



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**



**PESQUISA MOLECULAR E MICROSCÓPICA
DE FILARÍDEOS EM CANINOS NO MUNICÍPIO DE CAMPO
GRANDE, MATO GROSSO DO SUL, BRASIL**

RODRIGO LEITE SOARES

Campo Grande – MS
2020

RODRIGO LEITE SOARES

**PESQUISA MOLECULAR E MICROSCÓPICA
DE FILARÍDEOS EM CANINOS NO MUNICÍPIO DE CAMPO
GRANDE, MATO GROSSO DO SUL, BRASIL**

*Molecular and microscopical research of filarids in canines from
municipality of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil*

RODRIGO LEITE SOARES

Orientador: Carlos Alberto do Nascimento Ramos

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul,
como requisito parcial para obtenção do título
de Mestre em Ciências Veterinárias.

Campo Grande – MS
2020

“Rapadura é doce, mas num é mole não”
Sabedoria popular

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida, minha essência e por iluminar meu caminho, trazendo oportunidades, aprendizado e, principalmente, amizades;

Aos meus pais, pelo amor incondicional, pela educação, valores de minha criação, e todo apoio/ incentivo aos meus estudos, trabalhos e projetos de vida;

A todos familiares e amigos, que sempre me apoiam e torcem pelo meu sucesso pessoal e profissional;

Ao meu orientador e professor Carlos Alberto do Nascimento Ramos. Agradeço pela amizade, paciência, oportunidades e ensinamentos, mas principalmente por ser uma das maiores referências de profissional e ser humano que tive o prazer de conhecer, e que com certeza lembrarei por toda minha vida;

Aos professores, técnicos e amigos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Muito obrigado por toda ajuda, apoio, companheirismo e amizade;

Aos professores e técnicos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Obrigado pelo conhecimento e ajuda durante todo o mestrado;

Aos funcionários do Centro de Controle de Zoonoses e da Secretaria Municipal de Saúde de Campo Grande- MS, pela parceria e auxílio nas coletas de amostras;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de recursos financeiros;

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para que a realização deste trabalho fosse possível.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
CAPÍTULO 1.....	10
1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS.....	11
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	12
3.1 FILARÍDEOS EM CANINOS.....	12
3.1.1 <i>Dirofilaria</i>	12
3.1.2 <i>Acanthocheilonema</i>	16
3.1.3 <i>Cercopithifilaria</i>	18
3.2 DIAGNÓSTICO DE FILARIOSE CANINA.....	20
3.2.1 Análise microscópica.....	20
3.2.2 Provas sorológicas.....	23
3.2.3 Provas moleculares.....	24
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
CAPÍTULO 2	30
Artigo 1- Filarids in canines from Midwest Brazil: Epidemiological and diagnostic aspects	30
Abstract.....	30
Introduction.....	31
Material and methods.....	31
Results and Discussion.....	32
Acknowledgment.....	35
References.....	35
CAPÍTULO 3.....	40
Artigo 2- Molecular detection of <i>Cercopithifilaria bairnei</i> and other tick-borne pathogens in <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l. isolated from dogs in Midwest Brazil.....	40
Abstract.....	41
Resumo.....	41

Introduction.....	42
Material and methods	43
Results and Discussion	44
Acknowledgment	47
References.....	47
CAPÍTULO 4.....	54
Artigo 3- Giant cutaneous cyst in a dog infected by <i>Cercopithifilaria baina</i>	54
Abstract.....	55
Introduction.....	55
Materials and methods.....	56
Results.....	59
Discussion.....	59
Acknowledgment	61
References.....	62
CAPÍTULO 5.....	67
Artigo 4- Primeiro relato de dirofilariose canina (<i>Dirofilaria immitis</i>) em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.....	67
Resumo.....	67
Introdução.....	68
Casuística.....	69
Discussão.....	71
Agradecimentos.....	74
Referências.....	74
CAPITULO 6.....	76
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
ANEXOS.....	77
Aprovação de Comitê de Ética de Uso Animal.....	77
Aprovação do Colegiado de Curso.....	78
Aprovação da Secretaria Municipal de Saúde de Campo Grande...	79
Autorização SisGen – Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado.....	80
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	81
Questionário Epidemiológico.....	82
Normas das Revistas.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferenças morfométricas e morfológicas das principais microfilárias em cães.....	22
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Diferença morfológica entre macho e fêmea de <i>Dirofilaria immitis</i>	13
Figura 2.	Microfilária de <i>Dirofilaria immitis</i>	14
Figura 3	Esquematização do ciclo de vida de <i>Dirofilaria immitis</i>	15
Figura 4	Microfilária de <i>Acanthocheilonema reconditum</i>	16
Figura 5	Ciclo de vida de <i>Acanthocheilonema reconditum</i>	17
Figura 6	Microfilária de <i>Cercopithifilaria bairnei</i>	19
Figura 7	Ciclo de vida de <i>Cercopithifilaria bairnei</i>	19
Figura 8	Microfilária de <i>Dirofilaria immitis</i> em esfregaço sanguíneo.....	21
Figura 9	Técnica de <i>Knott</i> modificado.....	22
Figura 10	Teste sorológico SNAP (ELISA) para detecção de antígenos de fêmeas adultas de <i>Dirofilaria immitis</i>	23
Figura 11	Teste sorológico de imunomigração rápida para detecção de antígenos de fêmeas adultas de <i>D. immitis</i>	24
Figura 12	Produtos de amplificação da PCR para detecção de fragmento do gene 12S rRNA de filarídeos, visualizados após eletroforese em gel de agarose 2%.	25

SOARES, R. L. Pesquisa molecular de filarídeos em caninos no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. 2020. Mestrado- Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. 2020.

RESUMO

Filarídeos em caninos incluem espécies cujo microfilárias circulam na corrente sanguínea (ex., *Dirofilaria immitis* e *Acantocheilonema reconditum*) ou habitam no tecido subcutâneo (ex., *Cercopithifilaria* spp. e *Onchocerca* spp.) O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de filarídeos em cães e seus potenciais hospedeiros artrópodes do município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. Esta dissertação é composta por quatro artigos. Artigo 1- Objetivou investigar a ocorrência de infecções filariais em cães residentes em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. As amostras de sangue e pele de cães domiciliados (n = 80) foram microscopicamente (teste de Knott modificado e exame de sedimento de fragmento de pele) e molecularmente (PCR do gene 12S rRNA PCR) avaliados. Informações epidemiológicas foram obtidas por exame físico e questionário com os proprietários dos cães. O exame microscópico e molecular de amostras de sangue revelou que 5,0% (4/80) foram positivos para *D. immitis* em ambos os testes. Amostras de microfilárias dérmicas (todas identificadas como *Cercopithifilaria* sp.) foram detectadas em 42,5% (34/80) das amostras, considerando pelo menos um teste realizado. *Cercopithifilaria* sp. teve associação significativa com presença de carrapatos (*Rhipicephalus sanguineus*), acesso à rua e pequenos nódulos dérmicos. Foi observado excelente nível de concordância (Kappa = 0,759) entre os dois métodos de diagnóstico (exame microscópico e PCR). O sequenciamento de DNA confirmou a identificação de *D. immitis* e *C. bairnei* circulando no Mato Grosso do Sul. A PCR mostrou maior sensibilidade e serve para detectar e classificar espécies de microfilárias, mas a análise microscópica deve ser considerada como teste de triagem para detecção do gênero de filarídeos em cães. Considerando que, na área de estudo, *Rhipicephalus sanguineus* e mosquitos são prevalentes ao longo do ano, medidas preventivas devem ser adotadas para evitar a infestação por artrópodes e a infecção por filarioides. Artigo 2- O objetivo do presente estudo foi detectar *Cercopithifilaria bairnei* e outros patógenos transmitidos por carrapatos e realizar a caracterização molecular do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* s.l. coletado em cães. Carrapatos (n= 432, incluindo 8 larvas, 59 ninfas e 365 adultos) foram amostrados de cães domiciliados (n= 73) residentes no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul (centro-oeste do Brasil). Todos os carrapatos foram identificados morfológicamente como *R. sanguineus*. O DNA genômico foi extraído em pools (três a cinco carrapatos por animal), seguido pela definição de haplótipos (com base no gene 16S rRNA) e pela investigação de patógenos (*Cercopithifilaria* sp., *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Hepatozoon canis*, *Babesia vogeli* e *Rickettsia* spp.). Os espécimes coletados foram identificados como haplótipos A e B de *R. sanguineus*. Foram detectados DNA de *Cercopithifilaria bairnei* (43,83%; 32/73), *Ehrlichia canis* (24,65%; 18/73), *Anaplasma platys* (19,17%; 14/73) e *Hepatozoon canis* (5,47%; 4/73). A identidade dos patógenos foi confirmada por análise de sequência de DNA. O presente estudo confirma a circulação dos haplótipos A e B de *R. sanguineus* no estado de Mato Grosso do Sul e sua importância como vetor de vários patógenos de interesse veterinário. Finalmente, este é o primeiro relato de *C. bairnei* em carrapatos na região centro-oeste do Brasil. Artigo 3- O objetivo do presente estudo é relatar um caso de cisto cutâneo gigante em um cão infectado por *Cercopithifilaria bairnei*. Um cão sem raça definida, 9 anos, macho, deu entrada em uma clínica veterinária de Dourados, Mato Grosso do Sul (Centro-Oeste do Brasil) com uma massa na região lombossacral. No exame clínico, observou-se que a massa tinha aproximadamente 15 cm de diâmetro, com consistência flutuante e presença de fluido viscoso; a lesão, no entanto, era não ulcerada e não aderente. O exame citológico revelou presença de celularidade linfocitária moderada e macrófagos espumosos, eritrofagocitose e presença de numerosas microfilárias. Após análise morfológica e molecular do gene rRNA 12S, as microfilárias foram identificadas como *C. bairnei*, exibindo 99-100% de identidade com as seqüências de DNA disponíveis no Genbank. A cirurgia foi recomendada e após a ressecção do cisto gigante, o cão foi tratado com ivermectina por duas semanas e o quadro clínico foi completamente resolvido. Com base na presença de microfilárias no líquido do cisto, o papel desse filarídeo no determinismo da lesão foi discutido. Artigo 4- O presente trabalho tem por objetivo relatar o primeiro caso de dirofilariose canina em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. No dia 6 de setembro de 2018, um canino, fêmea, poodle, de 14 anos de idade, foi atendido numa clínica veterinária particular de Campo Grande- MS, apresentando hipertensão arterial e eosinofilia. O animal foi medicado e após nove dias, retornou com piora do quadro clínico (emese, melena, taquicardia, taquipneia). Mais exames laboratoriais foram solicitados, em que observou-se alterações cardíacas, hepáticas, renais e pancreáticas, além da presença de microfilárias, identificadas morfológicamente como *D. immitis* e confirmada espécie por teste sorológico e molecular. O animal foi internado, mas veio a óbito no quinto dia. Apesar de Campo Grande tratar-se de uma área não endêmica, o animal possui relato de viagem para região litorânea, sem realização de tratamento profilático. Portanto, representa um caso alóctone de dirofilariose na região.

Keywords: *A. reconditum*, *C. bairnei*, *D. immitis*

SOARES, R. L. Molecular research of filarids in canines from municipality of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. 2020. Master's degree- Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. 2020.

ABSTRACT

Canine filarioids include microfilariae species that circulate in bloodstream (e.g., *Dirofilaria immitis* and *Acantocheilonema reconditum*) or dwell into the subcutaneous tissue (e.g., *Cercopithifilaria* spp. and *Onchocerca* spp.). The aim of this dissertation was to evaluate the occurrence of filarids in dogs and their potential arthropod hosts from municipality of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. This dissertation consists of four articles. Article 1- The aim of this study was to investigate the occurrence of filarial infections in dogs from Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. Blood and skin samples of domiciled dogs (n = 80) were microscopically (modified Knott's test and skin fragment sediment examination) and molecularly (12S rRNA gene PCR) evaluated. Epidemiological information was obtained by physical examination and questionnaire with dog's owner. Microscopic and molecular examination of blood samples revealed that 5.0% (4/80) were positive for *D. immitis* in both tests. Specimens of dermal microfilariae (all identified as *Cercopithifilaria* sp.) were detected in 42.5% (34/80) of samples considering at least one test performed. *Cercopithifilaria* had sinificative association with tick presence (*Rhipicephalus sanguineus*), street access and small subcutaneous nodule. Good concordance level (Kappa= 0.759) between the two diagnostic methods (microscopic examination and PCR) was observed. DNA sequencing confirmed identification of *D. immitis* and *C. bairnei* circulating in Mato Grosso do Sul. PCR showed more sensitivity and serves to detect and classify microfilaria species, but the microscopic analysis should be considered as screening test for detection of filarids genus in dogs. Considering that in the area of study *Rhipicephalus sanguineus* and mosquitoes are prevalent throughout the year, preventive measures should be disposed in order to avoid arthropods infestation and filarioids infection. Article 2- The aim of the present study was to detect *Cercopithifilaria bairnei* and other tick-borne pathogens and to perform molecular characterization of the tick *Rhipicephalus sanguineus* s.l. collected from dogs. Ticks (n= 432, including 8 larvae, 59 nymphs, and 365 adults) were sampled from domiciled dogs (n= 73) living in Campo Grande, Mato Grosso do Sul (Midwest Brazil). All ticks were morphologically identified as *R. sanguineus*. Genomic DNA was extracted in pools (three to five ticks per animal) and was used for definition of *R. sanguineus* haplotypes (based on 16S rRNA analysis) and pathogen identification (*Cercopithifilaria* sp., *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Hepatozoon canis*, *Babesia vogeli* and *Rickettsia* spp.). *Rhipicephalus sanguineus* specimens were identified as haplotypes A and B. DNA of *Cercopithifilaria bairnei* (43.83%; 32/73), *Ehrlichia canis* (24.65%; 18/73), *Anaplasma platys* (19.17%; 14/73), and *Hepatozoon canis* (5.47%; 4/73) was detected. The identity of pathogens was confirmed by DNA sequence analysis. The present study confirms the presence of haplotypes A and B of *R. sanguineus* in the state of Mato Grosso do Sul and its importance as a vector of several pathogens of veterinary concern. Finally, this is the first report to identify *C. bairnei* in ticks in the Midwestern region of Brazil. Article 3- The aim of this study was describe a case of giant cutaneous cyst in a dog infected by *Cercopithifilaria bairnei*. A 9-year-old male mixed-breed dog presented to a veterinary facility in Dourados, Mato Grosso do Sul (Midwest Brazil) with a mass in the lumbosacral region. On clinical examination, the mass was observed to be approximately 15 cm in diameter with a floating consistency and conspicuous presence of viscous fluid; the lesion, however, was non-ulcerated and non-adherent. Cytological examination revealed the presence of moderate lymphocyte cellularity and spumous macrophages, erythrophagocytosis and the presence of numerous microfilariae. After morphological and molecular analysis of the 12S ribosomal RNA gene, the microfilariae were identified as *C. bairnei*, exhibiting 99-100% identity with DNA sequences available from Genbank. Surgery was recommended and after resection of the giant cyst, the dog was treated with ivermectin for two weeks and the clinical condition was completely resolved. Based on the presence of microfilariae in the cyst fluid the role of this filarioid in the determinism of the lesion has been discussed. Article 4- The present study aims to report the first case of canine heartworm disease in Campo Grande, Mato Grosso do Sul. On September 6, 2018, a 14-year-old female canine, poodle, was seen at a private veterinary clinic in Campo Grande- MS, with arterial hypertension and eosinophilia. The animal was medicated and, after nine days, returned with a worsening of the clinical condition (emesis, melena, tachycardia, tachypnea). Further laboratory tests were requested, in which cardiac, hepatic, renal and pancreatic changes were observed, in addition to the presence of microfilariae, morphologically identified as *D. immitis* and a species confirmed by serological and molecular testing. The animal was hospitalized, but died on the fifth day. Although Campo Grande is a non-endemic area, the animal has reports of travel to the coastal region, without prophylactic treatment. Therefore, it represents an allochthonous case of heartworm disease in the region.

Keywords: *A. reconditum*, *C. bairnei*, *D. immitis*

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A filariose canina é uma parasitose de distribuição mundial cujos agentes etiológicos são filarídeos (Filarioidea: Onchocercidae). Mundialmente, as espécies mais comuns parasitando cães são pertencentes aos gêneros *Dirofilaria*, *Acanthocheilonema* e *Cercopithifilaria* (BAIN et al., 2008; OTRANTO et al., 2012).

Dirofilaria immitis é a espécie mais estudada em cães, devido a seu potencial patogênico e importância zoonótica (MILANEZ DE CAMPOS, 1997), sendo transmitida por culicídeos (Nematocera: Culicidae) dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* (ANDERSON, 2000). A forma adulta de *D. immitis* se alimenta de plasma e pode ser encontrada no ventrículo direito e nas artérias pulmonares dos cães causando tosse, dispneia, fraqueza, ascite, anorexia, desidratação, perda de peso e óbito (SEVIMLI et al., 2007).

No gênero *Acanthocheilonema*, *A. reconditum* é a principal espécie em cães, sendo transmitido por pulgas e piolhos (OLMEDA-GARCÍA et al., 1993; DANTAS-TORRES E FIGUEIREDO, 2007). Suas formas adultas habitam o tecido subcutâneo e muscular do hospedeiro definitivo, enquanto as microfilárias são encontradas principalmente na circulação sanguínea periférica. Normalmente a infecção por *A. reconditum* destaca-se por apresentar caráter transitório e sem consequências patológicas, sendo diagnosticada na maioria das vezes de forma acidental (KNIGHT, 1987). No entanto, já foram relatados presença de anemia hemolítica acompanhada de distúrbios hepáticos e renais em cães parasitados por *A. reconditum* (HASHEM E BADAWY, 2008).

No Brasil, estudos e relatos de filarídeos em cães são normalmente restritos as espécies encontradas principalmente no sangue, como *D. immitis* e *A. reconditum*. Entretanto *Cercopithifilaria baina* também já foi descrito no Rio de Janeiro (ALMEIDA e VICENTE, 1984) e registrado no Nordeste do país (RAMOS, et al., 2016). Trata-se de um filarídeo cujas formas evolutivas estão presentes na derme ou tecido subcutâneo em tem como principal transmissor conhecido o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (OTRANTO et al. 2011; BRIANTI

et al., 2012). Sua patogenicidade é desconhecida até então, sendo considerada de menor importância quando comparada com *D. immitis*. Entretanto, há relatos de que larvas de *C. bairnei* possam induzir alterações locais como dermatite intersticial perivascular (OTRANTO et al., 2012; BOYD et al., 2019) e sistêmicas como poliartrite crônica em cães (GABRIELLI et al., 2014).

A circulação de cães domésticos infectados é associado como um dos principais modos de introdução e disseminação dos filarídeos (Ex. *Dirofilaria*, *Acantocheilonema* e *Cercopithifilaria*) para áreas antes livres (DA SILVA e LANGONI, 2009). A diferenciação entre as espécies de filarídeos nos cães pode ser realizada mediante detecção suas microfilárias presentes em amostras (sanguíneas e/ou pele), seguido de análises microscópicas e/ou moleculares (KNOTT, 1939; OTRANTO et al., 2012; RAMOS et al., 2016).

O Brasil, em seu amplo território, possui características importantes para transmissão dos filarídeos que acometem cães. O clima, o desmatamento e a falta de saneamento básico favorecerem o desenvolvimento biológico e a manutenção de uma elevada população de vetores em potencial no meio urbano (DA SILVA E LANGONI, 2009). Em Campo Grande- MS, no ano de 2016, observou-se a presença de *C. bairnei* infectando cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. O diagnóstico foi confirmado por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento de DNA. No entanto, a magnitude, importância clínica e epidemiológica, para essa e outras espécies de filarídeos, não são conhecidas na região.

Dessa forma, o presente estudo tem por objetivo avaliar a ocorrência de filarídeos em cães e seus potenciais hospedeiros artrópodes no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, e definir aspectos clínicos e epidemiológicos dos mesmos na região.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a ocorrência de filarídeos em cães domésticos e seus potenciais hospedeiros artrópodes no município de Campo Grande- MS, Brasil.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as espécies de filárideos presentes em amostras de sangue e pele de cães;
- Avaliar aspectos clínico-epidemiológicos de cães infectados por filarídeos no município de Campo Grande, MS;
- Comparar a eficiência dos métodos diagnósticos (análise microscópica e técnica de PCR);
- Identificar filarídeos e outros patógenos em vetores que parasitam o animal;
- Relatar casos clínicos de cães acometidos por filarídeos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. FILARÍDEOS EM CANINOS

A filariose canina é uma parasitose de ampla distribuição mundial cujos agentes etiológicos são vermes filarióides pertencentes à ordem Spirurida e família Onchocercidae (ANDERSON, 2000; OTRANTO et al., 2011). A família Onchocercidae é composta por cerca de 80 gêneros, que acometem uma gama de hospedeiros e podem causar doenças graves nos animais e no homem, em regiões tropicais e subtropicais (ANDERSON, 2000; OTRANTO e EBERHARD, 2011). Mundialmente, as espécies mais comuns parasitando cães são pertencentes aos gêneros *Dirofilaria*, *Acantocheilonema* e *Cercopithifilaria* (BAIN et al., 2008; OTRANTO et al., 2012).

3.1.1 *Dirofilaria*

O gênero *Dirofilaria* é representado principalmente por duas espécies: *D. repens* e *D. immitis*. *Dirofilaria repens* geralmente causa infecção subcutânea pouco patogênica em cães da Europa, Ásia e África (DA SILVA E LANGONI, 2009), enquanto *D. immitis* é a espécie mais estudada, tratando-se de um parasito do sistema circulatório (coração e grandes vasos), podendo ocasionar doenças cardiorrespiratórias em cães, além de possuir importante caráter zoonótico (MILANEZ DE CAMPOS, 1997; SMITH et al., 2015).

A dirofilariose, causada por *D. immitis*, também conhecida popularmente como doença do “verme do coração”, é transmitida por um hospedeiro intermediário da família Culicidae, cujas espécies já descritas incluem *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Anopheles maculipennis* e *Coquillettidia richiardii* (CIRIO, 2005; DA SILVA E LANGONI, 2009). O cão é o seu hospedeiro definitivo e, por vezes, o gato e o homem podem surgir como hospedeiros acidentais (ANDERSON, 2000).

Os nematódeos adultos localizam-se nas artérias pulmonares (machos) e no ventrículo direito (fêmeas) dos animais susceptíveis (Figura 1). São delgados e de corpo filiforme. A fêmea adulta pode medir entre 25- 30 cm de comprimento e 1- 1,3 mm de largura, enquanto o macho mede entre 12- 20 cm de comprimento e 0,7- 0,9 mm de largura, com uma calda em espiral (GENCHI et al., 2014).



Figura 1. Diferença morfológica entre macho e fêmea de *Dirofilaria immitis*. **Fonte:** Adaptado de <http://cal.vet.upenn.edu/projects/merial/Nematodes/images/heartwormF.GIF>

As fêmeas são vivíparas, e após a cópula dos nematódeos adultos, liberam microfilárias na circulação sanguínea do hospedeiro (Figura 2). Essas larvas possuem em média 298 μ m de comprimento e 7,3 μ m de largura, com extremidade anterior ovalada e a posterior reta (BRITO et al., 2001).



Figura 2. Microfilária de *Dirofilaria immitis*. **Fonte:** Acervo do autor

As fêmeas de mosquitos ingerem as microfilárias durante o hematofagismo. Estas larvas se desenvolvem até L3 no corpo do mosquito e são transmitidas para outro cão, durante os próximos repastos sanguíneos. Entre 71 e 110 dias após a infecção os parasitas atingem as artérias pulmonares (machos) e o ventrículo direito (fêmeas). Após três meses, os nematódeos atingem a maturidade sexual, acasalam e completam o ciclo com a liberação de microfilárias na circulação dos cães (Figura 3). As microfilárias podem ser encontradas na circulação sanguínea periférica entre seis e oito meses após a infecção (KNIGHT, 1987; CIRIO, 2005; DA SILVA e LANGONI, 2009).

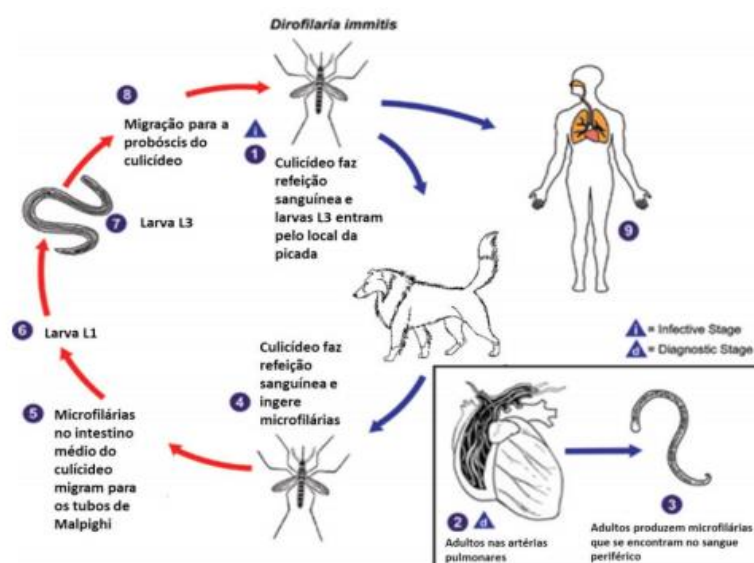


Figura 3. Esquematização do ciclo de vida de *Dirofilaria immitis*. Adaptado de <http://www.cdc.gov>

O ciclo zoonótico ocorre quando fêmeas de mosquito infectadas com L3 realizam repasto sanguíneo em humanos (OGAWA, 2013). O ciclo não se completa e as L4 formam os chamados nódulos em “forma de moeda” nos pulmões do hospedeiro, podendo ser confundido com neoplasia (GARCEZ et al., 2006; SIMÓN et al., 2007). Em humanos, foram relatados 51 casos de dirofilariose pulmonar no Brasil, e centenas de casos em todo o mundo (RODRIGUES-SILVA et al., 2004). Desde 1979, devido à importância desta parasitose para os cães e a população humana, e pela íntima relação dos animais domésticos com o ser humano, a enfermidade passou a ser considerada uma zoonose pela Organização Mundial da Saúde (OMS), e atualmente é tratada como uma Zoonose Emergente Negligenciada (DA SILVA E LANGONI, 2009).

Os cães podem ser assintomáticos ou manifestarem sinais como tosse crônica, intolerância a exercícios, dispneia, ruídos cardíacos e pulmonares, hepatomegalia e síncope. Nas formas graves, manifestações de insuficiência cardíaca direita, como ascite, congestão aguda do fígado e rins, hemoglobinúria e morte em 24 a 72 horas podem ocorrer (ACHA E SZYFRES, 2003; SMITH et al., 2015).

A distribuição de *D. immitis* é cosmopolita, podendo apresentar prevalências superiores a 50% em determinadas áreas (LUZON-PENA E GÓMEZ BAUTISTA, 1993). No Brasil, segundo Barbosa e Alves (2006), a prevalência média em cães é

de aproximadamente 10,2% para cães microfilarêmicos e 9,1% baseado em testes sorológicos. É também citada como endêmica em áreas litorâneas, com prevalência de 29,7% em Niterói (RJ) e 14% no Rio de Janeiro (LABARTHE et al., 1998); 9,41% na Cidade de Uberlândia (MG) (FERREIRA et al., 1999); 10,7% em Recife (PE) (ALVES et al., 1999); 5,8 % no Mato Grosso (FERNANDES et al., 1999), 15% em Santa Catarina (ARAÚJO et al., 2003); 8% no Estado de São Paulo (SOUZA E LARSSON, 2001).

3.1.2 *Acanthocheilonema*

No gênero *Acanthocheilonema*, *A. reconditum* é a principal espécie responsável por filariose em cães, sendo encontrado nos tecidos subcutâneos perirrenal e cavidade peritoneal (LEITE et al., 2012). São transmitidos por pulgas e piolhos, cujas espécies descritas incluem *Ctenocephalides felis*, *C. canis*, *Pulex irritans*, *Trichodectes canis* e *Heterodoxus spiniger* (DANTAS-TORRES E FIGUEIREDO, 2007; LEITE et al., 2012).

Os machos adultos medem cerca de 13,0 mm de comprimento e as fêmeas 17- 32 mm. Após o acasalamento, as fêmeas fecundadas originam microfilárias, que podem ser encontradas principalmente na circulação sanguínea periférica dos cães (Figura 5). As microfilárias de *A. reconditum* tem em média cerca de 250-270mm de comprimento e 4- 4,5mm de largura, com um corpo arredondado e curvado, gancho cefálico distinto e uma extremidade anterior romba (HUYNH et al., 2001; LEITE et al., 2012).

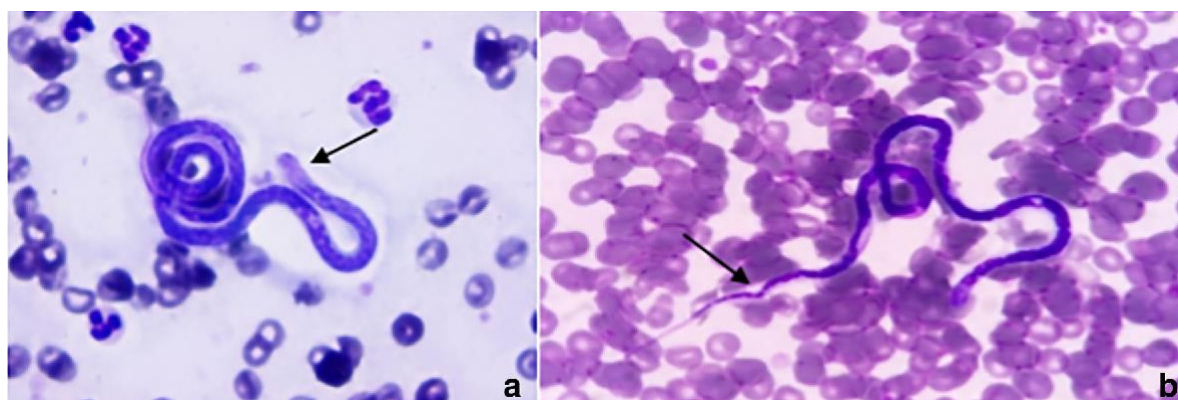


Figura 4 - Microfilária de *Acanthocheilonema reconditum*. a) Região cefálica com extremidade anterior romba- seta; (b) Cauda em gancho – seta. Microscopia optica (ampliação 1000 x) **Fonte:**

<https://doi.org/10.1007/s00580-018-2859-2>

A pulga ou piolho se infecta com as microfilárias durante repasto sanguíneo em animal infectado. Na hemocela desses ectoparasitas ocorre o desenvolvimento das microfilárias até L3. As L3 migram para as peças bucais da pulga/piolho, aguarda novo repasto sanguíneo para infectar os cães. 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) (LINARD et al., 2004; ENGELMANN et al., 2018).

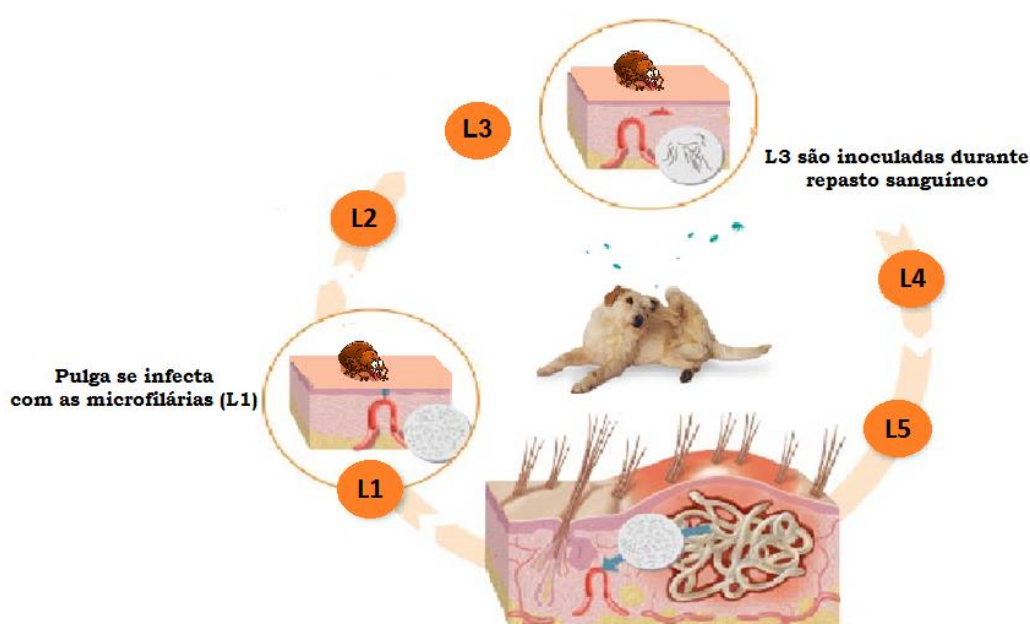


Figura 5: Ciclo de vida de *Acanthocheilonema reconditum*. **Fonte:** Adaptado de <https://www.advocate-spot-on.com/en/why-use/>

Normalmente a infecção por *A. reconditum* destaca-se por apresentar caráter transitório e sem consequências patológicas significativas (KNIGHT, 1987), sendo diagnosticada na maioria das vezes de forma acidental. No entanto podem causar abscessos e ulcerações cutâneas (URQUHART et al., 1996). Estudos realizados por Hashem e Badawy (2008) também comprovaram presença de anemia hemolítica acompanhada de distúrbios hepáticos e das funções renais em 14 cães parasitados por *A. reconditum*. Alguns casos de acometimento ocular por *Acanthocheilonema* spp., também já foram descritos em humanos (BEAVER et al., 1980; BEAVER, 1989), incluindo *A. reconditum* no espaço subconjuntival do olho direito de um paciente com 62 anos na Austrália (HUYNH et al., 2001).

No Brasil ainda é subestimado o percentual de cães microfilarêmicos e/ou portadores de formas adultas de *A. reconditum*, devido à escassa quantidade de publicações (LEITE et al., 2012). No entanto, já foram relatados prevalência de 1,6% no estado da Bahia (BARROS et al., 1993); 0,6% em Cuiabá-MT (FERNANDES et al., 2000); 1,3% em Maceió-AL (BRITO et al., 2001); e 6,9% em Recife-PE (ALVES et al., 1999).

3.1.3 *Cercopithifilaria*

Em contraste com alguns parasitos filarióides em que as formas imaturas circulam na corrente sanguínea, outros filarídeos foram caracterizados como parasitos dérmicos, como *Cercopithifilaria* spp. (OTRANTO et al., 2012). Vinte e oito espécies já foram descritas (OTRANTO et al., 2013), das quais três parasitam o tecido subcutâneo de cães: *C. baina*, *C. grass* e *Cercopithifilaria* sp. Il sensu Otranto et al. 2012 (BAIN et al., 2008; OTRANTO et al. 2012; ANDERSSON et al., 2017). *Cercopithifilaria baina* é a espécie mais comum em cães, e sua distribuição está associada principalmente com a presença do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (s.l), conhecido como seu principal transmissor (OTRANTO et al. 2011; BRIANTI et al., 2012).

As fêmeas adultas de *C. baina* possuem entre 14-19 mm de comprimento e os machos 9,0-12,0 mm de comprimento, e são encontrados nos tecidos subcutaneos e tecidos adiposos peri-renais dos cães infectados. Já as microfíliárias presentes na derme (Figura 6) possuem em média $180,2 \pm 2,3 \mu\text{m}$ de comprimento e $4,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$ de largura, com extremidade anterior arredondada, corpo achatado dorsoventralmente e cutícula espessa com estrias transversais (OTRANTO et al., 2013; RAMOS et al., 2016).



Figura 6: Microfilária de *Cercopithifilaria bainaie*. **Fonte:** Arquivo Pessoal

O ciclo de vida (Figura 7) envolve larvas infectantes (L3) sendo inoculadas pelo carrapato (*Rhipicephalus sanguineus*). As L3 residem na derme do cão, onde se tornam adultas e se reproduzem, gerando as microfilárias. O ciclo é concluído quando os carrapatos ingerem as microfilárias presentes na derme, enquanto se alimentam nos cães (BRIANTI et al., 2012; OTRANTO et al., 2012; SANTOS et al., 2017).

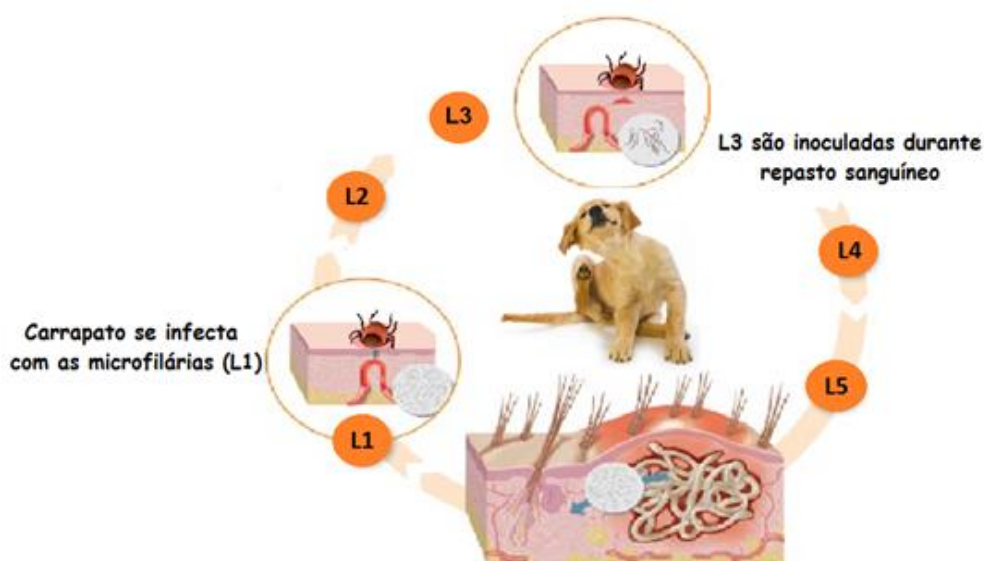


Figura 7: Ciclo de vida de *Cercopithifilaria bainaie*. **Fonte:** Adaptado de <https://www.advocate-spot-on.com/en/why-use/>

Embora *C. bairnei* seja a espécie de filária dérmica mais descrita nos cães, sua patogenicidade é desconhecida até então. Entretanto, há relatos de suas larvas possam induzir alterações locais, como dermatites (OTRANTO et al., 2012; BOYD et al., 2019), e sistêmicas, como poliartrite crônica em cães (GABRIELLI et al., 2014).

No Brasil, os relatos de filarídeos em caninos são normalmente restritos a estudos de infecções de filárias no sangue, como *D. immitis* e *A. reconditum*. Entretanto, *C. bairnei*, já foi registrado parasitando cães no Rio de Janeiro (ALMEIDA E VICENTE, 1984) e em Pernambuco (RAMOS et al., 2016). Recentemente, DNA de *Cercopithifilaria* spp. também foi detectado em carrapatos *R. sanguineus* (s.l) no Nordeste do país (LATROFA et al., 2014; SANTOS et al., 2017). No entanto, pouco ainda se sabe sobre as espécies de microfilárias dérmicas, aspectos como a dinâmica sazonal e a distribuição na população canina e em seus respectivos vetores (SANTOS et al., 2017).

3.2. DIAGNÓSTICO DE FILARIOSE CANINA

Os sinais clínicos manifestados em cães parasitados por filarídeos são variáveis dependendo da espécie relacionada, sendo comum também os animais assintomáticos (GRANDI et al., 2007). O diagnóstico laboratorial requer a detecção de suas microfilárias em amostras sanguíneas e/ou fragmentos de pele, mediante análise microscópica, provas sorológicas ou moleculares.

3.2.1 Análise microscópica

São métodos diagnósticos que se fundamentam na detecção de microfilárias presentes no sangue (ex. esfregaço sanguíneo, gota espessa, *Knott* modificado) e/ou análise do sedimento de fragmentos de pele (DA SILVA E LANGONI et., 2009; RAMOS et al., 2016).

O esfregaço sanguíneo direto é um teste simples que pode ser usado como triagem para encontrar microfírias sanguíneas (Ex *D. immitis* e *A. reconditum*), no entanto, para melhor sensibilidade do teste, é necessário que o animal esteja infectado com um grande número de larvas. Em infecções mais brandas, o teste

pode gerar resultado falso negativo (DILLON, 2007; DA SILVA E LANGONI et al., 2009).

Já a técnica de gota espessa examina o sangue a fresco para detectar a presença e avaliar padrões de tamanho e movimentação de microfilárias, servindo de auxílio para diferenciar *A. reconditum* de *D. immitis* (KNIGHT, 1977; BRITO et al., 2001). Esta primeira espécie realiza movimentos erráticos e deslocam-se com rapidez, enquanto *D. immitis* são dotadas de movimentos ondulantes serpentiformes e movem-se lentamente (BRITO et al., 2001; LEITE et al., 2012).

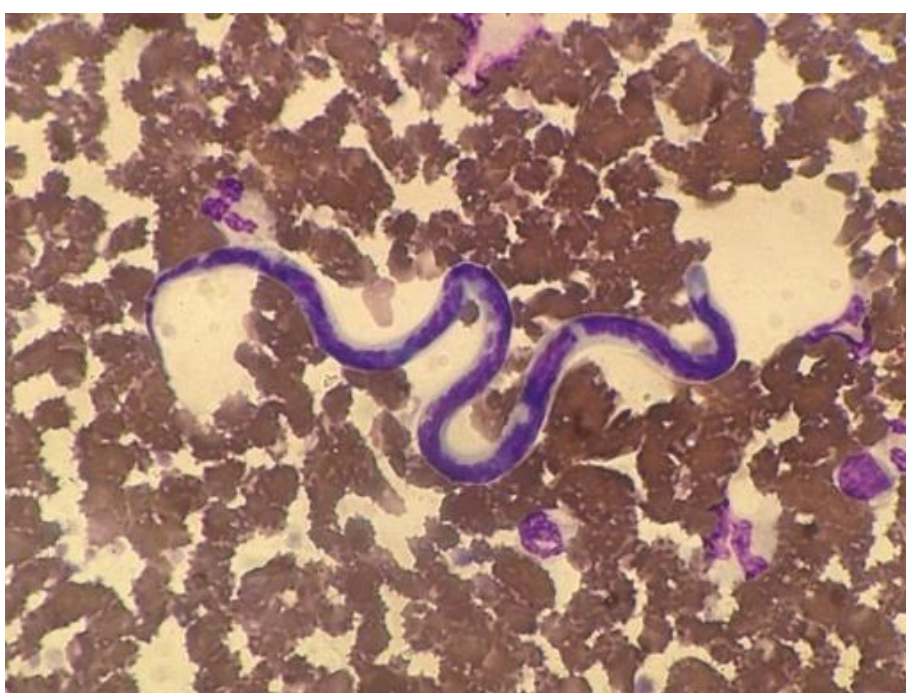


Figura 8: Microfilária de *Dirofilaria immitis* em esfregaço sanguíneo. **Fonte:** Laboratório VetAnalisa

A detecção e diferenciação de espécies por estas duas técnicas é mais difícil, sendo o teste de *Knott* modificado (KNOTT, 1939) mais usado para determinar a presença de microfilárias e diferenciá-las, com base em aspectos morfológicos e morfométricos. Esta técnica consiste em formolizar o sangue, de modo a destruir os glóbulos vermelhos e posteriormente misturar um corante (Ex. azul de metileno, giensa) ao sedimento, para examinar sob microscopia ótica em diferentes aumentos (400 e 1000X) (Figura 9). Possui boa sensibilidade, especificidade e baixo custo (SMITH et al., 2015).

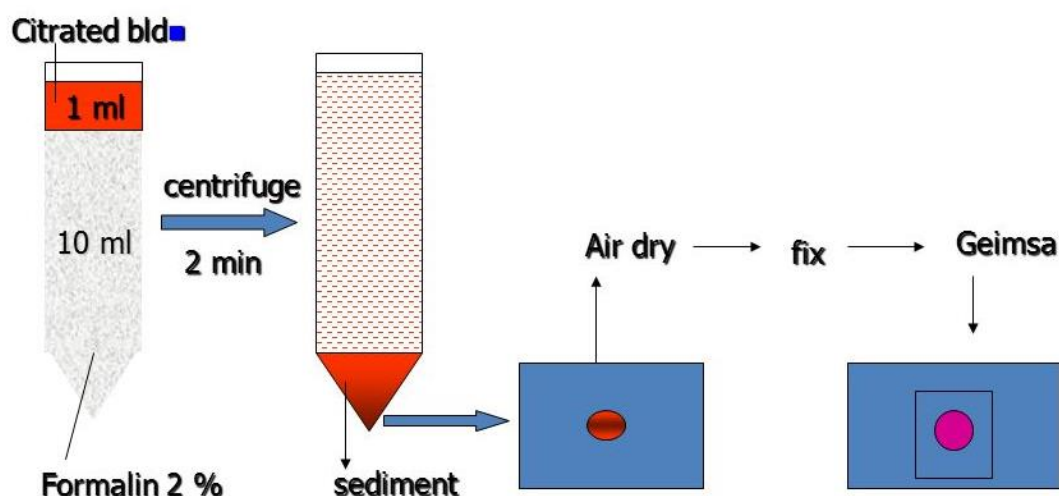


Figura 9: Técnica de Knott modificado. **Fonte:** disponível em:
<https://www.slideshare.net/shabanko/diagnosis-1226947>

Já as microfilárias dérmicas podem ser analisadas por exame microscópico do sedimento de recortes cutâneos. Os fragmentos 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 (100 e 400X) (OTRANTO et al., 2012; RAMOS et al., 2016).

As diferenças morfométricas e morfológicas das microfilárias das principais espécies, de acordo com Ramos et al. (2016), podem ser observadas na seguinte tabela (Tabela 1).

TABELA 1. Diferenças morfométricas e morfológicas das principais microfilárias em cães.

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

3.2.2 Provas sorológicas

Testes que envolvem a reação antígeno-anticorpo são utilizados rotineiramente para pesquisa de infecção por filarídeos em cães, no entanto são restritos para *D. immitis*. Os testes que pesquisam antígenos (Ag) circulantes permitem a detecção desde altas intensidades até infecções ocultas (ausência de microfilárias) com baixa carga parasitária. É o método recomendado pela *American Heartworm Society* (AHS) para triagem da infecção em cães. Possuem alta especificidade e maior sensibilidade que os testes de pesquisa de microfilárias (ALMOSNY, 2002; NELSON e COUTO, 2006). Os testes mais utilizados são os ensaios imunoenzimáticos- ELISA (Figura 10) ou de imunomigração rápida (Figura 11). Estes testes irão detectar a presença de antígenos circulantes provenientes do trato genital de fêmeas adultas (URQUHART et al., 1996; TILLEY et al., 2008).

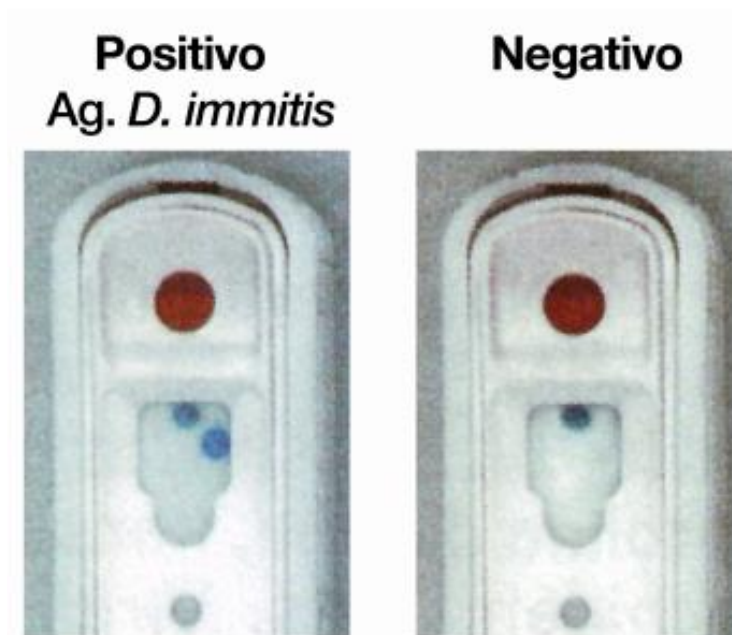


Figura 10: Teste sorológico SNAP (ELISA) para detecção de antígenos de fêmeas adultas de *Dirofilaria immitis*. **Fonte:** Almosny, 2002.

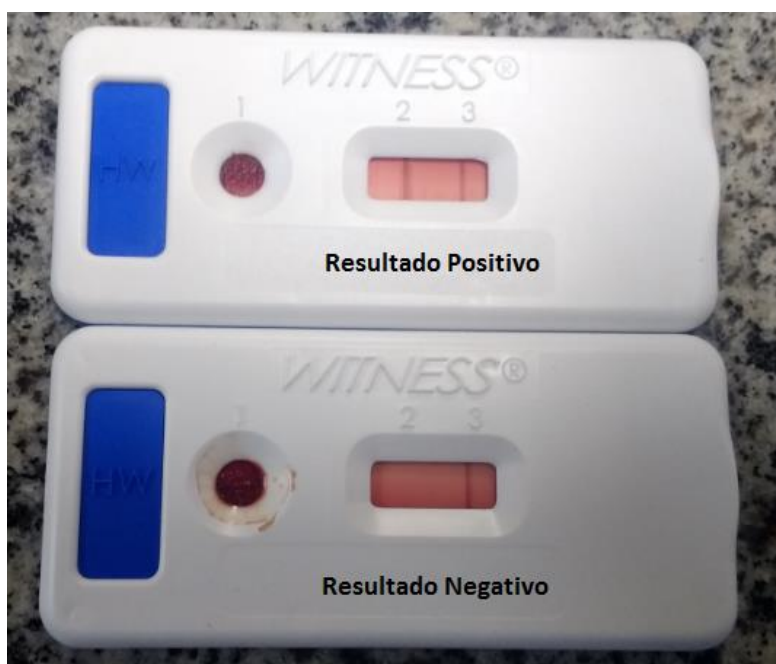


Figura 11: Teste sorológico de imunomigração rápida para detecção de antígenos de fêmeas adultas de *D. immitis*. **Fonte:** Acervo do autor

Um problema é que detectam somente antígenos de fêmeas adultas, cerca de sete a oito meses após infecção. Infecções recentes (< 8 meses) ou animais infectados somente com machos, resultarão quase sempre em falso negativo. Para sanar essas limitações, as técnicas de *immunoblotting* têm sido capazes de detectar mais precocemente cães infectados e infecções envolvendo parasitas machos e/ou fêmeas (FERNANDES et al., 1999; DA SILVA E LANGONI, 2009). No entanto, a possibilidade de reação cruzada com antígenos de outros helmintos deixa em dúvida a qualidade dos resultados obtidos por este método, tanto para fins epidemiológicos, como para diagnóstico específico (FERNANDES et al., 1999). Portanto, o uso destes testes não é aconselhado em locais em que não se conhece as espécies de filarídeos presentes nestas áreas (GENCHI et al., 2007).

3.2.3 Provas moleculares

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) têm sido usada para identificação de espécies de filarídeos. Consiste na amplificação de um segmento do DNA específico do parasita, utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), e podem ser visualizados após eletroforese em gel de agarose (Figura 12).

Muitos pesquisadores 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)

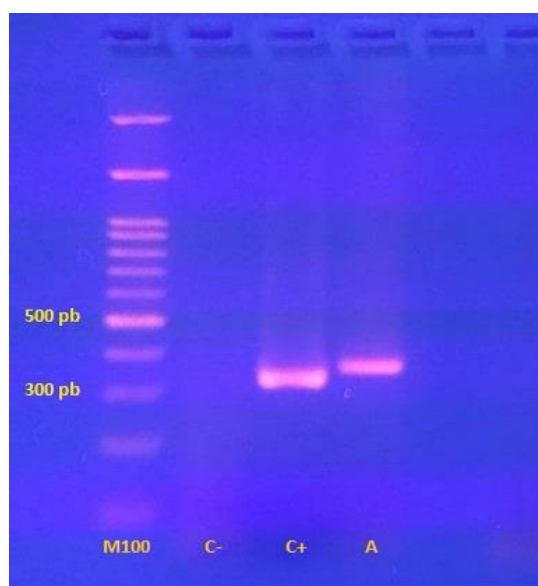


Figura 12- Produtos de amplificação da PCR para detecção de fragmento do gene 12S rRNA de filarídeos, visualizados após eletroforese em gel de agarose 2%. M100 (Ludwig Biotec) representa marcador molecular de 100 pares de base; C- controle Negativo; C+ controle positivo; e na coluna 4 representa a amostra positiva testada. **Fonte:** arquivo pessoal.

A partir das amplificações da PCR, pode-se utilizar enzimas de restrição, para diferenciar as espécies (CASIRAGHI et al., 2006) ou a análise por sequenciamento de DNA (OTRANTO et al., 2011). Além destes, PCR multiplex também pode ser utilizada para detectar e diferenciar simultaneamente os filarioides caninos (LATROFA et al., 2012).

Apesar de ser considerada onerosa, devido aos custos com equipamentos, reagentes e mão de obra, a caracterização molecular de filarídeos tem se mostrado uma ferramenta de extrema importância, pois auxiliam na identificação desses parasitas, no conhecimento sobre mecanismos de ação e resistência de alguns fármacos utilizados no tratamento de filarioses (GENCHI et al., 2007), além de enriquecer os bancos de dados (ex. *Genbank*) sobre a filogenia desses parasitos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Filariasis zoonóticas**. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3.ed. Washington: OPS, 2003. V.3, p.284-291.
- ALMEIDA, G.L.G.; VICENTE, J.J. *Cercopithifilaria binae* parasita de *Canis familiaris* (L.) (Nematoda, Filarioidea). **Atas Soc. Biol. Rio de Janeiro**, v.24, p.18, 1984.
- ALMOSNY, N.R.P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. 1. ed. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária Ltda., 2002. p.112-126.
- ALVES, L.C.; SILVA, L.V.A.; FAUSTINO, M.A. *et al.* Survey of canine heartworm in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.94, n.5, p. 587- 590, 1999.
- ANDERSON, R.C. **Nematode parasites of vertebrates, their development and transmission**. 2. ed. Wallingford, UK, 2000. 650 p.
- ANDERSSON, M.O.; CHITIMIA-DOBLER, L. Detection of *Cercopithifilaria binae* in western Romania. **Parasitol. Res.**, 116: 3,235– 3,238, 2017.
- ARAUJO, R.T.; MARCONDES, C.B.; BASTOS, L.C.; SARTOR, D.C. Canine dirifilariasis in the region of Conceicao Lagoon, Florianópolis, and in the Military Police kennel, São Jose, State of Santa Catarina, Brazil. **Vet. Parasitol.**, 113: 239-42. 2003.
- ARAUJO, F.R.; RAMOS, C.A.N.; LUIZ, H.L. *et al.* **Avaliação de um protocolo de extração de DNA genômico a partir de sangue total**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, n.5, 2009. (Comunicado Técnico, 120)
- AYRES, M. AYRES, M.J.; AYRES, D.L. *et al.* **BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Bio-Médicas**. Versão 5.0. Belém, Pará: Sociedade Civil Mamirauá, 324p. 2007.
- BAIN, O.; CASIRAGHI, M.; MARTIN, *et al.* Thenematoda Filarioidea: critical analysis linking molecular and traditional approaches. **Parasite** v.15, n.3, p.342–348, 2008.
- BARBOSA, C.L.; ALVES, L.C. Dirofilariose canina: situação atual no Brasil. **Rev. Cons. Fed. Med. Vet.**, v.1, p.57-62, 2006.
- BARROS, M.T.G.; SANTOS, E.P.; ALMEIDA, M.A.O. Frequência de microfilárias de *Dipetalonema reconditum* Grassi, 1890 em cães dos municípios de Salvador e Lauro de Freitas, Bahia. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA EM LÍNGUA PORTUGUESA, 6., 1993, Salvador. **Anais...** Salvador: UFBA, 1993. p. 340.
- BEAVER, P.C.; MEYER, E.A.; JARROLL, E.L.; *et al.* *Dipetalonema* from the eye of a man in Oregon, USA. A case report. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 29, p. 367–372, 1980.
- BEAVER, P. C. Intraocular filariasis: a brief review. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 40, n. 1, p. 40-45, 1989.

- BOYD, M.; SANTORO, D.; CRAFT, W.F.; *et al.* Dermatitis caused by autochthonous *Cercopithifilaria baina* from a dog in Florida, USA: clinical, histological and parasitological diagnosis and treatment. **Vet. Dermatol**, v.30, n.1, p.68-20, 2019.
- BRIANTI, E.; OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; *et al.* *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodida, Ixodidae) as intermediate host of a canine neglected filarial species with dermal microfilariae. **Vet. Parasitol**, v.183, p.330–337, 2012.
- BRITO, A.C., VILA-NOVA, M.C., MARTINS ROCHA, D.A. *et al.* Prevalência da filariose canina causada por *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum* em Maceió, Alagoas, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v.17, n.6, p.1497-1504, 2001.
- CASIRAGHI, M., BAZZOCCHI, C., MORTARINO, M., *et al.* simple molecular method for discriminating common filarial nematodes of dogs (*Canis familiaris*). **Vet Parasitol**, 141: 368 - 372. 2006.
- CIRIO, S.M. **Epidemiologia e clínica de cães portadores de dirofilariose em espaços urbanos de município do litoral do Paraná e aspectos da histologia de *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) (Diptera, Culicidae)**. 2005. 155f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- DA SILVA, R.C.; LANGONI, H. Dirofilariasis. Neglected emerging zoonosis. **Ciênc. Rural**, v.39, n.5, p.1614-1623, 2009.
- DILLON, R. Feline heartworm disease. Cats get heartworms too! **Auburn University. College of Veterinary Medicine**. 2007. Disponível em: <http://www.vetmed.auburn.edu/distance/cardio/>. Acesso em 26/05/2019.
- ENGELMANN, A.M.; SCHAFER, A.S.; LHAMAS, C.L.; *et al.* Morphological and molecular identification of *Acanthocheilonema reconditum* in a canine. **Comp. Clin. Path.**, v.28, p.271–274, 2019.
- FERNANDES, C.G.N., MOURA, A.T., DIAS, A.R., *et al.* Ocorrência de dirofilariose canina na região da Grande Cuiabá, Estado de Mato Grosso-Brasil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci**, 36: 258-261. 1999.
- FERREIRA, A.F.; BARBOSA, F.C.; MASTRANTONIO, E.C. Ocorrência da dirofilariose canina na cidade de Uberlândia, MG, Brasil. **Vet. Notícias**, v.5, n.1, p. 57-61, 1999.
- FERRI, E. BARBUTO, M.; BAIN, O.; *et al.* Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). **Front. Zool.**, v.6, n.1, p.1, 2009.
- GABRIELLI, S.; GIANNELLI, A.; BRIANTI, E. *et al.* Chronic polyarthritis associated to *Cercopithifilaria baina* infection in a dog. **Vet. Parasitol.** v.205, n.1-2, p.401–404, 2014.
- GARCEZ, L.M.; DE SOUZA, N.F.; MOTA, E.F. *et al.* Focus of canine heartworm disease in Marajo Island, North of Brazil: a risk factor for human health. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 39: 333–336, 2006.
- GRANDI, G., ŽIVIČNJAK, T., BECK, R. Pathogenesis of *Dirofilaria* spp. Infections. In: **Mappe Parassitologiche 8: *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat**

- 571 **and human infections.** Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G. (eds.). Nápoles.
572 Rolando Editore. 2007. p. 60 – 66.
- 573 GENCHI, C., BOWMAN, D. & DRAKE, J. Canine heartworm disease (*Dirofilaria*
574 *immitis*) in Western Europe: survey of veterinary awareness and perceptions.
575 **Parasites vectors**, v.206, 2014.
- 576 HASHEM, M.; BADAWY, A.I.I. Blood cellular and biochemical studies on filariasis
577 of dogs. **Res. J. An. Sci.**, v.2, n.5, p.128-134, 2008.
- 578 HUYNH, T.; THEAN, J.; MAINI, I. *Dipetalonema reconditum* in the human eye. **Br.**
579 **J. Ophthalmol.**, London, v.85, n.11, p.1384, 2001.
- 580 KNIGHT, D.H., Heartworm infection. **Veterinary Clinics of North America. Small**
581 **Animals Practice**, v.17, p.1463-1518, 1987.
- 582 KNOTT, J. A method for making microfilarial survey on day blood. **Med. Hyg**, v.33,
583 p.191–196, 1939.
- 584 LABARTHE, N., SERRAO, M.L., MELO, Y.F., et al. Mosquito frequency and feeding
585 habits in an enzootic canine dirofilariasis area in Niteroi, state of Rio de Janeiro,
586 Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.93, p.145-54, 1998.
- 587 LATROFA, M.S., WEIGL, S., DANTAS-TORRES, F., et al. A multiplex PCR for the
588 simultaneous detection of species of filarioids infesting dogs. **Acta Trop.** v.122, p.
589 36-41, 2012.
- 590 LATROFA, M.S.; DANTAS-TORRES, F., GIANNELLI, A., OTRANTO, D. Molecular
591 detection of tick-borne pathogens in *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Ticks**
592 **Tick-borne Dis.** v.5, p.943-946, 2014.
- 593 LEITE, L.C.; LUZ, E.; MOLINARI, H.P. et al.; Infecção de cães domésticos (*Canis*
594 *lupus familiaris*, Linnaeus, 1758) da região metropolitana na de Guaratuba, Paraná,
595 Brasil por microfilárias circulantes de *Acanthocheilonema reconditum* (Grassi,
596 1899). **Ciênc. Agrár.**, v.331149-1156, 2012.
- 597 LINARDI, P.M.; GUIMARÃES, L.R. **Sifonápteros do Brasil**. São Paulo: Museu de
598 Zoologia USP/FAPESP, 2000. 291p.
- 599 LUZON-PENA, M.; GOMEZ-BAUTISTA, M. Epidemiologia da dirofilariose. **Canis et**
600 **Felis**, v.3, p.19-31, 1993.
- 601 MILANEZ DE CAMPOS, J.R. Human Pulmonary dirofilariasis analysis of 24 cases
602 from Sao Paulo, Brazil. **Chest.** v. 112, p. 729-733, 1997.
- 603 NELSON, R.W.; COUTO, C. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 2. ed, p.127
604 - 139, 1998.
- 605 OGAWA, GUILHERME MAERSCHNER. **Prevalência de *Dirofilaria immitis***
606 **(Leyd, 1856) em cães e sua ocorrência em mosquitos (Diptera, Culicidae) na**
607 **cidade de Porto Velho, Rondônia, Brasil** / Guilherme Maerschner Ogawa. – São
608 Paulo, 2013. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
609 Biomédicas.
- 610 OLMEDA-GARCÍA, A.S.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J.A.; ROJO-VÁZQUEZ, F.
611 A. Experimental transmission of *Dipetalonema dracunculoides* (Cobbold 1870) by
612 *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille 1806). **Vet. Parasitol**, v.47, p.339–342, 1993.

- OTRANTO, D.; EBERHARD, M.L. Zoonotic helminths affecting the human eye. **Parasites Vectors**. 4: 41, 2011.
- OTRANTO, D.; BRIANTI, E.; DANTAS-TORRES, F. et al. Morphological and molecular data on the dermal microfilariae of a species of *Cercopithifilaria* from a dog in Sicily. **Vet. Parasitol.**, v.182, p.221–229, 2011.
- OTRANTO, D.; BRIANTI, E.; ABRAMO, F. et al. Cutaneous distribution and localization of *Cercopithifilaria* sp. microfilariae in dogs. **Vet. Parasitol.**, v.190, p.143–150, 2012.
- OTRANTO, D.; BRIANTI, E.; DANTAS-TORRES, F. et al. Species diversity of dermal microfilariae of the genus *Cercopithifilaria* infesting dogs in the Mediterranean region. **Parasitology**, 140, p.99–108, 2013.
- RAMOS, R.A.; OLIVEIRA RÊGO, A.G.; FARIAS FIRMINO, E.D. et al. Filarioids infecting dogs in northeastern Brazil. **Vet. Parasitol**, v.226, p.26–29, 2016.
- REIFUR, L.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MONTIANI-FERREIRA, F. Epidemiological aspects of filariosis on the coast of Paraná state, Brazil with emphasis on *Dirofilaria immitis*. **Vet. Parasitol.**, Michigan, USA, 122: 273-286, 2004.
- RODRIGUES-SILVA, R.; GUERRA, R. J. DE A.; ALMEIDA, F. B. et al. *Dirofilaria immitis* pulmonar humana no estado do Rio de Janeiro: relato de um caso. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.37, n.1, p.56-59, 2004.
- SANTOS, M.A.B.; SOUZA, I.B.; MACEDO, L.O., et al. *Cercopithifilaria binae* in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks from dogs in Brazil. **Ticks Tick-borne Dis.**, v.8, p.623–625, 2017.
- SEVIMLI, F.K.; KOZAN, E.; BÜLBÜL, A. et al. *Dirofilaria immitis* infection in dogs: unusually located and unusual findings. **Parasitol. Res**, v.101, p.1487-94, 2007.
- SIMON, F.L.H. KRAMER, A., ROMÁN, W. et al. Immunopathology of *Dirofilaria immitis* infection. **Vet. Res. Commun**, 31, 161–171, 2007.
- SMITH, JR. F., TILLEY, L., OYAMA, M., Sleeper, M. **Manual of Canine and Feline Cardiology**. 3th ed. St. Louis: Elsevier. 2015, 472p.
- SOUZA, N.F.; LARSSON, M.H.M.A. Frequência de dirofilariose canina (*D. immitis*) em algumas regiões do Estado de São Paulo por meio da detecção de antígenos circulantes. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 53, p. 321-325, 2001.
- TILLEY, L.P.; SMITH, Jr; FRANCIS, W.K. **Consulta Veterinária em 5 Minutos: Espécie Canina e Felina**. 3. ed. São Paulo: Manole Ltda., 2008, p.380-381.
- TORRES, F.D.; FIGUEREDO, L.A. *Heterodoxus spiniger* (Enderlein, 1909) on domestic dogs (*Canis familiaris*, L. 1758) from the city of Recife, Pernambuco State, Brazil. **Braz. J. Vet. Res. An. Sci.** v.44, n.2, p.77-80, 2007.
- URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; et al. **Parasitologia Veterinária**, 2ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 77-79.

CAPÍTULO 2

Artigo 1- (formatado seguindo as normas do periódico: *Parasitology Research*)

Filarids in canines from Midwest Brazil: Epidemiological and diagnostic aspects

Rodrigo Leite Soares^{a,*}, Angélica Oliveira da Silva^a; Mateus Lotério Coelho^a, Rafael Antonio do Nascimento Ramos^b,
Juliane Francielle Tutija^a, Carlos Antonio do Nascimento Ramos^a

^a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

^b Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

*Corresponding author: Rodrigo Leite Soares, Av. Senador Filinto Muller, 2443, Vila Ipiranga, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. e-mail: rodrigo_fls@hotmail.com

Abstract

Canine filarioids include microfilariae species that circulate in bloodstream (e.g., *Dirofilaria immitis* and *Acantocheilonema reconditum*) or dwell into the subcutaneous tissue (e.g., *Cercopithifilaria* and *Onchocerca* sp.) of animals. The aim of this study was to investigate the occurrence of filarial infections in dogs living in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul, Midwest Brazil. Blood and skin samples of domiciled dogs (n = 80) were microscopically (modified Knott's test and skin fragment sediment examination) and molecularly (12S rRNA gene PCR) evaluated. Epidemiological information was obtained by physical examination and questionnaire with dog's owner. Microscopic and molecular examination of blood samples revealed that 5.0% (4/80) were positive for *D. immitis* in both tests. Specimens of dermal microfilariae (all identified as *Cercopithifilaria*) were detected in 42.5% (34/80) of samples considering at least one test performed. *Cercopithifilaria* infection had significant association with tick presence (*Rhipicephalus sanguineus*), street access and small dermal nodules. Excellent concordance level (Kappa= 0.759) between the two diagnostic methods (microscopic examination and PCR) was observed. DNA sequencing confirmed the morphological identification and presence of *D. immitis* and *C. bairdii* circulating in Mato Grosso do Sul. PCR showed more sensitivity and serves to detect and classify microfilariae species, but the microscopic analysis should be considered as screening test for detection of filariids genus in dogs. Considering that in the area of study *Rhipicephalus sanguineus* and mosquitoes are prevalent throughout the year, preventive measures should be disposed in order to avoid the animal infestation and filarioids infection.

Keywords *D. immitis* – *A. reconditum* – *C. bairdii* – *R. sanguineus*

Introduction

Canine filarioids are distributed in tropical and subtropical regions and belong to the family Onchocercidae (Nematoda: Filarioidea) whose circulate in bloodstream (e.g., *Dirofilaria immitis* and *Acantocheilonema reconditum*) or dwell into the subcutaneous tissue (e.g., *Cercopithifilaria* spp. and *Onchocerca* spp.) (Otranto et al. 2015; Ramos et al. 2016). Among these nematodes *D. immitis* is the most studied species due to its zoonotical importance and pathogenicity in dogs. This nematode is transmitted by culicid vectors of the genus *Aedes*, *Culex* and *Anopheles* (Da Silva and Langoni 2009) and cause the so-called heartworm disease in dogs. This infection is featured by animals be asymptomatic or exhibit nonspecific signs such as cough, dyspnea, weakness, anorexia, and in some severe cases syncope, cachexia, ascites and death (Sevimli et al. 2007; Smith et al. 2015).

Filarioid that have transient character and minor pathological relevance in dogs is *A. reconditum* (Knight 1987). Adult forms dwell into the subcutaneous and peri-renal tissue and their microfilariae circulate into the bloodstream. It is transmitted by fleas (e.g., *Ctenocephalides felis*, *C. canis*; *Pulex irritans*) and lice (e.g., *Trichodectes canis* e *Heterodoxus spiniger*) (Dantas-Torres and Figueiredo 2007; Leite et al. 2012).

Cercopithifilaria includes three species that also inhabit the subcutaneous tissue of dogs (i.e. *C. baina*, *C. grassi* and *Cercopithifilaria* sp. II sensu Otranto et al. 2012) (Otranto et al. 2013b). *Cercopithifilaria baina* is the most common species in dogs, and its distribution overlaps the geographical area of occurrence of its vector, the tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Brianti et al. 2012). Although its pathogenicity is currently unknown, limited histological researches of dogs indicated that the presence of *C. baina* microfilariae in the skin might cause focal epidermal and subepidermal inflammation, aside from moderate edematous alterations and perivascular interstitial dermatitis (Otranto et al. 2012; Boyd et al. 2019). In addition, a systemic chronic polyarthritis case was associated to this filarioid in a dog from Europe (Gabrielli et al. 2014).

In Brazil, the knowledge on filarioid species infecting dogs is mostly restricted to studies of blood infections by means microscopic and serological exams (Labarthe et al. 2014). There is no report regarding the clinical and epidemiologic importance of filarial species in dogs from the State of Mato Grosso do Sul, Midwest region, Brazil. Therefore, the aim of this study was to evaluate the occurrence of filarial infections in dogs living in Campo Grande, wich belongs to the previously mentioned macrorregion.

Materials and methods

Animal samples

From Setember 2018 to June 2019, blood samples and skin fragments (3mm × 3mm) were collected of 80 domiciled dogs. Animals came from the Zoonosis Center Control and Teaching Veterinary Hospital of the Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, both located in the municipality of Campo Grande (20°26'34" South and 54°38'47" West) Midwest region Brazil.

Clinical and epidemiological information was obtained through physical examination and applying a questionnaire to the dog's owner to evaluate associations with filarids presence. Epidemiological information questioned included sex, age, reproductive status, resident area, contact with other animals, street access, recent deworming, knowledge about coinfection with another pathogen, and presence of dermal nodules. Ectoparasites were collected manually for a period of five minutes from each animal to evaluate association with ticks and fleas species. The specimens were placed in glass

vials containing 70% ethanol and subsequently ticks were identified based on morphology following Barros-Battesti et al. (2006) and the fleas according to Linardi and Santos (2012).

Microscopical analysis

The search of blood microfilariae was assessed using the modified Knott test (Knott 1939). Dermal microfilariae were examined by microscopic examination of skin fragment according to Otranto et al. (2012). Blood and dermal microfilariae were identified morphometrically and morphologically according to Ramos et al. (2016).

Molecular analysis

Genomic DNA of skin's sediment and blood samples was extracted using the protocol described by Araujo et al. (2009). DNA quality and quantity of all samples was evaluated by electrophoresis in 1% agarose gel and spectrophotometry (A260/A280), respectively. The samples were submitted to polymerase chain reaction (PCR) according to Otranto et al. (2011) using the primers Fila_12S_F (5' CGGGAGTAAAGTTTTGTTTAAACCG 3') and Fila_12S_R (5' CATTGACGGATGGTTTGTACCAC 3'), which targets a partial conserved region of 12S rRNA gene (330 bp) of *Acanthocheilonema*, *Cercopithifilaria* and *Dirofilaria* (Otranto et al. 2011). DNA of *C. bairnei* previously stored in the Laboratory of Molecular Biology of the Universidade Federal de Grosso do Sul (GenBank accession number MG793436) was taken as positive control. Nuclease free water was used as negative control.

The amplifications were visualized by electrophoresis in 2% agarose gel stained with GelRed (Biotium). A 100 bp marker (Ludwig Biotec) was used to verify the lengths of the amplified fragments. The amplicons were purified using Clean Sweep PCR Purification (Thermo Fisher Scientific Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Samples were sequenced in both directions using the same primers by Sanger's method (Sanger et al. 1977) in an ABI-3130 automated sequencer (Applied Biosystems). The Chromatograms were evaluated and edited using Contig Editor version 2.2.0 (Gene Studio) and the identity of the DNA consensus sequence were determined by comparisons with sequences available in the GenBank database using the BLASTn search tool (Altschul et al. 1990).

Data analysis

The frequency of filarioids infecting dogs was associated to clinical-epidemiological information and presence of ectoparasites by the Fisher's exact test with 5% significance. The concordance in the results of the diagnostic tests was verified by the Kappa test. All calculations were done using BioEstat 5.0 software (Ayres et al. 2007).

Results and Discussion

Through microscopic and molecular examination of blood samples, 5.0% (4/80) were positive for *D. immitis* considering both tests. although there are methodological differences, these results are lower compared to coastal regions of Brazil as Rio de Janeiro and Pernambuco (Labarthe et al. 1998; Alves et al. 1999) but similar to observed by Fernandes et al. (1999) in Mato Grosso (5.8%), which show that non-coastal cities at Midwest-Brazil may also harbor this parasite. According to Da Silva and Langoni (2009), the introduction and dissemination of heartworm disease in previously free areas is associated with infected dog circulation. However, in the present study, two dogs had never traveled to endemic

areas. Therefore, these cases can be considered the first autochthonous cases in Campo Grande, Mato Grosso do Sul (Midwest Brazil).

Acantocheilonema and *Cercopithifilaria* were not found in blood samples (0%). In Brazil, studies have shown that the prevalence of *A. reconditum* is low (Barros et al. 1993; Fernandes et al. 1999; Brito et al. 2001) even though the current knowledge regarding this parasite species is still scarce. The present findings also confirmed this trend. Adult nematodes and larvae of *Cercopithifilaria* are found in the subcutaneous tissue, but a recent report in Campo Grande (Midwest, Brazil) showed that microfilariae may also circulate into the bloodstream of dog (Tutija et al. 2020). *Dirofilaria immitis* may cause severe heart disease and requires expensive and potential aggressive therapy. In contrast, infection by *C. bairnei* and *A. reconditum* is usually an accidental finding, with no clinical signs (Otranto et al. 2012). In this sense, differential diagnosis between filarids types in blood samples is important for the treatment prescription and prognosis establishment.

Microfilariae can be diagnosed using morphological and morphometric observation. Ramos et al. (2016) show that *D. immitis* has $301.2 \pm 7.6 \mu\text{m}$ in length and $5.9 \pm 0.8 \mu\text{m}$ in width, featured by conical anterior and a straight posterior ends, respectively. Microfilariae of *A. reconditum* has $272.3 \pm 4.3 \mu\text{m}$ in length and $4.1 \pm 0.3 \mu\text{m}$ in width, and are characterized by blunt anterior end. Microfilariae of *C. bairnei* has $180.2 \pm 2.3 \mu\text{m}$ in length and $4.6 \pm 0.2 \mu\text{m}$ in width, rounded anterior end, short dorsal-ventrally flattened body and thick cuticle with transverse striations. The present morphological observations revealed microfilariae of *D. immitis* ($300.05 \pm 23 \mu\text{m}$ in length and $6.1 \pm 1.1 \mu\text{m}$ in width) similar to those observed by Ramos et al. (2016). This especie was confirmed by molecular analysis and partial 12S rRNA gene sequencer, which the microfilariae presented 100% identity (E value 4e-145) to *D. immitis* with DNA sequences available in GenBank. (Accession number: KU885998, KP898738, KF707482).

About epidemiological parameters, *D. immitis* has been significantly associated with intrinsic factors of the animal, such as advanced age, male, breed and large size (Yildirim et al. 2007; Garcez et al. 2006; Vezzani et al. 2011). However, none association was observed in the present study ($p > 0.05$), similar to the data Almeida et al. (2001). Extrinsic factors, such as environment, management, length of stay and activity performed are common cited to favor *D. immitis* infection in dogs, but these features were not evaluated in the present study.

In the microscopic and molecular examination of skin samples, dermal microfilariae were detected in 42.5% (34/80) considering at least one test performed. Due to the wide distribution of its main vector, *R. sanguineus sensu lato* (Brianti et al. 2012), it is speculated that the distribution of *C. bairnei* may also be extensive. Some canine studies reported prevalence (9.4% to 13.9%) in some regions of Italy and others of the Mediterranean (Otranto et al. 2012; Solinas et al. 2014). On other hand, a prevalence rate of 0.96% has been reported in the northeastern region of Brazil (Ramos et al. 2016). However, to our knowledge, the present study expressess the highest frequency of *C. bairnei* infection in dogs.

At microscopic analyzes dermal microfilariae specimens were detected in 33.75% (27/80) and were all identified as belonging to *Cercopithifilaria* (Figure 1) based on morfometric (i.e., $182.18 \pm 20 \mu\text{m}$ long and $4.8 \pm 0.5 \mu\text{m}$ wide) and morphological features (i.e., rounded anterior end, short dorsal-ventrally flattened body and thick cuticle with transverse striations) (Ramos et al., 2016). This technique is simpler, cheaper and more commonly used to diagnose dermal microfilariae (i.e., *Cercopithifilaria* and *Onchocerca*) (Otranto et al. 2015; Ramos et al. 2016), however, it is more difficult to determine species of filarids.

According to PCR, 40% (32/80) of the samples were positive for the presence of dermal microfilariae and all 12S rRNA gene fragments sequence showed 99-100% of genetic identity with *C. bairnei* comparing with available sequences deposited in GenBank (Acession numbers: KF381408; JF461461; KP760321). The PCR showed better diagnose

sensibility than microscopic examination, but both tests have excellent concordance level (Kappa= 0.759), regarding to dermal microfilariae (Table 2). These results were higher than observed by Otranto et al. (2012) that obtained low sensibility of PCR and bad concordance between these two diagnostic methods. The better performance of PCR in this study is due different DNA extraction protocol which it was used skin's sediment while Otranto et al. (2012) used fragments of skin to DNA extraction and subsequent PCR. The fact is that most microfilariae are deposited at the bottom of eppendorf tubes; therefore, the present study shows that the use of skin sediment to detect and classify dermal microfilariae species by PCR is more sensible, however the microscopic examination, being simpler and having an excellent concordance level with PCR, should be considered as screening test to detect dermal filarids genus in dogs.

Dermatitis and granuloma have already been described with the presence of adult worms and/or microfilariae of filarioids infecting dogs like *Dirofilaria repens*, *Onchocerca lupi* and *C. bairdii* (Albanese et al. 2013; Otranto et al. 2013b; Boyd et al., 2019) and should be considered for confirmatory diagnosis of dermal filarioids species. However, in this study, only *C. bairdii* was found and associated with dermal nodules less than 1 cm (Table 1). Therefore, when dealing with dermatitis and papules in dogs from Campo Grande, infection by *Cercopithifilaria* should be investigated.

In this study, animals with street access were significantly associated with infections by *Cercopithifilaria* ($p=0.026$) probably due to greater chance of exposure to potential vectors in the environment. It is known that *C. bairdii* infecting dogs overlaps the geographical area of *R. sanguineus* occurrence, however, low frequencies of ticks positive for *C. bairdii* (less than 3.9%; determined by molecular analysis) have been observed in regions from Italy, Spain and Greece, although the frequencies of infection in dogs in the same regions varied from 0 to 45.4% (Otranto et al. 2013a,b). In the present study, besides to the significant association with *R. sanguineus* presence ($p=0.039$), the high frequency of infection by *Cercopithifilaria* in dogs (42.5%; 34/80) was similar to observed in *R. sanguineus* sensu lato (A and B haplotypes) in the same region (43.83%; 32/73) by Soares et al. (2020). Therefore, the present study reinforces the importance and vectorial competence of *R. sanguineus* for *Cercopithifilaria* transmission to dogs.

Flea presence on 16 dogs (all identified as *Ctenocephalides felis*), have no significative association with *Cercopithifilaria* infecting dogs ($p=0.263$). There is no report about *Cercopithifilaria* be transmited by flea too. Although *C. felis* be related to *A. reconditum* transmission (Leite et al. 2012), this study shows that this filarid have no importance in dogs from Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Others parameters evaluated (i.e., age, sex, resident area, contact with other animals, deworming recent, castrated, coinfection with another disease) had no significance association with *Cercopithifilaria* infection ($p>0.05$).

The DNA sequence evaluations confirmed the morphological identification and presence of *D. immitis* and *C. bairdii* circulating in dogs from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Midwest Brazil. PCR showed more sensibility and serves to detect and classify microfilaria species, but the microscopic analysis should be considered as screening test for detection of filarids genus in dogs, mainly in the presence of dermal nodules. Considering that in the area of study mosquitoes and *R. sanguineus* are prevalent throughout the year, preventive measures should be disposed in order to avoid the animal infestation and filarioids infection.

Acknowledgment

This work was supported by the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brazil (Financing Code 001).

References

- Almeida MAO, Barros MTG, Santos EP, Ayres MCC, Guimarães JE, Gondim FP. (2001) Parasitismo de cães por microfilárias de *Dirofilaria immitis*: influência da raça, sexo e idade. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal 2:59-64.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990) Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403–410.
- Alves LC, Silva LVA, Faustino MAG, McCall JW, Supakoderj P, Labarthe NW, Sanchez M, Caires O. (1999) Survey of canine heartworm in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 94(5): 587-590.
- Araujo FR, Ramos CAN, Luiz HL, Peres IAHFS, Oliveira RHM, Souza IIF. (2009) Avaliação de um protocolo de extração de DNA genômico a partir de sangue total. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte; 5 p. 120 Comunicado Técnico.
- Ayres M, Ayres-Júnior DL, Ayres AAS. (2007). BioEstat–Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biomédicas Ong Mamiraua, Belém, PA.
- Barros MTG, Santos EP, Almeida MAO. (1993) Frequência de microfilárias de *Dipetalonema reconditum* Grassi, 1890 em cães dos municípios de Salvador e Lauro de Freitas, Bahia. In: Congresso Internacional de Medicina Veterinária Em Língua Portuguesa, 6., Salvador. Anais... Salvador: UFBA, p. 340.
- Barros-Battesti DM, Arzua M, & Bechara GH. (2006) Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan; 223 p.
- Boyd M, Santoro D, Craft WF, Ginn PE, Childress AL, Wellehan JFX, & Walden HS. (2019) Dermatitis caused by autochthonous *Cercopithifilaria baina* from a dog in Florida, USA: clinical, histological and parasitological diagnosis and treatment. Vet. Dermatol, 30(1): 68-20.
- Brianti E, Otranto D, Dantas-Torres F, Weigl S & Latrofa MS. (2012) Rhipicephalus sanguineus (Ixodida, Ixodidae) as intermediate host of a canine neglected filarial species with dermal microfilariae. Veterinary Parasitology, 10: 330–337.
- Brito AC, Vila-Nova MC, Rocha DAM, Costa LG, Almeida WAP, Lopes Juniro RR, Fontes G, Rocha EMM, Regis L. (2001) Prevalência de filariose canina causada por *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum* em Maceió, Alagoas, Brasil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 17(6): 1497-1504.
- Da Silva RC, Langoni H. (2009) Dirofilariasis. Neglected emerging zoonosis. Ciência Rural, 39(5):1614-1623
- Gabrielli S, Giannelli A, Brianti E, Dantas-Torres F, Bufalini M, Fraulo M, LaTorre F, Ramos RA, Cantacessi C, Latrofa MS, Cancrini G, Otranto D. (2014) Chronic polyarthritis associated to *Cercopithifilaria baina* infection in a dog. Vet. Parasitol, 205: 401-404.
- Garcez LM, de Souza NF, Mota EF, Dickson LAJ, Abreu WU, Cavalcanti VFN, Gomes PAF (2006) Focus of canine heartworm disease in Marajo Island, North of Brazil: a risk factor for human health. Rev Soc Bras Med Trop 39:333–336.

- 224 Hall RE, Kestler DP, Agarwal S, Goldstein KM. (1999) Expression of the monocytic differentiation/activation factor P48
225 in species. *Mycoplasma Microb Pathog*, 27(3): 145-153.
- 226 Knight DH. (1987) Heartworm infection. *Veterinary Clinics of North America. Small Animals Practice, USA*, 17: 1463-
227 1518.
- 228 Knott J. (1939) A method for making microfilarial survey on day blood. *Med. Hyg*, 33: 191–196.
- 229 Labarthe NV, Serrão ML, Melo YF, Oliveira SJ, Lourenço-de-Oliveira R. (1998). Mosquito frequency and feeding habits
230 in an enzootic canine *Dirofilariasis* area in Niterói, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 93: 145-54.
- 231 Labarthe NV, Paiva JP, Reifur L, Mendes-de-Almeida F, Merlo A, Pinto CJ, Juliani OS, Almeida MA, Alves LC. (2014).
232 Updated canine infection rates for *Dirofilaria immitis* in areas of Brazil previously identified as having a high incidence
233 of heartworm-infected dogs. *Parasites Vectors* 7: 493.
- 234 Leite LC, Luz E, Cirio SM, Leite MC, Molinari HP, Zadorosnei ACB, Oliveira TMFS, Leite SC. (2012) Infection in
235 domestic dogs (*Canis lupus familiaris*, Linnaeus, 1758) from Guaratuba, Paraná, Brazil by circulating microfilariae
236 of *Acanthocheilonema reconditum* (Grassi, 1889). *Semin. Cienc. Agrar* 33(3):1149–1155.
- 237 Linardi PM & Santos JLC. (2012) *Ctenocephalides felis felis* vs. *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae): some
238 issues in correctly identify these species. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21(4), 345-354.
- 239 Otranto D, Brianti E, Dantas-Torres F, Weigl S, Latrofa MS, Gaglio G, Cauquil L, Giannetto S, Bain O. (2011)
240 Morphological and molecular data on the dermal microfilariae of a species of *Cercopithifilaria* from a dog in Sicily. *Vet*
241 *Parasitol*, 182: 221–229.
- 242 Otranto D, Brianti E, Latrofa MS, Annoscia G, Weigl S, Lia RP, Gaglio G, Napoli E, Giannetto S, Papadopoulos E, Mirò
243 G, Dantas-Torres F, Bain O. (2012) On a *Cercopithifilaria* sp. transmitted by *Rhipicephalus sanguineus*: aneglected, but
244 widespread filarioid of dogs. *Parasites Vectors*, 5: 1.
- 245 Otranto D, Brianti E, Dantas-Torres F, Miró G, Latrofa MS, Mutafovchiev Y, Bain O. (2013a). Species diversity of dermal
246 microfilariae of the genus *Cercopithifilaria* infesting dogs in the Mediterranean region. *Parasitology* 140, 99–108.
- 247 Otranto D, Varcasia A, Solinas C, Scala A, Brianti E, Dantas-Torres F, Annoscia G, Martin C, Mutafovchiev Y, Bain O,
248 (2013b) Redescription of *Cercopithifilaria baina* Almeida & Vicente, 1984 (Spirurida, Onchocercidae) from a dog in
249 Sardinia, Italy. *Parasit. Vectors* 6: 132.
- 250 Otranto D, Giannelli A, Trumble NS, Chavkin M, Kennard G, Latrofa MS, Bowman DD, Dantas-Torres F, Eberhard ML.
251 (2015) Clinical case presentation and a review of the literature of canine onchocercosis by *Onchocerca lupi* in the United
252 States. *Parasites Vectors*, 8: 89.
- 253 Ramos RA, Oliveira Rêgo AG, Farias Firmino ED, Ramos CA, Carvalo GA, Dantas-Torres F, Otranto D. & Alves LC.
254 (2016) Filarioids infecting dogs in northeastern. Brazil *Veterinary Parasitology*, 226: 26-29.
- 255 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR, (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
256 *U.S.A.* 74: 5463–5467.

- 257 Santos MAB, Souza IB, Macedo LO, Ramos CAN, Rego AGO, Alves LC, Ramos RAN, Carvalho GA.
 258 (2017). *Cercopithifilaria bainae* in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks from dogs in Brazil. Ticks and Tick Borne
 259 Diseases, 8: 623–625.
- 260 Sevimli FK, Kozan E, Bülbül A, Birdane FM, Köse M, Sevimli A. (2007) *Dirofilaria immitis* infection in dogs: unusually
 261 located and unusual findings. Parasitology Research, 101: 1487-94.
- 262 Smith JRF, et al. Manual of Canine and Feline Cardiology. 3. ed. St. Louis: Elsevier, 2015, 472 p.
- 263 Soares RL, da Silva AO, Coelho ML; Echeverria JT, de Souza ML, Babo-Terra VJ; Pasquatti TN, Ramos RAN, Ramos,
 264 CAN. (2020). Molecular detection of *Cercopithifilaria bainae* and other tick-borne pathogens in *Rhipicephalus*
 265 *sanguineus* s.l. isolated from dogs in Midwest Brazil, Brazilian journal of veterinary Parasitology, printing-press.
- 266 Torres FD, Figueredo LA. (2007) *Heterodoxus spiniger* (Enderlein, 1909) on domestic dogs (*Canis familiaris*, L. 1758)
 267 from the city of Recife, Pernambuco State, Brazil. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, São
 268 Paulo, 44(2): 77-80.
- 269 Vezzani D, Carbajo AE, Fontanarrosa MF, Scodellaro CF, Basabe J, Cangiano G, and Eiras DF. (2011). Epidemiology
 270 of canine heartworm in its southern distribution limit in South America: risk factors, inter-annual trend and spatial
 271 patterns. Vet. Parasitol, 176: 240–249.
- 272 Yildirim A, Ica A, Atalay O, Duzlu O, and Inci A. (2007). Prevalence and epidemiological aspects of *Dirofilaria*
 273 *immitis* in dogs from Kayseri province, Turkey. Res. Vet. Sci., 82: 358–363.
- 274



Figure 1: *Cercopithifilaria bainae* detected by microscopic examination of skin's fragment sedimentation

Table 1. Epidemiological aspects associated with *Dirofilaria* and *Cercopithifilaria* infection in dogs from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Midwest Brazil.

Parameters	Dogs						
	Samples	<i>Dirofilaria</i> +	<i>Dirofilaria</i> -	<i>p</i> - Value*	<i>Cercopithifilaria</i> +	<i>Cercopithifilaria</i> -	<i>p</i> - Value*
Sex							
Male	36	3	33	0.321	19	17	0.260
Female	44	1	43		15	27	
Age							
< 5 years	59	2	57	0.280	26	33	0.797
> 5 years	21	2	19		8	13	
castrated							
yes	15	1	14	0.980	5	10	0.565
no	65	3	62		29	36	
Area resident							
urban	74	4	70	1.0	33	41	0.233
rural	6	0	6		1	5	
Contact with other animals							
yes	55	3	52	1.0	22	33	0.626
no	25	1	24		12	13	
Street access							
yes	24	0	24	0.310	15	9	0.026
no	56	4	52		19	37	
Deworming recent							
yes	28	1	27	1.0	12	16	1.0
no	52	3	49		22	30	
Coinfection with another disease							
yes	44	1	43	0.321	22	22	0.174
no	36	3	33		12	24	
Tick presence¹							
yes	45	2	43	1.0	24	21	0.039
no	35	2	33		10	25	
Flea presence²							
yes	16	0	16	0.578	9	7	0.263
no	64	4	60		25	39	
Dermal nodule (less than 1cm)							
yes	27	1	26	1.0	16	11	0.035
no	53	3	50		18	35	

*Fisher's exact test

¹*Rhipicephalus sanguineus*²*Ctenocephalides felis*

279 **Table 2.** Comparison between PCR results and microscopic examination for dermal microfilariae detection

Test	PCR +	PCR -	Total colum
Microscopic examination +	25	2	27
Microscopic examination -	7	46	53
Total line	32	48	80

280 Kappa test= 0.759

CAPÍTULO 3

(Artigo 2- Aceito e publicado de acordo com o periódico: *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*- RBPV)

SHORT COMMUNICATION

Molecular detection of *Cercopithifilaria binae* and other tick-borne pathogens in *Rhipicephalus sanguineus* s.l. isolated from dogs in Midwest Brazil

Detecção molecular de *Cercopithifilaria binae* e outros patógenos transmitidos por carrapatos em *Rhipicephalus sanguineus* s.l. isolados de cães no Centro-Oeste do Brasil

C. binae* and tick-borne pathogen in *R. sanguineus

Rodrigo Leite Soares¹; Angélica Oliveira da Silva¹; Mateus Lotério Coelho¹; Jessica Teles Echeverria¹; Michelli Lopes de Souza¹; Veronica Jorge Babo-Terra¹; Taynara Nunes Pasquatti²; Rafael Antonio Nascimento Ramos³; Carlos Alberto do Nascimento Ramos¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brasil

²Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS, Brasil

³Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFPRE), Garanhuns, PE, Brasil

*Corresponding author: Rodrigo Leite Soares. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Av. Senador Filinto Muller, 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil. Tel: 55(67) 98174-2669. E-mail: rodrigo_fls@hotmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-4821-218X>

Abstract

The aim of the present study was to detect *Cercopithifilaria baina*e and other tick-borne pathogens and to perform molecular characterization of the tick *Rhipicephalus sanguineus* s.l. collected from dogs. Ticks (n= 432, including 8 larvae, 59 nymphs, and 365 adults) were sampled from domiciled dogs (n= 73) living in Campo Grande, Mato Grosso do Sul (Midwest Brazil). All ticks were morphologically identified as *R. sanguineus*. Genomic DNA was extracted in pools (three to five ticks per animal) and was used for definition of *R. sanguineus* haplotypes (based on 16S rRNA analysis) and pathogen identification (*Cercopithifilaria* sp., *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Hepatozoon canis*, *Babesia vogeli* and *Rickettsia* spp.). *Rhipicephalus sanguineus* specimens were identified as haplotypes A and B. DNA of *Cercopithifilaria baina*e (43.83%; 32/73), *Ehrlichia canis* (24.65%; 18/73), *Anaplasma platys* (19.17%; 14/73), and *Hepatozoon canis* (5.47%; 4/73) was detected. The identity of pathogens was confirmed by DNA sequence analysis. The present study confirms the presence of haplotypes A and B of *R. sanguineus* in the state of Mato Grosso do Sul and its importance as a vector of several pathogens of veterinary concern. Finally, this is the first report to identify *C. baina*e in ticks in the Midwestern region of Brazil.

Keywords: Ticks, genetic characterization, dog, central western region, Brazil.

Resumo

O objetivo do presente estudo foi detectar *Cercopithifilaria baina*e e outros patógenos transmitidos por carrapatos e realizar a caracterização molecular do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* s.l. coletado em cães. Carrapatos (n= 432, incluindo 8 larvas, 59 ninfas e 365 adultos) foram amostrados de cães domiciliados (n= 73) residentes no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul (centro-oeste do Brasil). Todos os carrapatos foram identificados morfologicamente como *R. sanguineus*. O DNA genômico foi extraído em pools (três a cinco carrapatos por animal), seguido pela definição de haplótipos (com base no gene 16S rRNA) e pela investigação de patógenos (*Cercopithifilaria* sp., *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Hepatozoon canis*, *Babesia vogeli* e *Rickettsia* spp.). Os espécimes coletados foram identificados como haplótipos A e B de *R. sanguineus*. Foram detectados DNA de *Cercopithifilaria baina*e (43,83%;

32/73), *Ehrlichia canis* (24,65%; 18/73), *Anaplasma platys* (19,17%; 14/73) e *Hepatozoon canis* (5,47%; 4/73). A identidade dos patógenos foi confirmada por análise de sequência de DNA. O presente estudo confirma a circulação dos haplótipos A e B de *R. sanguineus* no estado de Mato Grosso do Sul e sua importância como vetor de vários patógenos de interesse veterinário. Finalmente, este é o primeiro relato de *C. binae* em carrapatos na região centro-oeste do Brasil.

Palavras-chave: Carrapato, Caracterização genética, cão, Centro-Oeste, Brasil.

Introduction

Ticks and tick-borne pathogens constitute an important problem of medical and veterinary concern around the world. Several microorganisms (e.g., *Rickettsia rickettsii*, *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia canis*) transmitted by ticks may cause infection in humans and animals (ALMEIDA et al., 2013; SCHREIBER et al., 2014). Therefore, studies on the detection of ticks and their associated pathogens provide valuable information to better understand their epidemiology (SCHREIBER et al., 2014).

Among the tick species infesting dogs, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato is considered the most important and is widespread throughout the world. Two genetic lineages are currently recognized within this species (i.e., the Southern or temperate lineage and the Northern or tropical lineage) (MORAES-FILHO et al., 2011). The vector competence of ticks belonging to these different lineages has been subject of speculation. For example, differences have been observed in the transmission of distinct Brazilian strains of *E. canis* to dogs (MORAES-FILHO et al., 2015) and it is likely that this variation in vector competence also holds true for other pathogens. In the state of Mato Grosso do Sul (central western Brazil), little is known about the occurrence of different lineages of *R. sanguineus*, although there is evidence of genetic similarity between local strains and those recognized as tropical lineages and reported in the States of Rio de Janeiro and São Paulo (BURLINI et al., 2010; MORAES-FILHO et al., 2011).

Ehrlichia canis and *Anaplasma platys* are among the most prevalent and disease-causing pathogens in dogs in Brazil (RAMOS et al., 2010; SOARES et al., 2017). On the other hand, the distribution and epidemiological impact of other pathogens are poorly documented. For instance, although the filarid *Cercopithifilaria binae* was first reported

in Brazil in 1984 (ALMEIDA & VICENTE, 1984), the parasite has only gained attention in the last four years, especially in the North-Eastern regions of the country (RAMOS et al., 2016; SANTOS et al., 2017).

Researchers have placed increasing importance on investigating the occurrence of pathogens in ticks (SCHREIBER et al., 2014; MELO et al., 2016), which is an interesting alternative to surveys carried out in dogs, especially for pathogens that present with low parasitemia. Therefore, the present study aimed to characterize *R. sanguineus* strains infesting dogs in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul, Brazil, as well as to identify the main pathogens carried by this tick.

Materials and Methods

The present study was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Federal University of Mato Grosso do Sul (protocol number: 961/2018).

Ticks were collected from 73 naturally infested domiciled dogs at the Veterinary Teaching Hospital of the Federal University of Mato Grosso do Sul and the Zoonosis Control Center, municipality of Campo Grande (20°30'32.0"S 54°37'15.2"W), Mato Grosso do Sul (MS), Brazil.

Ticks were manually and randomly collected from each dog during a period of 5 min, for a total of 432 ticks. The specimens were placed in glass vials containing 70% ethanol and subsequently identified based on morphological characteristics, according to Barros-Battesti et al. (2006).

Adult ticks were pooled (three to five per animal) and DNA was extracted from them. The ticks were first washed with autoclaved distilled water and dried. The selected parasites were macerated in microtubes; this was followed by addition of 500 µl of 20% sodium dodecyl sulfate and 10 µl of proteinase K (20 mg/ml), incubation for 24 hours at 56°C, addition of 400 µl of chloroform and vigorous homogenization by vortexing. After the addition of 300 µl of protein precipitation solution (0.8 M potassium acetate and 11% glacial acetic acid), the mixture was centrifuged at 10,000 × g for 10 minutes. The aqueous phase was transferred to a microtube and DNA was precipitated by the addition of 1 ml of 100% ethanol. After centrifugation at 10,000 × g for 5 minutes, the pellet was washed with 1 ml of 70% ethanol and dried at room temperature (approximately 25°C) for 30 minutes. The pellet was suspended in 1x TE buffer. DNA integrity and quantity

were evaluated by electrophoresis in 0.8% agarose gels and spectrophotometry (A260/A280), respectively.

Samples were submitted to polymerase chain reaction (PCR) using the primers described in Table 1. A single PCR was used for the detection of *Cercopithifilaria* sp., *B. vogeli*, *Hepatozoon* sp., and *Rickettsia* sp., and a nested PCR was used for *E. canis* and *A. platys*. The PCR products were visualized in an UV transilluminator after 1.5% agarose gel electrophoresis and staining with Gel Red (Biotium, Fremont, CA, USA).

Amplicons were purified using Clean Sweep PCR Purification reagent (Thermo Fisher Scientific Carlsbad, CA, USA) and sequenced in both directions by Sanger sequencing in an ABI-3130 automated sequencer (Applied Biosystems). Sequences were analyzed with the aid of Contig editor version 2.2.0 (Gene Studio Inc), and the identity of DNA sequences was determined by comparison with sequences available in the GenBank database using the BLASTn search tool.

Ten tick-positive samples were subjected to 16S rRNA sequencing. A phylogenetic tree was constructed using the UPGMA method (SNEATH & SOKAL, 1973). DNA sequences of ticks available in the GenBank database were used for phylogenetic analysis. Bootstrap resampling (1000 replicates) was performed for statistical support of reliability of tree nodes (FELSENSTEIN, 1985) using the MEGA software version 6.0 (TAMURA et al., 2013).

Moreover, five samples positive for *Cercopithifilaria* sp., four positive for *E. canis*, four positive for *A. platys*, and two positive for *Hepatozoon* sp., were similarly submitted for DNA sequencing. The DNA sequences were deposited in Genbank under the accession numbers shown in Table 2.

Results and Discussion

All ticks analyzed in the present study were morphologically identified as *R. sanguineus* partially or completely engorged (n=432, including 8 larvae, 59 nymphs and 365 adults). The 16S rRNA gene was amplified from all 73 samples (pools); the 10 samples sequenced revealed $\geq 99\%$ identity (100% coverage) with sequences of *R. sanguineus* available in the Genbank database.

In the phylogenetic analysis, the Campo Grande (CG) strains clustered with haplotypes A and B (Figure 1), previously identified by Moraes-Filho et al. (2011) and defined as tropical haplotypes.

The present results confirmed the presence of these *R. sanguineus* haplotypes in the region and corroborate the observations made by Melo et al. (2016), who found only the A and B haplotypes in the Pantanal region of the state of Mato Grosso, Brazil. The C haplotype described in the Northern regions of South America (e.g., Colombia) (MORAES-FILHO et al., 2011) segregated into a separate branch from the strains from Mato Grosso do Sul, but with all these haplotypes having a common ancestry. In contrast, the D, E, and F haplotypes (temperate haplotypes) formed a separate clade, supported by a high bootstrap value. These haplotypes have been reported in Chile, Argentina, Uruguay, and Southern Brazil (state of Rio Grande do Sul) (MORAES-FILHO et al., 2011) and have greater genetic proximity to strains from Europe (SZABÓ et al., 2005).

Regarding the pathogens analyzed from ticks (divided in 73 pools) by PCR, *Cercopithifilaria* sp., (43.83%; 32/73), *E. canis* (24.65%; 18/73), *A. platys* (19.17%; 14/73), and *Hepatozoon* sp. (5.47%; 4/73) were identified. DNA from *Babesia vogeli* and *Rickettsia* spp. were not detected in any sample. The DNA sequencing results confirmed the presence of *C. bairdii*, *E. canis*, *A. platys*, and *H. canis* in ticks from Campo Grande, and the sequences were deposited in Genbank under the accession numbers shown in Table 2.

A part from *C. bairdii*, all other pathogens have been frequently reported in dogs in the region of interest (RAMOS et al., 2015; SOARES et al., 2017), among which *E. canis* stands out as the most prevalent agent and is often associated with veterinary health problems. An *E. canis* infection rate of 55.75% has been described in pet dogs from Campo Grande- MS (SOARES et al., 2017), as well as a rate of 8.5% in stray cats in the same region (ANDRÉ et al., 2015).

The high prevalence of *E. canis* in dogs in the region may also be associated with the presence of A and B haplotypes of *R. sanguineus* observed in the present study, corroborating the findings of a vector competence study by Moraes-Filho et al. (2015), who observed that the tropical haplotype of *R. sanguineus* is more effective at transmitting *E. canis* to dogs compared to temperate haplotypes.

It should be highlighted that *A. platys* was one of the most frequent pathogens found in the studied ticks (19.17%), a finding which is compatible with the *A. platys* prevalence rate described in dogs in the region. According to Soares et al. (2017), the infection frequency of dogs by *A. platys* in Campo Grande was 16.96% between 2007 and 2009. The high prevalence of *A. platys* and *E. canis* in dogs and ticks in the region provides evidence that the A and B haplotypes of *R. sanguineus* are competent vectors for both pathogens, which can be found in the same geographic areas where the tropical haplotypes (A and B) of *R. sanguineus* circulate.

Another important result of the present study was the identification, for the first time, of *C. bairnei* in ticks from the central western region of Brazil. *Rhipicephalus sanguineus* is a vector for this filarid, which parasitizes the dermis of dogs (BRIANTI et al., 2012). It has been recently described in dogs and *R. sanguineus* in North-Eastern Brazil (RAMOS et al., 2016; SANTOS et al., 2017). However, its clinical importance remains unknown. In the present study, *R. sanguineus* (haplotypes A and B) was considered a competent vector for this pathogen in the region, since *C. bairnei* was detected in 43.83% of tick samples. Despite the small number of collected ticks and the analyses being carried out in pools, this prevalence was very high, since Santos et al. (2017) found *C. bairnei* in only 51 (2.67%) out of 1906 ticks.

Moreover, Otranto et al. (2012) found the frequency of ticks positive for *C. bairnei* (determined through molecular analysis) to be lower than 3.9% in the studied regions of Italy, Spain, and Greece, although the frequencies of infection in dogs in these regions ranged from 0 to 45.4%. This indicates that the frequency of dogs infected by *C. bairnei* in the city of Campo Grande may be high as well. Further studies are needed to clarify this issue.

In the present study, *Hepatozoon canis* was detected in only 5.47% (4/73) of the *R. sanguineus* samples, but this prevalence is compatible with this pathogen infecting dogs (3.63%; 6/165) from the same region (RAMOS et al., 2015). Although *R. sanguineus* has been implicated as the main vector of *H. canis* pathogens in urban areas of Brazil, low infection rates have been reported in dogs, despite high tick infestation rates (RAMOS et al., 2010, RAMOS et al., 2015). The prevalence observed in dogs and ticks from Campo Grande- MS points to the low competence of *R. sanguineus* (A and B haplotypes) in acquiring and transmitting these specific isolates of the protozoan.

Previous studies have reported unsuccessful attempts at describing the development of *H. canis* in ticks, including *R. sanguineus* from Brazil (FORLANO et al., 2005; GOMES et al., 2010; DEMONER et al., 2013). On the other hand, the development of *H. canis* in populations of *R. sanguineus* in Europe has been reported frequently (BANETH et al., 2001; GIANNELLI et al., 2013). Therefore, genetic and morphological variability in *R. sanguineus* populations can probably be attributed to the tick's ability to transmit this pathogen in different regions.

Although no DNA from *Babesia vogeli* and *Rickettsia* spp. was found in the tick pools analyzed, both pathogens occur in the region, albeit at a low frequency. DNA from *Babesia vogeli* was found in dogs from the city of Campo Grande at a frequency of only 3.3% (2/60) (SOUSA et al., 2013). *Rickettsia rickettsii* was identified in only one tick of a total of 2015 specimens collected from dogs in the city of Campo Grande (ALMEIDA et al., 2013).

The results of the present study confirm the presence of *C. bairdii*, *E. canis*, *A. platys*, and *H. canis* in dogs in the municipality of Campo Grande, MS, Brazil and demonstrate the importance of the tick *R. sanguineus* (haplotypes A and B) as a host and potential vector of a set of pathogens in the region.

Acknowledgment

This work was supported by the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brazil (Financing Code 001).

References

- Almeida GLG, Vicente JJ. *Cercopithifilaria bairdii* sp. n. parasita de *Canis familiaris* (L.) (Nematoda, Filarioidea). *Atas Soc Biol Rio de Janeiro* 1984; 24: 18.
- Almeida RCF, Garcia MV, Cunha RC, Matias J, Silva EA, Matos MFC, et al. Ixodid fauna and zoonotic agents in ticks from dogs: first report of *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus sanguineus* in the state of Mato Grosso do Sul, mid-western Brazil. *Exp Appl Acarol* 2013; 60(1): 63-72. <https://doi.org/10.1007/s10493-012-9641-y>
- Andre MR, Herrera HM, Fernandes SJ, de Sousa KC, Goncalves LR, Domingos IH et al. Tick-borne agents in domesticated and stray cats from the city of Campo Grande, state of

- 250 Mato Grosso do Sul, midwestern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis* 2015; 6(6): 779-786.
 251 <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.07.004>
- 252 Baneth G, Samish M, Alekseev E, Aroch I, Shkap V. Transmission of *Hepatozoon*
 253 *canis* to dogs by naturally-fed or percutaneously-injected ticks *Rhipicephalus sanguineus*
 254 ticks. *J Parasitol* 2001; 87(3): 606-611. [https://doi.org/10.1645/0022-](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0606:TOHCTD]2.0.CO;2)
 255 [3395\(2001\)087\[0606:TOHCTD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0606:TOHCTD]2.0.CO;2)
- 256 Barros-Battesti DM, Arzua M & Bechara GH. *Carrapatos de importância médico-*
 257 *veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies.*
 258 1ª ed. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006.
- 259 Brianti E, Otranto D, Dantas-Torres F, Weigl S, Latrofa MS, Gaglio G, et al.
 260 *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodida, Ixodidae) as intermediate host of a canine neglected
 261 filarial species with dermal microfilariae. *Vet Parasitol* 2012; 183(3-4): 330-337.
 262 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.031>
- 263 Burlini L, Teixeira KR, Szabó MP, Famadas KM. Molecular dissimilarities of
 264 *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples
 265 throughout the world: is there a geographical pattern? *Exp Appl Acarol* 2010; 50(4): 361-
 266 374. <https://doi.org/10.1007/s10493-009-9321-8>
- 267 Demoner LC, Rubini AS, Paduan KS, Metzger B, Paula Antunes JM, Martins TF, et al.
 268 Investigation of tick vectors of *Hepatozoon canis* in Brazil. *Ticks Tick Borne Dis* 2013;
 269 4(6): 542-546. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.07.006>
- 270 Duarte SC, Linhares GFC, Romanowsky TN, Silveira Neto OJ, Borges LMF. Assessment
 271 of primers designed for the subspecies-specific discrimination among *Babesia canis*
 272 *canis*, *Babesia canis vogeli* and *Babesia canis rossi* by PCR assay. *Vet Parasitol* 2008;
 273 152(1-2): 16-20. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.013>
- 274 Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap.
 275 *Evolution* 1985; 39(4): 783-791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- 276 Forlano M, Scofield A, Elisei C, Fernandes KR, Ewing SA, Massard CL. Diagnosis
 277 of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic
 278 dogs in Brazil. *Vet Parasitol* 2005; 134(1-2): 1-7.
 279 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.05.066>
- 280 Giannelli A, Ramos RAN, Di Paola G, Mencke N, Dantas-Torres F, Baneth G, et al.
 281 Transstadial transmission of *Hepatozoon canis* from larvae to nymphs of *Rhipicephalus*

- 282 *sanguineus*. *Vet Parasitol* 2013; 196(1-2): 1-5.
 283 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.02.017>
- 284 Gomes PV, Mundim MJ, Mundim AV, Ávila DF, Guimarães EC, Cury MC. Occurrence
 285 of *Hepatozoon* sp. in dogs in the urban area originating from a municipality in
 286 southeastern Brazil. *Vet Parasitol* 2010; 174(1-2): 155-161.
 287 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.07.020>
- 288 Inokuma H, Okuda M, Ohno K, Shimoda K, Onishi T. Analysis of the 18S rRNA gene
 289 sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. *Vet Parasitol* 2002; 106(3):
 290 265-271. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00065-1](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00065-1)
- 291 Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, Pinter A, et al.
 292 *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São
 293 Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *J Clin Microbiol* 2004; 42(1):
 294 90-98. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.1.90-98.2004>
- 295 Mangold AJ, Barges MD, Mas-Coma S. Mitochondrial 16S rDNA sequences and
 296 phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among
 297 Metastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res* 1998; 84(6): 478-484.
 298 <https://doi.org/10.1007/s004360050433>
- 299 Martin AR, Brown GK, Dunstan RH, Roberts TK. *Anaplasma platys*: an improved PCR
 300 for its detection in dogs. *Exp Parasitol* 2005; 109(3): 176-
 301 180. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.11.007>
- 302 Melo ALT, Witter R, Martins TF, Pacheco TA, Alves AS, Chitarra CS, et al. A survey of
 303 tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. *Med Vet*
 304 *Entomol* 2016; 30(1): 112-116. <https://doi.org/10.1111/mve.12139>
- 305 Moraes-Filho J, Krawczak FS, Costa FB, Soares JF, Labruna MB. Comparative
 306 evaluation of the vector competence of four South american populations of the
 307 *Rhipicephalus sanguineus* group for the bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of canine
 308 monocytic ehrlichiosis. *PLoS ONE* 2015; 10(9): e0139386.
 309 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139386>
- 310 Moraes-Filho J, Marcili A, Nieri-Bastos FA, Richtzenhain LJ, Labruna MB. Genetic
 311 analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. *Acta*
 312 *Trop* 2011; 117(1): 51-55. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.09.006>

- Otranto D, Brianti E, Dantas-Torres F, Weigl S, Latrofa MS, Gaglio G, et al. Morphological and molecular data on the dermal microfilariae of a species of *Cercopithifilaria* from a dog in Sicily. *Vet Parasitol* 2011; 182(2-4): 221-229. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.043>
- Otranto D, Brianti E, Abramo F, Gaglio G, Napoli E, Latrofa MS, et al. Cutaneous distribution and localization of *Cercopithifilaria* sp. microfilariae in dogs. *Vet Parasitol* 2012; 190: 143-150. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.05.016>.
- Ramos CAN, Babo-Terra VJ, Pedroso TC, Souza Filho AF, Araújo FR, Cleveland HPK. Molecular identification of *Hepatozoon canis* in dogs from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2015; 24(2): 247-250. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612015019>
- Ramos RAN, Ramos CAN, Araujo FR, Oliveira R, Souza I & Pimentel D. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). *Parasitol Res* 2010; 107: 1115-1120. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720150556>
- Ramos RA, Oliveira RAG, Farias FED, Ramos CA, Carvalho GA, Dantas-Torres F, et al. Filarioids infecting dogs in northeastern Brazil. *Vet Parasitol* 2016; 226: 26-29. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.06.025>
- Santos MAB, de Souza IB, de Macedo LO, Ramos CAN, Rego AGO, Alves LC, et al. *Cercopithifilaria baina* in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks from dogs in Brazil. *Ticks Tick Borne Dis* 2017; 8(4): 623-625. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.04.007>
- Schreiber C, Krucken J, Beck S, Maaz D, Pachnicke S, Krieger K, et al. Pathogens in ticks collected from dogs in Berlin/Brandenburg, Germany. *Parasit Vectors* 2014; 7: 535. <https://dx.doi.org/10.1186%2Fs13071-014-0535-1>
- Sneath PHA, Sokal RR. *Numerical Taxonomy*. Freeman: San Francisco; 1973.
- Soares R, Ramos CA, Pedroso T, Babo-Terra VJ, Cleveland, HPK, Araújo FR. Molecular survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *An Acad Bras Ciênc* 2017; 89(1): 301-306. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720150556>
- Sousa KC, André MR, Herrera HM, de Andrade GB, Jusi MM, dos Santos LL, et al. Molecular and serological detection of tick-borne pathogens in dogs from an area

endemic for *Leishmania infantum* in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2013; 22(4): 525-531. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612013000400012>

Szabó MP, Mangold AJ, João CF, Bechara GH, Guglielmone AA. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. *Vet Parasitol* 2005; 130(1-2): 131-140. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.03.008>

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013; 30(12): 2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>

Wen B, Rikihisa Y, Mott JM, Greene R, Kim HY, Zhi N, et al. Comparison of nested PCR with immunofluorescent antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1852-1855.

Table 1. Polymerase chain reaction primers used to test DNA extracts of ticks sampled from dogs in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

Target organism	Primers (5'-3')	Gene	Amplicon (bp)	Reference
Ticks	16S Tick F- CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT 16S Tick R- GCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGT	16S rRNA	460	Mangold et al., 1998
<i>Babesia vogeli</i>	Bab1- TGAACCTTATCACTTAAAGG Bab4- CAACTCCTCCACGCAATCG	18S rRNA	590	Duarte et al., 2008
<i>Hepatozoon</i> sp.	HepF- ATACATGAGCAAAATCTCAAC HepR- CTTATTATTCCATGCTGCAG	18S rRNA	666	Inokuma et al., 2002
<i>Ehrlichia canis</i>	ECC - AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC ECB - CGTATTACCGCGGCTGCTGGC HE- ATAGGTACCGTCATTATCTTCCTAT* ECA-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA*	16S rRNA	389	Wen et al., 1997
<i>Anaplasma platys</i>	8F- AGTTTGATCATGGCTCAG 1448R- CCATGGCGTGACGGGCAGTGT PLATYS- GATTTTGTGCTAGCTTGCTATG* EHR16SR- TAGCACTCATCGTTTACAGC*	16S rRNA	678	Martin et al., 2005
<i>Cercopithifilaria</i> sp.	Fila12SF- CGGGAGTAAAGTTTTGTTTAAACCG Fila12SR- CATTGACGGATGGTTTGTACCAC	12S rRNA	330	Otranto et al., 2011
<i>Rickettsia</i> spp.	CS78- GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT Cs323- GCTTCCTTAAATTCAATAAATCAGGAT	<i>gltA</i>	401	Labruna et al., 2004

*Used in a nested-PCR reaction

361 **Table 2.** Genbank accession numbers for the DNA sequences amplified from ticks
 362 sampled from dogs in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

Sequence identification	Genbank accession number
<i>Rhipicephalus sanguineus</i> Campo Grande/MS 10	MG793426
<i>Rhipicephalus sanguineus</i> Campo Grande/MS 12	MG793427
<i>Rhipicephalus sanguineus</i> Campo Grande/MS 15	MG793428
<i>Rhipicephalus sanguineus</i> Campo Grande/MS 18	MG793429
<i>Rhipicephalus sanguineus</i> Campo Grande/MS 20	MG793430
<i>Rhipicephalus sanguineus</i> Campo Grande/MS 22	MG793431
<i>Rhipicephalus sanguineus</i> Campo Grande/MS 24	MG793432
<i>Rhipicephalus sanguineus</i> Campo Grande/MS 25	MG793433
<i>Rhipicephalus sanguineus</i> Campo Grande/MS 30	MG793434
<i>Rhipicephalus sanguineus</i> Campo Grande/MS 38	MG793435
<i>Cercopithifilaria bairdii</i> Campo Grande/MS 01	MG793436
<i>Cercopithifilaria bairdii</i> Campo Grande/MS 02	MG793437
<i>Cercopithifilaria bairdii</i> Campo Grande/MS 03	MG793438
<i>Cercopithifilaria bairdii</i> Campo Grande/MS 04	MG793439
<i>Cercopithifilaria bairdii</i> Campo Grande/MS 05	MG793440
<i>Ehrlichia canis</i> Campo Grande/MS 01	MG793441
<i>Ehrlichia canis</i> Campo Grande/MS 02	MG793442
<i>Ehrlichia canis</i> Campo Grande/MS 03	MG793443
<i>Ehrlichia canis</i> Campo Grande/MS 04	MG793444
<i>Anaplasma platys</i> Campo Grande/MS 01	MG793445
<i>Anaplasma platys</i> Campo Grande/MS 02	MG793446
<i>Anaplasma platys</i> Campo Grande/MS 03	MG793447
<i>Anaplasma platys</i> Campo Grande/MS 04	MG793448
<i>Hepatozoon canis</i> Campo Grande/MS 01	MG793449
<i>Hepatozoon canis</i> Campo Grande/MS 02	MG793450

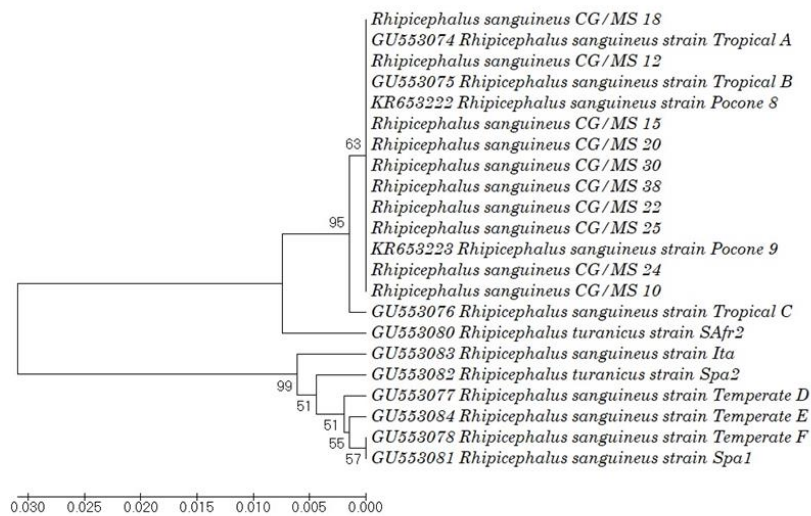


Figure 1. Phylogenetic tree constructed with the UPGMA method showing the relationship between strains of *Rhipicephalus sanguineus* from Campo Grande, MS, Brazil, and other isolates available in Genbank.

CAPÍTULO 4

Artigo 3- (formatado seguindo as normas da revista: *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*)

Giant cutaneous cyst in a dog infected by *Cercopithifilaria baina*

Rodrigo Leite Soares^{a,*}, Luana Bobadilha Parolin^b, Nathália Lopes Fontoura Mateus^b, Gabriella Rodrigues Duarte de Figueiredo^b, Volnei Rebeque Rodrigues^b, Gustavo Gomes de Oliveira^b, Dheywid Karlos Mattos Silva^b, Flávia Barbieri Bacha^b, Rafael Antonio do Nascimento Ramos^c, Domenico Otranto^d, Juliane Francielle Tutija^a, Carlos Alberto do Nascimento Ramos^a

^a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

^b Hospital Veterinário, Centro Universitário da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil

^c Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^d Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli studi di Bari, Valenzano, Bari, Italy

*Corresponding author: Rodrigo Leite Soares, Av. Senador Filinto Muller, 2443, Vila Ipiranga, Campo Grande, MS, Brasil. e-mail: rodrigo_fls@hotmail.com

Abstract

*Cercopithifilaria baina*e is the most prevalent species of filarioids within the genus. This parasite localizes in the skin, sometimes causing erythematous dermatitis. Herein, the authors describe a case of giant cutaneous cyst in a dog infected by *Cercopithifilaria baina*e. A 9-year-old male mixed-breed dog was presented to a veterinary facility in Dourados, Mato Grosso do Sul (Midwest Brazil) with a mass in the lumbosacral region. On clinical examination, the mass was observed to be approximately 15 cm in diameter with a floating consistency and conspicuous presence of viscous fluid; the lesion, however, was non-ulcerated and non-adherent. Cytological examination revealed the presence of moderate lymphocyte cellularity and spumous macrophages, erythrophagocytosis and the presence of numerous microfilariae. After morphological and molecular analysis of the 12S ribosomal RNA gene, the microfilariae were identified as *C. baina*e, exhibiting 99-100% identity with DNA sequences available from Genbank. Surgery was recommended and after resection of the giant cyst, the dog was treated with ivermectin for two weeks and the clinical condition was completely resolved. Based on the presence of microfilariae in the cyst fluid the role of this filarioid in the determinism of the lesion has been discussed.

Keywords: tick, *Cercopithifilaria*, microfilariae, canine

1. Introduction

Up to 28 species of filarioids are included in the genus *Cercopithifilaria* (Filarioida, Onchocercidae) of which three parasitize the subcutaneous tissue of dogs (i.e., *Cercopithifilaria baina*e, *Cercopithifilaria grassi*, and *Cercopithifilaria* sp. II, sensu (Otranto et al., 2012). Canine infection by *C. baina*e has been frequently reported worldwide, and its distribution is mainly associated with the presence of its vector, the

brown tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Brianti et al., 2012; Latrofa et al., 2014). In Brazil, information regarding *C. bairdii* in dogs and *R. sanguineus* is restricted to case reports from the Southeast (Almeida and Vicente 1984) and Northeast (Latrofa et al., 2014; Ramos et al., 2016; Santos et al., 2017). This filarioid is considered of minimal pathogenic relevance; however, histological researches indicated that the presence of microfilariae in the skin could cause focal epidermal and subepidermal inflammation, aside from moderate edematous alterations and perivascular interstitial dermatitis (Otranto et al., 2012; Boyd et al., 2019). In addition, a case of chronic polyarthritis has been associated to this filarioid in a dog from Europe (Gabrielli et al., 2014). The aim of the present study was to report a case of a giant cutaneous cyst in a dog infected by *C. bairdii* in Brazil.

2. Materials and methods

In March 2019, a 9-year-old male mixed breed dog was presented to the Veterinary Clinical of UNIGRAN, Dourados, Mato Grosso do Sul (22°12'43" South and 54°49'43" West) with a history of tumor like growth in the lumbosacral region. The animal had free street access, vaccination against rabies and was previously infested by ticks. The owner had noticed that the growth had started approximately two months earlier.

Physical examination revealed a mass, approximately 15cm diameter, in the lumbosacral region with floating consistency and apparently not adhered to the musculature (Fig. 1a). The animal exhibited normal vital signs and behavioral parameters. Five adult ticks (three partially engorged females and two males) were collected, morphologically identified as *R. sanguineus* sensu lato (Barros-Battesti et al., 2006) and then placed in glass vials containing 70% ethanol until molecular processing.

Complementary examinations, such as assessment of complete blood cell count (CBC) and that of serum alanine transaminase, creatinine, alkaline phosphatase, urea, albumin, and total plasma protein levels were performed. Total plasma protein level was the only abnormality noted (10.2g/dl [reference range, 6 to 8g/dl]).

Approximately 25mL of fluid was collected from the cyst, an aliquot of which was submitted to cytological examination, which revealed moderate lymphocyte cellularity, foamy macrophages, erythrophagocytosis, and the presence of microfilariae. The same cyst fluid was subjected to a modified Knott's test (Knott 1939), stained with 2% methylene blue, and microfilariae were identified morphologically according to Otranto et al. (2011) at light microscope (DMi8, Leica, Wetzlar, Germany; original magnification $\times 40$). Sixty-four microfilariae/10 μ L were counted, and 10 measured. All microfilariae were identified as *Cercopithifilaria* sp. (Fig. 2) according to Otranto et al. (2012).

To confirm the filarioid species in the dog through molecular analysis, genomic DNA of the fluid material was extracted using a protocol previously described by Araújo et al. (2009). To molecular analysis of filarioid species in ticks, pool of five adult ticks were submitted to DNA extraction according to Soares et al. (2020). Molecular characterization of the microfilariae was performed by PCR amplification of the 12S ribosomal RNA (rRNA) gene (Otranto et al., 2011). DNA from *C. bairnei* obtained in a previous study was used as positive control. Nuclease-free water was used as the no-DNA control.

The amplicons were purified using a commercially available kit (ExoSAP-IT Express, (Thermo Fisher Scientific Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's instructions. The samples were sequenced in both directions using the Sanger method and an automated sequencer (ABI 3130, Applied Biosystems, Thermo-Fisher, Waltham, MA,

USA). The chromatograms were evaluated and edited using Contig Editor version 2.2.0 (Gene Studio), and the consensus sequence was submitted to BLAST analysis to determine sequence identity by comparison with sequences available in the GenBank database.

Blood sample scored negative at the serological tests for *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma* sp., and *Borrelia burgdorferi* (SNAP 4Dx Plus®, IDEXX Laboratories), and *Leishmania infantum* (DPP® LVC, Bio-Manguinhos®). The prescribed treatment for the dog included prednisolone (1 mg/kg orally, twice per day for the first 7 days, and once daily for 7 additional days) to reduce inflammation and the remaining fluid. To treat microfilaria infection, a combination of moxidectin (minimum dose of 2.5 mg/kg body weight) and imidacloprid (minimum dose of 10.0 mg/kg body weight) spot-on (Advocate®, Bayer HealthCare) was prescribed.

In May, 2019, the dog returned to the veterinary clinic to assess its clinical condition. The mass had not decreased and presented a more consistent aspect (Fig. 1b). A second cytological examination revealed moderate lymphocyte cellularity and foamy macrophages, and the modified Knott test using fluid cyst detected 60 microfilariae/10 µL. Based on the clinical condition of the animal, the surgical removal of mass was indicated.

During surgery, a red floating mass (approximately 15cm in diameter, weighing 1.2kg) adhered to some points of the musculature was removed (Fig. 3a). The cyst presented a serosanguineous exudate and irregular firm yellowish nodules with different sizes (from 1 to 3 cm in diameter) (Fig. 3b). The internal content of cyst was assessed through bacterial analysis and scored negative. In addition, tissue fragments were fixed in 10% formalin solution, processed and stained with hematoxylin and eosin for histopathological analysis. Microscopically, there was a conspicuous amount of fibrous

tissue in the deep dermis, focal areas with edema, and a moderate number of plasma cells and eosinophils associated with moderate foci of hemorrhage and areas of necrosis.

After surgery, 250mg *amoxicillin* and 125mg *clavulanic acid* (Agemoxi CL®, 10 mg/kg orally, twice per day for 10 days), 2 mg meloxicam (Maxicam®, 0.2 mg/kg, orally once per day for 4 days) and 500mg sodium dipyrone (10 drops, three times per day for 5 days) were prescribed. Cleaning with physiological solution in the region of the skin suture, and application of antimicrobial and epithelial ointment (Vetaglos®, Vetnil, São Paulo, Brazil, twice per day, for 14 days) was also prescribed.

Subsequently suture removal, ivermectin (Mectimax®, 0.3mg/kg, orally, once per day for the first 7 days and 0.6 mg/kg, once per day, for 7 additional days) was administered. Seventeen days after surgical resection a complete resolution of the clinical condition was achieved.

3. Results

Microfilariae detected in the giant dermal cyst were identified as *Cercopithifilaria* sp. (Fig. 2) based on measurements (i.e., 182 ± 5.5 µm in length, 4.7 ± 0.4 µm in width) and morphological features, (i.e., rounded head, dorsoventrally flattened body, and thick cuticle presenting transverse striations). After PCR of tick and fluid sample with subsequent DNA sequence analysis of the 12S rRNA gene, it was possible to identify the species *C. binae* (identity, 99.62-100%). The DNA sequences obtained in the present study were deposited in the Genbank database under the accession number MN647587 and MN646393.

4. Discussion

This study reports a clinical case of giant cutaneous cyst in a dog infected by *C. bairnei*. Although the pathogenicity of *C. bairnei* had been poorly understood, attention has been paid by dermatologists and clinicians due to the description of cutaneous manifestations (i.e., subcutaneous nodules and erythematous dermatitis) (Otranto et al., 2011; Boyd et al., 2019) and systemic disorders, such as chronic polyarthritis (Gabrielli et al., 2014). In the present study, the large number of microfilariae (above 60 microfilariae/ 10 μ L), their persistence after 2 months of treatment and the absence of coinfection with other pathogens suggest a putative involvement of *C. bairnei* in this clinical condition.

The CBC and biochemical serum analysis did not reveal alterations (i.e., anemia, thrombocytopenia or increase in serum enzyme levels), which are common in infections by *Dirofilaria immitis*, causing heartworm diseases (Smith et al., 2015; Monobe et al., 2016). However, there is no information about hematological alterations associated to *C. bairnei* infection, probably due to the subcutaneous localization of this parasite. It is important to notice that the presence of subcutaneous effusion and *C. bairnei* microfilariae together had never been reported before. Most likely, it should be related to an exaggerated immune response against the parasite, with fluid sequestration or lymphatic obstruction.

In the present study, the lesions observed in the cyst on histopathological examination consisted of interstitial plasmacytic and eosinophilic dermatitis associated with edema, hemorrhage and necrosis. Dermal inflammation reactions (i.e., eosinophilic, phagocytic hyperplasia and/or granulomatous) have already been described with the presence of adult worms and/or microfilariae of filarioids infecting dogs, like *C. bairnei*, *Dirofilaria repens* and *Onchocerca lupi* (Boyd et al., 2019; Albanese et al., 2013; Otranto

et al., 2013), and should be considered for confirmatory diagnosis and to rule out other differential diagnoses.

Little is known about the treatment of *C. baina* infections. Previous studies have demonstrated the inefficacy of the association between melarsomin and doxycycline used for *D. immitis* treatment (Lefoulon et al., 2016; Boyd et al., 2019). Probably, this inefficiency is related to the melarsomin toxicity and doxycycline inefficacy due to the absence of *Wolbachia* spp. bacteria in *Cercopithifilaria* nematodes (Lefoulon et al., 2016; Boyd et al., 2019). For a long time, macrocyclic lactones (i.e., ivermectin, moxidectin, milbemycin) have been used for filarioids control. This has been confirmed by the successful treatment with moxidectin/imidacloprid (Multi Advantage®, Bayer, Leverkusen, Germany) of a case of erythematous dermatitis associated with *C. baina* infection in a dog (Boyd et al., 2019).

The clinical recovery of the animal was achieved after surgical resection and implementation of a drug protocol based on the use of ivermectin for two weeks. Finally, in the present study, *C. baina* have been detected in a tick-infested dog exhibiting a giant dermal cyst. Considering the presence of microfilariae in the cyst fluid the influence of this filarioid in the lesion has been speculated.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Acknowledgements

This work was supported by the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brazil (Financing Code 001).

References

- Albanese, F., Abramo, F., Braglia, C., Caporali, C., Venco, L., Vercelli, A., Ghibaud, G., Leone, F., Carrani, F., Giannelli, A., Otranto, D., 2013. Nodular lesions due to infestation by *Dirofilaria repens* in dogs from Italy. *Vet Dermatol.* 24, 255–e56.
- Almeida, G.L.G., Vicente, J.J., 1984. *Cercopithifilaria baina* parasita de *Canis familiaris* (L.) (Nematoda, Filarioidea). *Atas Soc. Biol. Rio de Janeiro*, 24, 18.
- Araújo, F.R., Ramos, C.A.N., Luiz, H.L., Peres, I.A.H.F.S., Oliveira, R.H.M., Souza, I.I.F., 2009. Avaliação de um protocolo de extração de DNA genômico a partir de sangue total. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte; 5 p. 120 Comunicado Técnico.
- Barros-Battesti, D.M., Arzua, M., Bechara, G.H., 2006. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan 223p.
- Boyd, M., Santoro, D., Craft, W.F., Ginn, P.E., Childress, A.L., Wellehan, J.F.X., Walden, H.S., 2019. Dermatitis caused by autochthonous *Cercopithifilaria baina* from a dog in Florida, USA: clinical, histological and parasitological diagnosis and treatment. *Vet. Dermatol.* 30, 68-20.
- Brianti, E., Otranto, D., Dantas-Torres, F., Weigl, S., Latrofa, M.S., Gaglio, G., Napoli, E., Brucato, G., Cauquil, L., Giannetto, S., Bain, O., 2012. *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodida, Ixodidae) as intermediate host of a canine neglected filarial species with dermal microfilariae. *Vet. Parasitol.* 10, 330–337.
- Gabrielli, S., Giannelli, A., Brianti, E., Dantas-Torres, F., Bufalini, M., Fraulo, M., LaTorre, F., Ramos, R.A., Cantacessi, C., Latrofa, M.S., Cancrini, G., Otranto, D., 2014. Chronic polyarthrititis associated to *Cercopithifilaria baina* infection in a dog. *Vet. Parasitol.* 205, 401-404.

- Knott, J., 1939. A method for making microfilarial survey on day blood. Med. Hyg. 33, 191–196.
- Latrofa, M.S., 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.
- Lefoulon, E., Bain, O., Makepeace, B.L., Haese, C., Uni, S., Martin, C., Gavotte, L., 2016. Breakdown of coevolution between symbiotic bacteria *Wolbachia* and their filarial hosts. Peer J. 4, 1840.
- Monobe, M.M., da Silva, R.C., Melanchauski, M.S., Lopes, R.S., 2016. Canine Heartworm Disease in a Brazilian non-endemic area. Arq. Ciên. Vet. Zool. UNIPAR. 19, 95-100.
- Otranto, D., Brianti, E., Dantas-Torres, F., Weigl, S., Latrofa, M.S., Gaglio, G., Cauquil, L., Giannetto, S., 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.
- Otranto, D., Brianti, E., Latrofa, M.S., Annoscia, G., Weigl, S., Lia, R.P., Gaglio, G., Napoli, E., Giannetto, S., Papadopoulos, E., Mirò, G., Dantas-Torres, F., Bain, O., 2012. On a *Cercopithifilaria* sp. transmitted by *Rhipicephalus sanguineus*: a neglected, but widespread filarioid of dogs. Parasit. Vectors. 5, 1.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Giannelli, A., Abramo, F., Ignjatovic´ Cupina, ´ A., Petric, ´ D., Cardoso, L., Mutafovchiev, Y., Cortes, H., 2013. Cutaneous distribution and circadian rhythm of *Onchocerca lupi* microfilariae in dogs. PLoS Negl. Trop. Dis. 7, e2585.

- 246 Ramos, R.A., Oliveira Rêgo, A.G., Farias, F.E.D., Ramos, C.A., Carvalho, G.A., Dantas-
 247 Torres, F., Otranto, D., Alves, L.C., 2016. Filarioids infecting dogs in northeastern
 248 Brazil. *Vet. Parasitol.* 226, 26-29.
- 249 Santos, M.A.B., Souza, I.B., Macedo, L.O., Ramos, C.A.N., Rego, A.G.O., Alves, L.C.,
 250 Ramos, R.A.N., Carvalho, G.A., 2017. *Cercopithifilaria baina* in *Rhipicephalus*
 251 *sanguineus* sensu lato ticks from dogs in Brazil. *Ticks Tick-Borne Dis.* 8, 623–625.
- 252 Smith, J.R.F., Tilley, L., Oyama, M., Sleeper, M., 2015. Manual of Canine and Feline
 253 Cardiology. 3th ed. (472p). St. Louis: Elsevier.
- 254
- 255 Fig 1. Tumor in the lumbosacral region associated with *C. baina* infection in a dog on
 256 March 23, 2019 (A) and May 15, 2019 (B).
- 257 Fig 2. *Cercopithifilaria baina* in subcutaneous fluid stained with 2% methylene blue.
- 258 Fig 3. Giant cutaneous cyst associated with *C. baina* infection in a dog. Mass of
 259 approximately 15cm in diameter and weighing 1.2kg removed by surgical procedure (A).
 260 Serosanguinous exudate and abundant irregular nodules with approximately 1 to 3 cm in
 261 diameter present within the mass (B).



Fig 1. Tumor in the lumbosacral region associated with *C. bairnei* infection in a dog on March 23, 2019 (A) and May 15, 2019 (B).

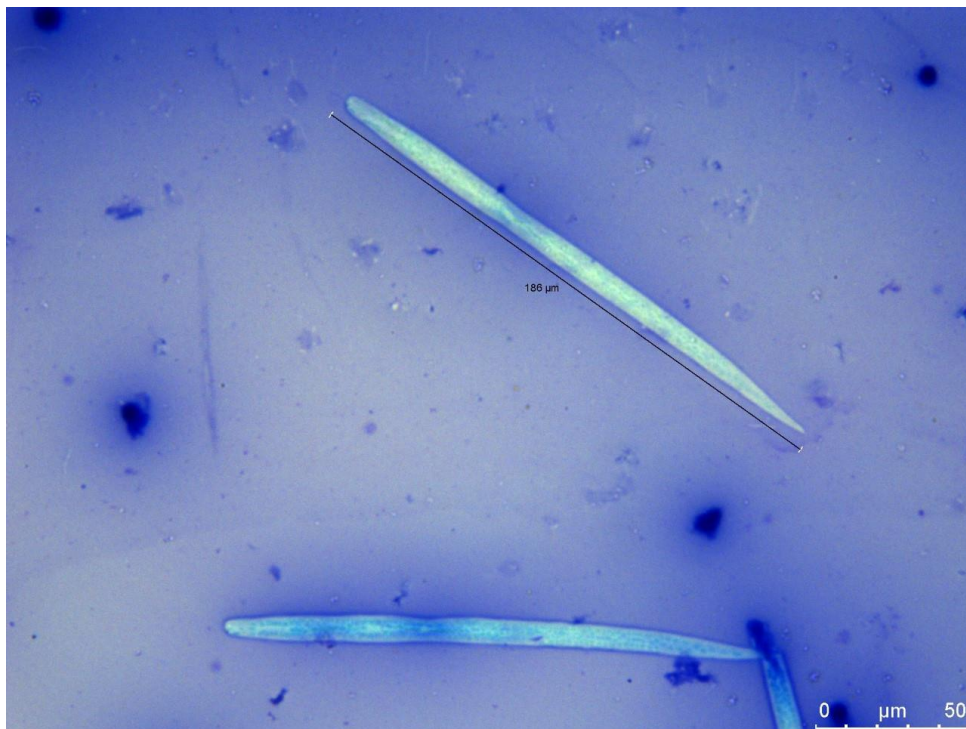


Fig 2. *Cercopithifilaria bairnei* in subcutaneous fluid stained with 2% methylene blue.

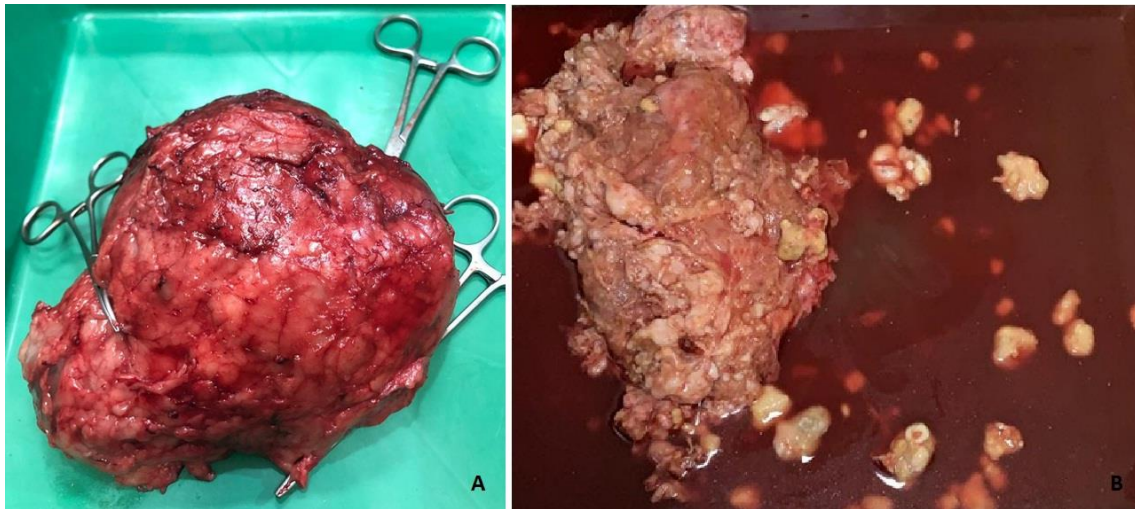


Fig 3. Giant cutaneous cyst associated with *C. bairdii* infection in a dog. Mass of approximately 15cm in diameter and weighing 1.2kg removed by surgical procedure (A). Serosanguinous exudate and abundant irregular nodules with approximately 1 to 3 cm in diameter within the mass (B).

CAPÍTULO 5

Artigo 4- (Artigo formatado seguindo as normas da *Acta veterinária Brasília*)

PRIMEIRO RELATO DE DIROFILARIOSE CANINA (*Dirofilaria immitis*) EM CAMPO GRANDE, MATO GROSSO DO SUL, BRASIL

Rodrigo Leite Soares^{1*}, Angélica Oliveira da Silva¹, Mateus Lotério Coelho¹, Polliana Alves Franco², Kallyna Flavia Monfort da Silva Orti³, Carlos Alberto do Nascimento Ramos¹

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brasil

² Laboratório VetAnalisa, Campo Grande, MS, Brasil

³ Clínica veterinária Senhor Pet, Campo Grande, MS, Brasil

*Corresponding author: Rodrigo Leite Soares. E-mail: rodrigo_fls@hotmail.com.
<https://orcid.org/0000-0002-4821-218X>

RESUMO - A dirofilariose é uma zoonose emergente de ampla distribuição mundial. No Brasil, é causada por *Dirofilaria immitis* e transmitida por diferentes espécies de culicídeos. O presente trabalho tem por objetivo relatar o primeiro caso de dirofilariose canina em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. No dia 6 de setembro de 2018, um canino, fêmea, poodle, de 14 anos de idade, foi atendido numa clínica veterinária particular de Campo Grande- MS, apresentando hipertensão arterial e eosinofilia. O animal foi medicado e após nove dias, retornou com piora do quadro clínico (emese, melena, taquicardia, taquipneia). Mais exames laboratoriais foram solicitados, em que observou-se alterações cardíacas, hepáticas, renais e pancreáticas, além da presença de microfilárias, identificadas morfolologicamente como *D. imittis* e confirmada espécie por teste sorológico e molecular. O animal foi internado, mas veio a óbito no quinto dia. Apesar de Campo Grande tratar-se de uma área não endêmica, o animal possui relato de viagem para região litorânea, sem realização de tratamento profilático. Portanto, representa um caso alóctone de dirofilariose na região.

Palavras-chave: microfilária, verme do coração, canino

INTRODUÇÃO

Dirofilariose, também conhecida popularmente como “doença do verme do coração” (*heartworm disease*), é uma zoonose emergente negligenciada cujo agente etiológico é *Dirofilaria immitis*. De transmissão vetorial, este nematódeo é responsável por ocasionar doença crônica de acometimento cardiopulmonar em cães (SEVIMLI et al., 2007).

Nestes animais a doença possui difícil diagnóstico clínico, pois os sintomas dependem do número de parasitos adultos presentes, do tempo de evolução da doença e da resposta imune do hospedeiro. Clinicamente, os animais podem apresentar-se assintomáticos ou exibirem sinais inespecíficos, como tosse, dispneia, fraqueza, anorexia, e em alguns casos mais graves, síncope, caquexia, ascite e óbito (SEVIMLI et al., 2007; SMITH et al., 2015).

O diagnóstico definitivo requer a detecção de antígenos circulantes de fêmeas adultas ou identificação de microfilárias em amostras sanguíneas mediante análise microscópica e/ou testes moleculares (DA SILVA; LANGONI, 2009; TAYLOR et al., 2010).

A distribuição da infecção é cosmopolita e caracterizada como endêmica em áreas litorâneas tropicais e subtropicais (TAYLOR et al., 2010), sendo relatado prevalências de 14% no Rio de Janeiro (RJ) (LABARTHE et al., 1998); 10,7% em Recife (PE) (ALVES et al., 1999); 15% em Santa Catarina (ARAÚJO et al., 2003); 8% no Estado de São Paulo (SOUZA; LARSSON, 2001). Segundo Barbosa; Alves (2006), a prevalência média nacional em cães é de aproximadamente 10, 2% para cães microfilarêmicos e 9, 1% baseado em testes sorológicos, no entanto, não há relatos da presença de *D. immitis* em Mato Grosso do Sul. Portanto, o presente trabalho tem por objetivo relatar o primeiro caso dirofilariose canina na região.

CASUÍSTICA

No dia 6 de setembro de 2018, um canino, fêmea, poodle, de 14 anos de idade, foi atendido numa clínica veterinária particular em Campo Grande, Mato Grosso do Sul (19°55'04 "S e 54°21'50" O), sob a queixa de um "nódulo no olho". O animal era castrado, alimentava-se unicamente de ração, vacinado e vermifugado anualmente, não possuía acesso à rua e nem ectoparasitas no momento do atendimento.

Ao exame clínico foi observado presença de um nódulo na pálpebra inferior esquerda (1cm de diâmetro), tempo de perfusão capilar (TPC) 2 segundos, temperatura retal, 38,5°C, Frequência cardíaca (FC) e respiratória (FR) normais e pressão arterial aumentada (PAS 180 mmHg e PAD:100mmHg).

Foi então solicitado hemograma completo e os bioquímicos séricos: alanina aminotransferase (ALT), creatinina, fosfatase alcalina (FA), ureia, proteínas totais e globulina. Na análise hematológica observou-se apenas eosinofilia (1425/ μ L). Foi prescrito dipirona 500mg, 1 gota/kg, a cada 12 horas, durante sete dias e Anlodipino, 0,2 mg/kg, VO, a cada 12 horas durante sete dias, para controle da hipertensão arterial.

No dia 15/09/2018, o paciente retornou apresentando piora do quadro clínico. O animal apresentava êmese, melena, taquicardia (135 bpm) e taquipneia (65 rpm). Foi solicitada a internação do animal e novos exames laboratoriais como, urinálise, razão P/CU, hemograma, ecocardiograma e bioquímicos séricos: ALT, creatinina, ureia, proteínas totais, globulina, colesterol, lipase, amilase, cálcio, fósforo, AST, GGT, triglicerídeos, bilirrubina direta e indireta.

No ecocardiograma notou-se dilatação ventricular direita, discreta hipertrofia ventricular esquerda e insuficiência mitral discreta. Na urinálise observou-se proteinúria intensa (+++) e P/CU aumentada (0,9 mg/dL). Na análise hematológica observou-se aumento nas enzimas ALT (142 U/L), FA (191,6 U/L), ureia (61,76 mg/dL), amilase (3.689 UI/L), colesterol (425,98 mg/dL) e lipase (1.979 UI/L). Também havia hemólise acentuada no plasma, esquitocitos e presença de microfilárias.

Uma alíquota sanguínea foi encaminhada para identificação morfológica e molecular das microfilárias. Pelo teste de *Knott* modificado, dez microfilárias foram avaliadas e mensuradas, apresentando comprimento médio de $312 \pm 14 \mu\text{m}$ e largura de $6,2 \pm 0,5 \mu\text{m}$, com extremidade frontal cônica e extremidade posterior reta, sendo então identificadas como *D. immitis* (Figura 1) de acordo com as descrições de Ramos et al. (2016). O diagnóstico foi confirmado pelo teste SNAP 4Dx Plus® (IDEXX Laboratórios), no qual a amostra sanguínea foi reagente para detecção de antígenos circulantes de fêmeas adultas de *D. immitis* e negativo para os demais patógenos (*Ehrlichia* sp., *Anaplasma* sp., e *Borrelia* sp.).

Figura 1. *Dirofilaria immitis* em sangue de cão detectado pelo teste de *knott* modificado.



Fonte: acervo do autor

Para caracterização molecular da espécie, DNA genômico da amostra de sangue foi extraído utilizando o protocolo descrito por Araújo et al. (2009). Em seguida procedeu-se a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) do gene 12S rRNA de acordo com Otranto et al. (2011). O produto de amplificação (330pb) foi visualizado após eletroforese em gel de agarose (2%) e purificado utilizando ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A amostra foi sequenciada em ambas as

116 direções pelo método de Sanger, usando um sequenciador automatizado 3130-ABI
117 (Applied Biosystems). Os cromatogramas foram avaliados e editados utilizando o
118 software Contig editor (Gene Studio) v. 2.2.0, e a sequência consenso (284pb) foi
119 submetida a análise BLASTn, apresentando 100% de identidade com sequencias 12S
120 rRNA de *D. immitis*. A sequência de DNA obtida no presente estudo foi depositada no
121 banco de dados Genbank sob o número de acesso MN947412.

122
123 Durante internação foi prescrito Silimarina 50mg/kg, a cada 24 horas, Bezafibrato 2,5
124 mg/kg a cada 12 horas, Omeprazol 1mg/kg a cada 24 horas, Enalapril 0,5m/kg a cada 12
125 horas, Doxiciclina 10mg/kg a cada 12 horas; Advocate® (Imidacloprida 100 mg,
126 moxidectina 25 mg) 1mL, dose única. No quinto dia de internação, o animal teve perda da
127 consciência, bradicardia acentuada, ausência de reflexos, parada cardíorrespiratória e
128 veio a óbito. Não foi autorizada a necropsia.

129 130 **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**

131
132 Embora a distribuição de *D. immitis* seja cosmopolita e estados vizinhos já terem relatado
133 a ocorrência desse parasita (FERNANDES et al., 1999; SOUZA; LARSSON, 2001), este trata-
134 se do primeiro caso relatado de dirofialariose canina no Mato Grosso do Sul.

135
136 A confirmação do diagnóstico suscitou o questionamento se esse caso seria autóctone, no
137 entanto, o proprietário relatou que o animal viajou para Macaé no estado do Rio de Janeiro,
138 entre dezembro e janeiro de 2017, e não foi realizada qualquer medida de prevenção. Pelo
139 fato do Rio de Janeiro ser endêmico (LABARTHE et al., 1998) e o mês em que as
140 microfilárias de *D. immitis* foram detectadas se encaixarem perfeitamente com o período
141 pré patente da doença (DA SILVA; LANGONI, 2009), assume-se que este relato represente
142 um caso alóctone.

143
144 Segundo DA SILVA; LANGONI (2009), a introdução e disseminação de *D. immitis* para
145 áreas antes livres, está associada circulação de cães domésticos infectados. Embora não
146 seja um caso autóctone, Campo Grande- MS também possui características que podem
147 favorecer a introdução e permanência do agente, como o clima, desmatamento, falta de

saneamento básico, e uma elevada população de vetores em potencial no meio urbano e periurbano (Ex. *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*).

Recentemente, um caso de microfilaremia por um outro filarídeo (*Cercopithifiaria baina*) também foi relatado nesta cidade (TUTIJA et al., 2020), no entanto assim como para *D. immitis* e *Acanthocheilonema reconditum*, não se sabe a importância clínica e epidemiológica desses filarídeos na região. Ao contrário de *D. immitis*, esses outros filarídeos não costumam estar relacionados a condições patológicas graves, no entanto necessitam ser diferenciados (via análise microscópica, sorológica ou molecular), para não ocasionar em erros no diagnóstico e no tratamento dos animais acometidos (TUTIJA et al., 2020).

As alterações clínicas associadas à dirofilariose são resultado de lesões vasculares causadas pela presença de parasitas no sistema circulatório do animal. Na maioria dos casos, a doença é assintomática ou apresenta sinais inespecíficos (SEVIMLI et al., 2007; SMITH et al., 2015). No dia 6/09/2018, os achados clínicos e laboratoriais não permitiram o reconhecimento antecipado da doença, ocasionando em comprometimento o prognóstico.

Embora eosinofilia seja em alguns casos relacionados com dirofilariose (SMITH et al., 2015; MONOBE et al., 2016), é um achado hematológico inconsistente, pois menos da metade dos cães com dirofilariose o apresentam, além de ser comumente encontrado em outras infecções causadas por parasitos nematódeos (MONOBE et al., 2016). Esta alteração esteve presente no primeiro hemograma, mas não reapareceu nos exames do dia 15/09/2018, mesmo com a intensificação do quadro clínico.

Em casos de infecções maciças, são comuns o desenvolvimento de quadros circulatórios e distúrbios imunomediados. Obstrução de ligações do fluxo sanguíneo pela insuficiência cardíaca direita leva a deposição de imunocomplexo e fibrina nos glomérulos, podendo levar à glomerulonefrite e insuficiência renal (TAYLOR et al., 2010; MONOBE et al., 2016). Os achados ecocardiográficos, proteinúria intensa (+++), azotemia e relação U/PC aumentada no presente relato foram compatíveis para estas condições.

Os achados laboratoriais ALT e FA aumentadas no presente relato foram sugestivos de hepatopatia, estando de acordo com Taylor et al. (2010) que afirmam que a insuficiência cardíaca direita congestiva também leva ao aumento da atividade das enzimas hepáticas, congestão e lesão do fígado. Alterações pancreáticas, dadas pelo aumento das enzimas amilase, lipase, colesterol, também foram observadas. Estas não costumam ser citadas, porém podem estar relacionadas com casos mais graves da dirofilariose.

Considerando a gravidade das lesões, com base nas alterações clínicas e laboratoriais observadas, a combinação de medicamento preventivo (Advocate®) com doxiclicina foi uma conduta correta e de acordo com as diretrizes da *American heartworm society*, sendo esta fortemente recomendada antes da terapia adulticida (Melasormina) para pacientes em estágios mais graves, de modo a evitar a morte em massa de parasitas adultos e consequente obstrução de vasos (MONOBE et al., 2016). Infelizmente, antes de se iniciar a terapia adulticida o animal veio a óbito.

Segundo Monobe et al. (2016) subdiagnóstico é o maior problema para esta infecção, principalmente para os animais que não recebem tratamento profilático e/ou são imunossuprimidos. Esses casos também são associados com tempo de sobrevivência reduzido, resultando em morte rápida do animal devido à falha cardíaca.

O presente relato, trata-se de um caso de dirofilariose em um cão idoso, com uma provável resposta imunitária ineficaz. A condição clínica de sinais leves e não específica, teve rápida progressão (em menos de duas semanas), resultando em alterações patológicas cardíacas, hepáticas, renais e pancreáticas, levando o animal a óbito. Porém devido ao deslocamento do animal para uma região endêmica e sem realização de tratamento profilático, provavelmente trata-se de um caso alóctone da região.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil (Código de Financiamento 001).

REFERÊNCIAS

- ALVES, L. C. et al. Survey of canine heartworm in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, p. 587- 590, 1999.
- ARAUJO, R. T. et al. Canine dirifilariasis in the region of Conceicao Lagoon, Florianópolis, and in the Military Police kennel, São Jose, State of Santa Catarina, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 113, n. 3-4, p. 239-42, 2003.
- ARAÚJO, F. R. et al. **Avaliação de um protocolo de extração de DNA genômico a partir de sangue total**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte. 2009, n. 5, p. 120, Comunicado Técnico.
- BARBOSA, C. L.; ALVES, L. C. Dirofilariose canina: situação atual no Brasil. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 1, p. 57-62, 2006.
- DA SILVA, R. C.; LANGONI, H. Dirofilariasis. Neglected emerging zoonosis. **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, p. 1614-1623, 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, n. 5, p. 258-261, 1999.
- LABARTHE, N. V. et al. Mosquito frequency and feeding habits in an enzootic canine Dirofilariasis area in Niterói, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 2, p. 145- 154, 1998.
- MONOBE, M. M. et al. Canine Heartworm Disease in a Brazilian non-endemic area. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 19, n. 2, p. 95-100, 2016.

- 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.
- RAMOS, R. A. et al. Filarioids infecting dogs in northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 226, p. 26-29, 2016.
- SEVIMLI, F. K. et al. *Dirofilaria immitis* infection in dogs: unusually located and unusual findings. **Parasitology Research**, v. 101, p. 1487-94, 2007.
- SMITH, JR. F. et al. **Manual of Canine and Feline Cardiology**. 3. ed. St. Louis: Elsevier, 2015, 472 p.
- SOUZA, N. F.; LARSSON, M. H. M. A. Frequência de dirofilariose canina (*D. immitis*) em algumas regiões do Estado de São Paulo por meio da detecção de antígenos circulantes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 3, p. 321-325, 2001.
- TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2010, 726 p.
- TUTIJA, J. F. et al. Microfilaremia by *Cercopithifilaria bainae* in a dog from the central western region of Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 2, 2020.

CAPÍTULO 6

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente dissertação, composta por quatro artigos, demonstra que por meio de avaliações da sequência de DNA foi possível confirmar a identificação de *Dirofilaria immitis* e *Cercopithifilaria baina*e infectando cães de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, incluindo casos autóctones.

Muitos animais infectados por filarídeos são assintomáticos, ou apresentam sinais leves e não específicos, porém também podem evoluir para lesões mais graves, sejam sistêmicas (ex. lesões cardiorrespiratórias, hepáticas e renais): como foi relatado no caso de dirofilariose (artigo 4), ou dérmicas (ex. dermatites, cisto cutâneo gigante): como relatado na presença de *C. baina*e (artigo 3). Essas informações servem de alerta para buscar confirmação da espécie de filarídeo, esteja presente no sangue ou na derme, de modo a não ocasionar em erros no estabelecimento do diagnóstico, prognóstico e tratamento dos animais acometidos.

Dentre os testes avaliados neste estudo, o diagnóstico molecular (PCR do gene 12S rRNA), possui melhor sensibilidade, além de ser útil para classificar espécies de microfilárias. No entanto, análises microscópicas (ex. teste de *Knott* modificado e exame de sedimento de pele) devem ser consideradas como teste de triagem para detecção de gênero de filarídeos circulando no sangue e/ou presentes na derme, justamente, por serem mais baratas e fáceis de serem amplamente utilizadas.

Medidas preventivas devem ser adotadas quando houver deslocamento de animais de/para regiões endêmicas para filarídeos, de modo a evitar mais casos alóctones e autóctones. Considerando que na área de estudo mosquitos e carrapatos (*Rhipicephalus sanguineus*) são predominantes ao longo do ano, medidas profiláticas também devem ser promovidas e adotadas para evitar a infestação de animais por estes ectoparasitos. Consequentemente, isso irá minimizar os riscos de infecções (sanguíneas e dérmicas) por filarídeos e outras doenças transmitidas por vetores artrópodes.

ANEXOS



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Pesquisa molecular de filarídeos caninos e seus potenciais vetores em Campo Grande, Mato Grosso Do Sul, Brasil", registrada com o nº 961/2018, sob a responsabilidade de **Carlos Alberto do Nascimento Ramos** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 6ª reunião ordinária do dia 07/08/2018.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	1º/08/2018 a 30/06/2020
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Canis familiaris</i> / SRD
Nº de animais	80 Machos + 80 Fêmeas = 160
Peso/Idade	Todas as idades
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Criadores domésticos

Joyce Stein

Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 08 de agosto de 2018.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua.propp@ufms.br
fone (67) 3345-7925



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



RESOLUÇÃO Nº 77, DE 08 DE MAIO DE 2018.

O PRESIDENTE EM EXERCÍCIO DO CONSELHO DE FACULDADE da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no uso de suas atribuições e considerando a Resolução 43 de 12 de setembro de 2012 – COUN/UFMS (Regulamento da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), e, o Parecer da Comissão de Pesquisa FAMEZ, instituída pela IS/FAMEZ Nº 115, de 21 de outubro de 2016, resolve, **ad referendum**:

Manifestar-se favoravelmente pela aprovação do Projeto de Pesquisa, denominado “PESQUISA MOLECULAR DE FILARÍDEOS CANINOS E SEUS POTENCIAIS VETORES EM CAMPO GRANDE, MATO GROSSO DO SUL, BRASIL” sob a Coordenação do Prof. Carlos Alberto do Nascimento Ramos, Siape nº 2142813.

ALEXANDRE MENEZES DIAS.



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Menezes Dias, Diretor(a), Substituto(a)**, em 08/05/2018, às 14:28, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0482068** e o código CRC **A480C0DC**.

GABINETE DA DIREÇÃO DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

Referência: Processo nº 23104.008046/2018-41

SEI nº 0482068



**PREFEITURA MUNICIPAL DE CAMPO GRANDE
ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE**

C.I. N. 20.750/GEP/SESAU/2018, 26 de Setembro de 2018.

DE: Gerência de Educação Permanente - SESAU

PARA: Veruska Lahdo - Superintendente

ASSUNTO: Autorização

Informo a autorização do orientador Carlos Alberto do Nascimento Ramos, com título do projeto de PESQUISA MOLECULAR DE FILARÍDEOS CANINOS E SEUS POTENCIAIS HOSPEDEIROS ARTRÓPODES EM CAMPO GRANDE, MATO GROSSO DO SUL, BRASIL, para iniciar a pesquisa conforme já autorizado no edoc 17409.

E-mail: carlos.nascimento@ufms.br telefone para contato (67)996210544.
Segue anexa a autorização da Comissão de Ética no uso de Animais.

Atenciosamente,

José Alexandre dos Santos
Assessor Executivo III



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº A9067A5

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro:	A9067A5
Usuário:	Carlos Alberto do Nascimento Ramos
CPF/CNPJ:	032.353.314-08
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa

Espécie

Dirofilaria immitis

Título da Atividade:

**PEQUISA MOLECULAR DE FILARÍDEOS CANINOS E SEUS POTENCIAIS
VETORES EM CAMPO GRANDE, MATO GROSSO DO SUL, BRASIL**

Equipe

Carlos Alberto do Nascimento Ramos

UFMS

Data do Cadastro: 28/06/2018 14:44:04

Situação do Cadastro: Concluído



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 16:13 de 16/08/2018.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
INQUÉRITO DE FILARÍDEOS EM CÃES

Eu _____
Idade _____ anos, Sexo _____, Naturalidade _____ Portador(a) do documento
RG _____ UF: _____, residente à Rua: _____ n° _____,
Bairro _____, tel. _____, declaro ter sido informado de que
estarei participando espontaneamente de um estudo de acadêmico referente a
filariose canina.

Estou ciente que ao participar desta pesquisa, estarei garantido eticamente e
poderei desistir a qualquer momento, inclusive sem nenhum motivo, bastando
para isso, informar minha decisão a(o) pesquisador(a). Minha participação é
voluntária e sem interesse financeiro, não estando correndo os riscos ou prejuízos
de qualquer natureza. Os dados referentes à minha pessoa serão sigilosos e
provados, sendo que poderei solicitar informações durante todas as fases da
pesquisa, inclusive após a publicação da mesma. Foi-me informado que para a
pesquisa constará de coleta de ectoparasitas do animal e no domicílio, amostra
de sangue, fragmento de pele e um questionário, garantindo-se toda a privacidade
e a confidência destas informações que será realizada pelo Médico Veterinário
Rodrigo Leite Soares, sob a orientação da professor Dr. Carlos Alberto do
Nascimento Ramos, telefone de contato (67) 98174-2669 (Rodrigo).

Como o meu anonimato será preservado por questões éticas, **CONFIRMO** estar
sendo informado por escrito e verbalmente dos objetivos deste estudo científico e
em caso de divulgação por foto e/ou vídeo **AUTORIZO** a publicação.

Campo Grande _____ de _____ de 2019.

Assinatura do participante

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO- FILARIOSE CANINA

Proprietário:_____

Nome:_____ N° _____ () Macho () Fêmea

Idade: () 6 a 12 meses () 1 – 5 anos () acima de 5 anos

() SRD () Raça pura Qual?_____

Castrado? () Sim () Não

Animal reside em: () área urbana () rural () periurbana

Origem:_____

Visita área rural? () não () sim Onde? _____ Frequência?_____

Alimentação: () caseira () Ração comercial () ambos

Tem contato com outros animais? () sim () não

Se sim, com quais? () cães () felinos () eqüídeos

() silvestres () aves () suínos

Possui acesso a rua? () sim () não

Qual ambiente onde o animal é criado?

() Terra () cimento () terra/cimento

É realizada limpeza ou desinfecção do local? () sim () não

Com que frequência? () diária () semanal () quinzenal () mensal

O animal tomou alguma vacina? () Sim () não

Se sim, quais? () anti – rábica () contra viroses () outra

O animal já foi vermifugado? () sim () não Quando?_____

Uso de ivermectina? () sim () não

Uso de doxiciclina? () sim () não

Conhecimento sobre a doença? () sim () não

Animal já fez transfusão de sangue? () não () sim Quando?_____

Animal tem doença crônica ou infecto-parasitária? () não () sim

Qual(is)?_____

Consulta ao veterinário? () Periodicamente () nunca () Só quando adoece

Sinais clínicos

	Apatia		Distensão abdominal		Mucosas palidas		Nódulo subcutâneo
	Anorexia		Edema		Taquicardia		Necrose cutânea
	Letargia		Linfadenomegalia		Taquipneia		Alopecia
	Vômitos		Hepatoesplenomegalia		Febre		Uveíte
	Diarreia		Outros				

III- DADOS SOBRE VETORES

Apresenta carrapatos? () sim () não

Nº de carrapatos coletados: () larva () ninfa () Adulta ingurgitada
() Adulta não ingurgitada () Macho

Animal tem/teve pulga? () sim () não

() nº de pulgas coletadas

Queixa de mosquitos? () sim () não

Período de maior queixa? () Manhã () Tarde () Noite

Vegetação nas mediações? () primária () secundária

Nº de mosquitos: () *Culex* sp. () *Aedes* sp. () Flebotomíneos

() *Anopheles* sp. () outros

Utiliza de estratégia/medicamento para tratamento e/ou prevenção de

ectoparasitos? () sim () não Qual? _____

Normas das revistas

Artigo 1: Formatado conforme as normas do periódico: *Parasitology Research*, disponível no link: <https://www.springer.com/journal/436/submission-guidelines>

Artigo 2: Formatado conforme as normas do periódico: *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*- RBPV, disponível no link: <http://rbpv.org.br/guia-do-autor>

Artigo 3: Formatado conforme as normas do periódico: *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, disponível no link: <https://www.elsevier.com/journals/veterinary-parasitology-regional-studies-and-reports/2405-9390/guide-for-authors>

Artigo 4: Formatado conforme as normas do periódico: *Acta Veterinária Brasília*, disponível no link: <http://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/about/submissions#onlineSubmissions>