


DINÂMICA SAZONAL DA ERLIQUIOSE CANINA: PERFIL EPIDEMIOLÓGICO EM UM HOSPITAL VETERINÁRIO ESCOLA DO NOROESTE DO PARANÁ

 <https://doi.org/10.56238/arev7n2-200>

Data de submissão: 18/01/2025

Data de publicação: 18/02/2025

Isabela Fideli Felizardo

Médica Veterinária, Universidade Estadual de Maringá (Campus Umuarama, PR)

E-mail: isabelafidelid@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-7514-7641>

LATTES: <https://lattes.cnpq.br/9435102496348200>

Ítalo Morelli Miacri Souza

Médico Veterinário, Universidade Estadual de Maringá (Campus Umuarama, PR)

Residência Multiprofissional em Saúde, subárea Patologia Clínica Veterinária

E-mail: morellimiacri@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3188-127X>

LATTES: <https://lattes.cnpq.br/8667808815713925>

Fernanda de Paula Roldi Vieira

Médica Veterinária, Doutoranda em Ciência Animal

Docente, Universidade Estadual de Maringá (Campus Umuarama, PR)

E-mail: fernandaroldi@hotmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2068-9418>

LATTES: <http://lattes.cnpq.br/5647918530167431>

RESUMO

A erliquiose monocítica canina (EMC) é uma doença infecciosa causada pela bactéria *Ehrlichia canis*, transmitida principalmente pelo carrapato *Rhipicephalus linnaei*. A enfermidade afeta células sanguíneas, com sintomas clínicos variados e difícil diagnóstico devido à sua apresentação heterogênea. A prevalência de EMC é alta em diversas regiões do Brasil, sendo um desafio para os médicos veterinários, especialmente devido à relação com fatores ambientais e biológicos, como a infestação por carrapatos. Considerando a relevância epidemiológica da doença, objetivou-se analisar sua prevalência associada ao diagnóstico de *E. canis* em cães atendidos no Hospital Veterinário Universitário da Universidade Estadual de Maringá, campus Umuarama, no período de novembro de 2022 a outubro de 2024. Foi realizado um levantamento de dados em 2.503 fichas clínicas de cães, diagnosticados por testes imunocromatográficos ou pela visualização de mórulas intracitoplasmáticas. As variáveis analisadas foram prevalência, período do ano, sexo, faixa etária e histórico de infestação por carrapatos. Os resultados mostraram uma predominância de 7,83%, com maior incidência no inverno (33,7%), em discordância com estudos prévios que apontam o verão como o período de maior prevalência. A pesquisa também evidenciou que cães adultos e idosos foram os mais afetados, enquanto filhotes apresentaram baixa prevalência, o que corrobora achados anteriores sobre a maior suscetibilidade dos adultos à doença. Além disso, a presença de carrapatos foi observada em 63,8% dos casos, destacando a forte correlação entre a infestação por ectoparasitas e o desenvolvimento da infecção. A EMC tem alta prevalência em cães atendidos na região de Umuarama, com fatores como faixa etária e infestação por carrapatos influenciando a prevalência. Os dados sugerem que o controle de carrapatos, mais do que a sazonalidade, impacta significativamente a primazia da doença,

destacando a importância do controle parasitário durante o ano todo, especialmente antes dos períodos de maior incidência, como inverno e verão.

Palavras-chave: Controle parasitário. *Ehrlichia canis*. Prevalência. *Rhipicephalus linnaei*. Sazonalidade.

1 INTRODUÇÃO

A erliquiose monocítica canina (EMC) é uma doença infecciosa severa causada por *Ehrlichia canis*, uma bactéria intracelular obrigatória que infecta células hematopoiéticas como monócitos, macrófagos e neutrófilos (Matos; Rocha-Lima, 2021; Espino-Solís *et al.*, 2023) e que apresenta uma alta prevalência em diferentes regiões do Brasil (Cirino *et al.*, 2021).

Sua transmissão ocorre principalmente durante o repasto sanguíneo do carrapato *Rhipicephalus linnaei*, podendo também ocorrer por via transplacentária, transfusões sanguíneas, ou pelo uso de agulhas e instrumentos contaminados (Matos; Rocha-Lima, 2021; Zu *et al.*, 2024). O animal infectado pode apresentar sinais leves a severos ou até mesmo ser assintomático, dependendo da fase da doença e da imunocompetência do hospedeiro. Alguns dos sinais clínicos mais observados são apatia, anorexia, febre, linfadenomegalia, perda de peso, epistaxe, edema periférico e choque hipovolêmico (Caxito *et al.*, 2018; Matos; Rocha-Lima, 2021).

O diagnóstico da erliquiose canina é desafiador devido à sua apresentação clínica variável. Alterações laboratoriais são fundamentais para um diagnóstico precoce da doença (Miranda; Souza; Martins, 2022). Dentre os resultados laboratoriais relatados, destacam-se a trombocitopenia, anemia arregenerativa e leucopenia, podendo ser encontradas mórulas intracitoplasmáticas das riquetsias (Espino-Solís *et al.*, 2023; Silva; Guimarães; Cunha, 2023) no interior dos leucócitos. Algumas alterações bioquímicas podem ser observadas como hipoalbuminemia, valores de fosfatase alcalina (ALP), alanina aminotransferase (ALT) e creatinina acima da referência, assim como concentração sérica de ureia abaixo do valor de referência (Carvalho *et al.*, 2024). O diagnóstico definitivo requer a associação de testes sorológicos e moleculares ou a visualização de mórulas de *E. canis* (Sales *et al.*, 2015).

A doença apresenta um padrão epidemiológico influenciado por fatores climáticos, comportamentais e biológicos. No Brasil, sua incidência é mais alta durante o verão, quando as condições de calor e umidade favorecem a reprodução do vetor, resultando em um aumento na ocorrência de casos (Babo *et al.*, 2020; Matos; Rocha-Lima, 2021). No entanto, a dinâmica da doença pode ser alterada por diferentes variáveis, como o clima, o habitat, o manejo dos animais, além de fatores epidemiológicos, como a disposição do vetor, o modo de vida e a faixa etária da população afetada (Cirino *et al.*, 2021). Em relação aos aspectos biológicos, estudos indicam que as fêmeas são frequentemente acometidas pela enfermidade em comparação aos machos, sendo que os animais adultos, especialmente aqueles sem raça definida (SRD), apresentam maior prevalência de infecção (Babo *et al.*, 2020; Maciel; Silva; Santo, 2021).

A EMC é uma enfermidade frequentemente presente na rotina de atendimentos do Hospital Veterinário Universitário da Universidade Estadual de Maringá, *campus* Umuarama. Embora existam alguns estudos sobre a doença, ainda são limitados os trabalhos que abordam o perfil epidemiológico associado à erliquiose na microrregião de Umuarama. Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo analisar o perfil epidemiológico relacionado ao diagnóstico da doença no período de novembro de 2022 a outubro de 2024 no Hospital Veterinário Universitário da Universidade Estadual de Maringá, *campus* Umuarama.

2 METODOLOGIA

2.1 TRIAGEM DE PACIENTES E COLETA DE DADOS

Realizou-se um levantamento de dados no período de novembro de 2022 a outubro de 2024, no Hospital Veterinário Universitário da Universidade Estadual de Maringá (UEM), *campus* Umuarama. Os dados foram coletados de prontuários registrados no sistema eletrônico Vetwork®. Foram incluídos no estudo cães de quaisquer idades, raça ou sexo que apresentaram sinais clínicos compatíveis com a EMC e diagnóstico positivo para *E. canis* através do teste imunocromatográfico (SNAP 4Dx Plus®, IDEXX; Erliquiose Ac Test Kit®, Alere; Ehrlichia Ab ECO Vet®, ECO Diagnóstica) ou pela visualização de agrupamentos intracitoplasmáticos sugestivos de riquetsias durante análise do esfregaço sanguíneo.

Os dados foram categorizados conforme o sexo, a faixa etária (Filhotes – até 11 meses de idade; adultos – de 12 meses a 6 anos; idosos – acima de 6 anos), raça e a presença e/ou histórico de carrapatos. A data da consulta também foi coletada para a realização de um perfil epidemiológico, considerando a época do ano, com o objetivo de realizar inferências quanto à sazonalidade. As informações observadas foram registradas em planilha do software Microsoft Excel® versão 2019.

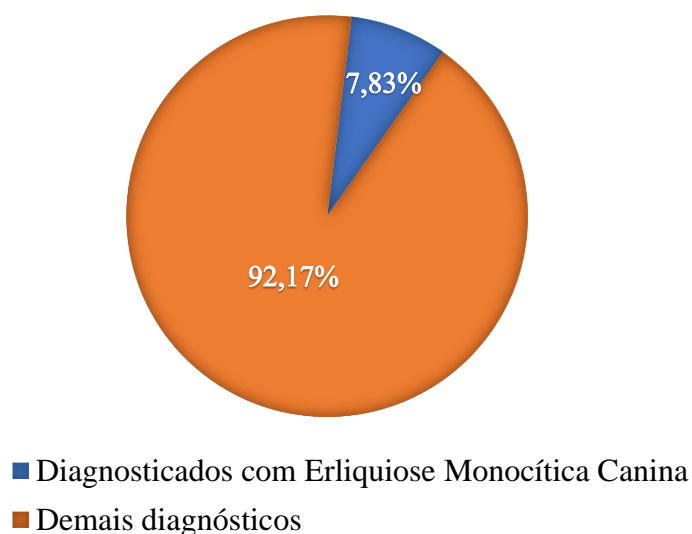
2.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

As variáveis foram analisadas por meio de estatística descritiva, com análise de frequência relativa, e apresentadas em gráficos e tabelas, baseadas nos pacientes diagnosticados com a enfermidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total foram analisadas 2.503 fichas do Hospital Veterinário Universitário da Universidade Estadual de Maringá, *campus* Umuarama, no período de novembro de 2022 a outubro de 2024. Dentre eles, aproximadamente 7,83% (196/2503) foram positivos para *E. canis* (Imagem 1).

Imagem 1. Diagnósticos de *E. canis* no Hospital Veterinário da UEM em relação ao número total de atendimentos registrados no período de novembro de 2022 a outubro de 2024.



Fonte: arquivo pessoal, 2024

Observou-se menor prevalência de infecções por erliquiose no verão, com uma incidência de 12,2% nesse período (Tabela 1). A incidência aumentou para 26,5% no outono, atingindo sua maior prevalência no período de inverno, com 33,7%. Esses dados contrastam com as afirmações de autores como Babo *et al.* (2020), Matos e Rocha-Lima (2021) e Espino-Solís *et al.* (2023), que indicam uma maior frequência da erliquiose no verão, possivelmente associada à distribuição do vetor.

A imagem 2 mostra um pico no número de casos durante o mês de outubro, seguido por uma redução acentuada nos meses subsequentes, o que pode indicar uma maior adoção de medidas profiláticas por parte dos tutores. Dessa forma, pode-se inferir que a menor incidência observada no verão esteja relacionada ao controle parasitário realizado nos meses que precedem esse período.

Tabela 1. Distribuição de frequências de casos positivos para *E. canis* por estação do ano diagnosticados no Hospital Veterinário da UEM, *campus* Umuarama, no período de novembro de 2022 a outubro de 2024.

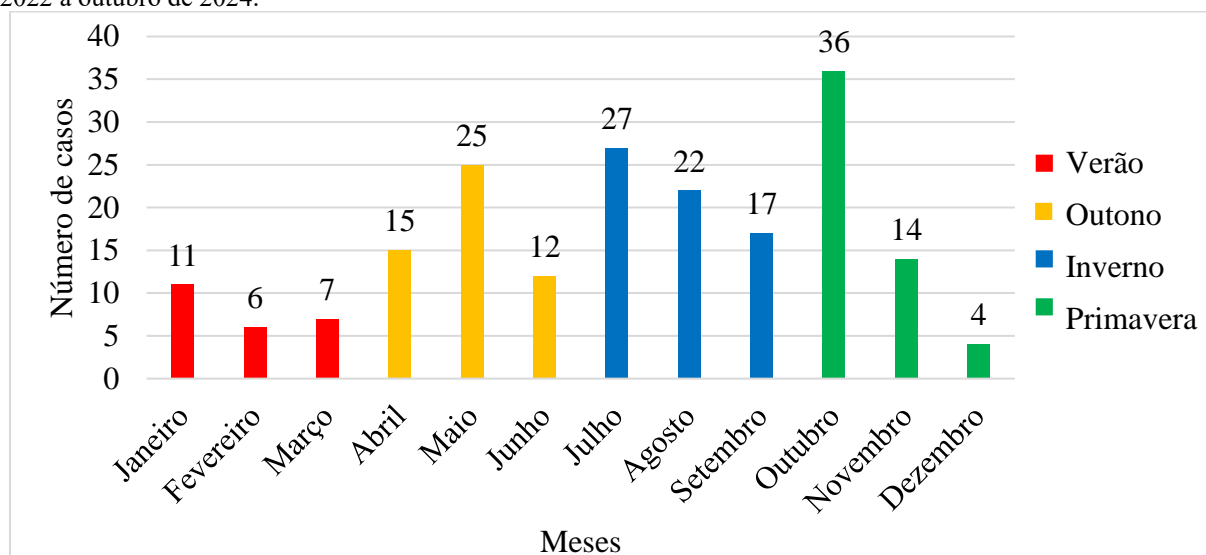
ESTAÇÕES	FA ¹ (N)	FR ²
Primavera		
2022	6	3,1%
2023	27	13,8%
2024	21	10,7%
	54	27,6%
Verão		
2023	10	5,1%
2024	14	7,1%
	24	12,2%
Outono		
2023	15	7,6%
2024	37	18,9%
	52	26,5%
Inverno		

2023	28	14,3%
2024	38	19,4%
	66	33,7%
TOTAL	196	100%

Legenda: ¹Frequência Absoluta; ²Frequência Relativa

Fonte: arquivo pessoal, 2024.

Imagem 2. Distribuição mensal de pacientes diagnosticados com *E. canis* no Hospital Veterinário da UEM, de novembro de 2022 a outubro de 2024.

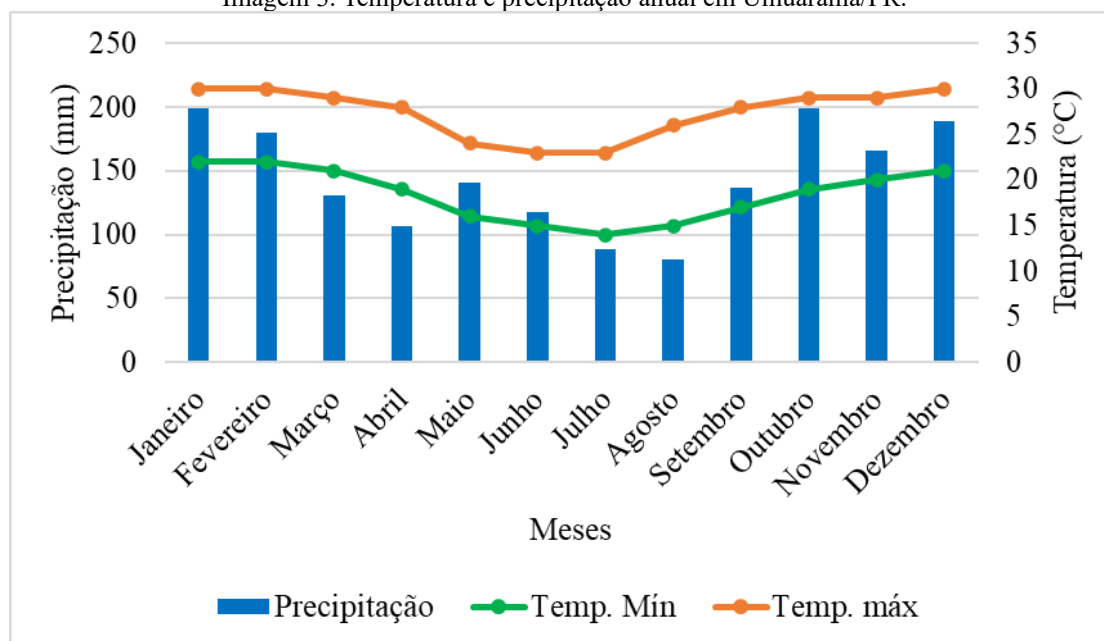


Fonte: arquivo pessoal, 2024.

Conforme demonstrado na Imagem 3, a temperatura e a precipitação média no inverno em Umuarama variam entre 14 °C a 26 °C e 81 mm a 137 mm, respectivamente (Climatempo, 2024). A faixa de temperatura observada está dentro dos limites em que o vetor pode se desenvolver adequadamente, conforme evidenciado por Dantas-Torres (2010), o qual destaca que o vetor pode prosperar em temperaturas variando de 20 °C a 35 °C.

Segundo Monteiro (2017), o tempo necessário para a postura de ovos até a eclosão das larvas depende das condições de temperatura e umidade, podendo variar entre 20 a 60 dias. Santos (2021a) afirma que, em períodos mais secos, a postura de ovos do parasito se intensifica, contribuindo para o crescimento do número de carrapatos no ambiente. Dessa forma, uma hipótese que o presente estudo possibilita cogitar é que, durante o inverno, período de menor precipitação, as infestações por carrapatos tendem a ser mais frequentes.

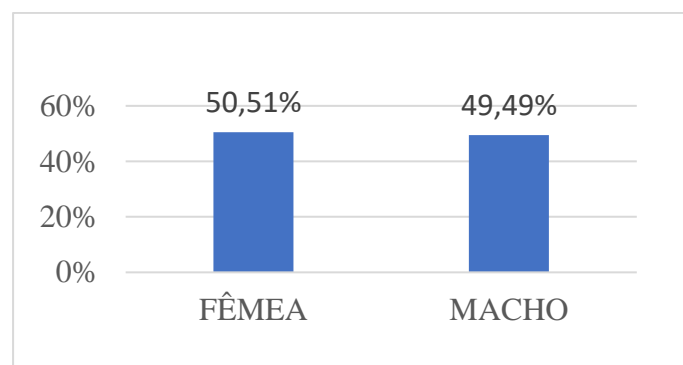
Imagem 3. Temperatura e precipitação anual em Umuarama/PR.



Fonte: Climatempo, 2024.

Em relação ao sexo, 99 animais (50,51%) eram fêmeas e 97 (49,49%) eram machos (Imagem 4). Esse resultado não evidenciou uma predominância clara entre os sexos, contrastando com o estudo de Silva, Guimarães e Cunha (2023), os quais observaram que 56,25% dos cães acometidos pela doença eram fêmeas. De maneira semelhante, Babo *et al.* (2020) encontraram uma taxa de 57% de fêmeas afetadas pela enfermidade em sua pesquisa. No entanto, outros autores, como Cirino *et al.* (2021) e Maciel, Silva e Santo (2021), relataram uma maior prevalência de machos, com 52,22% e 52,63%, respectivamente. O presente estudo sugere, portanto, uma distribuição equitativa da doença entre machos e fêmeas na região estudada.

Imagem 4. Distribuição de casos, por sexo, diagnosticados com *E. canis* no Hospital Veterinário da UEM, de novembro de 2022 a outubro de 2024.

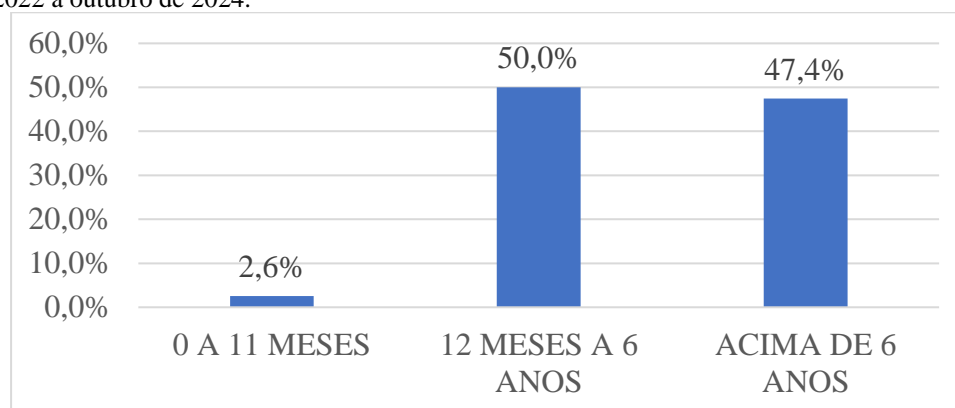


Fonte: arquivo pessoal, 2024.

A frequência etária está descrita na Imagem 5, categorizada em filhotes (0 a 11 meses), adultos

(12 meses a 6 anos) e idosos (acima de 6 anos). Observou-se que apenas cinco filhotes testaram positivo para erliquiose, o que corresponde a 2,6% do total, enquanto 98 cães adultos (50%) e 93 cães idosos (47,4%) apresentaram diagnóstico positivo para *E. canis*. Esse resultado corrobora com os achados de Maciel, Silva e Santo (2021), os quais relataram que 70,63% dos cães positivos para a enfermidade tinham mais de 1 ano de idade. Por outro lado, em um estudo realizado por Babo *et al.* (2020), cerca de 34% dos cães diagnosticados com erliquiose eram filhotes com menos de um ano. No entanto, de acordo com Silva, Guimarães e Cunha (2023), apesar dos filhotes apresentarem maior suscetibilidade devido ao sistema imunológico em desenvolvimento, a menor exposição ao ambiente externo e ao vetor resulta em uma prevalência mais baixa nessa faixa etária.

Imagem 5. Distribuição de casos, por faixa etária, diagnosticados com *E. canis* no Hospital Veterinário da UEM, de novembro de 2022 a outubro de 2024.



Fonte: arquivo pessoal, 2024.

O presente levantamento encontrou uma variedade de 22 raças diferentes (Tabela 2), com a maior prevalência observada entre os cães sem raça definida (54,1%), seguido por Shih-Tzu (7,7%), Pinscher (7,1%) e Pit bull (7,1%). Autores como Babo *et al.* (2020), Maciel, Silva e Santo (2021) e Cirino *et al.* (2021), relatam que os cães mais afetados pela infecção são aqueles de raça definida, com as raças Poodle e Shih-Tzu apresentando maior incidência. Neste contexto, é importante considerar a realidade socioeconômica dos tutores atendidos no Hospital Veterinário da UEM, cujos indicadores revelam níveis reduzidos de escolaridade e menor poder aquisitivo. Além disso, o predomínio de determinadas raças em regiões específicas também pode influenciar a predisposição à manifestação da doença.

Tabela 2. Distribuição das raças nos pacientes diagnosticados com *E. canis* no Hospital Veterinário da UEM, de novembro de 2022 a outubro de 2024.

RAÇAS	FA ¹ (N)	FR ²
American Bully	1	0,5%
Blue Heeler	3	1,5%

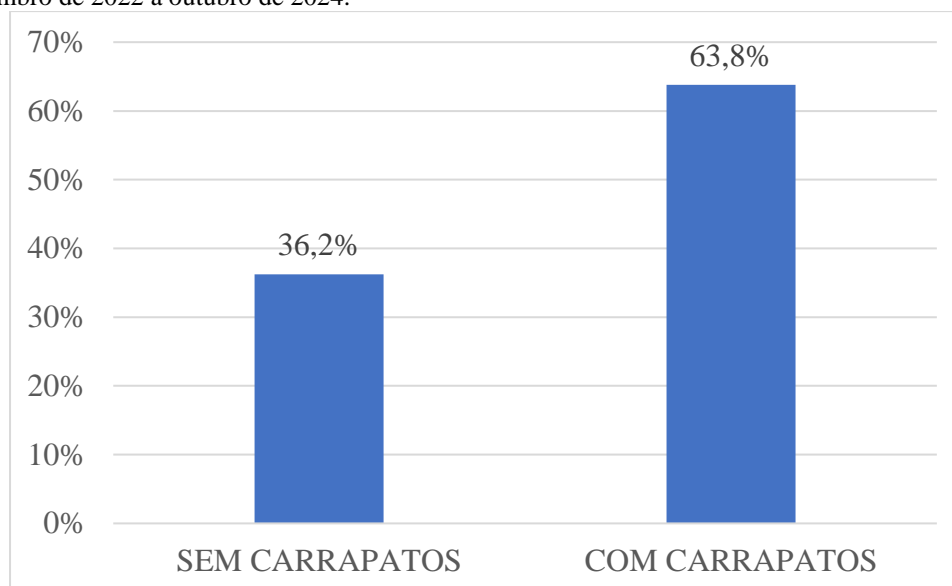
Border Collie	4	2,0%
Boxer	2	1,0%
Bulldogue Francês	2	1,0%
Chowchow	1	0,5%
Cocker Spaniel	1	0,5%
Golden Retriever	1	0,5%
Labrador Retriever	2	1,0%
Lhasa Apso	4	2,0%
Maltês	3	1,5%
Pastor Alemão	5	2,5%
Pequinês	1	0,5%
Pinscher	14	7,1%
Pit Monster	2	1,0%
Pit bull	14	7,1%
Poodle	3	1,5%
Rottweiler	7	3,5%
Shih-Tzu	15	7,7%
Spitz Alemão	1	0,5%
Sem Raça Definida	106	54,1%
Yorkshire Terrier	4	2,0%
Total	196	100,0%

Legenda: ¹Frequência Absoluta; ²Frequência Relativa

Fonte: arquivo pessoal, 2024.

A imagem 6 demonstrou que, dos 196 cães diagnosticados, 125 (63,8%) apresentavam histórico da presença de carrapatos antes ou no momento da consulta. Por outro lado, em 71 cães (36,2%) este dado não esteve presente ou o relato informava que não havia presença de ectoparasitos no paciente previamente à infecção. De acordo com Espino-Solís *et al.* (2023), a infestação por carrapatos está correlacionada com a distribuição e prevalência das hemoparasitoses, sendo que, em seu estudo, foi observado que cães com o ectoparasito possuem uma probabilidade 113 vezes maior de adquirir a EMC.

Imagem 6. Histórico de infestação por carrapatos nos pacientes diagnosticados com *E. canis* no Hospital Veterinário da UEM, de novembro de 2022 a outubro de 2024.



Fonte: arquivo pessoal, 2024.

Conforme observado por Almeida, Barbosa e Alvarez (2024), muitos tutores demonstram um desconhecimento em relação aos riscos associados aos ectoparasitos. Esse déficit de informação resulta em práticas inadequadas de métodos de profilaxia, que envolvem o uso correto de antiparasitários e a manutenção de um intervalo apropriado entre as aplicações.

Santos (2021b) destaca essa falha ao apontar que, embora muitos tutores afirmem realizar o controle de pulgas e carrapatos, a frequência desses procedimentos varia significativamente, com uma proporção considerável de tutores (37,7%) realizando o controle apenas a cada três meses. Essa irregularidade nas práticas de controle aumenta o risco de infecção por doenças transmitidas por vetores, como a erliquiose, uma vez que o intervalo inadequado entre as doses de antiparasitários compromete a eficácia da prevenção.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a EMC tem prevalência significativa no Hospital Veterinário da UEM, especialmente em cães adultos e idosos, e está fortemente associada ao histórico de infestação por carrapatos. Diferentemente de outros estudos, os dados indicam que o controle de vetores, mais do que a sazonalidade, pode estar relacionado à dinâmica da doença. Sugere-se que a implementação de medidas de controle antes dos períodos de maior incidência da doença, como o inverno e o verão, possa resultar em redução do número de casos anuais. Além disso, recomenda-se que pesquisas futuras investiguem a dinâmica populacional dos carrapatos e avaliem a eficácia de estratégias contínuas de controle parasitário em diferentes estações do ano.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. T. S.; BARBOSA, N. F.; ALVAREZ, G. M. Conhecimento dos tutores sobre ectoparasitas em cães e gatos na região do Sul de Minas Gerais. Pubvet, v. 18, n. 08, p. e1635-e1635, 2024. DOI: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v18n08e1635>
- BABO, A. M. S.; MACHADO, A.; BASTOS, E.; CARNEIRO, R. L.; SANTOS, R.; CÉZAR, S.; SOUZA, W. Estudo epidemiológico da erliquiose monocítica canina na cidade de Barreiras–Bahia. Pubvet, v. 14, p. 148, out. 2020. DOI: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v14n10a668.1-6>
- CARVALHO, J. P. S.; CALAZANS, A. P. F.; OLIVEIRA, G. M. S.; ALVES, L. F.; SANTOS, L. M.; SILVA, F. B.; MUNHOZ, A. D. Epidemiology of Ehrlichia canis: hematological and biochemical aspects, associated factors, and molecular features in healthy dogs in Porto Seguro, Bahia, Brazil. Semina: Ciência Agrária Londrina, v. 45, n. 3, p. 659-676, abr. 2024. DOI: 10.5433/1679-0359.2024v45n3p659
- CAXITO, M. S.; RODRIGUES, F. P.; TAQUES, I. I. G. G.; AGUIAR, D. M.; TAKAHIRA, R. K.; PAES, A. C. Alterações da medula óssea e a importância do mielograma no diagnóstico da ehrlichiose monocítica canina – Revisão. Veterinária e Zootecnia, v. 25, n.1, p. 061-066, dez. 2018. DOI: <https://doi.org/10.35172/rvz.2018.v25.37>
- CIRINO, R. N. V.; SANTOS, N. de J. P.; VIANA, M. K. R.; SANTOS, E. A.; GOMES, C. L. N.; CHAVES, D. P.; COIMBRA, V. C. S.; FONSECA, L. S. Perfil hematológico e parasitológico de cães suspeitos ou não para Erliquiose canina atendidos no Hospital Veterinário Universitário Francisco Edilberto Uchoa Lopes da Universidade Estadual do Maranhão entre os anos de 2019 a 2020 no município de São Luís. Brazilian Journal of Development, v. 7, n7, p. 69956–69974, jul. 2021. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n7-257>
- CLIMATEMPO. Climatologia e histórico de previsão do tempo em Umuarama, BR. 2024. Disponível em: <https://www.climatempo.com.br/climatologia/281/umuarama-pr>. Acesso em: 11 de janeiro de 2025.
- DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus. Parasites e Vectors, v. 3, n. 26, abr. 2010. DOI: 10.1186/1756-3305-3-26
- ESPINO-SOLÍS, G. P.; FLORES-LIRA, E. A.; BARRERAS-SERRANO, A.; GARCÍA-REYNOSO, I. C.; COVARRUBIAS, A. M.; VEJA, F. J.; ESCÁRCEGA-ÁVILA, A. Clinical and pathological factors associated with Ehrlichia canis in companion dogs. The Journal of Infection in Developing Countries, v. 17, n. 11, p. 1598–1160, jan. 2023. DOI: 10.3855/jidc.17961
- MACIEL, F. C. B.; SILVA, J. B. O.; SANTO, E. F. E. Estudo retrospectivo da infecção causada por Ehrlichia spp. Em cães de Manaus, Amazonas (2018-2020). Brazilian Journal of Animal and Environmental Research, v. 4, n. 2, p. 2056-2065, mar. 2021. DOI: 10.34188/bjaerv4n2-040.
- MATOS, R. W.; ROCHA-LIMA, A. B. C. Alterações hematológicas em cães diagnosticados com Erliquiose Monocítica Canina. Journal Health Science Institute, v. 39, n. 1, p. 24-8, 2021.

MIRANDA, L. M.; SOUZA, B. G.; MARTINS, J. T. A. Alterações hematológicas em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*. Pubvet, v. 16, n. 04, a1098, p. 1-7, abr. 2022. DOI: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v16n04a1098.1-7>

MONTEIRO, S. G. Parasitologia na medicina veterinária. 2nd ed. Rio de Janeiro: Roca, 2017.

SANTOS, D. M. Aspectos epidemiológicos e moleculares de *Ehrlichia canis* em cães domiciliados em municípios com diferentes altitudes no Estado do Rio de Janeiro. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Seropédica, 2021a.

SANTOS, M. A. Tutores e cuidados realizados com cães e gatos em Rio Verde – Goiás. 2021. Monografia (Graduação em Bacharelado de Zootecnia) – Instituto Federal Goiano, Rio Verde, 2021b.

SALES, M. R. R. P.; IGNACCHITI, M. D. C.; JUNIOR, A. F. M.; SUHETT, W. G.; PORFÍRIO, L. C.; MARINS, M.; APTEKMANN, K. P.; JÚNIOR, O. S. P. Prevalence of *Ehrlichia canis* using the nested-PCR, correlation with the presence of morulae and thrombocytopenia in dogs treated in Veterinary Hospital of the Federal University of Espirito Santo. Revista Brasileira de Medicina Veterinária, v. 37, n. 1, p. 47-51, mar. 2015.

SILVA, A. C. R.; GUIMARÃES, E. C.; CUNHA, G. N. Alterações hematológicas em cães infectados por *Ehrlichia* spp. no município de Patos de Minas – MG. Revista Animal em Foco, v. 3, p. 46-67, dez. 2023.

ZU, H.; XIANG, Z.; CAO, Q.; ZHANG, X.; LIN, Y.; YING, Z.; XIANG, H.; HAN, Q.; WANG, J. Prevalence of *Ehrlichia* spp. in dogs and ticks in Hainan province, China. BMC Veterinary Research, novembro. 2024. DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-5243221/v103/rs.3.rs-5243221/v1>