Para: Dra Martha Suarez Mutis
Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical / IOC / FIOCRUZ

TERMO DE ANUÊNCIA

Venho por meio deste autorizar o desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado “**Estudo sobre a Dirofilariose canina na Baixada Fluminense, RJ**” sob responsabilidade de **Viviane Marques de Andrade Vieira**, que será orientada pelo Prof. Dr. Antonio Henrique Almeida de Moraes Neto, do Laboratório de Inovações, Ensino e Bioprodutos (LITEB / IOC / FIOCRUZ) e co-orientada pelo Prof. Dr. Gilberto Salles Gazêta do Laboratório de Referência Nacional em vetores das Riquetsioses (LIRN/ IOC / FIOCRUZ). Este estudo contará com o apoio do POM do LITEB / IOC / FIOCRUZ e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Rio de Janeiro, 02 de março de 2018.

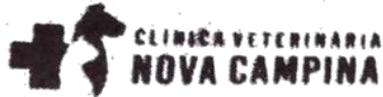
Atenciosamente,


Dra. Andrea Henrique Pons

Andrea Henriques Pons
Pesquisadora Titular UMI
em Terapias, Ensino e Bioprodutos
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ
Rio de Janeiro - CEP: 21551-009

Laboratório de Inovações, Ensino e Bioprodutos
Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Avenida Brasil, 4365, Pavilhão Lauro Travassos Térreo Salas 16 e 18
Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
CEP: 21040-900
Tels: (21) 2562-1054 ou 1604

ANEXO 3



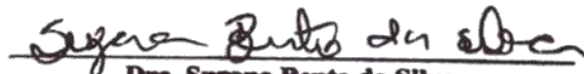
TERMO DE ANUÊNCIA

Venho por meio deste autorizar o desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado "Estudo sobre a *Dirofilariosis* canina na Baixada Fluminense, RJ" sob responsabilidade de Viviane Marques de Andrade Vieira, que será orientada pelo Prof. Dr. Antonio Henrique Almeida de Moraes Neto, do Laboratório de Inovações, Ensino e Bioprodutos (LITEB / IOC / FIOCRUZ) e co-orientada pelo Prof. Dr. Gilberto Salles Gazêta do Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsias (LIRN/ IOC / FIOCRUZ). Este estudo contará com o nosso apoio para coleta de sangue em pacientes caninos, a fim de identificar espécies de *Dirofilaria* pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Rio de Janeiro, 02 de março de 2018.

Atenciosamente,

Dra. Suzana Bento da Silva
Médica Veterinária
CRMV - RJ 10.265



Dra. Suzana Bento da Silva
Médica Veterinária (CRMV RJ - 10265)
Clínica Médica e Cirúrgica/ Ortopedia
Responsável Técnica da Clínica Veterinária

Clínica Veterinária Nova Campina
Av. B, quadra 75 Lote 03, área 02/ Loja 02- Nova Campina - Duque de Caxias/RJ
CEP 25268000
Telefones: 98273-1005/ 2675-2002

ANEXO 4

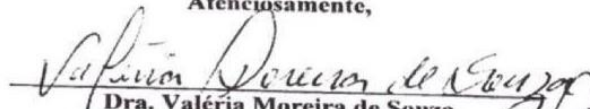


TERMO DE ANUÊNCIA

Venho por meio deste autorizar o desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado "Estudo sobre a **Dirofilariose canina na Baixada Fluminense, RJ**" sob responsabilidade de **Viviane Marques de Andrade Vieira**, que será orientada pelo Prof. Dr. Antonio Henrique Almeida de Moraes Neto, do Laboratório de Inovações, Ensino e Bioprodutos (LITEB / IOC / FIOCRUZ) e co-orientada pelo Prof. Dr. Gilberto Salles Gazêta do Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses (LIRN/ IOC / FIOCRUZ). Este estudo contará com o nosso apoio paracoleta de sangue em pacientes caninos, a fim de identificar espécies de *Dirofilaria* pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Rio de Janeiro, 02 de março de 2018.

Atenciosamente,


Dra. Valéria Moreira de Souza
Médica Veterinária (CRMV RJ - 11334)
Clínica Médica e Cirúrgica/ Anestesiologia
Responsável Técnica

Consultório Veterinária Taquara
Rua José Julio de Figueiredo n. 29 – Taquara – Duque de Caxias/RJ
Telefones: 98783-3713/ 2787-3648

ANEXO 5



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses- LIRN



LIRN

TERMO DE ANUÊNCIA

Venho por meio deste autorizar o desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado **“Estudo sobre a Dirofilariose canina na Baixada Fluminense, RJ** sob responsabilidade de **Viviane Marques de Andrade Vieira**, que será orientada pelo Prof. Dr. Antonio Henrique Almeida de Moraes Neto, do Laboratório de Inovações, Ensino e Bioprodutos (LITEB / IOC / FIOCRUZ) e co-orientada por mim, Prof. Dr. Gilberto Salles Gazêta do Laboratório de Referência Nacional em vetores das Riquetsioses (LIRN/IOC/FIOCRUZ), contando com o apoio e Infraestrutura do mesmo.

Rio de Janeiro, 02 de março de 2018.

Atenciosamente,

GILBERTO SALLES GAZÊTA
LAB. REF. NAC. VETORES RIQUETSIOSES
SIAPE 1224439-3 / FICV 917 9477.6

Dr. Gilberto Salles Gazêta

Pesquisador titular e Coordenador do Serviço de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses (LIRN) da Fundação Oswaldo Cruz.

Laboratório de Referência Nacional e Vetores das Riquetsioses
FioCruz, Instituto Oswaldo Cruz, Avenida Brasil, 4365, Pavilhão Lauro Travassos Anexo salas 01 a 10
Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
CEP: 21040-900
Tels: (21) 2562-1340/ 1364/1448/1313

ANEXO 6



Instituto Oswaldo Cruz

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/IOC

LICENÇA

L-003/2018

Certificamos que o protocolo (CEUA/IOC-035/2017), intitulado "Estudo sobre a *Dirofilaria immitis* Canina na Baixada Fluminense RJ.", sob a responsabilidade de Gilberto Salles Gazeta atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 31/03/2019 e inclui o uso total de:

Animal	Espécie e linhagem	quant. (total)	♂	♀	Idade	Peso	Origem (*)
(X) Outros	<i>Canis lupus familiaris</i>	142	-	-	Maior que 6 meses a 18 anos	3 kg a 60 kg	Clinicas e Consultórios Veterinários da Baixada Fluminense, RJ.

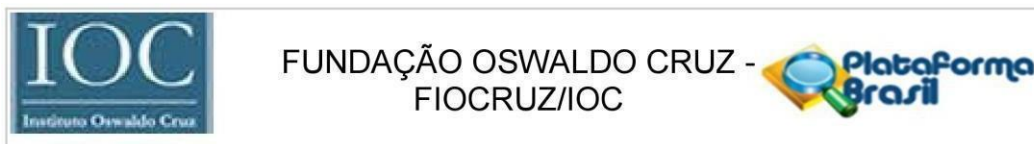
Observação: Esta licença não substitui outras licenças necessárias, como Certificado de Qualidade em Biossegurança para animais geneticamente modificados, certificado do IBAMA para captura de animais silvestres ou outros.

Rio de Janeiro, 14 de março de 2018.

Flávio Alves Lara
Coordenador da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz
Fundação Oswaldo Cruz

FIOCRUZ-Fundação Oswaldo Cruz/IOC-Instituto Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil
CEP: 21040-960 Tel: (21) 2562-1056

ANEXO 7



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO SOBRE A DIROFILARIOSE CANINA NA BAIXADA FLUMINENSE, RJ.

Pesquisador: ANTONIO HENRIQUE ALMEIDA DE MORAES NETO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 82490118.1.0000.5248

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.629.509

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de mestrado de Viviane Marques de Andrade Vieira Viviane, orientada pelo pesquisador principal Dr Antônio Henrique A. Moraes Neto. O estudo, segundo o pesquisador, "será do tipo descritivo, transversal, observacional, não aleatório por conveniência, envolvendo cães de companhia atendidos em serviço veterinário na Baixada Fluminense, RJ."

A dirofilariose é uma zoonose, cujo agente etiológico é o filarídeo *Dirofilaria immitis*. O hospedeiro mais frequente é o cão, acomete o coração, também conhecida como o "verme do coração". No homem, hospedeiro acidental, pode comprometer o parênquima pulmonar gerando nódulo. A possibilidade da infecção acometer o homem pode ser influenciada pelo tamanho da população canina, a prevalência da infecção em cães, a densidade dos vetores e a exposição do homem aos culicídeos. Casos têm ocorrido na região da Baixada Fluminense no RJ. Sendo assim, os pesquisadores propõem o estudo da infecção na região, enfatizando a prevalência da dirofilariose canina, os fatores de risco associados e o seu potencial zoonótico, na Baixada Fluminense, RJ. O estudo será realizado em clínicas, consultórios e laboratórios de patologia clínica veterinária. Para tanto, os pesquisadores irão coletar 142 amostras de sangue total (1 mL) de cada animal, por punção venosa, acondicionadas em tubo contendo EDTA, armazenadas a -20°C até a extração de DNA, para realização da técnica molecular de PCR. A prevalência (1,81 %) em cães para três bairros da região entre 2014 a 2016, em clínicas da Taquara, Imbariê e Nova Campinas foi calculada utilizando-se dados secundários. A frequência entre as raças também foi

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação de Parecer: 2.629.809

calculada, sendo que 40,8% eram de raça e 42,9% sem raça definida (SRD). Por faixa etária, 46,1% adultos, 26,92% de idosos, 19,2% filhotes e 76,9% não estavam identificados. Os pesquisadores pretendem avaliar a prevalência da infecção na localidade, os fatores de risco que predisõem o aumento de casos, a fim de despertar nos profissionais de saúde o interesse e adoção de métodos preventivos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Analisar a presença de *Dirofilariose* canina no município de Duque de Caxias, Baixada Fluminense, RJ, observando o risco de infecção humana.

Objetivos Secundários:

i) Detectar casos da *dirofilariose* canina, em Duque de Caxias, a partir de amostras sanguíneas de cães domiciliados ou que forem atendidos em serviços veterinários;

ii) Identificar molecularmente espécies de *Dirofilaria*;

iii) Obter a prevalência da *Dirofilariose* canina na localidade;

iv) Analisar os conhecimentos, atitudes e práticas de profissionais da área da saúde e tutores de animais acerca da *dirofilariose* canina;

v) Analisar o risco de infecção humana por *Dirofilaria* spp.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo o pesquisador principal:

Riscos:

"A pesquisa pode oferecer um certo desconforto para o animal devido ao procedimento de coleta de sangue como hiperemia e edema (devido a punção pela agulha). O tutor, ao acompanhar o procedimento, poderá apresentar algum mal estar (tonteira ou desmaio) e neste caso a coleta de sangue será suspensa, até que se recupere o bem estar do tutor."

Benefícios:

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 706 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3862-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfioacruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 2.629.509

Incluir o contato do CEP Fiocruz/IOC no TCLE:

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEP FIOCRUZ/IOC. Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz Avenida Brasil, 4.036 - sala 705 -Manguinhos - Rio de Janeiro-RJ - CEP: 21.040-360 Tel.:(21) 3882-9011 Fax: (21) 2561-4815 e-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP Fiocruz/IOC), de acordo com as atribuições definidas na Res. 466/12 do CNS, manifesta-se por APROVAR o projeto em tela em Ad-Referendum conforme resolução em sua 237ª Reunião Ordinária, uma vez que a pendência emitida pelo presente CEP foi atendida.

Cabe ressaltar que a responsabilidade do pesquisador principal é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

Apresentar relatórios parciais (anuais) e relatório final do projeto de pesquisa é responsabilidade indelegável do pesquisador principal.

Qualquer modificação ou emenda ao projeto de pesquisa em pauta deve ser submetida à apreciação do CEP Fiocruz/IOC.

O participante de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido -TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

76

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)			
Bairro: Manguinhos		CEP: 21.040-360	
UF: RJ	Município: RIO DE JANEIRO		
Telefone: (21)3882-9011	Fax: (21)2561-4815	E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br	



Continuação do Parecer: 2.629-509

"Identificar a possibilidade de casos de Dirofilariose canina na Baixada Fluminense e identificar as possíveis espécies de ocorrência na região; Elaboração de propostas para novos protocolos clínico para prevenção, diagnóstico, tratamento e controle da dirofilariose canina na Baixada Fluminense, RJ."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem fundamentado e tem relevância para o conhecimento epidemiológico de dirofilariose canina na Baixada Fluminense. O estudo proposto é pertinente e a metodologia parece adequada para permitir o alcance dos objetivos propostos.

O estudo será desenvolvido em cães, os participantes humanos só serão contatados para permitir e acompanhar os seus pets. Além de responder um questionário sobre dados referentes aos cães e ao seu conhecimento sobre a infecção.

Segundo o pesquisador principal, o grupo pretende elaborar um Guia metodológico para prevenção e controle da Dirofilariose canina na Baixada Fluminense, RJ. Coleta de amostra de sangue para análise diagnóstica e orientação de tratamento, conforme a necessidade identificada.

O projeto foi aprovado em 14 de março de 2018 pela CEUA IOC/Fiocruz Licença L-003/2018.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados e analisados os seguintes documentos:

1-PB INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO 1067634;

2-Licença CEUA;

3-Carta resposta "ponto a ponto", em papel timbrado, datada e assinada pelo pesquisador principal e pela aluna;

4-Cronograma atualizado;

5-Projeto detalhado atualizado e

6-TCLE atualizado.

Recomendações:

O projeto deve ser desenvolvido na forma em que foi aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está em conformidade com a Resolução 466/12 do CNS, pois a pendência emitida no parecer nº 2 572 842 de 01 de abril de 2018 foi atendida:

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3982-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.629.509

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1067634.pdf	20/04/2018 14:08:39		Aceito
Outros	Carta_Resposta.pdf	20/04/2018 14:06:06	ANTONIO HENRIQUE ALMEIDA DE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Atualizado.pdf	20/04/2018 13:59:17	ANTONIO HENRIQUE ALMEIDA DE	Aceito
Outros	Licença_CEUa.pdf	20/04/2018 13:57:14	ANTONIO HENRIQUE ALMEIDA DE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Atualizado_Viviane.pdf	20/04/2018 13:51:06	ANTONIO HENRIQUE ALMEIDA DE MORAES NETO	Aceito
Cronograma	Cronograma_atualizado.pdf	20/04/2018 13:49:57	ANTONIO HENRIQUE ALMEIDA DE	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_Atualizada.pdf	12/03/2018 12:46:01	ANTONIO HENRIQUE ALMEIDA DE	Aceito
Declaração de concordância	declaracao_concordancia.pdf	08/03/2018 13:44:48	Anselmo Gomes de Araujo	Aceito
Solicitação registrada pelo CEP	Parecer_CEP.pdf	08/03/2018 13:44:48	Anselmo Gomes de Araujo	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	carta_solicitacao_troca_pesquisador.pdf	08/03/2018 10:54:51	VIVIANE MARQUES DE ANDRADE VIEIRA	Aceito
Outros	Parecer_CEP_Viviane.pdf	08/03/2018 10:54:51	VIVIANE MARQUES DE ANDRADE VIEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	carta_resposta_CEP_atualizada.pdf	08/03/2018 10:46:45	VIVIANE MARQUES DE ANDRADE VIEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_anuencia_LITEB.pdf	07/03/2018 13:12:52	VIVIANE MARQUES DE ANDRADE VIEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_confidencialidade_Sigilo_atualizada.pdf	06/03/2018 10:40:32	VIVIANE MARQUES DE ANDRADE VIEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	Termo_anuencia_Vetnovacampina_atualizado.pdf	06/03/2018 10:40:18	VIVIANE MARQUES DE ANDRADE	Aceito

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)**Bairro:** Manguinhos**CEP:** 21.040-360**UF:** RJ**Município:** RIO DE JANEIRO**Telefone:** (21)3882-9011**Fax:** (21)2561-4815**E-mail:** cepfioacruz@ioc.fiocruz.br