



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

DANIELY OLIVEIRA DO NASCIMENTO ROCHA

**Filarídeos em cães de uma área costeira turística do Estado de
Pernambuco**

RECIFE

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

DANIELY OLIVEIRA DO NASCIMENTO ROCHA

**Filarídeos em cães de uma área costeira turística do Estado de
Pernambuco**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Antonio do Nascimento Ramos

RECIFE

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- R672f Rocha, Daniely Oliveira do Nascimento
Filarídeos em cães de uma área costeira turística do Estado de Pernambuco / Daniely Oliveira do Nascimento Rocha. - 2024.
49 f. : il.
- Orientador: Rafael Antonio do Nascimento Ramos.
Inclui referências e anexo(s).
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2024.
1. *Dirofilaria immitis*. 2. *Cercopithifilaria bairnei*. 3. *Acanthocheilonema reconditum*. 4. Litoral. 5. Vetores.
I. Ramos, Rafael Antonio do Nascimento, orient. II. Título

CDD 636.089

DANIELY OLIVEIRA DO NASCIMENTO ROCHA

Filarídeos em cães de uma área costeira turística do Estado de Pernambuco

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Área de concentração: Biotecnologia na linha de pesquisa Microbiologia e Parasitologia Básica e Aplicada

Aprovado em 22 de fevereiro 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rafael Antonio do Nascimento Ramos (orientador)
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco

Profa. Dra. Márcia Paula Oliveira Farias (Membro Titular)
Universidade Federal do Piauí

Profa. Dra. Gílcia Aparecida de Carvalho (Membro Titular)
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco

A minha mãe, Eliane Ferreira; a
minha avó, Francisca de Barros
(*in memoriam*) por tanta
dedicação, empenho e amor.

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão a Deus pelo dom da vida, por ter me dado foco, força, fé, aprendizado, superação e por cada uma das pessoas que o senhor colocou ao longo dessa caminhada.

Infinidamente agradeço a minha mãe pelo privilégio de ser sua filha, por todo investimento, incentivo, pelos “puxões de orelha” por sempre acreditar na minha capacidade.

A minha família, pois vocês são meu abrigo, refúgio e alicerce. Não sei o que seria de mim, sem vocês. Em especial, a minha irmã Juliana Oliveira por todo suporte, companheirismo e disponibilidade; a Enilda Oliveira, a melhor tia do mundo, por quem eu tenho muita admiração. A Izabel Ribeiro e Alexandre Costa, meus primos do coração.

Ao meu marido Wilton Rocha, que ao longo desses 18 anos decidiu caminhar comigo lado a lado; e que esteve presente em todas as coletas e fazia o que era possível para colaborar. Grata a você por compartilhar diversos momentos e entender quando estive ausente.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Antonio do Nascimento Ramos, por toda paciência comigo, por sua orientação, atenção e disponibilidade.

Obrigada a todos do Laboratório de Parasitologia – LAPAR/UFPE por contribuírem com o projeto. Em especial, a Jéssica Pessoa, Samuel Souza e Lúcia Macedo, por tanta empatia e cooperativismo.

Não poderia deixar de registrar o meu agradecimento a Thyara Bezerra, pessoa única que esbanja alegria, simpatia e por ter sido um canal de comunicação para que eu chegasse ao mestrado; a José Carlos Wilson Anselmo e a Alex Marques, por todo suporte, apoio e amizade durante a execução do projeto.

Meu agradecimento, ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, pelo aprendizado, convívio com profissionais de diversas áreas e por todo acolhimento aos seus discentes.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), por fomentar a bolsa de estudo, que viabilizou a execução desse projeto.

RESUMO

Os filarídeos são parasitos nematódeos que acometem diferentes espécies de animais, incluindo cães domésticos, canídeos selvagens, felídeos domésticos e selvagens e humanos. Dentre as espécies de importância médico-veterinária que acometem os cães, destacam-se os gêneros *Dirofilaria* e *Acanthocheilonema*, com microfilárias encontradas no sangue; *Cercopithifilaria* que é detectada na pele. O objetivo desse estudo foi determinar a prevalência da infecção por filarídeos sanguíneos e dérmicos em cães residentes em uma área costeira turística do Estado de Pernambuco. De fevereiro a setembro de 2021, amostras de sangue (n = 245) foram coletadas e analisadas pelo método modificado de Knott para pesquisa de microfilárias circulantes, seguido do teste ELISA qualitativo (SNAP® 4Dx® Plus, IDEXX Laboratory, Westbrook, Maine, EUA) para detectar anticorpos contra *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Ehrlichia* spp. e antígenos de *Dirofilaria immitis*. Para pesquisa de microfilárias dérmicas foram incluídos neste estudo fragmentos de amostras de pele (n = 71) examinados microscopicamente e molecularmente por meio de PCR visando o gene 12S rDNA. Foram detectados em 24 animais (9,8%), microfilárias e antígeno de *D. immitis*, já anticorpos de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. apresentaram soroprevalência em 64 (23,2%) e 11 (4,5%) animais, respectivamente. No teste ELISA, 9 (3,7%) animais microfilarêmicos obtiveram resultados negativo. A coinfeção entre *D. immitis* e outros patógenos predominaram sobre infecções isoladas por *D. immitis* ($\chi^2 = 4,381$; $p = 0,0363$). Nenhum filarídeo foi detectado na pele após análises microscópicas e moleculares. Em quatro municípios diferentes foram encontrados cães positivos para *D. immitis*, incluindo dois (Cabo de Santo Agostinho e Ipojuca), nos quais há um intenso fluxo de animais e humanos atraídos pelas atividades turísticas dessas localidades. Os dados deste estudo demonstram que *D. immitis* é o principal filarídeo que infecta cães em áreas litorâneas no nordeste do Brasil. Medidas preventivas, como coleiras repelentes e compostos microfilaricidas devem ser usadas para prevenir a infecção canina associado ao manejo ambiental correto nessas áreas a fim de controlar as populações de vetores.

Palavras-chave: *Dirofilaria immitis*, *Cercopithifilaria bairdi*, *Acanthocheilonema reconditum*, Litoral, Vetores, Zoonose.

ABSTRACT

Filarids are nematode parasites affecting different animal species, including domestic dogs, wild canids, domestic and wild felids, and humans. Among the species of medical and veterinary importance affecting dogs, the genera *Dirofilaria* and *Acanthocheilonema* stand out, with microfilariae found in the blood and *Cercopithifilaria* detected on the skin. Blood-feeding arthropod vectors (e.g., mosquitoes, fleas, lice and ticks) transmit these parasites. This study aimed to determine the prevalence of blood and dermal filarial infection in dogs residing in a touristic coastal area of the State of Pernambuco. From February to September 2021, blood samples (n = 245) were collected and analyzed using the modified Knott method to search for circulating microfilariae, followed by the qualitative ELISA test (SNAP® 4Dx® Plus, IDEXX Laboratory, Westbrook, Maine, USA) to detect antibodies against *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Ehrlichia* spp. and *Dirofilaria immitis* antigens. Fragments of skin samples (n = 71) were included in this study, and microscopically and molecularly, they were examined using PCR targeting the 12S rDNA gene to research dermal microfilariae. Microfilariae and *D. immitis* antigen were detected in 24 animals (9.8%), as well as antibodies to *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. showed seroprevalence in 64 (23.2%) and 11 (4.5%) animals, respectively. In the ELISA test, 9 (3.7%) microfilaremic animals obtained negative results. Co-infection among *Dirofilaria immitis* and other pathogens predominated over isolated infections by *D. immitis* ($\chi^2 = 4.381$; $p = 0.0363$). No filarial was detected in the skin after microscopic and molecular analyses. Dogs positive for *D. immitis* were found in four different municipalities, including two (Cabo de Santo Agostinho and Ipojuca), where there is an intense flow of animals and humans attracted by tourist activities in these localities. Data from this study demonstrate that *D. immitis* is the main filarial nematode infecting dogs in northeastern Brazil's coastal areas. Preventive measures such as repellent collars and microfilaricidal compounds should be used to prevent canine infection associated with correct environmental management in these areas to control vector populations.

Keywords: *Dirofilaria immitis*, *Cercopithifilaria bairnei*, *Acanthocheilonema reconditum*, Coastal, Vectors, Zoonosis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 <i>Dirofilaria immitis</i>	17
2.1.1 Agente etiológico	17
2.1.2 Biologia	18
2.1.3 Epidemiologia	20
2.1.4 Patogenia e sinais clínicos	22
2.2 <i>Acanthocheilonema spp.</i>	24
2.2.1 Agente etiológico	24
2.2.2 Biologia	25
2.2.3 Epidemiologia	27
2.2.4 Patogenia e sinais clínicos	28
2.3 <i>Cercopithifilaria spp.</i>	29
2.3.1 Agente etiológico	29
2.3.2 Biologia	31
2.3.3 Epidemiologia	32
2.3.4 Patologia e sinais clínicos	35
2.4 Métodos diagnósticos	35
2.4.1 Técnica de Knott modificado	35
2.4.2 Gota espessa	36
2.4.3 Análise do sedimento de fragmentos de pele	36
2.4.4 Testes imunológicos	37
2.4.5 Métodos moleculares	38
2.6 Profilaxia	41
3. OBJETIVOS	44

3.1 Geral	44
3.2 Específicos	44
4. REFERÊNCIAS	45
5. CAPÍTULO I	58
5.2 Material and Methods	61
5.2.1. Study area	61
5.2.2. Blood and skin sampling	61
5.2.3. Microscopic examination of blood and skin	62
5.2.4. ELISA test and molecular examination of the skin	62
5.2.5. Data analysis and maps creation	62
5.3. Results	63
5.4. Discussion	66
Acknowledgements	67
5.7. References	80
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
7. ANEXOS - Normas de submissão de manuscrito na revista Acta Parasitologica	85
7. ANEXOS - Artigo publicado na revista Acta Parasitológica	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL	Alagoas
AHS	American Heartworm Society
AM	Amazonas
BA	Bahia
cm	Centímetro
ELISA	Enzyme Linked Immunonorbent Assay
EUA	Estados Unidos da América
IgG	Imunoglobulina G
µm	Micrômetro
MG	Minas Gerais
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MS	Mato Grosso do Sul
MT	Mato Grosso
PA	Pará
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Pernambuco
PR	Paraná
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RJ	Rio de Janeiro
RO	Rondônia
RPM	Rotações por minuto
rRNA	Ácido Nucleíco Ribossomal
SC	Santa Catarina
SE	Sergipe

SIBBr Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira

SP São Paulo

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1- Dimorfismo sexual da <i>Dirofilaria immitis</i>	17
Figura 2 - Ciclo da <i>Dirofilaria immitis</i>	19
Figura 3 - Microfilária de <i>Acanthocheilonema reconditum</i> . (A) região cefálica, (B) gancho cefálico (cabeça de seta), (C) cauda em gancho (seta).....	25
Figura 4. Piolhos mastigadores. (A) <i>Heterodoxus spiniger</i> . (B) <i>Linognathus setosus</i>	26
Figura 5. Pulgas. (A) <i>Ctenocephalides canis</i> . (B) <i>Ctenocephalides felis</i> . (C) <i>Echidnophaga gallinacea</i> . (D) <i>Pulex irritans</i> . (E) <i>Pulex simulans</i>	26
Figura 6. Ciclo biológico de <i>Acanthocheilonema reconditum</i>	27
Figura 7. Microfilária de <i>Cercopithifilaria baina</i> e.....	30
Figura 8. Estágios de desenvolvimento de <i>Cercopithifilaria baina</i> e. (A) Larvas de 1º estágio de desenvolvimento (DL1). (B) Larvas de 2º estágio (L2). (C) Larvas tardias de segundo estágio (LL2). (D) Larvas infectantes de 3º estágio (L3).....	31
Figura 9. Ciclo biológico de <i>Cercopithifilaria baina</i> e.....	32
Figura 10. Diferenças morfológicas entre as principais microfilárias de cães. (A). <i>Acanthocheilonema reconditum</i> . (B) <i>Dirofilaria immitis</i> . (C) <i>Cercopithifilaria baina</i> e.	36

CAPÍTULO I

Figure 1 - Study area: map of Brazil indicating the state of Pernambuco and municipalities where animals were sampled.....	61
---	----

LISTA DE QUADROS

REVISÃO DE LITERATURA

Quadro 1 - Classificação sistemática de <i>Dirofilaria immitis</i>	18
Quadro 2 - Classificação sistemática de <i>Acanthocheilonema reconditum</i>	25
Quadro 3 - Classificação sistemática de <i>Cercopithifilaria bairnei</i>	29
Quadro 4 - Profiláticos parasiticidas para cães.....	42

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Infecções por <i>Dirofilaria immitis</i> em cães no Brasil nos últimos 13 anos.....	20
Tabela 2. Sinais Clínicos observados na dirofilariose canina de acordo com o grau de comprometimento animal	23
Tabela 3. Prevalência de infecção por <i>Acanthocheilonema reconditum</i> no Brasil.....	27
Tabela 4. Distribuição mundial de <i>Cercopithifilaria</i> spp.....	33
Tabela 5. Diferenças morfométricas e morfológicas das principais microfilárias em cães..	37

CAPÍTULO 1.

Table 1. Frequency of positive dogs in the modified Knott's test and ELISA test for <i>Dirofilaria immitis</i> , <i>Ehrlichia</i> spp. and <i>Anaplasma</i> spp.	64
Table 2 Distribution of <i>Dirofilaria immitis</i> antigen and microfilariae positive dogs according to the municipality of sampling.....	65

1 INTRODUÇÃO

Filarídeos são parasitos nematódeos pertencentes a Ordem Spirurida, Superfamília Filarioidea e Família Onchocercidae (Taylor et al., 2017), localizam-se em diferentes órgãos do hospedeiro definitivo e apresenta ciclo biológico caracterizado pela liberação de microfírias na circulação, são ingeridos e transmitidos por hospedeiro intermediário hematófago (Kannenberg et al., 2019). Dentre as diversas espécies de importância médico-veterinária, aquelas pertencentes aos gêneros *Dirofilaria*, *Acanthocheilonema* e *Cercopithifilaria* são as mais importantes para os caninos (Otranto et al., 2013). O gênero *Dirofilaria* atingem carnívoros, insetívoros e marsupiais em todo o mundo (Pampiglione et al., 1997); *Acanthocheilonema* acometem cães domésticos e outros carnívoros selvagens (Schwan, Schroter, 2006); já *Cercopithifilaria* infecta uma variedade de hospedeiros definitivos, incluindo primatas, carnívoros e ungulados (Eberhard, 1980).

Dirofilaria immitis está distribuída pela América do Sul, América Central, Caribe e América do Norte (Maggi, Krämer, 2019). É a espécie de filarídeo mais importante para os cães em virtude de sua relevância patológica e ampla distribuição geográfica (Simón et al., 2012; Gomes et al., 2012). Apesar da ampla prevalência em cães domésticos, este nematódeo tem sido descrito infectando canídeos selvagens, felinos domésticos e selvagens e humanos (Colwell, Dantas-Torres, Otranto, 2010; Otranto et al., 2013). Este filarídeo é transmitido por culicídeos, e no Brasil os gêneros *Aedes* e *Culex* são os mais importantes (Dantas-Torres, Otranto, 2020). Clinicamente, os cães acometidos apresentam lesões cardiovasculares, pulmonares, hepáticas e renais (Jang et al., 2015), com graves complicações que podem levar o animal a morte (Simón et al., 2012), além de possuir importante caráter zoonótico (Smith et al., 2015).

Outro importante filarídeo de distribuição cosmopolita é *Acanthocheilonema reconditum* (Napoli, et al., 2014). Transmitido por piolhos (*Heterodoxus spiniger*, *Linognathus setosus*, *Trichodectes canis*) (Engelmann et al., 2019), pulgas (*Ctenocephalides canis*, *Ctenocephalides felis*, *Echidnophaga galinacea*, *Pulex irritans* e *Pulex simulans*) e carrapatos (*Rhipicephalus sanguineus* sensu lato) (Brianti et al., 2012), são considerados pouco patogênicos. Embora pouco frequente, existem relatos de manifestações dermatológicas como eritema, pápulas ou alopecia multifocal nos animais infectados (López et al., 2012). Em áreas endêmicas para *D.*

immitis, a infecção por *A. reconditum*, é importante devido a possibilidade de equívoco no diagnóstico, uma vez que microfilárias de ambas espécies são detectadas no sangue circulante e sua diferenciação morfológica tem sido considerado um desafio (Magnis et al., 2013; Bowman, 2014).

Apesar da importância dos filarídeos em que as microfilárias estão presentes no sangue de caninos (*Dirofilaria* e *Acanthocheilonema*), recentemente atenção tem sido dada também a espécie em que as microfilárias estão presentes na pele como o gênero *Cercopithifilaria* (Mutafchiev et al., 2013). O gênero *Cercopithifilaria* é representado por três espécies de importância para caninos: *Cercopithifilaria grassii*, *Cercopithifilaria binae* e uma terceira espécie designada como *Cercopithifilaria* sp. II (Otranto et al., 2012). Devido sua ampla distribuição, espécie *C. binae* tem sido mais estudada e sabe-se que a transmissão ocorre via carrapatos do grupo *R. sanguineus* s.l (Otranto et al., 2011; Brianti et al., 2012). *C. binae* foi descrito inicialmente no Rio de Janeiro (Almeida, Vicente, 1984), e mais recentemente foi registrado no Nordeste (Ramos et al., 2016; Santos et al., 2017; Santos et al, 2018) e Centro-Oeste do país (Soares, 2020). Considerado de menor relevância patogênica, existem relatos de dermatite (Otranto et al., 2012; Boyd et al., 2019), poliartrite (Gabrielli et al., 2014) e mais recentemente foi associada a presença de um nódulo cutâneo em cão (Soares et al., 2020). Diferentemente dos filarídeos anteriormente citados, o diagnóstico de *C. binae* se dá pela visualização de larvas presentes em fragmentos de pele, que são embebidos em solução fisiológica e as microfilárias são liberadas neste material (Otranto et al., 2013).

A diversidade destes filarídeos em diferentes áreas geográficas no mundo estão correlacionadas à disponibilidade de hospedeiros definitivos, a possibilidade de serem parasitados pelos hospedeiros intermediários e às condições ambientais de multiplicação vetorial (Kannenbergh et al., 2019). Nos últimos anos, a intensa mobilidade global de animais de estimação dentro e entre países percorrendo grandes distâncias geográficas foram reconhecidos como uma preocupação veterinária e de saúde pública global, causando disseminação de vetores e infecções potencialmente zoonóticas em novas áreas (Tiffin et al., 2022).

A região costeira do estado de Pernambuco é considerada historicamente endêmica para *D. immitis* e *A. reconditum* (Alves et al., 1999; Labarthe et al., 2014), entretanto não tem sido observado relatos de filarídeos dérmicos. Apesar da ausência

da notificação de casos, a condição climática do local favorece a proliferação de carrapatos (Ramos et al., 2016), logo a presença simultânea de filarídeos sanguíneos e dérmicos não pode ser descartada. Desta forma, objetivou-se neste estudo determinar a prevalência da infecção por filarídeos sanguíneos e dérmicos em cães residentes em uma área costeira do Estado de Pernambuco.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Dirofilaria immitis*

2.1.1 Agente etiológico

Dirofilaria immitis é um nematódeo filarídeo em que fêmeas podem medir até 30 cm de comprimento, apresenta estrias transversais cuticulares, e extremidade cefálica levemente afilada e arredondada. Os machos possuem de 12 a 20 cm, com a cauda em espiral, e ânus em posição subterminal (Furtado et al., 2010; Genchi et al., 2014). As fêmeas são vivíparas e após a cópula, liberam larvas de 1º estágio (microfilárias) circulantes que possuem aproximadamente de 300 a 310 µm de comprimento (Figura 1).

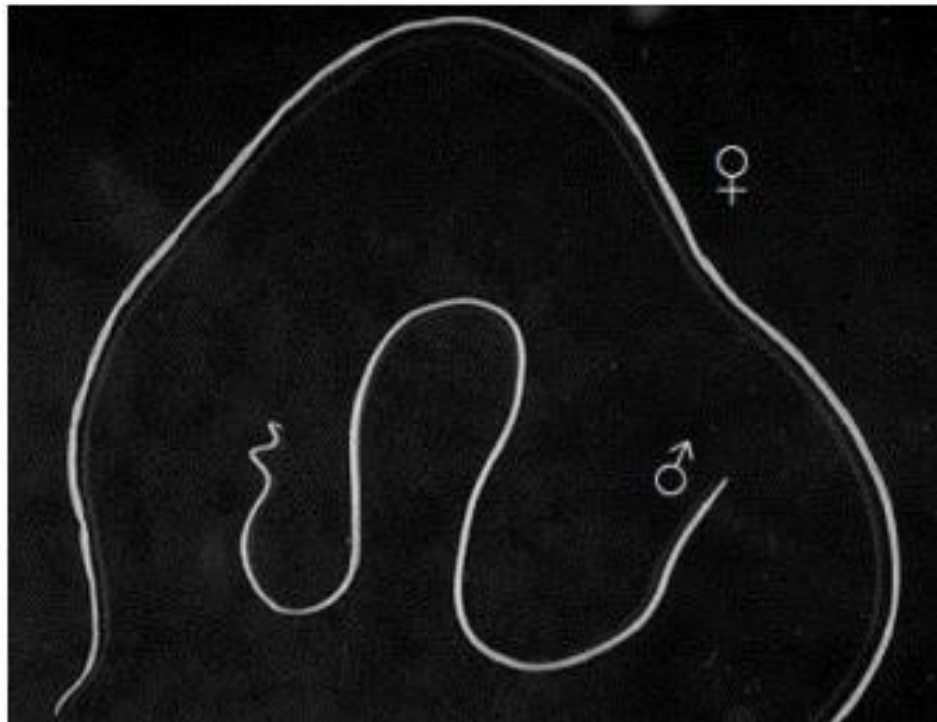


Figura 1. Dimorfismo sexual de *Dirofilaria immitis*. Fonte: (Pacheco 2016).

A extremidade anterior da microfilária é fusiforme e a posterior afilada e reta

(Song et al., 2009). O Quadro 1 detalha a classificação sistemática deste parasito.

QUADRO 1. Classificação sistemática de *Dirofilaria immitis* segundo Furtado et al. (2010).

Reino	Animalia
Filo	Nematoda
Classe	Secernentea
Subclasse	Spiruria
Ordem	Spirurida
Superfamília	Filaroidea Weiland (1958)
Família	Onchocercidae Leiper (1911)
Subfamília	Dirofilarinae Sandground (1921)
Gênero	<i>Dirofilaria</i> Railliet, Henry (1911)
Espécie	<i>Dirofilaria immitis</i> Leidy (1856)

2.1.2 Biologia

Dirofilaria immitis é transmitido por vetores pertencentes a família Culicidae. Sabe-se que aproximadamente 70 espécies de culicídeos são capazes de infectar-se com *D. immitis*, entre eles os gêneros *Aedes*, *Culex*, *Anopheles*, *Mansonia*, *Psorophora*, *Ochlerotatus*, *Amigeres* e *Coquillettidia* foram descritos como potenciais vetores (Vieira, 2019). Especificamente no Brasil infecções naturais por larvas infectantes (L3) foram detectadas nas espécies, *Aedes taeniorhynchus* e *Aedes scapularis*, além de *Culex quinquefasciatus* tem sido considerado importantes vetores (Ogawa et al., 2013). Em estudo experimental comprovou que *Aedes Albopictus*, *Aedes aegypti* e *C. quinquefasciatus* como potencial vetor da *D. immitis* no Recife (Carvalho et al., 2013).

O ciclo biológico deste parasito é complexo com período pré-patente variando de 6 a 9 meses (Kotani, Power, 1982). No entanto, características como a reação

imunológica, condições ambientais como, temperatura e umidade e características genéticas entre populações de *D. immitis* podem ser fatores que afetam a capacidade vetorial dos culicídeos (Christenssen, 1977). Após a ingestão da microfilária circulante pelo mosquito vetor, ocorre em seus túbulos de Malpighi, o desenvolvimento de L1 a L3. O tempo necessário do desenvolvimento no mosquito é temperatura-dependente, e em condições com temperatura de 27°C e umidade relativa de 80%, ocorre entre 10 a 14 dias. Após atingirem a fase L3, as larvas migram dos túbulos de Malpighi para a probóscide do mosquito e, durante novo repasto sanguíneo, as larvas infectantes são depositadas sobre a pele do hospedeiro vertebrado penetrando ativamente no orifício da picada (Kotani, Power, 1982). As larvas infectantes (L3) também dependem de condições climáticas para se desenvolverem (8 a 10 dias a 28-30°C, 11 a 12 dias a 24°C, e 16 a 20 dias a 22°C). Temperaturas inferiores a 14°C, provocam a suspensão do desenvolvimento das larvas de *D. immitis* nos mosquitos, no entanto, pode ser retomado assim que as condições ambientais sejam favoráveis (Morchón et al., 2012). No hospedeiro vertebrado, entre três e nove dias pós-exposição as larvas passam para o quarto estágio (L4). Após 50 a 70 dias, uma última muda ocorre, transformando L4 em L5 (adultos jovens), que alcançarão o ventrículo direito e artéria pulmonar (Figura 2) (Bowman, 2014; Taylor et al., 2017).

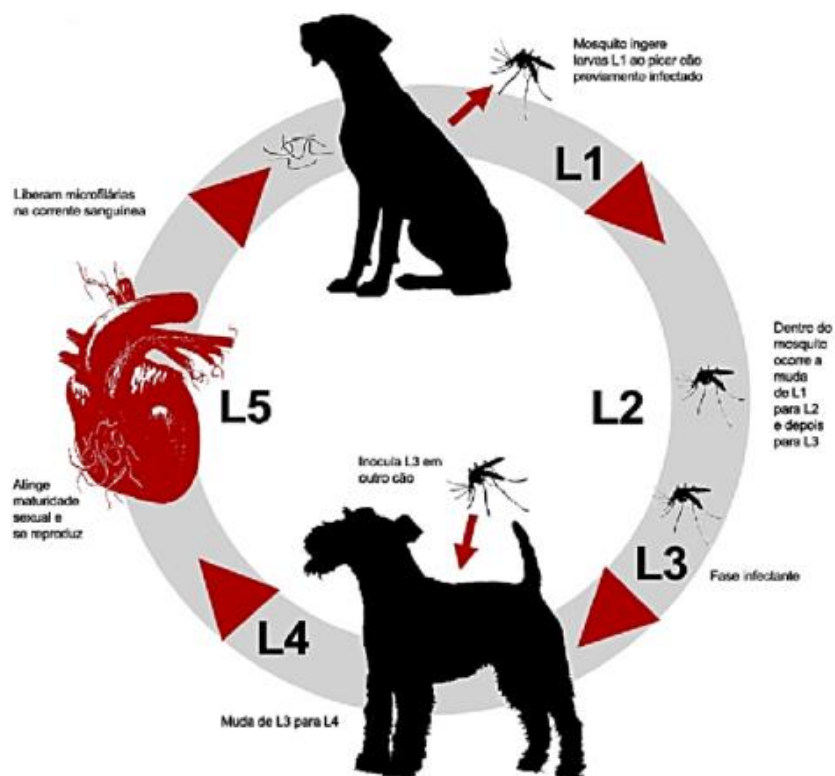


Figura 2. Ciclo da *Dirofilaria immitis*. Fonte: Adaptado de Cicarino, (2009).

Os canídeos domésticos e silvestres (raposas, lobos, coiotes, furões) são as principais espécies afetadas por *D. immitis* (Alho et al., 2014; Taylor et al., 2017), seguidas por felinos domésticos (gatos domésticos) e silvestres (gatos selvagens no Norte da Flórida) (Luria et al., 2004; Alberigi et al., 2020) e ocasionalmente humanos e primatas (Velez et al., 2019; Gabrielli et al., 2021) além de cavalos, leões-marinhos e castores (Alho et al., 2014; Taylor et al., 2017).

2.1.3 Epidemiologia

Com o passar dos anos a dirofilariose canina vem passando por mudanças em relação a sua distribuição e prevalência (Labarthe et al., 2014). Descrita originalmente em áreas litorâneas, atualmente existem relatos cada vez mais frequentes no interior do Brasil, decorrentes do aumento da temperatura, modificações ambientais, como expansão imobiliária, e migração de animais de áreas endêmicas a áreas com presença de vetores competentes (Sebolt, 2020). Por ser uma doença de transmissão vetorial, existe uma forte influência das alterações climáticas, principalmente umidade e temperatura (Morchón et al., 2012). Nesse sentido, as mudanças climáticas causadas pelo aquecimento global, que propiciam a proliferação dos vetores encurtaram o desenvolvimento extrínseco dos estágios infecciosos e prolongou a temporada de transmissão em áreas onde originalmente não existiam a presença de vetor durante todo o ano, como em regiões temperadas (Genchi, Kramer, 2020). Além disso, a distribuição da doença pode ser influenciada por outros fatores, como o aumento global da mobilidade de animais reservatórios de áreas endêmicas e alterações ambientais causadas por atividades humanas, como as culturas agrícolas e urbanização (Genchi, Kramer, 2020).

Nas Américas a dirofilariose por *D. immitis* encontra-se amplamente distribuída desde os Estados Unidos até Argentina, apresentando prevalências médias variando de 1 a 40%. No Brasil, existe uma ampla variação na prevalência de 1 a 62% (Tabela 1).

Tabela 1. Infecções por *Dirofilaria immitis* em cães no Brasil nos últimos 13 anos.

Regiões	Cidade (Estado)	Prevalência (%)	Método de diagnóstico	Referência
Centro-Oeste	Cuiabá (MT)	1	Necropsia	RAMOS et al. (2015)
	Campo Grande (MS)	5	Knott modificado PCR	SOARES (2020)
Nordeste	Lauro de Freitas (BA)	20,3	Deteção de antígeno	LABARTHE et al. (2014)
	Salvador (BA)	20	Deteção de antígeno	LABARTHE et al. (2014)
	Itamaracá (PE)	49,5	Deteção de antígeno	LABARTHE et al. (2014)
	Recife (PE)	11,54	Knott modificado	RAMOS et al. (2016)
	Garanhuns (PE)	5,5	Deteção de antígeno	DE MACEDO et al. (2022)
Norte	Recife (PE)	12,9	Deteção de antígeno	RAMOS et al. (2022)
	Ilha de Marajó (PA)	32,5	Knott modificado PCR	FURTADO et al. (2009)
	Porto Velho (RO)	7,9	Deteção de antígeno PCR Esfregaço espesso de sangue	OGAWA (2013)
Sudeste	Lábrea (AM)	44,4	PCR	SOARES et al. (2014)
	Bertioga (SP)	7,6	Deteção de antígeno	LABARTHE et al. (2014)
	Guarujá (SP)	2,8	Deteção de antígeno	LABARTHE et al. (2014)
	Armação de Búzios (RJ)	62,2	Deteção de antígeno	LABARTHE et al. (2014)
	Cabo Frio (RJ)	27,5	Deteção de antígeno	LABARTHE et al. (2014)
	Mangaratiba (RJ)	16,3	Deteção de antígeno	LABARTHE et al. (2014)
	Niterói (RJ)	58,6	Deteção de antígeno	LABARTHE et al. (2014)
	Rio de Janeiro (RJ)	7	ELISA (SNAP 4DX [®])	MENDES-DE-ALMEIDA et al. (2021)
Sul	Guaraqueçaba (PR)	31,8	Deteção de antígeno	LABARTHE et al. (2014)
	Guaratuba (PR)	24,5	Deteção de antígeno	LABARTHE et al. (2014)
	Araquari (SC)	2,1	Deteção de antígeno	LABARTHE, et al. (2014)
	Florianópolis (SC)	12	Deteção de antígeno	LABARTHE et al. (2014)
	Laguna (SC)	4,62	PCR	SEBOLT (2020)

2.1.4 Patogenia e sinais clínicos

A gravidade das lesões e as conseqüentes manifestações clínicas estão relacionadas a carga parasitária, assim como a duração da infecção e a interação parasito-hospedeiro (Atkins, 2010). No início da infecção o animal apresenta-se assintomático, e os sinais surgem com a evolução da doença que se caracteriza por danos vasculares. Sinais clínicos comumente exibidos por cães infectados são tosse crônica, dispneia, fraqueza, intolerância ao exercício, síncope, anorexia, perda de peso, ascite ou sons cardíacos alterados (Ames, Atkins, 2020). As formas mais graves caracterizam-se por perda de peso, insuficiência da valva tricúspide, insuficiência cardíaca direita, distensão abdominal e hepatoesplenomegalia. O surgimento dos sinais clínicos normalmente está relacionado com a chegada dos parasitos imaturos aos pulmões ou à morte dos nematódeos adultos (Jericó, Andrade Neto, Kogika, 2019).

O dano ao endotélio pulmonar e a oclusão vascular pela morte do parasito reduzem o débito cardíaco. A hipertensão pulmonar resultante pode levar ao aumento compensatório do lado direito do coração e progredir para insuficiência cardíaca direita. Embora não seja frequente, pode ocorrer uma obstrução súbita do fluxo sanguíneo através dos pulmões causados por grande número de adultos nas artérias pulmonares. Esta forma de bloqueio caracteriza uma manifestação aguda da dirofilariose e é chamada de síndrome da veia cava (Bowman, Atkins, 2009; Simón et al., 2012; Ames, Atkins, 2020).

Ainda observa-se a ocorrência de edema celular endotelial e alargamento das junções intercelulares, levando ao aumento da permeabilidade vascular pulmonar. A oclusão vascular ocorre de maneira gradual, permitindo que o suprimento de oxigênio seja compensado através da circulação pulmonar colateral. Por esta razão, infarto pulmonar é incomum nesses casos e obstruções de vasos por parasitos vivos não costumam ter conseqüências clínicas graves, exceto em animais com alta carga parasitária. O aumento da permeabilidade vascular culmina em extravasamento e edema peri arterial (Bowman, Atkins, 2009; Nelson, Couto, 2009).

O dano ao parênquima pulmonar, ocasiona quadros de pneumonite eosinofílica, que é decorrente da destruição de microfilárias pelo sistema imune do hospedeiro, seguida por reação inflamatória local. A formação de granulomas pulmonares pela morte e aprisionamento de parasitos no parênquima pulmonar é

menos comum em animais, mas é considerada uma lesão característica em humanos (Hoch, Strickland, 2008). Nos cães, o deslocamento dos parasitos mortos e suas partículas originam tromboembolismo pulmonar e infarto que podem levar a óbito (Meireles, Paulos, Serrão, 2014).

Imunocomplexos que se formam em resposta aos antígenos (Oleaga et al., 2009) podem induzir glomerulonefrite acompanhada de proteinúria e, mais raramente, insuficiência renal (Aresu et al., 2007). A congestão hepática leva a hemoglobinúria, provocada pela insuficiência da válvula tricúspide, logo, evolui para insuficiência hepática, levando ao aumento da fragilidade dos eritrócitos, que ao serem destruídos liberam hemoglobina (Jacobs et al., 2015).

Atualmente sabe-se que a patologia da dirofilariose está relacionada também a presença da bactéria endossimbiótica *Wolbachia* spp. (Salgueiro, 2016). Após tratamento adulticida os títulos de anticorpos anti-*Wolbachia* aumentam, sugerindo que o contato do sistema imunológico com a bactéria ocorre depois da morte do parasito (Morchón et al., 2012). Em órgãos onde acontece a destruição de microfilárias, incluindo o rim, há resposta inflamatória através da produção *in situ* de IgG específicas contra *Wolbachia* (Alho et al., 2014). De acordo com a American Heartworm Society, o paciente canino com dirofilariose pode apresentar diferentes níveis de manifestações clínicas e baseado no estadiamento apresenta diferentes classificações, como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Sinais clínicos observados na dirofilariose canina de acordo com o grau de comprometimento animal (AHS, 2018).

SINAIS CLÍNICOS	GRAU
Assintomático ou tosse	Leve
Tosse, intolerância ao exercício, ruídos pulmonares anormais	Moderado
Tosse, intolerância ao exercício, dispneia, sons cardíacos e pulmonares anormais, hepatomegalia, síncope, ascites, morte	Severo
Início súbito de letargia e fraqueza grave, acompanhado de hemoglobinemia e hemoglobinúria	Síndrome da veia cava

2.2 *Acanthocheilonema* spp.

2.2.1 Agente etiológico

O gênero *Acanthocheilonema* possui três espécies que infectam cães: *A. reconditum*, *Acanthocheilonema dracunculoides*, e uma espécie não descrita relatado no sangue de cães em Ladhak, descoberta inicialmente por meio de triagem microscópica, posteriormente a Multiplex PCR em etapa única possibilitou a identificação de um único amplicon correspondente *Acanthocheilonema*, no norte da Índia (Megat Abd Rani et al., 2010; Rani, 2011).

Acanthocheilonema reconditum é frequentemente descrita, encontrada nos tecidos subcutâneos perirrenal e cavidade peritoneal de cães (Leite et al., 2012). Os adultos machos medem cerca de 13 mm de comprimento e as fêmeas 17 a 32 mm. Após o acasalamento, as fêmeas fecundadas originam microfírias, que podem ser encontradas principalmente na circulação sanguínea periférica dos cães. As microfírias de *A. reconditum* tem em média cerca de 250 - 270 μm de comprimento e 4 - 4,5 μm de largura, com um corpo arredondado e curvado, gancho cefálico distinto e uma extremidade anterior arredondada (Figura 3) (Leite et al., 2012). A classificação taxonômica da *A. reconditum* é descrita no Quadro 2.

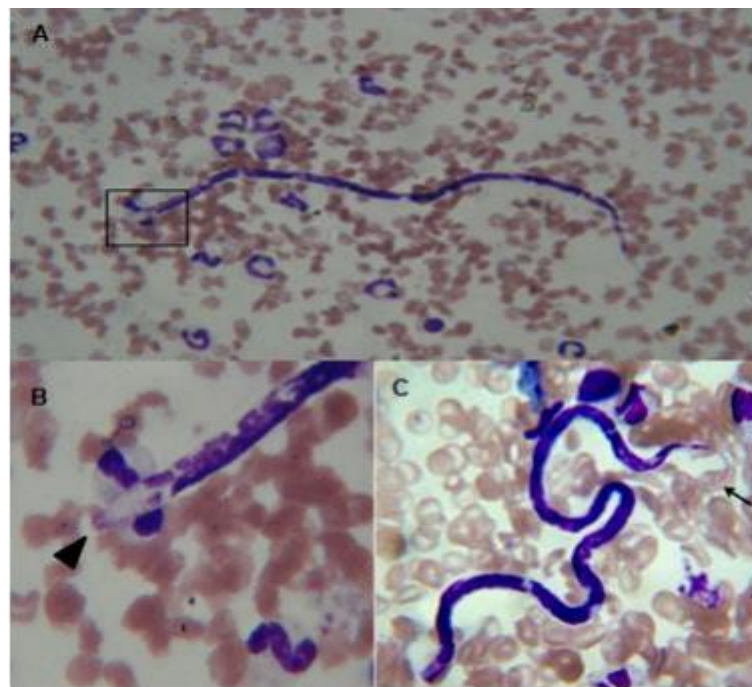


Figura 3. Microfíria de *Acanthocheilonema reconditum*. (A) região cefálica, (B) gancho cefálico (cabeça de seta), (C) cauda em gancho (seta). Fonte: Gomes et al. (2012).

QUADRO 2. Classificação sistemática de *Acanthocheilonema reconditum* segundo Napoli et al., (2014).

Reino	Animalia
Filo	Nematoda
Classe	Secernentea
Ordem	Spirurida
Superfamília	Filarioidea
Família	Onchocercidae
Sub-família	Onchocercinae
Gênero	<i>Acanthocheilonema</i>
Espécie	<i>Acanthocheilonema reconditum</i> (Grassi 1889)

2.2.2 Biologia

Formas infectantes (L3) de *A. reconditum* foram encontrados em diferentes espécies de artrópodes que destacam-se como hospedeiros intermediários e vetores competentes para este filarídeo, por exemplo, os piolhos mastigadores *H. spiniger* e *L. setosus* (Figura 4) (Nelson, 1962; Pennington, Phelps, 1969) e as pulgas *C. canis*, *C. felis*, *E. gallinacea*, *P. irritans* e *P. simulans* (Figura 5) (Lewis, 1890; Calandruccio, 1892; Newton, Wright, 1956; Pennington, 1971; Korkejian, Edeson, 1978; Brianti et al., 2012; Napoli et al., 2014).



Figura 4. Piolhos mastigadores. (A) *Heterodoxus spiniger*. Fonte: Torres-Chales et al. (2017) (B) *Linognathus setosus*. Fonte: Kohler-Aanesen et al. (2017)

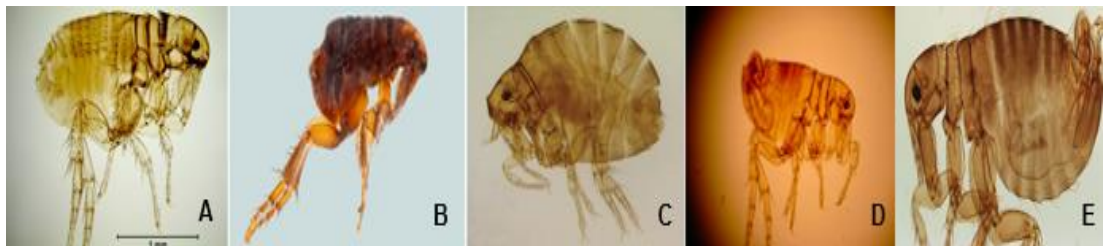


Figura 5. Pulgas. (A) *Ctenocephalides canis*. Fonte: (Saari, Näreaho, Nikanderl 2018). (B) *Ctenocephalides felis*. Fonte: (Seraydar, Kaufmann 2014). (C) *Echidnophaga gallinacea*. Fonte: Koehler, Pereira, Kaufman, 2009. (D) *Pulex irritans*. Fonte: Buckland, Sadler 1989. (E) *Pulex simulans*. Fonte: BYU, 2021.

Após a infecção do vetor, as microfilárias se desenvolvem em L3 na hemocele destes ectoparasitos. Posteriormente, ocorre a migração para o aparelho bucal e infecção do novo hospedeiro vertebrado após o repasto sanguíneo. No tecido subcutâneo do cão, a L3 se desenvolve em L4 e L5, quando então ocorre a diferenciação entre macho e fêmea. Posteriormente, ocorrerá a cópula e formação de microfilárias, que irão novamente para a circulação sanguínea (Figura 6) (Engelmann et al., 2019).

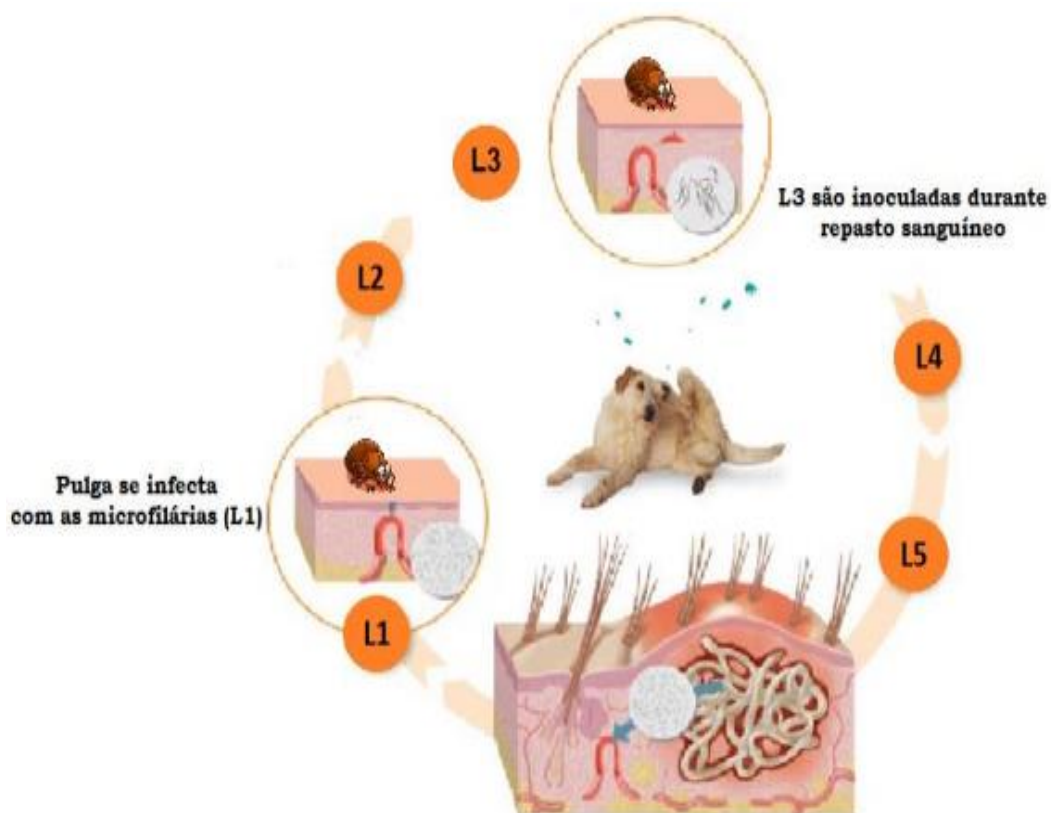


Figura 6. Ciclo biológico de *Acanthocheilonema reconditum*. Fonte: Soares 2020.

2.2.3 Epidemiologia

Acanthocheilonema reconditum é descrito na Ásia, África, América, Oceania e Europa (Otranto et al., 2013; Mendoza-Roldan et al., 2020). Nas Américas, a maioria das informações são da América do Norte e em menor extensão, na América do Sul, em países como Brasil, Chile, Costa Rica e Colômbia (Dantas-Torres, Otranto, 2020; Espinosa et al., 2020). No Brasil ainda é subestimado o percentual de cães microfilarêmicos e/ou portadores de formas adultas de *A. reconditum*, devido à escassez em número de publicações (Leite et al., 2012). As informações sobre prevalência de *A. reconditum* no Brasil estão contidas na Tabela 3.

Tabela 3. Prevalência de infecção por *Acanthocheilonema reconditum* no Brasil.

Regiões	Cidade (Estado)	Prevalência	Diagnóstico	Referência
Centro- oeste	Cuiabá (MT)	0,6%	Knott modificado	FERNANDES et al. (1999)
Nordeste	Recife (PE)	6,9%	Knott modificado	ALVES et al. (1999)
	Maceió (AL)	1,3%	Knott modificado	BRITO et al. (2001)
	São Cristovão (SE)	16,7%	Knott modificado	SILVA et al. (2017)
Norte	Anajá (PA)	2,86%	PCR	DE ARGÔLO et al. (2018)
	Chaves (PA)	17,86%	PCR	DE ARGÔLO et al. (2018)
	Portel (PA)	3,01%	PCR	DE ARGÔLO et al. (2018)
	São Sebastião da Boa Vista (PA)	14,0%	PCR	DE ARGÔLO et al. (2018)
	Soure (PA)	9,93%	PCR	DE ARGÔLO et al. (2018)
Sudeste	Uberlândia (MG)	1 Caso	Esfregaço sanguíneo	GOMES et al. (2012)
Sul	Antonina, Guaratuba, Guaraqueçaba, Ilha de Leste, Ilha das Peças, Ipanema, Montinhos, Morretes, Pontal do sul, Praia do Mel, Shangrilá (PR)	22,6%	Teste de filtração	REIFUR, THOMAZ-SOCCOL, MONTIANI-FERREIRA (2004)
	Guaratuba (PR)	7,10%	Knott modificado	LEITE et al. (2012)

2.2.4 Patogenia e sinais clínicos

Acanthocheilonema spp. é considerado pouco patogênico e normalmente são diagnosticados acidentalmente (Leite et al., 2012). Infecções provocadas por este gênero apresentam manifestações dermatológicas como eritema, prurido, pápulas, focais ou alopecia multifocal (López et al., 2012). Há relatos na literatura de granuloma cutâneo causado por *Acanthocheilonema* spp. diagnosticado através de exames citológicos e histopatológicos (Palacios et al., 2020).

Os nematódeos adultos de *A. reconditum* penetram na pele e podem se manifestar como pequenos nódulos subcutâneos, raramente dolorosos ou com coceira (Day, 2016). No entanto, é importante realizar o diagnóstico diferencial de vários tipos de lesões cutâneas e subcutâneas de origem etiológica desconhecida para identificar e assim diferenciar as lesões de origem inflamatória, neoplásica ou mista por meio de análise citológica (Dzimira, Przada, 2020). Animais parasitados por *A. reconditum*, já tem sido identificados casos que apresentaram elevada eosinofilia e aumento da contagem leucocitária, anemia hemolítica e distúrbios a nível renal e hepático (Leite et al., 2012).

Casos acometidos por *A. dracunculoides*, foram detectadas alterações dermatológicas como prurido, alopecia, úlceras na pele, além de efusão pleural, dispneia e alterações neurológicas (Muñoz et al., 2020).

2.3 *Cercopithifilaria* spp.

2.3.1 Agente etiológico

O gênero *Cercopithifilaria* sp. acomete muitas espécies de vertebrados como primatas, ungulados e carnívoros, incluindo os cães. Este parasito é transmitido para seus hospedeiros vertebrados por carrapatos ixodídeos da espécie *R. sanguineus* s.l (Eberhard, 1980; Otranto et al., 2012). Este gênero compreende 28 espécies de filárias das quais três acometem o tecido subcutâneo de cães: *C. grassi*, *C. baina*e e *Cercopithifilaria* sp. II (Otranto et al., 2011, 2012, 2013). *C. baina*e, a mais comum das espécies reportada em cães, foi originalmente descrita com base em espécimes isolados de cães no Brasil (Almeida, Vicente, 1985), e estudada na Itália através da utilização de métodos clássicos e moleculares (Otranto et al., 2013). A classificação taxonômica da *C. baina*e é descrita no Quadro 3.

QUADRO 3. Classificação sistemática de *Cercopithifilaria binae* segundo Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira - SIBBr (2020).

Reino	Animalia
Filo	Nematoda
Classe	Secernentea
Ordem	Spirurida
Família	Onchocercidae
Gênero	<i>Cercopithifilaria</i>
Espécie	<i>Cercopithifilaria binae</i> Almeida & Vicente 1984.

As fêmeas de *C. binae* possuem entre 14 -19 mm de comprimento e os machos 9,0 -12,0 mm de comprimento. São encontrados nos tecidos subcutâneos e tecidos adiposos perirrenais dos cães infectados (Otranto et al., 2013). Já as microfíliarias presentes na derme possuem em média $180,2 \pm 2,3 \mu\text{m}$ de comprimento e $4,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$ de largura (Figura 7), com extremidade anterior arredondada, corpo achatado dorsoventralmente e cutícula espessa com estrias transversais (Otranto et al., 2013; Ramos et al., 2014).



Figura 7. Microfíliaria de *Cercopithifilaria binae*. Fonte: (Soares 2020).

2.3.2 Biologia

Sabe-se que este parasito é transmitido vetorialmente por *R. sanguineus* s.l (Brianti et al., 2012; Ramos et al., 2013). Em infecção experimental, o desenvolvimento larval foi detalhadamente analisado em carrapatos (Brianti et al., 2012). As larvas internas aos carrapatos foram classificadas em quatro diferentes tipos de desenvolvimento com base em suas características morfométricas (Figura 8): larvas de primeiro estágio em desenvolvimento (DL1), larvas de segundo estágio (L2), larvas tardias de segundo estágio (LL2) e larvas infectantes de terceiro estágio (L3) (Brianti et al., 2012). Outras espécies de carrapatos como *Ixodes ricinus* também foram avaliados como potenciais vetores, mas sem sucesso (Ramos et al., 2013). Recentemente, o DNA de *C. binae* foi detectado em *Rhipicephalus haemaphysaloides* na Índia, o que sugere que carrapatos de diferentes espécies ou gêneros podem ser potenciais vetores deste nematódeo (Bezerra-Santos et al., 2022).

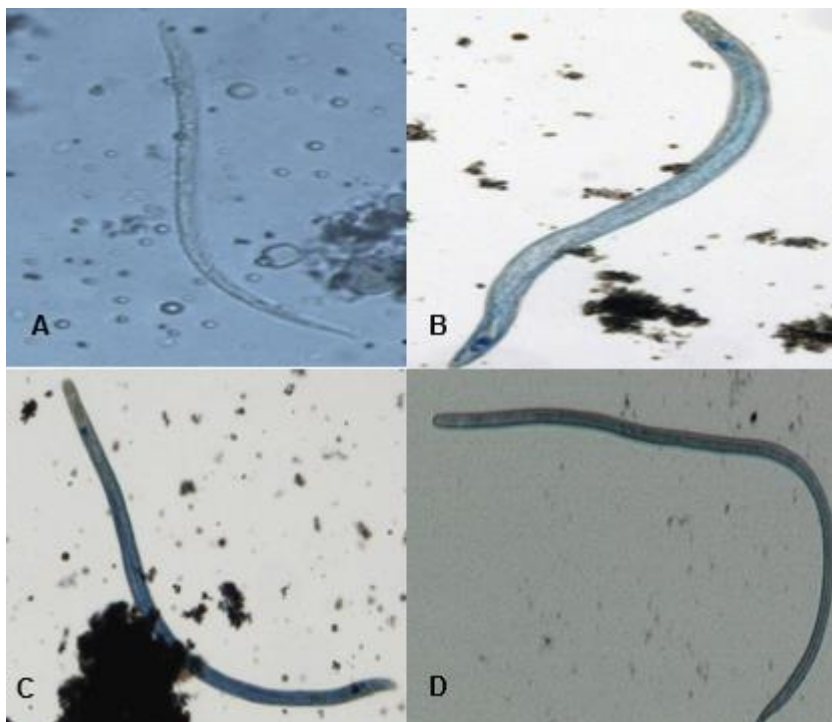


Figura 8. Estágios de desenvolvimento de *Cercopithifilaria binae*. (A) Larvas de 1º estágio de desenvolvimento (DL1). (B) Larvas de 2º estágio (L2). (C) Larvas tardias de segundo estágio (LL2) (fase de transição que precede o 3º estágio) antes da muda. (D) Larvas infectantes de 3º estágio (L3). Fonte: Brianti et al. (2012).

O ciclo de vida envolve larvas infectantes (L3) sendo inoculadas pelo carrapato. As L3 residem na derme do cão, onde se tornam adultas e reproduzem-se, gerando as microfilárias. O ciclo é concluído quando os carrapatos ingerem as microfilárias presentes na derme, enquanto se alimentam nos cães (Figura 9) (Brianti et al., 2012; Otranto et al., 2012; Santos et al., 2017).

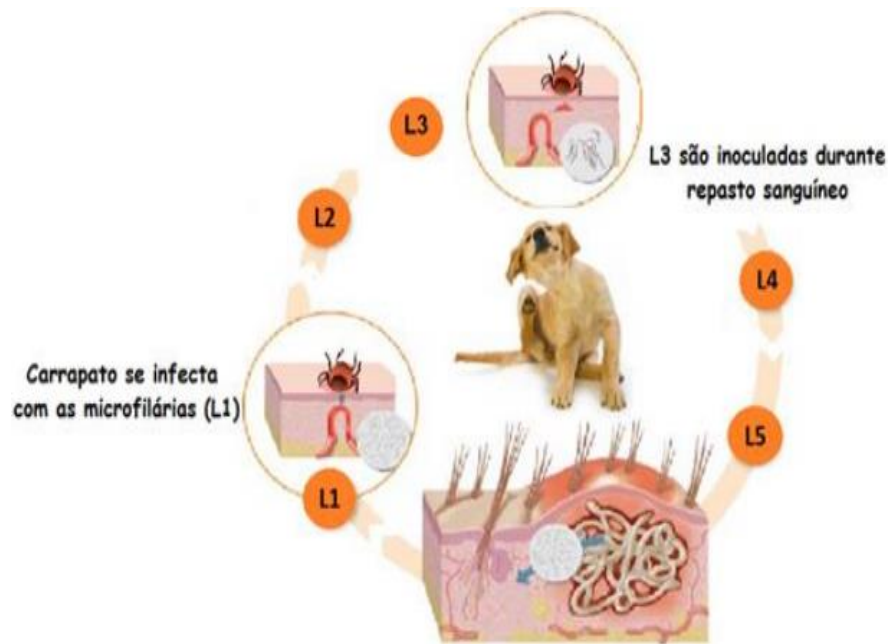


Figura 9. Ciclo biológico de *Cercopithifilaria baina*. Fonte: Soares 2020.

2.3.3 Epidemiologia

Há registros de *Cercopithifilaria* spp. em cães em diversas regiões do mundo como nos continentes Asiático, Europeu e Americano (Bezerra-Santos, 2022; Otranto et al., 2012; Cortes et al., 2014; Ionică et al., 2014; Boyd et al., 2019; Rojas et al., 2015; Latrofa et al., 2014; Ramos et al., 2016; Santos et al., 2017; Santos et al., 2018; Soares, 2020). Na América do Sul, o primeiro relato de *Cercopithifilaria* spp. foi descrito no Rio de Janeiro (Almeida, Vicente, 1984).

A tabela 4 demonstra a distribuição mundial de *Cercopithifilaria* spp.

Tabela 4. Distribuição mundial de *Cercopithifilaria* spp.

País	Cidade (Estado)	Cães		Carrapatos		Referência
		Exame microscópico	Análise molecular	Exame microscópico	Análise molecular	
		Prevalência (%)	Prevalência (%)	Prevalência (%)	Prevalência (%)	
Ásia						BEZERRA-SANTOS et al. (2022)
	Índia	-	-	-	9,5%	
Brasil						
	Rio de Janeiro (RJ)	1 cão	-	-	-	ALMEIDA, VICENTE (1984)
	São Vicente Férrer, (PE)	-	-	-	3 carrapatos	LATROFA et al. (2014)
	Recife, (PE)	1 cão	1 cão	-	-	RAMOS et al. (2016)
	Garanhuns, (PE)	-	-	-	2,68%	SANTOS et al. (2017)
	Garanhuns, (PE)	-	-	-	0,93%	SANTOS et al. (2018)
	Campo Grande, (MS)	-	1 cão	-	-	SOARES (2020)
Costa Rica						
	San Ramón, Alajuela	-	1 cão	-	-	ROJAS et al. (2015)

Estados Unidos	Flórida		1 cão	-	-	BOYD et al. (2019)*
Espanha						
	La Vera	21,60%	45,40%	16,70%	-	OTRANTO et al. (2012)
Grécia						
	Xanthi	4,30%	-	6,40%	0,50%	OTRANTO et al. (2012)
Itália						
	Bari	-	13,60%	-	-	OTRANTO et al. (2012)
	Ginosa	-	5,30%	-	-	
	Putignano	-	12,50%	-	3,90%	
	Basilicata	12%	-	5,20%	2,60%	
	Sicília	13,30%	19,50%	15,10%	2,60%	
Portugal						
	Algarve	9,80%	-	-	-	CORTES et al. (2014)
Romênia						
	Delta do Danúbio	-	1 cão	-	-	IONICĂ et al. (2014)

*Trabalho publicado por Boyd et al. (2019) revelou resultados por meio de avaliação histopatológica

2.3.4 Patologia e sinais clínicos

Infecções por *Cercopithifilaria* spp. sugerem que este gênero pode causar alterações dermatológicas edematosas focais no tecido epidérmico e subdérmico, além de dermatite intersticial perivascular caracterizada pela presença de neutrófilos, eosinófilos e linfócitos (Otranto et al., 2012).

Este parasito tem sido associado à poliartrite crônica, encontrado no líquido sinovial da articulação escápulo-umeral de um animal infectado (Gabrielli et al., 2014). Entretanto, ainda não está claramente elucidado se a infecção por *C. bairnei* afeta a resposta imunológica do cão em relação a outros patógenos transmitidos por carrapatos ou vice-versa, facilitando a infecção por estes agentes durante a picada do carrapato (Ramos et al., 2014).

Condição dermatológica foi associada à infecção primária por *C. bairnei* em um cão da Flórida, Estados Unidos, apresentando histórico com presença de placas eritematosas e úlceras na cabeça. Na avaliação histopatológica, o animal apresentava quadro eosinofílico a dermatite perivascular linfo-histiocítica com múltiplos microgranulomas e rara infecção por microfilárias de *C. bairnei* (Boyd et al., 2019).

Em Campo Grande, Mato Grosso do Sul a *C. bairnei* foi encontrada e associada a nódulos dérmicos menores que 1 cm. Portanto, ao se tratar de alterações dermatológicas como, dermatites e pápulas foi investigada a infecção por *Cercopithifilaria*. Animais com acesso a rua foram significativamente associados a infecção pelo parasito devido a maiores chances de exposição a potenciais vetores no ambiente associando a ocorrência por *R. sanguineus* na mesma região, sendo assim o estudo reforça a importância da competência vetorial (Soares, 2020).

2.4 Métodos diagnósticos

A análise microscópica pode ser realizada por técnicas que se fundamentam na detecção de microfilárias presentes no sangue ou na pele (Silva, Langoni, 2009; Ramos et al., 2016).

2.4.1 Técnica de Knott modificado

Esta técnica é caracterizada por ser um método de concentração, cuja vantagens são o diagnóstico fácil, rápido e de baixo custo. Para a realização deste teste é utilizado 1 ml de sangue total, ao qual é adicionado 9 ml de água em um tubo

de centrifugação. Posteriormente o material é centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante resultante é eliminado, e a partir do sedimento são confeccionadas lâminas, que após secagem é corada pelo método de coloração rápida e observado em microscópio ótico (Magnis et al., 2013).

Por apresentar uma sensibilidade elevada quando comparada as técnicas de observação direta do sangue no microscópio, permite diferenciar as espécies de microfilárias presentes no sangue através da avaliação morfométrica (Landum, 2013; Trancoso, 2017).

2.4.2 Gota espessa

Dentre os métodos diretos, a gota espessa é a técnica não concentrante mais satisfatória, seguida do Knott. Dentre as vantagens, apresenta baixo custo além de ser rápido, por não necessitar de centrifugação. A técnica consiste na disposição de gotas de sangue com anticoagulante entre lâminas e lamínulas que serão visualizadas na objetiva de 10x e 40x. Entretanto, não é satisfatória no que diz respeito a diferenciação da morfologia das espécies de filárias (Gomes et al., 2012; Leite et al., 2012; Pegado et al., 2019).

2.4.3 Análise do sedimento de fragmentos de pele

As microfilárias dérmicas podem ser analisadas por exame microscópico do sedimento de fragmentos cutâneos. Os recortes de pele são imersos em solução salina por cerca de 6 horas em temperatura ambiente e todo o sedimento deve ser examinado microscopicamente em diferentes aumentos (100x e 400x) (Otranto et al., 2012; Ramos et al., 2016). As diferenças morfométricas e morfológicas (Figura 10) das microfilárias e das principais espécies de filarídeos sanguíneos e dérmicos de ocorrência no Brasil, de acordo com Ramos et al. (2016), é reportado na Tabela 5.

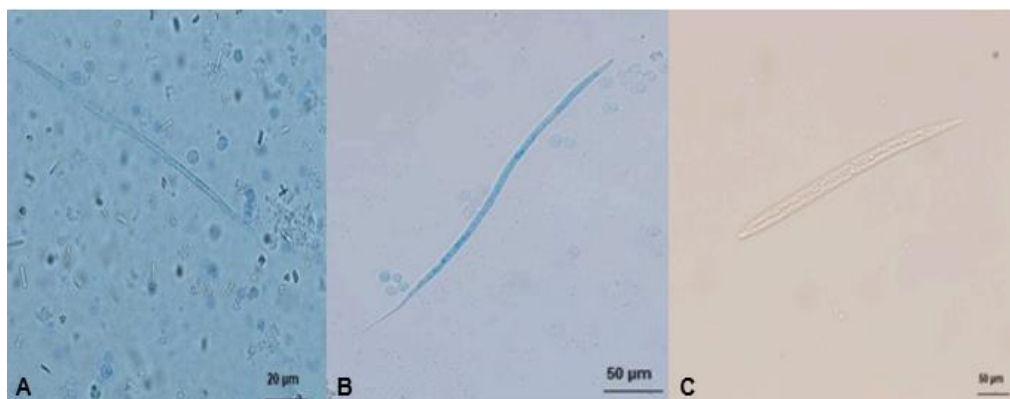


Figura 10. Diferenças morfológicas entre as principais microfilárias de cães. (A). *Acanthocheilonema reconditum*. (B) *Dirofilaria immitis*. (C) *Cercopithifilaria baina*.
Fonte: Gruntmeir et al. (2023).

Tabela 5. Diferenças morfométricas e morfológicas das principais microfilárias em cães.

Espécie	Comprimento e largura	Características morfológicas
<i>Dirofilaria immitis</i>	301,2 μm (\pm 7,6); 5,9 μm (\pm 0,8)	Extremidade frontal cônica; extremidade posterior reta
<i>Acanthocheilonema reconditum</i>	272,3 \pm 4,3 μm e 4,1 \pm 0,3 μm	Corpo arredondado e curvado; gancho cefálico; extremidade anterior romba
<i>Cercopithifilaria baina</i>	180,2 \pm 2,3 μm e 4,6 \pm 0,2 μm	Corpo achatado dorso-ventralmente; cutícula espessa com estrias transversais

2.4.4 Testes imunológicos

O método imunoenzimático (ELISA) detecta antígenos de dirofilárias em circulação e têm provado ser clinicamente útil, sendo capaz de identificar a maioria das infecções ocultas (presença de helmintos adultos, porém sem microfilárias em circulação) que possuam pelo menos uma fêmea (AHS, 2018).

Os testes imunocromatográficos rápidos são recomendados para detecção de antígeno de parasitos adultos de *D. immitis*, são considerados altamente específicos e não apresentam reatividade cruzada com outros parasitos como *D. repens* e *Acanthocheilonema* spp. (Mccall et al., 2008). Os kits comerciais disponíveis baseiam-se em ensaios imunológicos que detectam antígenos circulantes do aparelho reprodutor da fêmea do parasito (Nelson, Couto, 2010).

Com relação à pesquisa de antígenos, imunocomplexos antígenos-anticorpos podem interferir no resultado dos testes comerciais disponíveis, isso porque o antígeno ligado a um complexo imunológico pode não está disponível para detecção. Deve-se suspeitar dessa possibilidade principalmente quando o resultado negativo difere da clínica apresentada pelo animal (Digangi, 2017)

Os testes de antígeno detectam o parasito após 7 a 8 meses pós infecção e o

nível de antígeno existente está diretamente relacionado com o número de fêmeas presentes (Smith et al., 2015). Embora mínima, existe a possibilidade de ocorrência de falso-negativos e falso-positivos. Os falso-negativos podem ocorrer devido a presença exclusiva de parasitos machos, fêmeas imaturas, falha no seguimento das instruções dos kits de teste e infecções leves. Os resultados dos testes de antígeno devem ser interpretados com cautela, levando em conta outras informações médicas relevantes (AHS, 2014).

A utilização de lactonas macrocíclicas, como a moxidectina injetável de ação lenta (ProHeart®), apesar de ter seu efeito microfilaricida comprovado (Bowman et al., 2017; Mctier et al., 2017), em cães portadores da infecção é apontada como possível causa de redução da sensibilidade dos testes. Haveria aumento na produção de anticorpos específicos pelo hospedeiro, o que reduziria a quantidade de antígenos livres disponíveis para serem detectados pelos testes e assim os resultados seriam falsos negativos (Little et al., 2014; Drake et al., 2015). Para obter resultados confiáveis e reprodutíveis, a prova de antígeno deve ser realizadas em conformidade com as instruções do fabricante.

O teste de diagnóstico rápido SNAP 4Dx® detecta antígenos circulantes de *D. immitis* (Henry et al., 2018), desta forma, esta ferramenta de diagnóstico não permite detecção para espécies de microfilárias dérmicas, como *Acanthocheilonema* spp. e *Cercophthiphilaria* spp.

2.4.5 Métodos moleculares

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma ferramenta molecular que têm sido usada para identificação de espécies de filarídeos (Otranto et al., 2011). Nos últimos anos tem-se desenvolvido métodos moleculares para identificação de filarídeos que permite um diagnóstico com maior sensibilidade e especificidade (Mccall et al., 2008). No método PCR multiplex podem ser detectadas simultaneamente diferentes espécies de filárias comuns que infectam cães, como *D. immitis* e *D. repens*, *A. reconditum* e *Cercophthiphilaria* sp. tanto nos vetores como nos hospedeiros vertebrados, tornando-se uma ferramenta importante em levantamentos epidemiológicos de áreas endêmicas (Latrofa et al., 2012). No geral, têm como alvo a detecção de uma sequência parcial do gene subunidade 1 da enzima citocromo oxidase mitocondrial (cox1 DNAm) (Ferri et al., 2009) e 12S rRNA, de

Acanthocheilonema spp., *Cercopithifilaria* spp., e *Dirofilaria* spp. (Otranto et al., 2011).

Apesar da PCR ser considerada uma técnica de alto custo, a caracterização molecular de filarídeos tem se mostrado uma ferramenta de extrema importância, pois auxiliam na identificação desses parasitos, no conhecimento sobre mecanismos de ação e resistência de alguns fármacos utilizados no tratamento de filarídeos (Genchi et al., 2007). Além desta técnica, a PCR multiplex também pode ser utilizada para detectar e diferenciar simultaneamente os filarídeos caninos (Latrofa et al., 2012).

A PCR multiplex padronizada reduz o custo com reagentes, o tempo de processamento e o risco de contaminação, possibilitando também a detecção específica de duas espécies de filarídeos mais comuns de cães, sendo importante tanto para estudos epidemiológicos, como para diagnóstico em áreas de co-infecção (Gioia et al., 2010).

A PCR multiplex realizada em DNA é capaz de detectar níveis baixos para microfilarías dérmicas de *A. reconditum*; *D. repens* e para *D. immitis*, sendo capaz de representar um método útil para a discriminação simultânea, bem como para um diagnóstico rápido de filarídeos caninos incluindo *Cercopithifilaria* sp. (Latrofa et al., 2012).

Em estudo, ao comparar os métodos PCR duplex e qPCR em tempo real para detecção de *D. immitis* e *D. repens*, notou-se que a primeiro ensaio molecular citado, tem a vantagem de detectar amostras positivas com concentração mais baixa, encontrado um limite inferior de detecção, respectivamente de $(8,0 \times 10^{-6} \text{ mf}/\mu\text{l})$, $(2,4 \times 10^{-4} \text{ mf}/\mu\text{l})$. Ainda assim, o presente método tem a vantagem de detectar outros filarídeos com um único par de primers e separá-los com base em suas curvas de dissociação de alta resolução (HRM-curvas), o que torna menos trabalhoso na triagem de um grande número de cães. Uma limitação do método é o uso de uma amostra positiva como ponto de partida da curva padrão, desta forma exige a extrapolação de valores de microfílaemia acima da curva (Rojas et al., 2015).

A abordagem molecular desenvolvida utilizando tecnologias TaqMan multiplex qPCR representa uma melhora no diagnóstico da filariose canina, bem como a detecção do endossimbionte *Wolbachia* a nível de sangue canino. Além disso, a implementação de um ensaio qPCR triplex é altamente sensível e específico para identificação de formas ocultas (Laidoudi et al., 2020).

2.5 Tratamento

Para o tratamento da *D. immitis* a American Heartworm Society (AHS) recomenda o uso de doxiciclina associado a uma lactona macrocíclica antes do regime de três doses de melarsomina (não é comercializada no Brasil) para o tratamento em cães aparentemente saudáveis, mas infectados. O uso de lactonas macrocíclicas isoladamente como adulticida de morte lenta não é recomendado. O tromboembolismo pulmonar é uma consequência inevitável da terapia com adulticidas, porém esta complicação pode ser reduzida restringindo o exercício durante o período de recuperação (30-40 dias) acrescentado da administração de glicocorticoides, como prednisolona, que é rotineiramente dosado em 0,5 mg/kg durante a 1ª semana e 0,5 mg/kg uma vez ao dia durante a 2ª semana, seguido em 0,5 mg/kg em dias alternados durante 1-2 semanas (AHS, 2018).

Embora os protocolos de “slow-kill” não sejam recomendados pelo American Heartworm Society (Nelson et al, 2018), em áreas como o Brasil onde a prevalência de dirofilariose é substancial, protocolos alternativos que consiste no uso das lactonas macrocíclicas mensais associadas ao ciclo de doxiciclina e até mesmo de corticoesteróides para reduzir a inflamação causada pelo verme adulto e pela bactéria do gênero *Wolbachia* devem ser considerados para uso compassivo sob critério veterinário para fornecer tratamento de cães infectados com dirofilariose (Alberigi et al., 2020).

A intervenção cirúrgica é aconselhada quando várias microfilárias deslocam-se para a câmara cardíaca direita, produzindo o início súbito da síndrome da veia cava (Simón et al., 2012). A terapia adulticida é recomendada algumas semanas após a cirurgia para eliminar as larvas restantes (AHS, 2018).

A eficácia no tratamento adulticida é confirmado com a realização do teste de antígeno para dirofilariose, após 6 meses de tratamento espera-se a morte das formas adultas (Maxwell et al., 2014).

Apesar de não possuir fármacos específicos para o tratamento de *A. reconditum* estudo demonstra a eficácia na administração spot-on associada de moxidectina 2,5% com imidaclopramida 10% na eliminação de larvas infectantes (Traversa et al., 2013). Há relato na literatura de um cão diagnosticado com granuloma cutâneo por microfilária de *Acanthocheilonema* spp. que obteve excelente resultado com o

tratamento cirúrgico e clínico prescrito com anti-inflamatório e analgésico (Palacios et al., 2022).

Nenhum tratamento está disponível contra os parasitos do gênero *Cercopithifilaria*. No entanto, notou-se que no caso em que microfírias de *C. bairnei* foram encontradas em líquido sinovial de um cão com poliartrite crônica, tratamento com 2 ciclos de anti-inflamatórios, sendo o primeiro administrado Meloxicam na dose de 0.1 mg/kg (Metacam, Boehringer Ingelheim, Germany); o segundo ciclo com Robenacoxib 1 mg/kg (Onsior, Novartis, USA), respectivamente e com a evolução positiva do quadro clínico, o animal foi tratado com Prednisona na dose de 1mg/kg (Vetsolone, Bayer, Italy) por 10 dias, resultou em recuperação parcial temporária. Porém 7 meses após o início do tratamento em virtude de complicações o cão foi tratado especificamente com milbemicina oxima (Milbemax, Novartis, Switzerland), administrado por via oral na dose de 0,5mg/kg, uma vez a cada 7 dias por 3 semanas, entretanto não resultou em melhora clínica (Gabrielli et al., 2014).

Nos Estados Unidos, cão com alteração dermatológica teve o quadro clínico sanado após ser submetido ao tratamento com spot-on composta por formulação de imidacloprida e moxidectina (Boyd et al., 2019). Em Mato Grosso do Sul, paciente canino com cisto cutâneo gigante infectado por *C. bairnei* foi recomendado ressecção do cisto gigante e posteriormente foi tratado com ivermectina por duas semanas e o quadro clínico foi completamente sanado (Soares et al., 2020).

2.6 Profilaxia

A prevenção da infecção por *D. immitis* é realizada através do uso de quimioterápicos pertencentes a classe das lactonas macrocíclicas, como ivermectinas, milbemicina, oxima, moxidectina e selamectina, que devem ser iniciados antes da oitava semana de vida, principalmente em áreas endêmicas. Posteriormente, a oitava semana de vida, cães expostos ao ar livre e sem proteção em áreas com alta endemicidade, devem ser testados seis meses após a dose inicial, seguido por testes anuais. Antes de iniciar a prevenção em cães a partir dos sete meses de idade ou mais, recomenda-se a realização de teste de antígeno e de microfírias circulantes, esta conduta garante a detecção da infecção subclínica, evitando assim a dúvida da eficácia do programa de prevenção, particularmente quando a infecção pré-existente só se torna evidente após o início da terapêutica preventiva, em casos em que a

quimioprofilaxia foi iniciada durante o período pré-patente (AHS, 2018).

Em regiões altamente endêmicas é indicado a adição de produtos repelentes e ectoparasiticida, apesar de serem úteis não são completamente eficazes quando utilizado como única ferramenta na prevenção da dirofilariose em regiões endêmicas (AHS, 2018).

Para *Acanthocheilonema* spp. é recomendado evitar o contato com pulgas e piolhos, pois o controle das pulgas e piolhos malófagos deve ser realizado periodicamente. As principais formas de prevenção e controle são contra os hospedeiros intermediários, podendo ser realizada no animal utilizando coleira repelente, por aplicação direta no animal e no ambiente. Para as pulgas o mais eficiente é o controle ambiental. Para *Cercopithifilaria* spp. a melhor estratégia contra esse filarídeo é proteger os cães contra infestações por carrapatos, usando substâncias pertencentes ao grupo dos organofosforados por serem eficientes, porém eles não impedem que o invertebrado entre em contato com o cão, apenas o matam após hematofagia (Leite et al., 2012; Coelho, Soares, Ramos, 2020).

Existem diversos fármacos que podem ser utilizados como medicação profilática, podendo ser administradas por via oral e tópica (Labarthe et al., 2015; Moraes-da-Silva et al., 2016; Bowman et al., 2017). O quadro 4 reporta os fármacos preventivos para cães de acordo Soares (2022).

Quadro 4. Profiláticos parasiticidas para cães de acordo Soares (2022).

Nome Comercial	Princípio Ativo	Duração	Apresentação	Via de Administração
Frontmax	Fipronil, Piriproxifen e Permetrina	8 meses	Coleira	Tópico
Leevre	Deltametrina e Pro- poxur	6 meses	Coleira	Tópico
Seresto	Imidacloprida e Flumetrina	6 meses	Coleira	Tópico
Nexgard Spectra	Afoxolaner e Milbemicina oxima	Mensal	Comprimido	Oral
Milbemax	Milbemicina Oxima e Praziquantel	Mensal	Comprimido	Oral
Endogard/Top Dog/Vermivet Iver/Canex Premium/ Zenprox	Febantel, Pirantel, Praziquantel e Ivermectina	Mensal	Comprimido	Oral
Mectimax	Ivermectina	Semanal	Comprimido	Oral
Advocate	Imidacloprida e Moxidectina	Mensal	Pipeta	Tópico
Advantage Max 3	Imidacloprida e Permetrina	Mensal	Pipeta	Tópico
Vectra 3D	Dinotefuran, Piriproxifen e Permetrina	Mensal	Pipeta	Tópico
Revolution	Selamectina	Mensal	Pipeta	Tópico
ProHeart	Moxidectina	Anual	Injetável	Subcutâneo

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Determinar a prevalência da infecção por filarídeos sanguíneos e dérmicos em cães residentes em uma área costeira turística do Estado de Pernambuco.

3.2 Específicos

Caracterizar morfológicamente microfilárias de filarídeos;

Caracterizar molecularmente diferentes espécies de filarídeos que acometem os cães na área de estudo;

Avaliar as possíveis coinfeções entre filarídeos e outros patógenos transmitidos por vetores;

Obter dados epidemiológicos sobre as infecções por filarídeos em cães residentes na Região Metropolitana do Recife e Litoral Sul do Estado de Pernambuco.

4. REFERÊNCIAS

AHS-AMERICAN HEARTWORM SOCIETY. Highlights of the current canine guidelines for the Prevention, Diagnosis, and Management of Heartworm (*Dirofilaria immitis*) Infection in Dogs. **Am Heart Assoc**, 2014. Disponível em: [/www.heartwormsociety.org/veterinary-resources/american-heartworm-society-guidelines](http://www.heartwormsociety.org/veterinary-resources/american-heartworm-society-guidelines). Acesso em: 26 jan. 2023.

AHS-AMERICAN HEARTWORM SOCIETY. Highlights of the current canine guidelines for the Prevention, Diagnosis, and Management of Heartworm (*Dirofilaria immitis*) Infection in Dogs. **Am Heart Assoc**, 2018. Disponível em: [/www.heartwormsociety.org/veterinary-resources/american-heartworm-society-guidelines](http://www.heartwormsociety.org/veterinary-resources/american-heartworm-society-guidelines). Acesso em: 07 jan. 2023.

ALBERIGI, B.; et al. Unusual feline *Dirofilaria immitis* infection: a case report. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, p. e008420, 2020.

ALHO, A.M.; et al. Dirofilariose canina e felina, uma parasitose em evolução (II): fisiopatologia, diagnóstico e terapêutica. **Clinica Animal**, v. 3, p. 26–32, 2014.

ALMEIDA, G.L.G.; VICENTE, J. J. *Cercopithifilaria baina* sp. n. parasita de *Canis familiaris* (L.) (Nematoda, Filarioidea). **Atas Soc Bio do Rio de Janeiro**, v. 24, p. 18, 1984.

ALVES, L. C.; et al. Survey of canine heartworm in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 587-590, 1999.

AMES, M.K.; ATKINS, C.E. Treatment of dogs with severe heartworm disease. **Veterinary Parasitology**, v. 283, p. 109131, 2020.

ARESU, L.; et al. Membranoproliferative glomerulonephritis type III in a simultaneous infection of *Leishmania infantum* and *Dirofilaria immitis* in a dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, n. 5, p. 569-572, 2007.

ATKINS, C.E. Heartworm Disease. **St Louis: Saunders Elsevier**, 2010. Disponível em: <http://www.animalhealthcarecenterofhershey.com/medical%20handouts/Heartworm%20Disease.pdf>>. Acesso em: 27 jan. 2023.

BEZERRA-SANTOS, M.A.; et al. *Cercopithifilaria* spp. in ticks of companion animals from Asia: new putative hosts and vectors. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 13, n. 4, p. 101957, 2022.

BOWMAN, D.D.; ATKINS, C.E. Heartworm biology, treatment, and control. **Veterinary Clinical small Animal Practice**, v.39, n.6, p. 1127-1158, 2009.

BOWMAN, D.D. Georgis' Parasitology for Veterinarians. **St. Louis: Elsevier Health Sciences**, 2014.

BOWMAN, D. D.; et al. Evaluation of the efficacy of ProHeart® 6 (moxidectin) against a resistant isolate of *Dirofilaria immitis* (JYD-34) in dogs. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 2, p. 53-57, 2017.

BOYD, M.; et al. Dermatitis caused by autochthonous *Cercopithifilaria bainae* from a dog in Florida, USA: clinical, histological and parasitological diagnosis and treatment. **Veterinary Dermatology**, v. 30, n. 1, p. 68-e20, 2019.

BRIANTI, E.; et al. New insights into the ecology and biology of *Acanthocheilonema reconditum* (Grassi, 1889) causing canine subcutaneous filariasis. **Parasitology**, v. 139, n. 4, p. 530-536, 2012.

BRIANTI, E.; et al. *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodida, Ixodidae) as intermediate host of a canine neglected filarial species with dermal microfilariae. **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 3-4, p. 330-337, 2012.

BRITO, A.C.; et al. Prevalência da filariose canina causada por *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum* em Maceió, Alagoas, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 6, p. 1497-1504, 2001.

BUCKLAND, P.I.C.; SADLER, J.P. A biogeography of the human flea, *Pulex irritans* L. (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Biogeography**, p. 115-120, 1989.

BYU. Fleas of the world – *Pulex simulans*. BRIGHAM YOUNG UNIVERSITY, 2021. Disponível em: <<https://biology.byu.edu/fleas-of-the-world/pulex-simulans>>. Acesso em 11 nov.2023.

CALANDRUCCIO, S. **Descrizione degli embrioni e delle larve della *Filaria recondita* (Grassi)**. 1892.

CARVALHO, G. A.; et al. Evaluation of larval development of *Dirofilaria immitis* in different populations of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Open Journal of Veterinary Medicine**, v. 3, n. 6, p. 277, 2013.

CICARINO, C. **Dirofilariose canina**. Trabalho de conclusão de curso. São Paulo.

Centro Universitário das faculdades metropolitanas unidas. 2009.

CHRISTENSEN, B. Laboratory studies on the development and transmission of *Dirofilaria immitis* by *Aedes trivittatus*. 1977.

COELHO, M.L.; SOARES, R.L; RAMOS, C.A.N. **Manual de Identificação para a filariose canina, 2020**. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS. Disponível em: <<https://famez.ufms.br/utilidade-publica-manual-de-identificacao-para-filariose-canina/>>. Acesso em:10 jan. 2023.

COLWELL, D.D.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Vector-borne parasitic zoonoses: emerging scenarios and new perspectives. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 1, p. 14-21, 2011.

CORTES, H.C.E.; et al. Diversity of *Cercopithifilaria* species in dogs from Portugal. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1-4, 2014.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Overview on *Dirofilaria immitis* in the Americas, with notes on other filarial worms infecting dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 282, p. 109113, 2020.

DAY, M.J. (Ed.) **Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat**. CRC Press, 2016.

DE ARGÔLO, E.G.G.; et al. Canine filariasis in the Amazon: Species diversity and epidemiology of these emergent and neglected zoonoses. **PLoS One**, v. 13, n. 7, p. e0200419, 2018.

DE MACEDO, L.O.; et al. Vector-borne pathogens of zoonotic concern in dogs from a Quilombola community in northeastern Brazil. **Parasitology Research**, v. 121, n. 11, p. 3305-3311, 2022.

DIGANGI, B.A.; et al. Impact of heat treatment on *Dirofilaria immitis* antigen detection in shelter dogs. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 2, p. 123-128, 2017.

DRAKE, J.; et al. False negative antigen tests in dogs infected with heartworm and placed on macrocyclic lactone preventives. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 1-5, 2015.

DZIMIRA, S.; PRZADKA, P. Cytological diagnostics of subcutaneous dirofilariasis imitating proliferative lesions in dogs. **Veterinární Medicína**, v. 65, n. 12, p. 537-542, 2020.

- EBERHARD, M.L. *Dipetalonema (Cercopithifilaria) kenyensis* subgen. et sp. n. (Nematoda: Filarioidea) from African baboons, *Papio anubis*. **The Journal of Parasitology**, p. 551-554, 1980.
- ENGELMANN, A.M.; et al. Morphological and molecular identification of *Acanthocheilonema reconditum* in a canine. **Comparative Clinical Pathology**, v. 28, p. 271-274, 2019.
- ESPINOSA, N.; et al. Canine filariasis outbreak in southwestern Colombia: A Molecular and Epidemiological Study. **Preprints.org**, v.1, p. 2020100221, 2020. <http://doi.org/10.20944/preprints202202.0191.v1>
- FERRI, E.; et al. Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). **Frontiers in Zoology**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2009.
- FERNANDES, C.G.N.; et al. Ocorrência de dirofilariose canina na região da Grande Cuiabá, Estado de Mato Grosso-Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, p. 258-261, 1999.
- FURTADO, A.P.; et al. Detection of dog filariasis in Marajo Island, Brazil by classical and molecular methods. **Parasitology Research**, v. 105, p. 1509-1515, 2009.
- FURTADO, A.P.; et al. Morphological redescription of *Dirofilaria immitis*. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 3, p. 499-504, 2010.
- GABRIELLI, S.; et al. Chronic polyarthritis associated to *Cercopithifilaria binae* infection in a dog. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 1-2, p. 401-404, 2014.
- GABRIELLI, S.; et al. Molecular identification of new cases of human dirofilariosis (*Dirofilaria repens*) in Italy. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 251, 2021.
- GENCHI, C.; et al. Guideline for the laboratory diagnosis of canine and feline *Dirofilaria* infections. **Guideline for the laboratory diagnosis of canine and feline *Dirofilaria* infections.**, v. 8, p. 137-144, 2007
- GENCHI, C.; BOWMAN, D.; DRAKE, J. Canine heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) in Western Europe: survey of veterinary awareness and perceptions. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2014.
- GENCHI, C.; KRAMER, L.H. The prevalence of *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in the

- Old World. **Veterinary Parasitology**, v. 280, p. 108995, 2020.
- GIOIA, G.; et al. Highly sensitive multiplex PCR for simultaneous detection and discrimination of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood. **Veterinary Parasitology**, v. 172, n. 1-2, p. 160-163, 2010.
- GOMES, L. R.; et al. Identificação morfológica de *Acanthocheilonema reconditum* em um cão no município de Uberlândia – MG: relato de caso. **Veterinária Notícias**, v.18, n. 2, p. 126-130, 2012.
- GRUNTMEIR, J.; et al. Cutaneous filarioid nematodes of dogs in the United States: Are they emerging, neglected, or underdiagnosed parasites?. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, p. 1128611, 2023.
- HOCH, H.; STRICKLAND, K. Canine and feline dirofilariasis: prophylaxis, treatment, and complications of treatment. **Compendium**, v. 30, n. 3, p. 146, 2008.
- HENRY, L.G.; et al. Comparison of six commercial antigen kits for detection of *Dirofilaria immitis* infections in canines with necropsy-confirmed heartworm status. **Veterinary Parasitology**, v. 254, p. 178-182, 2018.
- IONICĂ, A.M.; et al. First report of *Cercopithifilaria* spp. in dogs from Eastern Europe with an overview of their geographic distribution in Europe. **Parasitology Research**, v. 113, p. 2761-2764, 2014.
- JACOBS, D.; et al. **Principles of Veterinary Parasitology**. John Wiley & Sons, 2015.
- JANG, H.; LEE, H.C; JUNG, D. A case of canine ectopic parasitism of heartworm in the systemic circulation. **Journal of Veterinary Clinics**, v. 32, n. 4, p. 347-351, 2015.
- LEWIS, Ü.H. Entwicklungscyklus einer Filaria (*Filaria recondita* Grassi) des Hundes. **Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde**, v. 7, n.1, p. 18-26, 1890.
- LÓPEZ, J.; et al. Identificación morfológica y molecular de filarias caninas en una comuna semi-rural de la Región Metropolitana, Chile. **Revista Chilena de Infectología**, v. 29, n. 3, p. 248-289, 2012.
- LURIA, B.J.; et al. Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 6, n. 5, p. 287-296, 2004.
- JERICÓ, M.M.; ANDRADE NETO, J.P.; KOGIKA, M.M. Tratado de medicina interna

de cães e gatos. **Rio de Janeiro: Roca**, 2015.

KANNENBERG, A.K.; et al. Occurrence of filarid parasites in household and sheltered dogs in the city of Joinville–Santa Catarina, Brazil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, p. e-53529, 2019.

KOEHLER, P.G.; PEREIRA, R.; KAUFMAN, P. **Sticktight flea, *Echidnophaga gallinacea***. Gainesville, FL, USA: University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences, EDIS, 2009.

KOHLER-AANESEN, H.; et al. Efficacy of fluralaner (Bravecto™ chewable tablets) for the treatment of naturally acquired *Linognathus setosus* infestations on dogs. **Parasites & Vectors**, v. 10, p. 1-7, 2017.

KORKEJIAN, A.; EDESON, J. F. B. Studies on naturally occurring filarial infections in dogs in Lebanon I. *Dipetalonema reconditum*. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 72, n. 1, p. 66-78, 1978.

KOTANI, T.; POWERS, K.G. Developmental stages of *Dirofilaria immitis* in the dog. **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, n. 12, p. 2199-2206, 1982.

LABARTHE, N.V.; et al. Updated canine infection rates for *Dirofilaria immitis* in areas of Brazil previously identified as having a high incidence of heartworm-infected dogs. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 1-8, 2014.

LABARTHE, N.V.; et al. Chemoprophylaxis of *Dirofilaria immitis* (Leidy 1856) infection at a high challenge environment. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1-4, 2015.

LAI DOUDI, Y.; et al. Development of a multiplex qPCR-based approach for the diagnosis of *Dirofilaria immitis*, *D. repens* and *Acanthocheilonema reconditum*. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1-15, 2020.

LANDUM, M.C. Detecção de *Dirofilaria* spp. em cães da região Centro de Portugal. 2013. Tese de Doutorado. Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

LATROFA, M.S.; et al. A multiplex PCR for the simultaneous detection of species of filarioids infesting dogs. **Acta Tropica**, v. 122, n. 1, p. 150-154, 2012.

LATROFA, M.S.; et al. Molecular detection of tick-borne pathogens in *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 5, n. 6, p. 943-946, 2014.

LEITE, L.C.; et al. Infection in domestic dogs (*Canis lupus familiaris*, Linnaeus, 1758)

from Guaratuba, Paraná, Brazil by circulating microfilariae of *Acanthocheilonema reconditum* (Grassi, 1889). **Semina: Ciências Agrárias (Londrina)**, v. 33, n. 3, p. 1149-1155, 2012.

LITTLE, S.E.; et al. Heat treatment prior to testing allows detection of antigen of *Dirofilaria immitis* in feline serum. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 1-4, 2014.

MAGGI, RG.; KRÄMER, F. A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-37, 2019.

MAGNIS, J.; et al. 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. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 1-5, 2013.

MAXWELL, E.; et al. Outcome of a heartworm treatment protocol in dogs presenting to Louisiana State University from 2008 to 2011: 50 cases. **Veterinary Parasitology**, v. 206, n. 1-2, p. 71-77, 2014.

MCCALL, J.W.; et al. Heartworm disease in animals and humans. **Advances in Parasitology**, v. 66, p. 193-285, 2008.

MCTIER, TL.; et al. Microfilarial reduction following ProHeart® 6 and ProHeart® SR-12 treatment in dogs experimentally inoculated with a resistant isolate of *Dirofilaria immitis*. **Parasites & Vectors**, v. 10, p. 47-52, 2017.

MEGAT ABD RANI, P.A.; et al. A survey of canine filarial diseases of veterinary and public health significance in India. **Parasites & Vectors**, v. 3, p. 1-11, 2010.

MENDES-DE-ALMEIDA, F.; et al. Infection with *Dirofilaria immitis* and other infections in cats and dogs from Rio de Janeiro, Brazil: the need for prophylactic enforcement. **Acta Parasitologica**, v. 66, p. 962-968, 2021.

MEIRELES, J.; PAULOS, F.; SERRÃO, I. Dirofilariose canina e felina. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 109, n. 591-592, p. 70-78, 2014.

MENDOZA-ROLDAN, J.; et al. *Leishmania infantum* and *Dirofilaria immitis* infections in Italy, 2009–2019: changing distribution patterns. **Parasites & Vectors**, v. 13, p. 1-8, 2020.

MORAES-DA-SILVA, M.F.C.V.; et al. Selamectin for the prevention of canine *Dirofilaria immitis* infection: field efficacy in client-owned dogs in a high risk area. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2016.

MORCHÓN, R.; et al. Heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) and their vectors in Europe - new distribution trends. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 196, 2012.

MORCHÓN, R.; et al. Anti-Wolbachia surface protein antibodies are present in the urine of dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis* with circulating microfilariae but not in dogs with occult infections. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 1, p. 17-20, 2012.

MUÑOZ, C.; et al. Massive microfilaremia in a dog subclinical infected with *Acanthocheilonema dracunculoides*. **Parasitology International**, v. 76, p. 102070, 2020.

MUTAFCHIEV, Y.; et al. Redescription of *Onchocerca lupi* (Spirurida: Onchocercidae) with histopathological observations. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2013.

NAPOLI, E.; et al. Development of *Acanthocheilonema reconditum* (Spirurida, Onchocercidae) in the cat flea *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera, Pulicidae). **Parasitology**, v. 141, n. 13, p. 1718-1725, 2014.

NELSON, C.T.; et al. Current canine guidelines for the prevention, diagnosis, and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. *Am. Hear. Soc.*, v. 2018, p.1-35, 2018.

NELSON, G.S. *Dipetalonema reconditum* (Grassi, 1889) from the dog with a note on its development in the flea, *Ctenocephalides felis* and the louse, *Heterodoxus spiniger*. **Journal of Helminthology**, v. 36, n. 3, p. 297-308, 1962.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Small Animal Internal Medicine-E-Book**. Editora Elsevier, 2009.

NELSON, R.W.; COUTO, C. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. Elsevier Brasil, 2010.

NEWTON, W.L.; WRIGHT, W.H. The occurrence of a dog filariid other than *Dirofilaria immitis* in the United States. **The Journal of Parasitology**, v. 42, n. 3, p. 246-258, 1956.

OGAWA, G.M. **Prevalência de *Dirofilaria immitis* (Leyd, 1856) em cães e sua ocorrência em mosquitos (Diptera, Culicidae) na cidade de Porto Velho, Rondônia, Brasil.** 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

OGAWA, G.M.; et al. Canine heartworm disease in Porto Velho: first record, distribution map and occurrence of positive mosquitoes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 559-564, 2013.

OLEAGA, A.; et al. Identification of immunoreactive proteins from the dog heartworm (*Dirofilaria immitis*) differentially recognized by the sera from dogs with patent or occult infections. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 166, n. 2, p. 134-141, 2009.

OTRANTO, D.; et al. Morphological and molecular data on the dermal microfilariae of a species of *Cercopithifilaria* from a dog in Sicily. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 2-4, p. 221-229, 2011.

OTRANTO, D.; EBERHARD, M.L. Zoonotic helminths affecting the human eye. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 1-21, 2011.

OTRANTO, D.; et al. Cutaneous distribution and localization of *Cercopithifilaria* sp. microfilariae in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 1-2, p. 143-150, 2012.

OTRANTO, D.; et al. On a *Cercopithifilaria* sp. transmitted by *Rhipicephalus sanguineus*: a neglected, but widespread filarioid of dogs. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2012.

OTRANTO, D.; et al. Species diversity of dermal microfilariae of the genus *Cercopithifilaria* infesting dogs in the Mediterranean region. **Parasitology**, v. 140, n. 1, p. 99-108, 2013.

OTRANTO, D.; et al. Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2013.

OTRANTO, D.; et al. Redescription of *Cercopithifilaria binae* Almeida & Vicente, 1984 (Spirurida, Onchocercidae) from a dog in Sardinia, Italy. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2013.

PACHECO, A.C. Caracterização da resposta imunoinflamatória na coinfeção *Dirofilaria* spp. – *Wolbachia* spp. no cão. 2016. Dissertação (Mestrado em ciências Biomédicas em especialidade em Parasitologia Médica) – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2016.

- PALACIOS, A. R. O. et al. Granuloma caused by *Acanthocheilonema* spp. in a canine case report. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 74, p. 351-358, 2022.
- PAMPIGLIONE, S. et al. The species of the genus *Dirofilaria*, Railliet & Henry, 1911. **Parassitologia**, v. 39, n. 4, p. 369-374, 1997.
- PEGADO, I.M.P.; et al. Incidência de *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) por meio dos métodos de Knott modificado, Gota espessa e Imunocromatografia em cães atendidos no hospital veterinário Prof. Mário Dias Teixeira (HOVET-UFRA). 2019.
- PENNINGTON, N.E.; PHELPS, C.A. Canine filariasis on Okinawa, Ryukyu islands. **Journal of Medical Entomology**, v. 6, n. 1, p. 59-67, 1969.
- PENNINGTON, N.E. Arthropod vectors, cyclodevelopment and prepatent period of *Dipetalonema reconditum* (Grassi) and the incidence of canine filariasis and ectoparasites in North-central Oklahoma. Oklahoma State University, 1971.
- RAMOS, D.G.S.; et al. Helminths parasites of stray dogs (*Canis lupus familiaris*) from Cuiabá, Midwestern of Brazil. **Semina: Ciências Agrárias (Londrina)**, v. 36, n. 2, p. 889-893, 2015.
- RAMOS, R.A.N.; et al. Tick vectors of *Cercopithifilaria bainae* in dogs: *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato versus *Ixodes ricinus*. **Parasitology Research**, v. 112, p. 3013-3017, 2013.
- RAMOS, R.A.N.; et al. Incidence of *Cercopithifilaria bainae* in dogs and probability of co-infection with other tick-borne pathogens. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e88198, 2014.
- RAMOS, R.A.N.; et al. Filarioids infecting dogs in northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 226, p. 26-29, 2016.
- RAMOS, R.A.N.; et al. Vector-borne pathogens in dogs from areas where leishmaniosis is endemic. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 32, p. 100746, 2022.
- RANI, P.A.M.A.; et al. *Hippobosca longipennis* a potential intermediate host of a species of *Acanthocheilonema* in dogs in northern India. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2011.
- REIFUR, L.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MONTIANI-FERREIRA, F. Epidemiological

aspects of filariosis in dogs on the coast of Paraná state, Brazil: with emphasis on *Dirofilaria immitis*. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 4, p. 273-286, 2004.

ROJAS, A.; et al. Detection of *Dirofilaria immitis* and other arthropod-borne filarioids by an HRM real-time qPCR, blood-concentrating techniques and a serological assay in dogs from Costa Rica. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2015.

SAARI, S.; NÄREAHO, A.; NIKANDER, S. **Canine parasites and parasitic diseases**. Academic press, 2018.

SALGUEIRO, J. M.; et al. **Dirofilariose canina**. 2016. Dissertação de Mestrado.

SANTOS, M.A.B.; et al. *Cercopithifilaria binae* in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks from dogs in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 4, p. 623-625, 2017.

SANTOS, M.A.B.; et al. Screening of *Cercopithifilaria binae* and *Hepatozoon canis* in ticks collected from dogs of Northeastern Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 63, n. 3, p. 605-608, 2018.

SCHWAN, E.V.; SCHROTER, F.G. First record of *Acanthocheilonema dracunculoides* from domestic dogs in Namibia. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 77, n. 4, p. 220-221, 2006.

SEBOLT, A.P.R. *Dirofilaria immitis*: prevalência da infecção em cães no município de Laguna, SC, Brasil. 2020.

SERAYDAR, K.S.; KAUFMANN, P.E. Entomology and Nematology Department, University of Florida. 2014. Disponível em: creatures/urban/occas/dogflea.htm. Acesso em 11 nov. 2023.

SILVA, R.C.; LANGONI, H. Dirofilariose: zoonose emergente negligenciada. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1615-1624, 2009.

SILVA, P.L.; et al. Frequência de filarídeos sanguíneos em cães do estado de Sergipe, Nordeste do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 38., 2017, Recife. **Anais...** Recife: Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais, 2017. p. 1372-1377.

SIMÓN, F.; et al. Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 3, p. 507-544, 2012.

SISTEMA DA INFORMAÇÃO SOBRE A BIODIVERSIDADE BRASILEIRA (SIBBr). Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil e Lista da Flora do Brasil, 2020. Disponível em: <<https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/188006#classification>>. Acesso em 02 de fev. 2023.

SMITH, F.W.K.; et al. Manual of Canine and Feline Cardiology. **Elsevier Health Sciences**, 2015.

SOARES, Adriano Mesquita. **Medicina Veterinária e Zootecnia: métodos e tendências de pesquisa**. AYA Editora, 2022.

SOARES, H.S.; et al. Survey of canine tick-borne diseases in Lábrea, Brazilian Amazon: 'accidental' findings of *Dirofilaria immitis* infection. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 473-480, 2014.

SOARES, R.L. Pesquisa molecular de filarídeos em caninos no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. 2020.

SOARES, R.L.; et al. Giant cutaneous cyst in a dog infected by *Cercopithifilaria binae*. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 20, p. 100401, 2020.

SONG, K.H.; TANAKA, S.; HAYASAKI, M. Scanning electron microscopic observation of ultrastructure of *Dirofilaria immitis* microfilaria. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 71, n. 6, p. 779-783, 2009.

TAYLOR, M.A.; et al. Parasitologia Veterinária. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

TIFFIN, H.S.; et al. Tick control in a connected world: Challenges, solutions, and public policy from a United States border perspective. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 11, p. 388, 2022.

TORRES-CHABLE, O.M.; et al. First report of chewing lice *Heterodoxus spiniger* (Enderlein, 1909) and *Trichodectes canis* (De Geer, 1778) on domestic dogs at Tabasco, Mexico. **Southwestern Entomologist**, v. 42, n. 2, p. 409-418, 2017.

TRANCOSO, T.A.L. Comparação de técnicas para o diagnóstico de filarioses caninas. Universidade Federal Fluminense, 2017.

TRAVERSA, D.; et al. Potential efficacy of monthly administrations of spot-on

moxidectin 2.5%/imidacloprid 10% in the simultaneous prevention of major canine filarioses. **Parasitology Research**, v. 112, p. 3753-3756, 2013.

VELEV, V.; et al. Human dirofilariasis in Bulgaria between 2009 and 2018. **Helminthologia**, v. 56, n. 3, p. 247-251, 2019.

VIEIRA, V.M.A. Potencial zoonótico por *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) Railliet & Henry, 1911 na Baixada Fluminense do Rio de Janeiro. – Tese de Doutorado. Fundação Oswaldo Cruz- FIOCRUZ, 2019.

5. CAPÍTULO I

Filarial nematodes in dogs from the Northeast Region of Brazil

Manuscript published at Acta Parasitologica
<https://doi.org/10.1007/s11686-024-00834-x>. Published online: 27 March 2024

Filarial nematodes in dogs from the Northeast Region of Brazil

Abstract

Purpose Medical and veterinary filarial nematodes are transmitted by blood-feeding vectors. In dogs, these parasites are mainly represented by nematodes in which microfilariae dwell in the blood (*Dirofilaria* spp. and *Acanthocheilonema* spp.) or skin (*Cercopithifilaria* spp. and *Onchocerca lupi*). The aim of this study was to determine the prevalence of these filarial infections in dogs residing in a touristic, heavily populated location in the northeastern region of Brazil.

Methods Blood samples (n = 245) were assessed by a modified Knott test, followed by a qualitative ELISA test (SNAP® 4Dx® Plus, IDEXX Laboratory, Westbrook, Maine, USA) for the detection of antibodies against *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Ehrlichia* spp. and antigens of *Dirofilaria immitis*. Skin samples (n = 71) were microscopically examined and molecularly assessed through a PCR targeting the 12S rRNA gene.

Results Microfilariae and antigen of *D. immitis* were detected simultaneously in 15 (6.1%; 95% CI = 3.7–9.8) animals. Nine animals (3.6%; 95% CI = 1.9–6.8) were *D. immitis* antigen positive but microfilariae negative and nine other animals (3.6%; 95% CI = 1.9–6.8) were microfilariae positive but *D. immitis* antigen negative. *D. immitis* positive dogs were found in four different municipalities. No filarioids were detected in the skin after microscopical and molecular analyses.

Conclusion Data from this study demonstrate that *D. immitis* is the main filarial nematode infecting dogs in coastal areas in northeastern Brazil. Based on the potential risk of infection in which animals are submitted, it is essential to perform tests to detect microfilariae and *D. immitis* antigen. Preventive measures must be adopted by using microfilaricidal compounds and anti-feeding insecticides to prevent canine infection.

Keywords: *Acanthocheilonema reconditum* · Beach area · *Cercopithifilaria baina* · *Dirofilaria immitis* · Zoonosis.

5.1 Introduction

The family Onchocercidae (Rhabditida: Filarioidea) comprises nematodes of particular interest due to their high impact on human and animal health [1]. These parasites are transmitted through blood-feeding vector arthropods (e.g., mosquitoes, fleas, lice, and ticks) and may infect a wide plethora of wild and domestic animals, especially dogs [2, 3]. Various species can parasitize dogs, some of which have microfilariae present in their blood, such as *Dirofilaria* spp. and *Acanthocheilonema* spp., while others have them in their skin, including *Cercopithifilaria* spp. and *Onchocerca lupi* [4].

Among those in which microfilariae are detected in the blood, the genus *Dirofilaria* is the most important due to the virulence presented by the species *Dirofilaria immitis* [5,6]. This filarioid parasitizes the right ventricle and pulmonary arteries, and infective stage is transmitted by mosquitoes (e.g., *Culex* spp., *Aedes* spp., and *Anopheles* spp.) [7-10]. In the Americas, *D. immitis* infection is widely distributed from the United States to Argentina, with prevalence ranging from 1% to 40% [11, 12]. In Brazil, prevalence values over 30% have been observed [11, 13], with some areas in the northeastern region with 12.9% [14] and 5.5% [15]. Despite being less studied, *Acanthocheilonema reconditum* has been reported in the same areas of *D. immitis*, and the differential diagnosis is imperative.

Blood filarioids are uniquely considered epidemiologically crucial for the canine population for the last few decades. In recent years, attention has also been given to skin-dwelling filarioid nematodes such as *Cercopithifilaria* and *Onchocerca* [3, 16]. The genus *Cercopithifilaria* comprises of three species that may infect dogs (i.e., *Cercopithifilaria bainae*, *Cercopithifilaria grassi*, and *Cercopithifilaria* sp. II [17], but most of the knowledge accumulated over the last year is restricted to *C. bainae* [18, 19]. The life cycle shows that brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, is transmitting this pathogen, which is evident by previous studies showing overlap [20]. In Brazil, *C. bainae* in dogs and *R. sanguineus* s.l. are restricted to reports from the Southeast [21], Northeast [20, 22, 23] and Mid-West regions [24]. Despite being considered to be minimal in virulent relevance, there are reports of dermatitis [25], polyarthritis [26] and the presence of a giant cyst [24] associated with *C. bainae* infection.

The diversity of filarial nematodes in a canine population is linked to the availability of definitive hosts and vectors, as well suitable environmental conditions that promote vector proliferation [27]. In recent years, the intense global mobility of pets within and between countries traversing large geographic distances has been recognized as a global public health and veterinary concern. Leading to vectors expansion and potentially increasing zoonotic transmission into new areas. Therefore, the aim of this study was to determine the prevalence

of filarial infection in dogs living in a touristic region with a constant interaction of both animals and humans year-round.

5.2 Material and Methods

5.2.1. Study area

The study was conducted in seven municipalities of the South Coast of Pernambuco, northeastern Brazil (Fig. 1). Mangroves are a key feature in the area and are close to fragments of the Atlantic Forest. This region has an average temperature of 25 °C (18 °C – 31 °C), average annual rainfall of 1,250 mm (1,000 mm – 2,200 mm) and an average relative humidity of 80%. According to the Köppen classification, the humid tropical climate (*As*) is predominant in the study area [28]. In addition, the region is known for high touristic attraction and has a continuous influx of humans and animals throughout the year.

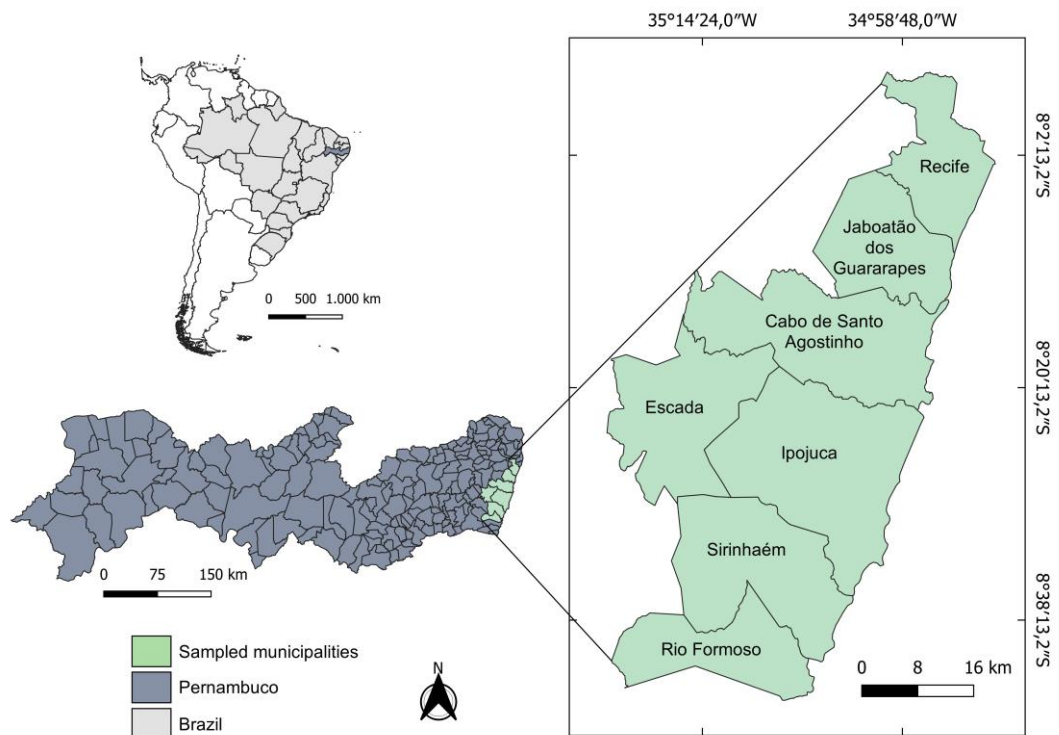


Fig. 1 Study area: map of Brazil indicating the state of Pernambuco and municipalities where animals were sampled.

5.2.2. Blood and skin sampling

The minimum sample size required ($n = 245$) was calculated considering the estimated canine population of the region ($n = 70,068$). This estimation followed a proportion of previously established of human/dog (4.4/1) [29]. The margin of error was calculated at 5% and a confidence interval of 95% for this estimation [30].

From February to September 2021, blood samples ($n = 245$) were collected from the cephalic vein of dogs

and stored in tubes containing an anticoagulant (ethylenediaminetetraacetic acid – EDTA). Fragments of skin samples (n = 71) were collected using a disposable punch (2 mm diameter) from the inter-scapular region. The low number of skin samples was due to the low adherence of dog owners in the collection of skin.

5.2.3. Microscopic examination of blood and skin

Blood samples were processed by the modified Knott test [31]. Briefly, 1 mL of whole blood was mixed with 9 mL of 2% formalin in a conical tube and centrifuged for 5 minutes. The supernatant was removed, and the pellet was mixed with 1% methylene blue dye. Approximately 20 µL of the material was transferred to slides and examined under optical microscopy at different magnifications (40 and 100X) [32]. Skin samples were examined according to Otranto *et al.* [18]. Each fragment was soaked in saline solution for about 6 hours at room temperature, and the sediment was examined microscopically at different magnifications (10 and 40X). The skin fragment that remained was stored at -20 °C until molecular processing.

5.2.4. ELISA test and molecular examination of the skin

Blood samples were tested by an ELISA test (SNAP® 4Dx® Plus, IDEXX Laboratory, Westbrook, Maine, USA), which detects antibodies to *Anaplasma* spp. (*A. platys*/*A. phagocytophilum*), *Ehrlichia* spp. (*E. canis*/*E. ewingii*), *Borrelia burgdorferi* s.l. and *D. immitis* antigens. The immunological test was performed according to the manufacturer's recommendations.

Genomic DNA of skin samples was extracted using a commercial kit (Reliaprep™ gDNA Tissue Miniprep System Kit, Promega®, USA) according to the manufacturer's instructions. In order to detect *Cercopithifilaria* spp., DNA skin samples were analyzed by amplification of 330 bp using a set of primers (Fila12SF: 5'-CGGGAGTAAAGTTTTGTTTAAACCG-3' and Fila12SR: 5'-CATTGACGGATGGTTTGTACCAC-3') designed on the 12S rRNA gene [18].

5.2.5. Data analysis and maps creation

Absolute and relative frequencies were calculated. Confidence intervals (95% CI) were considered, and the modified Wilson method was applied (<https://epitools.ausvet.com.au/ciproportion>). The Chi-square test was used to compare *D. immitis* antigen detection versus *D. immitis* plus co-infections at the ELISA test, and differences in positivity for sex, age and breed among *D. immitis* positive dogs at ELISA test. All analyzes were performed with the BioEstat 5.0 software [33].

A map was created using the QGIS 3.22.10 software, in which georeferenced data were inserted in continuous cartographic base (Shapefiles, version 2017) available at Brazilian Institute for Geography and Statistics database [34].

5.3. Results

Overall, microfilariae and antigen of *D. immitis* were detected simultaneously in 15 (6.1%; 95% CI = 3.7–9.8) animals. Nine animals (3.6%; 95% CI = 1.9–6.8) were *D. immitis* antigen positive but microfilariae negative and nine other animals (3.6%; 95% CI = 1.9–6.8) were microfilariae positive but *D. immitis* antigen negative.

Table 1 shows the frequency of blood microscopy and ELISA tests results, including co-infections by other vector-borne pathogens. *D. immitis* plus co-infections showed significance when compared to single infections of only *D. immitis* ($\chi^2 = 4.5111$; $p = 0.0337$). No statistical difference was observed between male and female ($\chi^2 = 0.344$; $p = 0.5573$) and between breed and crossbreed ($\chi^2 = 3.314$; $p = 0.0687$). Conversely, positivity of animals aging > 2 to 5 years-old was statistically significant when compared to other ages ($\chi^2 = 7.6138$; $p = 0.0222$).

Table 2 shows the frequency of *D. immitis* antigen and microfilariae positive dogs according the municipality of sampling. No filarioids were detected in the skin after microscopic and molecular analysis.

Table 1 Frequency of positive dogs in the modified Knott's test and ELISA test for *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp.

Variables	Knott test	ELISA test					
		<i>D. immitis</i>	<i>D. immitis</i> + <i>E. canis</i>	<i>D. immitis</i> + <i>E. canis</i> + <i>A. platys</i>	<i>E. canis</i>	<i>A. platys</i>	<i>E. canis</i> + <i>A. platys</i>
n/N (%; 95% CI)							
Overall positivity	24/245 (9.8; 6.7–14.2)	7/245 (2.9; 1.4–5.8)	15/245 (6.1; 3.7–9.8)	2/245 (0.8; 0.2–0.9)	39/245 (16; 11.9–21)	1/245 (0.4; 0–2.3)	8/245 (3.3; 1.7–6.3)
Male	12/116 (10.3; 6–17.2)	5/116 (4.3; 1.8–9.7)	4/116 (3.4; 1.3–8.5)	1/116 (0.9; 0.1–4.7)	17/116 (14.7; 9.4–22.2)	1/116 (0.9; 0.1–4.7)	3/116 (2.6; 0.9–7.3)
Female	12/129 (9.3; 5.4–15.6)	2/129 (1.5; 0.4–5.5)	11/129 (8.5; 4.8–14.6)	1/129 (0.5; 0.1–4.3)	22/129 (17; 11.5–24.5)	0	5/129 (3.9; 1.7–8.7)
Crossbreed	19/152 (12.5; 8.1–18.7)	3/152 (2; 0.7–5.6)	14/152 (9.2; 5.6–14.9)	2/152 (1.3; 0.4–4.7%)	34/152 (22.4; 16.5–29.6)	0	8/152 (5.3; 2.7–10)
Breed	5/93 (5.4; 2.3–12)	4/93 (4.3; 1.7–10.5)	1/93 (1.1; 0.2–5.8)	0	5/93 (5.4; 2.3–12)	1/93 (1.1; 0.2–5.8)	0
<2 years	2/65 (3; 0.8–10.5)	2/65 (3; 0.8–10.5)	3/65 (4.6; 1.6–12.7)	0	0	0	1/65 (1.5; 0.2–8.2)
>2 to 5 years	18/112 (16; 10.4–24)	4/112 (3.6; 1.4–8.8)	11/112 (9.8; 5.6–16.7)	0	29/112 (25.9; 18.7–34.7)	0	5/112 (4.5; 1.9–10)
>5 years	4/68 (5.9; 2.3–14.2)	1/68 (1.5; 0.3–7.9)	1/68 (1.5; 0.3–7.9)	0	10/68 (14.7; 8.2–25)	1/68 (1.4; 0.3–7.9)	2/68 (2.9; 0.8–10.1)

*CI, confidence interval; n, number of dogs positives; N, number total of dogs.

Table 2 Distribution of *D. immitis* antigen and microfilariae positive dogs according to the municipality of sampling.

Municipality	Animals sampled	Microfilariae + <i>D. immitis</i> antigen positive	<i>D. immitis</i> antigen positive	Microfilarie positive
Cabo de Santo Agostinho	132	1	3	5
Escada	7	1	1	0
Ipojuca	97	12	4	4
Jaboatão dos Guararapes	2	1	1	0
Recife	1	0	0	0
Rio Formoso	1	0	0	0
Sirinhaém	5	0	0	0

5.4. Discussion

This study reports the occurrence of blood filarial nematodes and co-infections in dogs that inhabit an area characterized by a high and continuous flow of animals and humans throughout the year. The prevalence of *D. immitis* infection (9.8%; 95% CI = 6.7 – 14.2) observed in the study area highlights the need for preventive measures in the dog population using microfilaricidal compounds and anti-feeding insecticides to prevent canine infection. The presence of *D. immitis* hotspots in coast zones has been reported in northeastern Brazil, with prevalence varying from 12.9% to 49.5% [11, 14, 35, 36]. These areas present suitable climate conditions (temperature ranging from 25 °C to 28 °C, and relative humidity mean of 80%) for the development of vectors and extrinsic incubation period for *D. immitis* [37]. It is known that the success of larval development within the mosquito host is temperature dependent. When the temperature falls below the minimum threshold, (14°C), development of the transmitting vector will cease [38].

The absence of *D. immitis* antigen in nine microfilaremic dogs suggests the infection of *Acanthocheilonema* spp., a nematode transmitted by ectoparasites (e.g., fleas and lice) found worldwide [39]. Despite low virulence, massive infections by *Acanthocheilonema* spp. have been recently associated to anemia in dogs [40]. In addition, evidence of sympatry with other *Dirofilaria* spp. may require differentiation in microscopic and molecular diagnostics between both filarioids [14, 32]. The presence of different filarioids in the canine population in this area reinforces the importance of immunological tests for detecting *D. immitis* antigens.

The co-infection among *D. immitis* and other pathogens (i.e., *Anaplasma* spp. and *Ehrlichia* spp.) follows a trend observed in tropical regions where vectors are present throughout the year. While the presence of multiple infections has been reported in dogs of northeastern Brazil [14, 15, 35] the ELISA test can detect antibodies against *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp., indicating exposure of these animals to these pathogens. These findings on multiple infections emphasize the importance of enhancing veterinary practitioners' awareness of the high frequency and potential missed diagnosed co-infections in dogs found in this area [14].

There was no statistical difference in positivity for *D. immitis* antigen or microfilariae between male and female and breed and crossbreed animals, which revealed that regardless of the sex or the breed, animals in this study might be equally exposed to the infection. The statistical predominance of *D. immitis* and microfilariae-infected animals among the dog population aged > 2 to 5 years old likely might be related to the highest number (n = 112) of samples collected in this age compared to other age groups.

The distribution of dogs infected by *D. immitis* was observed in four municipalities but with a higher concentration in Cabo de Santo Agostinho and Ipojuca. Since all municipalities present similar climate conditions that allow vector development, this difference is related to number of samples collected. In fact, more than 90%

(n = 229) of samples were collected in these two municipalities which impair a reliable statistical comparison. Both municipalities are characterized by several beaches that attract a constant flow and interaction of animals and humans from different Brazilian regions year-round. This constant presence poses an additional risk of spreading *D. immitis*, since animals from non-endemic areas are exposed to infected vectors. The epidemiology of *D. immitis* in dogs has been studied in the region since the late 1990s [41], and the situation has no evidence of change according to more recent studies [11, 14]. Health authorities should be aware of the zoonotic risk of *D. immitis*, and considering the epidemiological situation of the study area, the presence of asymptomatic humans cannot be ruled out.

No skin-dwelling microfilariae were detected during microscopic and molecular examination. *C. bairnei* had been detected in dogs and ticks in the northeastern region of Brazil [22, 23], but in this study, a low number of skin samples were analyzed due to the lack of the sampling. It is important to note that collecting skin snips is a minimally invasive technique and does not offer any risk to the dog when appropriately performed. The reduced number of skin samples and no ticks collected are limitations of this study, a factor to be addressed in future assessments.

Data from this study demonstrate that *D. immitis* is the main filarial nematode infecting dogs in beach areas in northeastern Brazil. Based on the potential risk of infection, it is essential to perform the recommended bi-annual screening for microfilariae and antigen specific to *D. immitis* through integrative microscopic and immunological testing. Moreover, continued research on the epidemiology and biology of *Acanthocheilonema* spp. and its potential impact on disease dynamics is crucial for devising targeted interventions and ensuring the health and well-being on a One Health level. Understanding different filarial species prevalence and interactions can inform effective control and prevention strategies. Preventive measures can include microfilaricidal compounds, anti-feeding insecticides, and environmental management control for culicid populations.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Acknowledgements

This article is based on the Master of Science (Graduate Program in Animal Bioscience) of the first author, developed at the Federal Rural University of Pernambuco, and supported by a grant fellowship (process number: IBPG-0105-5.05/22) from the Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

Authors thank Maureen Kelly (Texas A&M University) for her critical English reading.

Compliance with Ethical Standards**Conflict of Interest**

On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

Ethical statement

All procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation (ECAE) of the Federal Rural University of Pernambuco (protocol number 9759161120).

Supplementary file 1. Individual data of all animals, sampling, tests performed.							
Animal	Sex	Age	Modified Knott's test	SNAP® 4Dx Plus	Blood sample collection	Collection of blood and skin samples	Microscopic examination skin
1	Female	6 years	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	3	1	Negative
2	Female	1 year	Absence of microfilariae	Negative	4	2	Negative
3	Male	3 years	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	5	13	Negative
4	Female	4 months	Absence of microfilariae	Negative	6	15	Negative
5	Male	10 month	Absence of microfilariae	Negative	7	25	Negative
6	Female	1 year	Absence of microfilariae	Negative	8	30	Negative
7	Male	2 years	Absence of microfilariae	Negative	9	31	Negative
8	Female	2 years	Absence of microfilariae	Negative	10	32	Negative
9	Male	3 months	Absence of microfilariae	Negative	11	33	Negative
10	Male	10 years	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	12	34	Negative
11	Female	10 month	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	14	35	Negative
12	Female	7 months	Absence of microfilariae	Negative	16	36	Negative
13	Female	7 years	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp. and <i>Anaplasma</i> spp.	17	37	Negative
14	Female	2 years	Presence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp. and <i>D. immitis</i>	18	38	Negative
15	Female	7 years	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	19	40	Negative
16	Male	3 years	Presence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	20	41	Negative
17	Female	8 years	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	21	42	Negative
18	Male	3 years	Presence of microfilariae	<i>D. immitis</i>	22	48	Negative
19	Female	3 years	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp. and <i>D. immitis</i>	23	49	Negative
20	Female	7 years	Absence of microfilariae	<i>D. immitis</i>	24	50	Negative

21	Female	1 year	Presence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp. and <i>D. immitis</i>	26	51	Negative
22	Female	4 years	Presence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	27	52	Negative
23	Female	10 months	Absence of microfilariae	Negative	28	53	Negative
24	Female	2 years	Absence of microfilariae	Negative	29	54	Negative
25	Male	5 years	Presence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	39	55	Negative
26	Female	4,3 years	Presence of microfilariae	<i>D. immitis</i>	43	56	Negative
27	Male	1 year	Absence of microfilariae	Negative	44	87	Negative
28	Male	3 years	Absence of microfilariae	Negative	45	88	Negative
29	Female	8 months	Absence of microfilariae	Negative	46	89	Negative
30	Male	8 years	Absence of microfilariae	<i>D. immitis</i>	47	90	Negative
31	Male	adult	Absence of microfilariae	<i>D. immitis</i>	57	91	Negative
32	Female	adult	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	58	92	Negative
33	Female	adult	Presence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	59	93	Negative
34	Female	adult	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	60	94	Negative
35	Male	7 years	Presence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp. and <i>Anaplasma</i> spp.	61	95	Negative
36	Female	adult	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.; <i>Anaplasma</i> spp and <i>D. immitis</i>	62	96	Negative
37	Female	adult	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	63	97	Negative
38	Male	adult	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	64	98	Negative
39	Male	adult	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	65	99	Negative
40	Female	adult	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	66	100	Negative
41	Female	adult	Presence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp. and <i>D. immitis</i>	67	101	Negative

42	Female	adult	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	68	102	Negative
43	Male	adult	Presence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp. and <i>D. immitis</i>	69	103	Negative
44	Male	adult	Absence of microfilariae	Negative	70	104	Negative
45	Female	11 years	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	71	105	Negative
46	Female	3 years	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp. and <i>D. immitis</i>	72	106	Negative
47	Male	2,8 years	Absence of microfilariae	Negative	73	123	Negative
48	Female	5,2 years	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp. and <i>Anaplasma</i> spp.	74	124	Negative
49	Male	adult	Absence of microfilariae	Negative	75	125	Negative
50	Female	adult	Presence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp. and <i>D. immitis</i>	76	126	Negative
51	Female	adult	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp. and <i>D. immitis</i>	77	127	Negative
52	Female	adult	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	78	128	Negative
53	Female	adult	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	79	129	Negative
54	Male	adult	Absence of microfilariae	Negative	80	130	Negative
55	Male	adult	Presence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	81	131	Negative
56	Male	adult	Absence of microfilariae	Negative	82	132	Negative
57	Female	adult	Absence of microfilariae	Negative	83	133	Negative
58	Female	1 year	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i>	84	134	Negative
59	Female	2,8 years	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp. and <i>Anaplasma</i> spp.	85	135	Negative
60	Female	7 months	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	86	136	Negative
61	Male	6 years	Absence of microfilariae	Negative	107	137	Negative
62	Male	6 years	Presence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	108	138	Negative

63	Female	8 years	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	109	139	Negative
64	Female	5 years	Absence of microfilariae	Negative	110	140	Negative
65	Male	9 months	Absence of microfilariae	Negative	111	141	Negative
66	Male	4 months	Absence of microfilariae	Negative	112	142	Negative
67	Male	7 months	Absence of microfilariae	Negative	113	145	Negative
68	Female	2 years	Absence of microfilariae	Negative	114	146	Negative
69	Female	10 months	Absence of microfilariae	Negative	115	147	Negative
70	Male	5 months	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	116	148	Negative
71	Male	13 years	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	117	149	Negative
72	Female	6 years	Absence of microfilariae	Negative	118		
73	Female	1 year	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp. and <i>Anaplasma</i> spp.	119		
74	Female	adult	Absence of microfilariae	Negative	120		
75	Female	2,8 years	Absence of microfilariae	Negative	121		
76	Male	13 years	Absence of microfilariae	Negative	122		
77	Female	6 years	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	143		
78	Male	9 months	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp. and <i>Anaplasma</i> spp.	144		
79	Male	5 years	Absence of microfilariae	Negative	150		
80	Male	8 months	Absence of microfilariae	Negative	151		
81	Female	1,7 years	Absence of microfilariae	Negative	152		
82	Female	adult	Absence of microfilariae	Negative	153		
83	Female	10 months	Absence of microfilariae	Negative	154		
84	Male	2 years	Absence of microfilariae	Negative	155		
85	Male	2 years	Absence of microfilariae	Negative	156		

86	Female	5 years	Absence of microfilariae	Negative	157		
87	Female	1 year	Presence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp. and <i>D. immitis</i>	158		
88	Female	adult	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	159		
89	Male	adult	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	160		
90	Male	adult	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp. and <i>Anaplasma</i> spp.	161		
91	Female	adult	Absence of microfilariae	Negative	162		
92	Female	adult	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp. and <i>D. immitis</i>	163		
93	Female	adult	Absence of microfilariae	Negative	164		
94	Female	adult	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp. and <i>D. immitis</i>	165		
95	Male	adult	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	166		
96	Female	adult	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	167		
97	Male	adult	Absence of microfilariae	Negative	168		
98	Female	adult	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	160		
99	Male	adult	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	170		
100	Male	adult	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	171		
101	Male	adult	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp. and <i>Anaplasma</i> spp.	172		
102	Female	adult	Absence of microfilariae	Negative	173		
103	Female	adult	Absence of microfilariae	Negative	174		
104	Female	adult	Presence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	175		
105	Female	adult	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	176		
106	Female	adult	Absence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	177		

107	Male	adult	Presence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp. and <i>D. immitis</i>	178		
108	Female	adult	Absence of microfilariae	Negative	179		
109	Female	7 years	Absence of microfilariae	Negative	180		
110	Male	9 months	Absence of microfilariae	Negative	181		
111	Male	6 years	Presence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp. and <i>D. immitis</i>	182		
112	Male	3 years	Absence of microfilariae	Negative	183		
113	Male	7 years	Absence of microfilariae	Negative	184		
114	Male	1 year	Absence of microfilariae	Negative	185		
115	Male	8 months	Absence of microfilariae	Negative	186		
116	Male	10 months	Absence of microfilariae	<i>Anaplasma</i> spp.	187		
117	Male	7 months	Absence of microfilariae	Negative	188		
118	Male	8 years	Absence of microfilariae	Negative	189		
119	Male	6 years	Absence of microfilariae	Negative	190		
120	Male	8 years	Absence of microfilariae	Negative	191		
121	Male	4 years	Presence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.	192		
122	Female	12 years	Absence of microfilariae	Negative	193		
123	Female	1 year	Absence of microfilariae	Negative	194		
124	Female	adult	Absence of microfilariae	Negative	195		
125	Female	adult	Absence of microfilariae	Negative	196		
126	Female	adult	Absence of microfilariae	Negative	197		
127	Female	adult	Absence of microfilariae	Negative	198		
128	Female	7 years	Absence of microfilariae	Negative	199		
129	Female	adult	Absence of microfilariae	Negative	200		

130	Male	adult	Absence of microfilariae	Negative	201		
131	Male	adult	Presence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.; <i>Anaplasma</i> spp and <i>D. immitis</i>	202		
132	Female	adult	Absence of microfilariae	Negative	203		
133	Male	adult	Absence of microfilariae	Negative	204		
134	Male	adult	Absence of microfilariae	Negative	205		
135	Female	adult	Absence of microfilariae	Negative	206		
136	Female	adult	Absence of microfilariae	Negative	207		
137	Female	adult	Absence of microfilariae	Negative	208		
138	Male	adult	Absence of microfilariae	Negative	209		
139	Female	adult	Absence of microfilariae	Negative	210		
140	Male	adult	Absence of microfilariae	Negative	211		
141	Female	adult	Absence of microfilariae	Negative	212		
142	Female	adult	Absence of microfilariae	<i>D. immitis</i>	213		
143	Female	adult	Absence of microfilariae	Negative	214		
144	Female	7 months	Absence of microfilariae	Negative	215		
145	Male	9 years	Presence of microfilariae	<i>D. immitis</i>	216		
147	Female	6 years	Absence of microfilariae	Negative	217		
147	Female	1 year	Absence of microfilariae	Negative	128		
148	Female	9 years	Absence of microfilariae	Negative	219		
149	Male	1 year	Absence of microfilariae	Negative	220		
150	Female	9 years	Absence of microfilariae	Negative	221		
151	Male	8 years	Absence of microfilariae	Negative	222		
152	Female	8 months	Absence of microfilariae	Negative	223		

153	Male	3 years	Absence of microfilariae	Negative	224		
154	Male	9 years	Absence of microfilariae	Negative	225		
155	Male	1 year	Absence of microfilariae	Negative	226		
156	Female	8 years	Absence of microfilariae	Negative	227		
157	Male	3 years	Absence of microfilariae	Negative	228		
158	Male	3 years	Absence of microfilariae	Negative	229		
159	Male	7 months	Absence of microfilariae	Negative	230		
160	Female	13 years	Absence of microfilariae	Negative	231		
161	Male	13 years	Absence of microfilariae	Negative	232		
162	Female	2 years	Absence of microfilariae	Negative	233		
163	Male	5 years	Absence of microfilariae	Negative	234		
164	Female	7 years	Absence of microfilariae	Negative	235		
165	Female	5 years	Absence of microfilariae	Negative	236		
166	Female	4 years	Presence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp. and <i>D. immitis</i>	237		
167	Male	adult	Absence of microfilariae	Negative	238		
168	Male	4 years	Absence of microfilariae	Negative	239		
169	Female	13 years	Absence of microfilariae	Negative	240		
170	Male	1 year	Absence of microfilariae	Negative	241		
171	Female	9 years	Absence of microfilariae	Negative	242		
172	Male	3 years	Absence of microfilariae	Negative	243		
173	Male	3 years	Absence of microfilariae	Negative	244		
174	Female	2 years	Absence of microfilariae	Negative	245		
175	Male	1 years	Presence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp. and <i>D. immitis</i>			

176	Male	2 years	Absence of microfilariae	Negative			
177	Male	3 years	Absence of microfilariae	Negative			
178	Male	12 years	Absence of microfilariae	Negative			
179	Male	7 years	Absence of microfilariae	Negative			
180	Male	7 years	Absence of microfilariae	Negative			
181	Male	8 months	Absence of microfilariae	Negative			
182	Female	8 years	Absence of microfilariae	Negative			
183	Male	9 years	Absence of microfilariae	Negative			
184	Male	adult	Absence of microfilariae	Negative			
185	Male	5,2 years	Absence of microfilariae	Negative			
186	Female	3 years	Absence of microfilariae	Negative			
187	Male	1 year	Absence of microfilariae	Negative			
188	Female	2 years	Absence of microfilariae	Negative			
189	Male	1 year	Absence of microfilariae	Negative			
190	Female	8 months	Absence of microfilariae	Negative			
191	Female	1,7 years	Absence of microfilariae	Negative			
192	Female	6 years	Absence of microfilariae	Negative			
193	Male	9 years	Absence of microfilariae	Negative			
194	Male	10 years	Absence of microfilariae	Negative			
195	Female	4 years	Absence of microfilariae	Negative			
196	Female	5 years	Absence of microfilariae	Negative			
197	Female	10 years	Absence of microfilariae	Negative			
198	Male	1 year	Presence of microfilariae	<i>Ehrlichia</i> spp.			
199	Male	8 months	Absence of microfilariae	Negative			
200	Male	7 years	Absence of microfilariae	Negative			

201	Female	1,5 years	Absence of microfilariae	Negative			
202	Female	8 years	Absence of microfilariae	Negative			
203	Female	4 years	Absence of microfilariae	Negative			
204	Female	2,8 years	Absence of microfilariae	Negative			
205	Male	10 years	Absence of microfilariae	Negative			
206	Male	7 years	Absence of microfilariae	Negative			
207	Male	9 years	Absence of microfilariae	Negative			
208	Male	8 months	Absence of microfilariae	Negative			
209	Female	2 years	Absence of microfilariae	Negative			
210	Male	7 years	Absence of microfilariae	Negative			
211	Male	adult	Absence of microfilariae	Negative			
212	Female	7 years	Absence of microfilariae	Negative			
213	Female	3 years	Absence of microfilariae	Negative			
214	Female	3 years	Absence of microfilariae	Negative			
215	Male	1 year	Absence of microfilariae	Negative			
216	Female	7 years	Absence of microfilariae	Negative			
217	Female	10 months	Absence of microfilariae	Negative			
128	Female	9 months	Absence of microfilariae	Negative			
219	Female	adult	Absence of microfilariae	Negative			
220	Male	6 years	Absence of microfilariae	Negative			
221	Male	1 year	Absence of microfilariae	Negative			
222	Female	9 years	Absence of microfilariae	Negative			
223	Female	8 years	Absence of microfilariae	Negative			
224	Male	4 years	Absence of microfilariae	Negative			
225	Male	9 years	Absence of microfilariae	Negative			

226	Male	3 years	Absence of microfilariae	Negative			
227	Male	1 year	Absence of microfilariae	Negative			
228	Female	4 years	Absence of microfilariae	Negative			
229	Male	10 months	Absence of microfilariae	Negative			
230	Female	8 months	Absence of microfilariae	Negative			
231	Male	8 months	Absence of microfilariae	Negative			
232	Female	1,7 years	Absence of microfilariae	Negative			
233	Male	1 year	Absence of microfilariae	Negative			
234	Female	2 years	Absence of microfilariae	Negative			
235	Female	10 months	Absence of microfilariae	Negative			
236	Male	1,2 years	Absence of microfilariae	Negative			
237	Female	1 year	Absence of microfilariae	Negative			
238	Male	10 years	Absence of microfilariae	Negative			
239	Female	2 years	Absence of microfilariae	Negative			
240	Male	2 years	Absence of microfilariae	Negative			
241	Male	3 years	Absence of microfilariae	Negative			
242	Male	1 year	Absence of microfilariae	Negative			
243	Female	6 years	Absence of microfilariae	Negative			
244	Female	2,8 anos	Absence of microfilariae	Negative			
245	Male	1 years	Absence of microfilariae	Negative			

*Adults: 2 to 5 years. Age considered for newly adopted animals and/or based on how long they have lived with the family.

5.7. References

1. Orihel T, Eberhard ML (1998). Zoonotic filariasis. *Clin Microbiol Rev* 11: 366–381.
2. Anderson RC (2000) *Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission*, 2nd edn, Cabi Publishing, Estados Unidos, pp 672.
3. Otranto D, Brianti E, Dantas-Torres F, Miro, G, Latrofa MS, Mutafchiev Y, Bain O (2013) Species diversity of dermal microfilariae of the genus *Cercopithifilaria* infesting dogs in the Mediterranean region. *Parasitol* 140:99–10. <https://doi.org/10.1017/S0031182012001357>.
4. Gruntmeir J, Kelly M, Ramos RAN, Verocai GG (2023) Cutaneous filarioid nematodes of dogs in the United States: Are they emerging, neglected, or underdiagnosed parasites? *Front Vet Sci* 10:1128611. <https://doi.org/10.339/fvets.2023.1128611>.
5. Vezzani D, Carbajo AE, Fontanarrosa MF, Scodellaro CF, Basabe J, Cangiano G, Eiras DF (2011) Epidemiology of canine heartworm in its southern distribution limit in South America: Risk factors, inter-annual trend and spatial patterns. *Vet Parasitol* 176(2-3): 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.046>
6. Simón F, Siles-Lucas M, Morchón R, González-Miguel J, Mellado I, Carretón E, Montoya-Alonso JA (2012) Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clin Microbiol Rev* 25:507–544. <https://doi.org/10.1128/cmr.00012-12>
7. Labarthe N, Serrão ML, Melo YF, Oliveira, S.J.D, Lourenço-de-Oliveira R (1998) Potential vectors of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) in Itacoatiara, oceanic region of Niterói municipality, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93:425–432. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761998000400001>
8. McCall JW, Genchi C, Kramer LH, Guerrero J, Venco L (2008) Heartworm disease in animals and humans. *AdvParasitol* 66:193-285. [https://doi.org/10.1016/S0065-308x\(08\)00204-2](https://doi.org/10.1016/S0065-308x(08)00204-2)
9. Bowman DD (2014) *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. Elsevier Health Sciences, Missouri
10. Taylor MA, Coop RL, Wall RL (2017) *Parasitologia Veterinária*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro
11. Labarthe NV, Paiva JP, Reifur L, Mendes-de-Almeida F, Merlo A, Carvalho Pinto CJ, Juliani PS, Almeida, MA, Alves LC (2014) Updated canine infection rates for *Dirofilaria immitis* in areas of Brazil previously identified as having a high incidence of heartworm-infected dogs. *Parasit Vectors* 7:493. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0493-7>
12. Bendas AJR, Mendes-de-Almeida F, Guerrero J, Labarthe N (2017) Update on *Dirofilaria immitis* epidemiology in South America and Mexico: literature review. *Braz J Vet Res Anim Sci* 54:319–329. <https://doi.org/10.11606/issn.16784456.bjvras.2017.132572>
13. Dantas-Torres F, Figueredo LA, Sales KGDS, Miranda DEO, Alexandre JLA, da Silva YY, da Silva LG, Valle GR, Ribeiro VM, Otranto D, Deuster K, Pollmeier M, Altreuther G (2020a) Prevalence and incidence of vector-

- borne pathogens in unprotected dogs in two Brazilian regions. *Parasit Vectors* 13:195. <http://doi.org/10.1186/s13071-020-04056-8>.
14. Ramos RAN, Giannelli A, Ubirajara-Filho CRC, Ramos CAN, Betbder D, Bezerra-Santos MA, Otranto D (2022) Vector-borne pathogens in dogs from areas where leishmaniosis is endemic. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 32:100746. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2022.100746>
 15. Macedo LO, Bezerra-Santos MA, Ubirajara Filho CRC, Sales KGS, de Sousa-Paula LC, Silva LG, Otranto D (2022) Vector-borne pathogens of zoonotic concern in dogs from a Quilombola community in northeastern Brazil. *Parasitol Res* 121:3305–3311. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07661-x>
 16. Mutafchiev Y, Dantas-Torres F, Giannelli A, Abramo F, Papadopoulos E, Cardoso L, Otranto D (2013) Redescription of *Onchocerca lupi* (Spirurida: Onchocercidae) with histopathological observations. *Parasit Vectors* 6:1–8. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-309>
 17. Otranto D, Brianti E, Latrofa MS, Annoscia G, Weigl S, Lia R.P, Bain O (2012) On a *Cercopithifilaria* sp. transmitted by *Rhipicephalus sanguineus*: a neglected, but widespread filarioid of dogs. *Parasit Vectors* 5:1–9. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-1>
 18. Otranto D, Brianti E, Dantas-Torres F, Weigl S, Latrofa MS, Gaglio G, Bain O (2011) Morphological and molecular data on the dermal microfilariae of a species of *Cercopithifilaria* from a dog in Sicily. *Vet Parasitol* 182:221–229. <https://10.1016/j.vetpar.2011.05.043>
 19. Ramos RAN, Giannelli A, Brianti, E, Annoscia G, Cantacessi C, Dantas-Torres F, Otranto D (2013) Tick vectors of *Cercopithifilaria bainae* in dogs: *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato versus *Ixodes ricinus*. *Parasitol Res* 112:3013–3017. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3474-4>
 20. Latrofa MS, Dantas-Torres F, Giannelli A, Otranto D (2014) Molecular detection of tick-borne pathogens in *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. *Ticks Tick Borne Dis* 5:943–946. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.07.014>.
 21. Almeida GLG, Vicente JJ (1985) *Cercopithifilaria bainae* parasita de *Canis familiaris* (L.) (Nematoda, Filarioidea). *Atas Soc Biol Rio de Janeiro* 24:18.
 22. Ramos RAN, Rêgo AGDO, Firmino EDF, Ramos CAN, Carvalho GA, Dantas-Torres F, Alves LC (2016) Filarioids infecting dogs in northeastern Brazil. *Vet Parasitol* 226:26–29. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.06.025>.
 23. Santos MAB, de Souza IB, de Macedo LO, do Nascimento Ramos CA, de Oliveira Rego AG, Alves LC, de Carvalho GA (2017) *Cercopithifilaria bainae* in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks from dogs in Brazil. *Ticks Tick Borne Dis* 8:623–625. <https://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ttbdis.2017.04.007>.
 24. Soares RL, Parolin LB, Mateus NLF, de Figueiredo GRD, Rodrigues VR, de Oliveira GG, Nascimento Ramos CA (2020) Giant cutaneous cyst in a dog infected by *Cercopithifilaria bainae*. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 20:100401. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100401>.

25. Boyd M, Santoro D, Craft WF, Ginn PE, Childress AL, Wellehan JF, Walden HS (2019) Dermatitis caused by autochthonous *Cercopithifilaria bainae* from a dog in Florida, USA: clinical, histological and parasitological diagnosis and treatment. *Vet Dermatol* 30: 68–e20. <https://doi.org/10.1111/vde12701>.
26. Gabrielli S, Giannelli A, Brianti E, Dantas-Torres F, Bufalini M, Fraulo M, Otranto D (2014) Chronic polyarthritis associated to *Cercopithifilaria bainae* infection in a dog. *Vet Parasitol* 205:401–404. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.06.027.18>
27. Kannenberg AK, Frondana L, Martins IHR, Longhi CE, Fialkowski MM, Milczewski V (2019) Occurrence of filarid parasites in household and sheltered dogs in the city of Joinville–Santa Catarina, Brazil. *Cienc Anim Bras* 20:e-53529. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v20e-53529>.
28. EMBRAPA (2021) Território Mata Sul de Pernambuco. Portal Embrapa <http://embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologias/territorios/territorio-mata-sul-pernambucana>. Accessed 20 March 2023
29. Canatto BD, Silva EA, Bernardi F, Mendes MCNC, Paranhos NT, Dias RA (2012) Caracterização demográfica das populações de cães e gatos supervisionados do município de São Paulo. *Arq Bras Med Vet Zootec* 64:1515–1523. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352012000600017>.
30. Thrusfield MV (2004) *Epidemiologia veterinária*. São Paulo, Roca.
31. Knott J (1939) A method for making microfilarial surveys on day blood. *Med Hyg* 33:191–196. [http://doi.org/10.1016/S0035-9203\(39\)90101-x](http://doi.org/10.1016/S0035-9203(39)90101-x).
32. Magnis J, Lorentz S, Guardone L, Grimm F, Magi M, Naucke TJ, Deplazes P (2013) Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the Knot’s test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. *Parasit Vectors* 6:1–5. <https://doi.org/10.1186/1756-3306-6-48>.
33. Ayres M, Ayres Jr, M, Ayres DL, Santos AA (2007) *BIOESTAT – Statistical Applications on the Biomedical Sciences*. Society Mamirauá civil, Belém
34. IBGE (2021) Cidades. <https://cidades.ibge.gov.br>. Accessed 05 February 2023
35. Figueredo LA, Sales KGDS, Deuster K, Pollmeier M, Otranto D, Dantas-Torres F (2017) Exposure to vector-borne pathogens in privately owned dogs living in different socioeconomic settings in Brazil. *Vet Parasitol* 243:18–23. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.05.020>.
36. Dantas-Torres F, Otranto D (2020b) Overview on *Dirofilaria immitis* in the Americas, with notes on other filarial worms infecting dogs. *Vet Parasitol* 282:109–113. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109113>.
37. Cuervo PF, Rinaldi L, Cringoli G (2015) Modeling the extrinsic incubation of *Dirofilaria immitis* in South America based on monthly and continuous climatic data. *Vet Parasitol* 209: 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.010>.
38. Ledesma N, Harrington L (2015) Fine-scale temperature fluctuation and modulation of *Dirofilaria immitis* larval development in *Aedes aegypti*. *Vet Parasitol* 209:93–100. <http://doi:10.1016/j.vetpar.2015.02.003>.

39. Engelmann AM, Schafer AS, Lhamas CL, Dornelles GL, Cargnelutti JF, Ramos RAN, Monteiro SG, Andrade CM (2019) Morphological and molecular identification of *Acanthocheilonema reconditum* in a canine. *Comp Clin Pathol* 28:271–274. <https://doi.org/10.1007/s00580-018-2859-2>
40. Espinosa N, Rosero A, Villegas CL, Garcia IC, Gaviria-Cantin T, Nieto AP, Ferro BE, Nieto Ramirez LM (2022) First Report of *Acanthocheilonema reconditum* outbreak in canines with clinical signs of anemia from Southwestern Colombia. *Pathogens* 11:1434. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121434>.
41. Alves LC, Silva LVDA, Faustino MAG, McCall JW, Supakonderj P, Labarthe NW, Caires O (1999) Survey of canine heartworm in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94:587–590. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000500004>.

Figure captions

Fig. 1 Study area: map of Brazil indicating the state of Pernambuco and municipalities where animals were sampled.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho apresenta informações relevantes sobre a determinação da infecção por filarídeos sanguíneos e dérmicos em cães residentes em áreas costeiras do litoral sul do estado de Pernambuco. Constatou-se por meio da análise morfológica e antigênica a presença de *Dirofilaria immitis*, evidenciando a importância da realização de testes imunológicos para detecção dessa espécie de filarídeo na área de estudo. Além disso, animais microfilarêmicos apresentaram ausência de antígeno para *D. immitis*, sugerindo infecção por filarídeos do gênero *Acanthocheilonema*.

Deve-se ressaltar, ausência de filarídeos dérmicos na análise microscópica e molecular. O estudo demonstrou que foi predominante a coinfeção de *D. immitis* entre patógenos como *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp. que segue uma tendência observada em regiões tropicais onde os vetores estão presentes durante todo o ano, desta forma enfatiza a importância de maior conscientização de médicos veterinários sobre as possíveis implicações resultantes da co-infecção em cães.

O estudo observou maior concentração de cães infectados com *D. immitis* nos municípios de Cabo de Santo Agostinho e Ipojuca, estas áreas compreendem várias praias, atraindo maior fluxo de animais e humanos de diferentes regiões do país ao longo do ano em virtude das diversas atividades turísticas; uma vez que a circulação de hospedeiros vertebrados indica que existe um risco zoonótico por esse patógeno. Portanto, medidas preventivas devem ser ferramentas adotadas para reduzir a ocorrência deste parasito transmitido por vetores e assim evitar os riscos da infecção humana e/ou animal.

7. ANEXOS - Normas de submissão de manuscrito na revista Acta Parasitologica



Acta Parasitologica

[Home](#) > [Acta Parasitologica](#) > [Submission guidelines](#)

Submission guidelines

Instructions for Authors

Authorship Policy

Authorship should incorporate and should be restricted to those who have contributed substantially to the work in one or more of the following categories:

- Conceived of or designed study
- Performed research
- Analyzed data
- Contributed new methods or models
- Wrote the paper

Types of Papers

- **Original Articles** Original Articles should present novel and original data as result of an independent, cohesive study. The manuscripts have to be structured to contain a structured Abstract, List of authors with affiliations, Keywords (5) describing the content, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Statement of author contributions, Acknowledgements, Legends to Figures and Tables, References. Manuscripts can be any length. There are no restrictions on word count, number of figures, or amount of supporting information. We encourage you to present and discuss your findings concisely.
- **Short Communications** Short Communications should present brief observations which do not warrant the length of a full paper. However, they have to present completed studies and to follow the same scientific standards as Original Articles. The manuscripts have to be structured to contain a structured Abstract, List of authors with affiliations, Keywords (5) describing the content. The text of a short communication is written without sections and without extra spacing between paragraphs. The length of such submissions is limited to 1500 words for short communication and 2000-3500 words for research note.
- **Comments** Comments on published papers and replies. Limited to 2500 characters.
- **Reviews** Mini-Review article are limited to 3000 words with two figures and two tables. Full Review article are limited to 5000 words with no limitations on figures and tables and a maximum of 150 references.

Nomenclature

The authors should follow the international rules of nomenclature in the names of organisms they describe. Recommendations of the International Code of Zoological Nomenclature, London 1999 should be strictly adhered to.

[Back to top ↑](#)

Manuscript Submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit manuscript” and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Source Files

Please ensure you provide all relevant editable source files at every submission and revision. Failing to submit a complete set of editable source files will result in your article not being considered for review. For your manuscript text please always submit in common word processing formats such as .docx or LaTeX.

Please note:

Manuscripts should be submitted in correct English checked by a native English-speaking biologist/parasitologist. Authors are responsible for the linguistic accuracy of their papers. Authors should clearly confirm that their manuscript submitted to this journal was neither send to another journal nor any part of it has been published or is being considered for publication elsewhere in any form. The manuscript should contain: the title (as concise and informative as possible); name(s), the affiliation(s) and address(es) of the author(s); corresponding author e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author; running title; abstract (preferably not exceeding 200–250 words) and keywords.

Papers should be typed in English with double-spacing, and wide margins including a left-hand margin of not less than 2.5 cm. The text should be composed of the Abstract in structural form (2-3 sentences from each section listed), Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion and Conclusions provided with Acknowledgements if any, References, Tables and Figures. No part of the manuscript should be typed in capitals. Please use no more than three levels of displayed headings.

Latin terms, including genus and species names should be written in italics. Only the generally accepted abbreviations and symbols are allowed. Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter. The description of new species should be supported, if possible, by results obtained by means of molecular analysis. Contributors of taxonomic studies are encouraged to use molecular analysis where this is appropriate and feasible. The text must also have line numbers to make it easier for reviewers making reviews. Each page of the manuscript must include continuous line numbers in the margin.

Before submission of the manuscript, authors should log in/register on Editorial Manager and then upload their manuscripts along with a cover letter. Authors should follow the step-by-step instructions. In case of any problems please contact directly to the Editorial Office actapar@twarda.pan.pl

Authors are asked to suggest at least three potential referees who are experts in the field and are not associated with any of the authors, including their addresses, e-mail addresses and, if possible, telephone and fax numbers.

Authors must send their responses to reviewers' objections, line by line, along with their revised manuscript.

Title Page

Please make sure your title page contains the following information.

Title

The title should be concise and informative.

Author information

- The name(s) of the author(s)
- The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country
- A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author
- If available, the 16-digit [ORCID](#) of the author(s)

If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.

For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

Large Language Models (LLMs), such as [ChatGPT](#), do not currently satisfy our [authorship criteria](#). Notably an attribution of authorship carries with it accountability for the work, which cannot be effectively applied to LLMs. Use of an LLM should be properly documented in the Methods section (and if a Methods section is not available, in a suitable alternative part) of the manuscript.

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- Purpose (stating the main purposes and research question)
- Methods
- Results
- Conclusion

For life science journals only (when applicable)

- Trial registration number and date of registration for prospectively registered trials
- Trial registration number and date of registration followed by “retrospectively registered”, for retrospectively registered trials

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Statements and Declarations

The following statements should be included under the heading "Statements and Declarations" for inclusion in the published paper. Please note that submissions that do not include relevant declarations will be returned as incomplete.

- **Competing Interests:** Authors are required to disclose financial or non-financial interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Please refer to “Competing Interests and Funding” below for more information on how to complete this section.

Please see the relevant sections in the submission guidelines for further information as well as various examples of wording. Please revise/customize the sample statements according to your own needs.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in **Word**.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (**Word** 2007 or higher) or doc format (older **Word** versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX. We recommend using [Springer Nature's LaTeX template](#).

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

[Back to top ↑](#)

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text.

The entries in the list should be numbered consecutively.

If available, please always include DOIs as full DOI links in your reference list (e.g. "https://doi.org/abc").

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325-329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing *PhysicsWeb*. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

[ISSN.org_LTWA](http://www.issn.org/LTWA)

If you are unsure, please use the full journal title.

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibliography style file `sn-basic.bst` which is included in the [Springer Nature Article Template](#).



Filarial Nematodes in Dogs from the Northeast Region of Brazil

Daniely Oliveira do Nascimento Rocha^{1,2} · Lucia Oliveira Macedo¹ · Jéssica Cardoso Pessoa de Oliveira^{1,2} · Samuel Souza Silva^{1,2} · Herbert Patric Kellermann Cleveland³ · Carlos Alberto do Nascimento Ramos³ · Alex Santos Marques⁴ · Leucio Câmara Alves⁵ · Gílcia Aparecida de Carvalho¹ · Rafael Antonio Nascimento Ramos¹

Received: 9 November 2023 / Accepted: 4 March 2024

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2024

Abstract

Purpose Medical and veterinary filarial nematodes are transmitted by blood-feeding vectors. In dogs, these parasites are mainly represented by nematodes in which microfilariae dwell in the blood (*Dirofilaria* spp. and *Acanthocheilonema* spp.) or skin (*Cercopithifilaria* spp. and *Onchocerca lupi*). The aim of this study was to determine the prevalence of these filarial infections in dogs residing in a touristic, heavily populated location in the northeastern region of Brazil.

Methods Blood samples ($n = 245$) were assessed by a modified Knott test, followed by a qualitative ELISA test (SNAP® 4Dx® Plus, IDEXX Laboratory, Westbrook, Maine, USA) for the detection of antibodies against *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Ehrlichia* spp. and antigens of *Dirofilaria immitis*. Skin samples ($n = 71$) were microscopically examined and molecularly assessed through a PCR targeting the 12 S rRNA gene.

Results Microfilariae and antigen of *D. immitis* were detected simultaneously in 15 (6.1%; 95% CI = 3.7–9.8) animals. Nine animals (3.6%; 95% CI = 1.9–6.8) were *D. immitis* antigen positive but microfilariae negative and nine other animals (3.6%; 95% CI = 1.9–6.8) were microfilariae positive but *D. immitis* antigen negative. *D. immitis* positive dogs were found in four different municipalities. No filarioids were detected in the skin after microscopical and molecular analyses.

Conclusion Data from this study demonstrate that *D. immitis* is the main filarial nematode infecting dogs in coastal areas in northeastern Brazil. Based on the potential risk of infection in which animals are submitted, it is essential to perform tests to detect microfilariae and *D. immitis* antigen. Preventive measures must be adopted by using microfilaricidal compounds and anti-feeding insecticides to prevent canine infection.

Keywords *Acanthocheilonema reconditum* · Beach area · *Cercopithifilaria baina* · *Dirofilaria immitis* · Zoonosis

Introduction

The family Onchocercidae (Rhabditida: Filarioidea) comprises nematodes of particular interest due to their high impact on human and animal health [1]. These parasites are transmitted through blood-feeding vector arthropods (e.g., mosquitoes, fleas, lice, and ticks) and may infect a wide plethora of wild and domestic animals, especially dogs [2, 3]. Various species can parasitize dogs, some of which have microfilariae present in their blood, such as *Dirofilaria* spp. and *Acanthocheilonema* spp., while others have them in their skin, including *Cercopithifilaria* spp. and *Onchocerca lupi* [4].

Among those in which microfilariae are detected in the blood, the genus *Dirofilaria* is the most important due to the virulence presented by the species *Dirofilaria immitis* [5, 6]. This filarioid parasitizes the right ventricle and pulmonary

✉ Lucia Oliveira Macedo
luciamacedo162@gmail.com

¹ Laboratory of Parasitology, Federal University of the Agreste of Pernambuco, Garanhuns, Brazil

² Graduate Program in Animal Biosciences, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Brazil

³ Faculty of Veterinary and Animal Sciences, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil

⁴ Brazilian University Center, Recife, Brazil

⁵ Department of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Brazil

arteries, and infective stage is transmitted by mosquitoes (e.g., *Culex* spp., *Aedes* spp., and *Anopheles* spp.) [7–10]. In the Americas, *D. immitis* infection is widely distributed from the United States to Argentina, with prevalence ranging from 1 to 40% [11, 12]. In Brazil, prevalence values over 30% have been observed [11, 13], with some areas in the northeastern region with 12.9% [14] and 5.5% [15]. Despite being less studied, *Acanthocheilonema reconditum* has been reported in the same areas of *D. immitis*, and the differential diagnosis is imperative.

Blood filarioids are uniquely considered epidemiologically crucial for the canine population for the last few decades. In recent years, attention has also been given to skin-dwelling filarioid nematodes such as *Cercopithifilaria* and *Onchocerca* [3, 16]. The genus *Cercopithifilaria* comprises of three species that may infect dogs (i.e., *Cercopithifilaria baina*, *Cercopithifilaria grassi*, and *Cercopithifilaria* sp. II [17], but most of the knowledge accumulated over the last year is restricted to *C. baina* [18, 19]. The life cycle shows that brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, is transmitting this pathogen, which is evident by previous studies showing overlap [20]. In Brazil, *C. baina* in dogs and *R. sanguineus* s.l. are restricted to reports from the Southeast [21], Northeast [20, 22, 23] and Mid-West regions [24]. Despite being considered to be minimal in virulent relevance, there are reports of dermatitis [25], polyarthritis [26] and the presence of a giant cyst [24] associated with *C. baina* infection.

The diversity of filarial nematodes in a canine population is linked to the availability of definitive hosts and vectors, as well suitable environmental conditions that promote vector proliferation [27]. In recent years, the intense global mobility of pets within and between countries traversing large geographic distances has been recognized as a global public health and veterinary concern. Leading to vectors expansion and potentially increasing zoonotic transmission into new areas. Therefore, the aim of this study was to determine the prevalence of filarial infection in dogs living in a touristic region with a constant interaction of both animals and humans year-round.

Materials and Methods

Study Area

The study was conducted in seven municipalities of the South Coast of Pernambuco, northeastern Brazil (Fig. 1). Mangroves are a key feature in the area and are close to fragments of the Atlantic Forest. This region has an average temperature of 25 °C (18–31 °C), average annual rainfall of 1,250 mm (1,000 mm–2,200 mm) and an average relative

humidity of 80%. According to the Köppen classification, the humid tropical climate (*As*) is predominant in the study area [28]. In addition, the region is known for high touristic attraction and has a continuous influx of humans and animals throughout the year.

Blood and Skin Sampling

The minimum sample size required ($n = 245$) was calculated considering the estimated canine population of the region ($n = 70,068$). This estimation followed a proportion of previously established of human/dog (4.4/1) [29]. The margin of error was calculated at 5% and a confidence interval of 95% for this estimation [30].

From February to September 2021, blood samples ($n = 245$) were collected from the cephalic vein of dogs and stored in tubes containing an anticoagulant (ethylenediaminetetraacetic acid–EDTA). Fragments of skin samples ($n = 71$) were collected using a disposable punch (2 mm diameter) from the inter-scapular region. The low number of skin samples was due to the low adherence of dog owners in the collection of skin.

Microscopic Examination of Blood and Skin

Blood samples were processed by the modified Knott test [31]. Briefly, 1 mL of whole blood was mixed with 9 mL of 2% formalin in a conical tube and centrifuged for 5 min. The supernatant was removed, and the pellet was mixed with 1% methylene blue dye. Approximately 20 μ L of the material was transferred to slides and examined under optical microscopy at different magnifications (40 and 100X) [32]. Skin samples were examined according to Otranto et al. [18]. Each fragment was soaked in saline solution for about 6 h at room temperature, and the sediment was examined microscopically at different magnifications (10 and 40X). The skin fragment that remained was stored at -20 °C until molecular processing.

ELISA Test and Molecular Examination of the Skin

Blood samples were tested by an ELISA test (SNAP® 4Dx® Plus, IDEXX Laboratory, Westbrook, Maine, USA), which detects antibodies to *Anaplasma* spp. (*A. platys/A. phagocytophilum*), *Ehrlichia* spp. (*E. canis/E. ewingii*), *Borrelia burgdorferi* s.l. and *D. immitis* antigens. The immunological test was performed according to the manufacturer's recommendations.

Genomic DNA of skin samples was extracted using a commercial kit (Reliaprep™ gDNA Tissue Miniprep System Kit, Promega®, USA) according to the manufacturer's instructions. In order to detect *Cercopithifilaria* spp., DNA

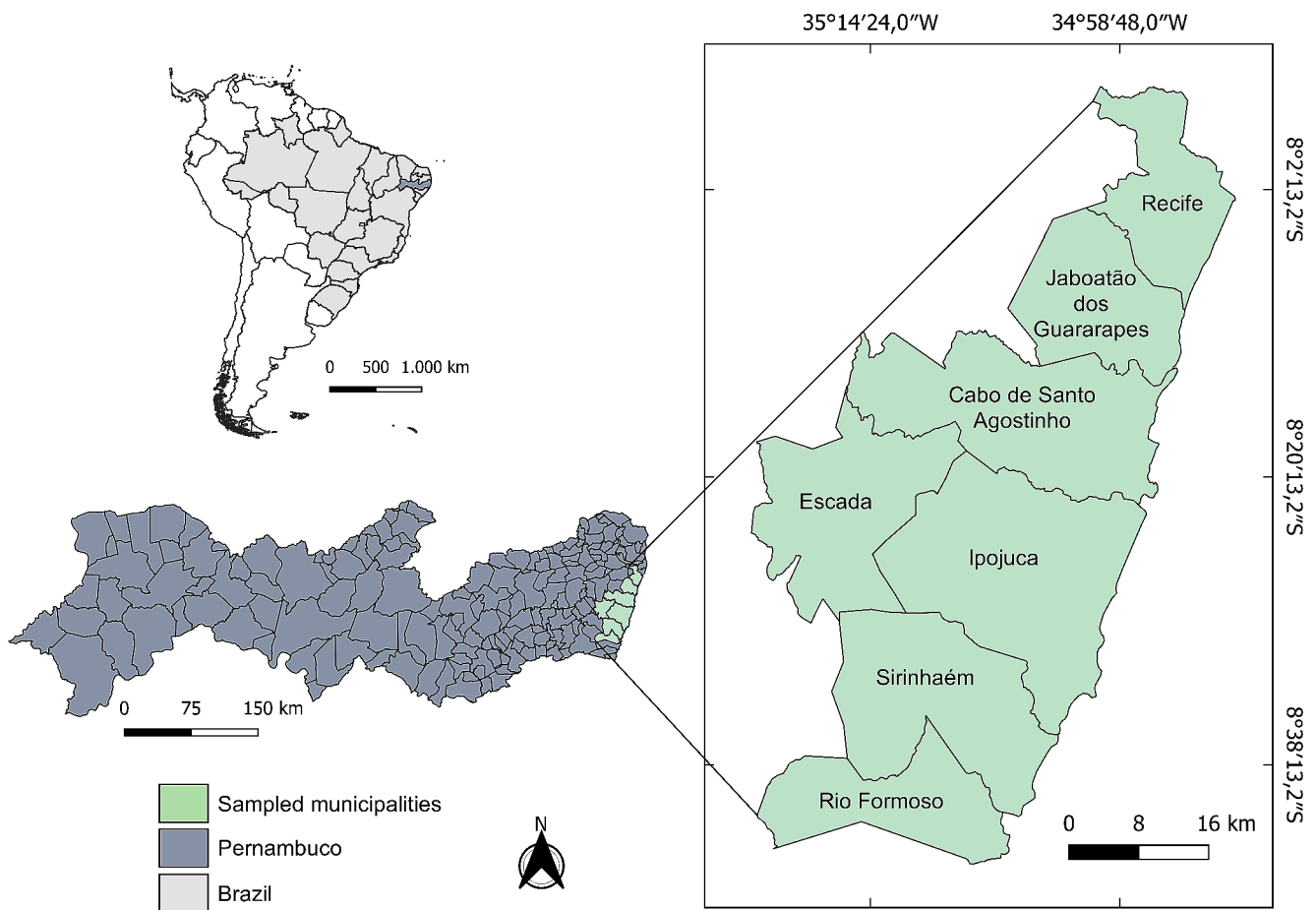


Fig. 1 Study area: map of Brazil indicating the state of Pernambuco and seven municipalities where animals were sampled

skin samples were analyzed by amplification of 330 bp using a set of primers (Fila12SF: 5'-CGGGAGTAAAGTT TTGTTTAAACCG-3' and Fila12SR: 5'-CATTGACGGAT GGTTTGTACCAC-3') designed on the 12 S rRNA gene [18].

Data Analysis and Maps Creation

Absolute and relative frequencies were calculated. Confidence intervals (95% CI) were considered, and the modified Wilson method was applied (<https://epitools.ausvet.com.au/ciproportion>). The Chi-square test was used to compare *D. immitis* antigen detection versus *D. immitis* plus co-infections at the ELISA test, and differences in positivity for sex, age and breed among *D. immitis* positive dogs at ELISA test. All analyzes were performed with the BioEstat 5.0 software [33].

A map was created using the QGIS 3.22.10 software, in which georeferenced data were inserted in continuous cartographic base (Shapefiles, version 2017) available at Brazilian Institute for Geography and Statistics database [34].

Results

Overall, microfilariae and antigen of *D. immitis* were detected simultaneously in 15 (6.1%; 95% CI=3.7–9.8) animals. Nine animals (3.6%; 95% CI=1.9–6.8) were *D. immitis* antigen positive but microfilariae negative and nine other animals (3.6%; 95% CI=1.9–6.8) were microfilariae positive but *D. immitis* antigen negative.

Table 1 shows the frequency of blood microscopy and ELISA tests results, including co-infections by other vector-borne pathogens. *D. immitis* plus co-infections showed significance when compared to single infections of only *D. immitis* ($\chi^2=4.5111$; $p=0.0337$). No statistical difference was observed between male and female ($\chi^2=0.344$; $p=0.5573$) and between breed and crossbreed ($\chi^2=3.314$; $p=0.0687$). Conversely, positivity of animals aging > 2 to 5 years-old was statistically significant when compared to other ages ($\chi^2=7.6138$; $p=0.0222$).

Table 2 shows the frequency of *D. immitis* antigen and microfilariae positive dogs according the municipality of sampling. No filarioids were detected in the skin after microscopic and molecular analysis.

Table 1 Frequency of positive dogs in the modified Knott's test and ELISA test for *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp

Variables	Knott test	ELISA test					
		<i>D. immitis</i>	<i>D. immitis</i> + <i>E. canis</i>	<i>D. immitis</i> + <i>E. canis</i> + <i>A. platys</i>	<i>E. canis</i>	<i>A. platys</i>	<i>E. canis</i> + <i>A. platys</i>
n/N (%; 95% CI)							
Overall positivity	24/245 (9.8; 6.7–14.2)	7/245 (2.9; 1.4–5.8)	15/245 (6.1; 3.7–9.8)	2/245 (0.8; 0.2–0.9)	39/245 (16; 11.9–21)	1/245 (0.4; 0–2.3)	8/245 (3.3; 1.7–6.3)
Male	12/116 (10.3; 6–17.2)	5/116 (4.3; 1.8–9.7)	4/116 (3.4; 1.3–8.5)	1/116 (0.9; 0.1–4.7)	17/116 (14.7; 9.4–22.2)	1/116 (0.9; 0.1–4.7)	3/116 (2.6; 0.9–7.3)
Female	12/129 (9.3; 5.4–15.6)	2/129 (1.5; 0.4–5.5)	11/129 (8.5; 4.8–14.6)	1/129 (0.5; 0.1–4.3)	22/129 (17; 11.5–24.5)	0	5/129 (3.9; 1.7–8.7)
Crossbreed	19/152 (12.5; 8.1–18.7)	3/152 (2; 0.7–5.6)	14/152 (9.2; 5.6–14.9)	2/152 (1.3; 0.4–4.7%)	34/152 (22.4; 16.5–29.6)	0	8/152 (5.3; 2.7–10)
Breed	5/93 (5.4; 2.3–12)	4/93 (4.3; 1.7–10.5)	1/93 (1.1; 0.2–5.8)	0	5/93 (5.4; 2.3–12)	1/93 (1.1; 0.2–5.8)	0
< 2 years	2/65 (3; 0.8–10.5)	2/65 (3; 0.8–10.5)	3/65 (4.6; 1.6–12.7)	0	0	0	1/65 (1.5; 0.2–8.2)
> 2 to 5 years	18/112 (16; 10.4–24)	4/112 (3.6; 1.4–8.8)	11/112 (9.8; 5.6–16.7)	2	29/112 (25.9; 18.7–34.7)	0	5/112 (4.5; 1.9–10)
> 5 years	4/68 (5.9; 2.3–14.2)	1/68 (1.5; 0.3–7.9)	1/68 (1.5; 0.3–7.9)	0	10/68 (14.7; 8.2–25)	1/68 (1.4; 0.3–7.9)	2/68 (2.9; 0.8–10.1)

Table 2 Distribution of *D. immitis* antigen and microfilariae positive dogs according to the municipality of sampling

Municipality	Animals sampled	Microfilariae + <i>D. immitis</i> antigen positive	<i>D. immitis</i> antigen positive	Microfilariae positive
Cabo de Santo Agostinho	132	1	3	5
Escada	7	1	1	0
Ipojuca	97	12	4	4
Jaboatão dos Guararapes	2	1	1	0
Recife	1	0	0	0
Rio Formoso	1	0	0	0
Sirinhaém	5	0	0	0

Discussion

This study reports the occurrence of blood filarial nematodes and co-infections in dogs that inhabit an area characterized by a high and continuous flow of animals and humans throughout the year. The prevalence of *D. immitis* infection (9.8%; 95% CI = 6.7–14.2) observed in the study area highlights the need for preventive measures in the dog population using microfilaricidal compounds and anti-feeding insecticides to prevent canine infection. The presence of *D. immitis* hotspots in coast zones has been reported in northeastern Brazil, with prevalence varying from 12.9 to 49.5% [11, 14, 35, 36]. These areas present suitable climate conditions (temperature ranging from 25 to 28 °C, and relative humidity mean of 80%) for the development of vectors and

extrinsic incubation period for *D. immitis* [37]. It is known that the success of larval development within the mosquito host is temperature dependent. When the temperature falls below the minimum threshold, (14°C), development of the transmitting vector will cease [38].

The absence of *D. immitis* antigen in nine microfilaremic dogs suggests the infection of *Acanthocheilonema* spp., a nematode transmitted by ectoparasites (e.g., fleas and lice) found worldwide [39]. Despite low virulence, massive infections by *Acanthocheilonema* spp. have been recently associated to anemia in dogs [40]. In addition, evidence of sympatry with other *Dirofilaria* spp. may require differentiation in microscopic and molecular diagnostics between both filarioids [14, 32]. The presence of different filarioids in the canine population in this area reinforces the importance of immunological tests for detecting *D. immitis* antigens.

The co-infection among *D. immitis* and other pathogens (i.e., *Anaplasma* spp. and *Ehrlichia* spp.) follows a trend observed in tropical regions where vectors are present throughout the year. While the presence of multiple infections has been reported in dogs of northeastern Brazil [14, 15, 35] the ELISA test can detect antibodies against *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp., indicating exposure of this animals to these pathogens. These findings on multiple infections emphasize the importance of enhancing veterinary practitioners' awareness of the high frequency and potential missed diagnosed co-infections in dogs found in this area [14].

There was no statistical difference in positivity for *D. immitis* antigen or microfilariae between male and female and breed and crossbreed animals, which revealed that regardless of the sex or the breed, animals in this study might be equally exposed to the infection. The statistical predominance of *D. immitis* and microfilariae-infected animals among the dog population aged > 2 to 5 years old likely might be related to the highest number ($n = 112$) of samples collected in this age compared to other age groups.

The distribution of dogs infected by *D. immitis* was observed in four municipalities but with a higher concentration in Cabo de Santo Agostinho and Ipojuca. Since all municipalities present similar climate conditions that allow vector development, this difference is related to number of samples collected. In fact, more than 90% ($n = 229$) of samples were collected in these two municipalities which impair a reliable statistical comparison. Both municipalities are characterized by several beaches that attract a constant flow and interaction of animals and humans from different Brazilian regions year-round. This constant presence poses an additional risk of spreading *D. immitis*, since animals from non-endemic areas are exposed to infected vectors. The epidemiology of *D. immitis* in dogs has been studied in the region since the late 1990s [41], and the situation has no evidence of change according to more recent studies [11, 14]. Health authorities should be aware of the zoonotic risk of *D. immitis*, and considering the epidemiological situation of the study area, the presence of asymptomatic humans cannot be ruled out.

No skin-dwelling microfilariae were detected during microscopic and molecular examination. *C. bairnei* had been detected in dogs and ticks in the northeastern region of Brazil [22, 23], but in this study, a low number of skin samples were analyzed due to the lack of the sampling. It is important to note that collecting skin snips is a minimally invasive technique and does not offer any risk to the dog when appropriately performed. The reduced number of skin samples and no ticks collected are limitations of this study, a factor to be addressed in future assessments.

Data from this study demonstrate that *D. immitis* is the main filarial nematode infecting dogs in beach areas in northeastern Brazil. Based on the potential risk of infection, it is essential to perform the recommended bi-annual screening for microfilariae and antigen specific to *D. immitis* through integrative microscopic and immunological testing. Moreover, continued research on the epidemiology and biology of *Acanthocheilonema* spp. and its potential impact on disease dynamics is crucial for devising targeted interventions and ensuring the health and well-being on a One Health level. Understanding different filarial species prevalence and interactions can inform effective control and prevention strategies. Preventive measures can include

microfilaricidal compounds, anti-feeding insecticides, and environmental management control for culicid populations.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s11686-024-00834-x>.

Acknowledgements Authors thank Maureen Kelly (Texas A&M University) for her critical English reading.

Declarations

Ethical Approval All procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation (ECAE) of the Federal Rural University of Pernambuco (protocol number 9759161120).

Conflict of Interest On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

References

- Orihel T, Eberhard ML (1998) Zoonotic filariasis. Clin Microbiol Rev 11:366–381
- Anderson RC (2000) Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission, 2nd edn. Cabi Publishing, Estados Unidos, p 672
- Otranto D, Brianti E, Dantas-Torres F, Miro G, Latrofa MS, Mutafchiev Y, Bain O (2013) Species diversity of dermal microfilariae of the genus *Cercopithifilaria* infesting dogs in the Mediterranean region. Parasitol 140:99–101. <https://doi.org/10.1017/S0031182012001357>
- Gruntmeir J, Kelly M, Ramos RAN, Verocai GG (2023) Cutaneous filarioid nematodes of dogs in the United States: are they emerging, neglected, or underdiagnosed parasites? Front Vet Sci 10:1128611. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1128611>
- Vezzani D, Carbajo AE, Fontanarrosa MF, Scodellaro CF, Basabe J, Cangiano G, Eiras DF (2011) Epidemiology of canine heartworm in its southern distribution limit in South America: risk factors, inter-annual trend and spatial patterns. Vet Parasitol 176(2–3):240–249. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.046>
- Simón F, Siles-Lucas M, Morchón R, González-Míguez J, Melhado I, Carretón E, Montoya-Alonso JA (2012) Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. Clin Microbiol Rev 25:507–544. <https://doi.org/10.1128/cmr.00012-12>
- Labarthe N, Serrão ML, Melo YF, Oliveira SJD, Lourenço-de-Oliveira R (1998) Potential vectors of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) in Itacoatiara, oceanic region of Niterói municipality, state of Rio De Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 93:425–432. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761998000400001>
- McCall JW, Genchi C, Kramer LH, Guerrero J, Venco L (2008) Heartworm disease in animals and humans. Adv Parasitol 66:193–285. [https://doi.org/10.1016/S0065-308x\(08\)00204-2](https://doi.org/10.1016/S0065-308x(08)00204-2)
- Bowman DD (2014) Georgis' parasitology for veterinarians. Elsevier Health Sciences, Missouri
- Taylor MA, Coop RL, Wall RL (2017) Parasitologia Veterinária. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro
- Labarthe NV, Paiva JP, Reifur L, Mendes-de-Almeida F, Merlo A, Carvalho Pinto CJ, Juliani PS, Almeida MA, Alves LC (2014) Updated canine infection rates for *Dirofilaria immitis* in areas of Brazil previously identified as having a high incidence of heartworm-infected dogs. Parasit Vectors 7:493. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0493-7>

12. Bendas AJR, Mendes-de-Almeida F, Guerrero J, Labarthe N (2017) Update on *Dirofilaria immitis* epidemiology in South America and Mexico: literature review. *Braz J Vet Res Anim Sci* 54:319–329. <https://doi.org/10.11606/issn.16784456.bjvras.2017.132572>
13. Dantas-Torres F, Figueredo LA, Sales KGDS, Miranda DEO, Alexandre JLA, da Silva YY, da Silva LG, Valle GR, Ribeiro VM, Otranto D, Deuster K, Pollmeier M, Altreuther G (2020a) Prevalence and incidence of vector-borne pathogens in unprotected dogs in two Brazilian regions. *Parasit Vectors* 13:195. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04056-8>
14. Ramos RAN, Giannelli A, Ubirajara-Filho CRC, Ramos CAN, Betbder D, Bezerra-Santos MA, Otranto D (2022) Vector-borne pathogens in dogs from areas where leishmaniosis is endemic. *Vet Parasitol Reg Stud Rep* 32:100746. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2022.100746>
15. Macedo LO, Bezerra-Santos MA, Ubirajara Filho CRC, Sales KGS, de Sousa-Paula LC, Silva LG, Otranto D (2022) Vector-borne pathogens of zoonotic concern in dogs from a Quilombola community in northeastern Brazil. *Parasitol Res* 121:3305–3311. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07661-x>
16. Mutafchiev Y, Dantas-Torres F, Giannelli A, Abramo F, Papadopoulos E, Cardoso L, Otranto D (2013) Redescription of *Onchocerca lupi* (Spirurida: Onchocercidae) with histopathological observations. *Parasit Vectors* 6:1–8. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-309>
17. Otranto D, Brianti E, Latrofa MS, Annoscia G, Weigl S, Lia RP, Bain O (2012) On a *Cercopithifilaria* sp. transmitted by *Rhipicephalus sanguineus*: a neglected, but widespread filarioid of dogs. *Parasit Vectors* 5:1–9. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-1>
18. Otranto D, Brianti E, Dantas-Torres F, Weigl S, Latrofa MS, Gaglio G, Bain O (2011) Morphological and molecular data on the dermal microfilariae of a species of *Cercopithifilaria* from a dog in Sicily. *Vet Parasitol* 182:221–229. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.043>
19. Ramos RAN, Giannelli A, Brianti E, Annoscia G, Cantacessi C, Dantas-Torres F, Otranto D (2013) Tick vectors of *Cercopithifilaria bainae* in dogs: *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato versus *Ixodes ricinus*. *Parasitol Res* 112:3013–3017. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3474-4>
20. Latrofa MS, Dantas-Torres F, Giannelli A, Otranto D (2014) Molecular detection of tick-borne pathogens in *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. *Ticks Tick Borne Dis* 5:943–946. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.07.014>
21. Almeida GLG, Vicente JJ (1985) *Cercopithifilaria bainae* parasita de *Canis familiaris* (L.) (Nematoda, Filarioidea). *Atas Soc Biol Rio De Janeiro* 24:18
22. Ramos RAN, Rêgo AGDO, Firmino EDF, Ramos CAN, Carvalho GA, Dantas-Torres F, Alves LC (2016) Filarioids infecting dogs in northeastern Brazil. *Vet Parasitol* 226:26–29. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.06.025>
23. Santos MAB, de Souza IB, de Macedo LO, do Nascimento Ramos CA, de Oliveira Rego AG, Alves LC, de Carvalho GA (2017) *Cercopithifilaria bainae* in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks from dogs in Brazil. *Ticks Tick Borne Dis* 8:623–625. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.04.007>
24. Soares RL, Parolin LB, Mateus NLF, de Figueiredo GRD, Rodrigues VR, de Oliveira GG, Nascimento Ramos CA (2020) Giant cutaneous cyst in a dog infected by *Cercopithifilaria bainae*. *Vet Parasitol Reg Stud Rep* 20:100401. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100401>
25. Boyd M, Santoro D, Craft WF, Ginn PE, Childress AL, Wellehan JF, Walden HS (2019) Dermatitis caused by autochthonous *Cercopithifilaria bainae* from a dog in Florida, USA: clinical, histological and parasitological diagnosis and treatment. *Vet Dermatol* 30:68–e20. <https://doi.org/10.1111/vde12701>
26. Gabrielli S, Giannelli A, Brianti E, Dantas-Torres F, Bufalini M, Fraulo M, Otranto D (2014) Chronic polyarthritides associated to *Cercopithifilaria bainae* infection in a dog. *Vet Parasitol* 205:401–404. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.06.027.18>
27. Kannenberg AK, Frondana L, Martins IHR, Longhi CE, Fialkowski MM, Milczewski V (2019) Occurrence of filarial parasites in household and sheltered dogs in the city of Joinville–Santa Catarina, Brazil. *Cienc Anim Bras* 20:e–53529. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v20e-53529>
28. EMBRAPA (2021) Território Mata Sul de Pernambuco. Portal Embrapa <http://embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologias/territorios/territorio-mata-sul-pernambucana>. Accessed 20 March 2023
29. Canatto BD, Silva EA, Bernardi F, Mendes MCNC, Paranhos NT, Dias RA (2012) Caracterização demográfica das populações de cães e gatos supervisionados do município de São Paulo. *Arq Bras Med Vet Zootec* 64:1515–1523. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352012000600017>
30. Thrusfield MV (2004) *Epidemiologia veterinária*. São Paulo, Roca
31. Knott J (1939) A method for making microfilarial surveys on day blood. *Med Hyg* 33:191–196. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(39\)90101-x](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(39)90101-x)
32. Magnis J, Lorentz S, Guardone L, Grimm F, Magi M, Naucke TJ, Deplazes P (2013) Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the Knot's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. *Parasit Vectors* 6:1–5. <https://doi.org/10.1186/1756-3306-6-48>
33. Ayres M, Ayres M Jr, Ayres DL, Santos AA (2007) BIOESTAT—statistical applications on the Biomedical sciences. Society Mamirauá civil, Belém
34. IBGE (2021) Cidades. <https://cidades.ibge.gov.br>. Accessed 05 February 2023
35. Figueredo LA, Sales KGDS, Deuster K, Pollmeier M, Otranto D, Dantas-Torres F (2017) Exposure to vector-borne pathogens in privately owned dogs living in different socioeconomic settings in Brazil. *Vet Parasitol* 243:18–23. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.05.020>
36. Dantas-Torres F, Otranto D (2020b) Overview on *Dirofilaria immitis* in the Americas, with notes on other filarial worms infecting dogs. *Vet Parasitol* 282:109–113. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109113>
37. Cuervo PF, Rinaldi L, Cringoli G (2015) Modeling the extrinsic incubation of *Dirofilaria immitis* in South America based on monthly and continuous climatic data. *Vet Parasitol* 209:70–75. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.010>
38. Ledesma N, Harrington L (2015) Fine-scale temperature fluctuation and modulation of *Dirofilaria immitis* larval development in *Aedes aegypti*. *Vet Parasitol* 209:93–100. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.003>
39. Engelmann AM, Schafer AS, Lhamas CL, Dornelles GL, Cargnelutti JF, Ramos RAN, Monteiro SG, Andrade CM (2019) Morphological and molecular identification of *Acanthocheilonema reconditum* in a canine. *Comp Clin Pathol* 28:271–274. <https://doi.org/10.1007/s00580-018-2859-2>
40. Espinosa N, Rosero A, Villegas CL, Garcia IC, Gaviria-Cantín T, Nieto AP, Ferro BE, Nieto Ramirez LM (2022) First Report of *Acanthocheilonema reconditum* outbreak in canines with clinical signs of anemia from Southwestern Colombia. *Pathogens* 11:1434. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121434>
41. Alves LC, Silva LVDA, Faustino MAG, McCall JW, Supakonderj P, Labarthe NW, Caires O (1999) Survey of canine heartworm in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94:587–590. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000500004>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.