

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA MULTIPROFISSIONAL E EM ÁREA
PROFISSIONAL DA SAÚDE - MEDICINA VETERINÁRIA**

Ana Martiele Engelmann

**IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE
Acanthocheilonema reconditum EM UM CANINO:
RELATO DE CASO**

Santa Maria, RS
2017

Ana Martiele Engelmann

**IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE
Acanthocheilonema reconditum EM UM CANINO:
RELATO DE CASO**

Monografia apresentada ao Programa de Residência Médico-Veterinária, Área de Concentração Patologia Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Especialista em Patologia Clínica Veterinária**.

Preceptor: Prof^ª.Dr^ª. Cinthia Melazzo de Andrade

Santa Maria, RS
2017

Ana Martiele Engelmann

**IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Acanthocheilonema reconditum* EM UM CANINO:
RELATO DE CASO**

Monografia apresentada ao Programa de Residência Médico-Veterinária, Área de Concentração Patologia Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Especialista em Patologia Clínica Veterinária**.

Comissão Examinadora:

**Cynthia Melazzo de Andrade, Doutora (UFSM)
(Presidente/Preceptor)**

**Juliana Felipetto Cargnelutti, Doutora (UFSM)
(Examinador)**

**Letícia dos Santos Petry, Mestre (UFSM)
(Examinador)**

**Cibele Lima Lhamas, Mestre (UNIPAMPA)
(Examinador/Suplente)**

Santa Maria, RS
2017

RESUMO

IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Acanthocheilonema*

reconditum EM UM CANINO:

RELATO DE CASO

Autora: Ana Martiele Engelmann

Orientadora: Cinthia Melazzo de Andrade

Acanthocheilonema reconditum (*A. reconditum*), também conhecido como *Dipetalonema reconditum*, é um helminto nematoide causador de filariose em cães, que apresenta distribuição global e produz microfilárias que circulam no sangue de seus hospedeiros naturais. As filárias estão preferencialmente alojadas no tecido subcutâneo e no tecido perirenal de cães. Pulgas e piolhos são os hospedeiros intermediários e vetores. Por ser um parasita de baixa patogenicidade e por existirem outros nematoides filarídeos que também liberam microfilárias na corrente sanguínea, torna-se importante a distinção entre eles por meio da observação morfológica das microfilárias circulantes, detecção de antígenos circulantes, coloração histoquímica ou imuno-histoquímica das microfilárias ou por diagnósticos moleculares. Dentre os nematódeos que devem ser diferenciados do *A. reconditum*, destacam-se a *Dirofilaria immitis* e *Dirofilaria repens*, que são reconhecidos como os agentes causadores da dirofilariose cardiopulmonar e subcutânea em cães, respectivamente. Este trabalho descreve um caso de infecção por *A. reconditum* em um cão, diagnosticado por meio de exame citológico aspirativo por agulha fina (CAAF) de dois nódulos cutâneos e por meio da técnica da gota espessa, sendo confirmado por PCR. Este canino apresentava aumento de volume na região perineal, nódulo no membro pélvico direito, região dorsal e face interna da orelha. A CAAF do aumento de volume perineal foi sugestiva de adenoma/adenocarcinoma de glândula perineal, enquanto que o mesmo procedimento realizado no membro pélvico foi compatível com mastocitoma. O material do nódulo costal e da face interna da orelha, ao serem avaliados em aumento de 100x, demonstrou a presença de microfilárias morfológicamente sugestivas de *A. reconditum*. No entanto, o quadro clínico do paciente se agravou em função de uma possível síndrome paraneoplásica relacionada com o mastocitoma de segundo grau, o qual foi diagnosticado por meio da citologia e confirmado pelo exame histopatológico, e não pela infecção por *A. reconditum*. Com este relato, pode-se concluir que este parasito está presente na região de Santa Maria e que a diferenciação de seu filarídeo mais semelhante, a *Dirofilaria immitis*, é de suma importância, pois a infecção por *A. reconditum* não implica em terapia tão dispendiosa e potencialmente agressiva como para *Dirofilaria immitis*.

Palavras-chave: Microfilárias. Filarídeos. *Dipetalonema reconditum*.

ABSTRACT

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF *Acanthocheilonema reconditum* IN A CANINE: CASE REPORT

Author: Ana Martiele Engelmann
Advisor: Cinthia Melazzo de Andrade

Acanthocheilonema reconditum (*A. reconditum*), also known as *Dipetalonema reconditum*, is a nematode helminth that causes filariasis in dogs, which presents global distribution and produces microfilariae that circulate in the blood of its natural hosts. The filarial worms are preferably housed in the subcutaneous tissue and the perirenal tissue of dogs. Fleas and lice are marked as the intermediate hosts and vectors. Due to the fact that it is a parasite of low pathogenicity and because there are other filarial nematodes that also release microfilariae in the bloodstream, it becomes important to distinguish between them by means of morphological observation of the circulating microfilariae, detection of circulating antigens, histochemical or immunohistochemical staining of microfilariae or by molecular diagnostics. Among the nematodes that must be differentiated from *A. reconditum* are the *Dirofilaria immitis* and the *Dirofilaria repens*, which are recognized as the causative agents of cardiopulmonary and subcutaneous dirofilariosis in dogs, respectively. This paper describes a case of *A. reconditum* infection in a dog, diagnosed by fine needle aspiration cytological examination of two cutaneous nodules and through the thick blood smear technique, being confirmed by PCR. This canine presented volume increase in the perineal region, nodule in the right pelvic limb, dorsal region and inner face of the ear. The CAAF of the perineal volume increase was suggestive of adenoma / adenocarcinoma of the perineal gland, whereas the same procedure performed on the pelvic limb was compatible with mastocytoma. The material of the costal node and the inner face of the ear, when evaluated at a magnification of 100x, demonstrated the presence of microfilaria morphologically suggestive of *A. reconditum*. However, the clinical manifestations of the patient probably worsened not by *A. reconditum* infection itself, but due to a possible paraneoplastic syndrome related to second degree mastocytoma, which was diagnosed by cytology and confirmed by histopathological examination. With this report, it can be concluded that this parasite is present in the Santa Maria region and that the differentiation of its most similar filarid, *Dirofilaria immitis*, is of the utmost importance, since *A. reconditum* infection does not imply in such expensive and potentially aggressive therapy as for *Dirofilaria immitis*.

Keywords: Microfilaria. Filarial nematodes. *Dipetalonema reconditum*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>Acanthocheilonema reconditum</i>	<i>A. reconditum</i>
Ácido desoxirribonucleico	DNA
Ácido etilenodiamino tetra-acético	EDTA
Ácido desoxirribonucleico	DNA
Citologia Aspirativa por Agulha Fina	CAAF
Fosfatase alcalina	FA
Força Centrífuga Relativa	x g
<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>D. immitis</i>
<i>Dirofilaria repens</i>	<i>D. repens</i>
Hospital Veterinário da Universidade Federal de Santa Maria	HVU-UFSM
Imunoglobulina E	IgE
Imunoglobulina G	IgG
Interleucina 5	IL-5
Larvas de terceiro estágio	L3
Microfilárias	mf
Microfilárias circulantes	mf-c
Microgramas	mcg
Micrômetros	µm
Milímetros	mm
Reação em Cadeia da Polimerase	PCR

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 MANUSCRITO.....	13
RESUMO	14
ABSTRACT	15
REFERÊNCIAS	22
3 CONCLUSÃO.....	29
BIBLIOGRAFIA	30

1 INTRODUÇÃO

Acanthocheilonema reconditum (*A. reconditum*) é um helminto pertencente à Classe Nematoda, Ordem Spirurida, Superfamília Filarioidea, Família Onchocercidae, Subfamília Onchocercinae, Gênero *Dipetalonema* (MONTEIRO, 2011). É responsável pela filariose em cães e apresenta distribuição global, sendo encontrado como a única ou a mais prevalente espécie de filarioide que acomete cães, em várias áreas geográficas da Bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio, África do Sul, América do Sul e Oceania (MAZZOTTI e CHABAUD, 1962; KORKEJIAN e EDESON, 1974; MINNAAR e KRECEK, 2001, PENNINGTON e PHELPS, 1969; BOREHAM e ATWELL, 1985; ORTEGA-MORA et al.1991; ARANDA et al.1998; ALVES et al.1999; CRINGOLI et al. 2001; REIFUR et al. 2004).

Como hospedeiros intermediários e vetores destacam-se as pulgas das espécies *Ctenocephalides canis*, *Ctenocephalides felis*, *Pulex irritans*, *Pulex simulans*, *Echidnophaga gallinae* e os malófagos (pioelhos mastigadores) das espécies *Trichodectes canis*, *Lingnathus setosus* e *Heterodoxus spiniger* (NEWTON e WRIGHT, 1956; NELSON, 1962; PENNINGTON e PHELPS, 1969; BAIN e BEAUCOURNU, 1974; TORRES e FIGUEIREDO, 2007). As microfilárias (mf) ingeridas durante o repasto sanguíneo se desenvolvem até larvas de terceiro estágio (L3) em 7 a 14 dias. Quando inoculadas em um cão, se desenvolvem até o estágio adulto em dois a três meses e passam a se localizar no tecido subcutâneo (FARNELL e FAULKNER, 1978; LINDEMANN et al., 1983a).

Suas filárias (parasito adulto) estão preferencialmente alojadas no tecido subcutâneo principalmente dos membros e ao longo do dorso (NELSON, 1962), além disso, também podem ser encontradas no tecido perirrenal (KORKEJIAN e EDESON, 1978). Os nematóides da Família Onchocercidae caracterizam-se por liberar mf na corrente sanguínea (MCCALL et al., 2008). O fato de esses filarídeos possuírem características morfológicas semelhantes torna importante a distinção entre eles. O quadro clínico e a presença ou não de lesões patológicas em cães microfilarêmicos constituem-se em uma das formas de distingui-los. Dentre os nematódeos que devem ser diferenciados do *A. reconditum*, destacam-se a *Dirofilaria immitis* e *Dirofilaria repens*, que são reconhecidos como os agentes causadores da dirofilariose cardiopulmonar e subcutânea em cães, respectivamente (MCCALL et al., 2008).

Ambas as espécies de *Dirofilaria* spp. apresentam potencial zoonótico e, na Europa, são considerados agentes emergentes de zoonoses parasitárias, contudo o *A. reconditum* tem sido relatado, ocasionalmente, também como um agente capaz de transmissão para seres humanos. Greene, Otto e Greenough (1978), descreveram, nos Estados Unidos, a ocorrência

de microfilárias similares morfológicamente ao *A. reconditum* em uma paciente de 12 anos de idade, portadora de Lupus Eritematoso Sistêmico, a qual apresentou microfilaremia durante a exacerbação da doença. No mesmo país, uma fêmea de *Acantocheilonema* spp. foi removida da câmara anterior do olho direito de um homem com 32 anos de idade (BEAVER et al., 1980). Os mesmos pesquisadores relataram três outros casos de filariose intraocular causada por *Acanthocheilonema* spp. com remoção dos parasitos. Na Austrália, Huynh, Thean e Maini (2001) descreveram o achado de uma fêmea adulta de *A. reconditum* com 32 mm de comprimento, retirada viva e intacta do espaço subconjuntival do olho direito de um paciente com 62 anos de idade.

Normalmente, a infecção por esse filarídeo não apresenta consequências patológicas, contudo, algumas alterações hematológicas podem ser observadas. No estudo realizado por Lindemann et al. (1983a), com cães experimentalmente infectados por *A. reconditum*, foi demonstrado que alguns animais apresentaram contagens significativamente maiores de leucócitos e eosinófilos do que os cães do grupo controle. Em outro estudo realizado em uma população de cães confinados em um abrigo municipal na Itália, no norte da Sicília, apenas um dos cães altamente infectados com microfilárias morfológicamente sugestivas de *A. reconditum* apresentou quadro hemorrágico (BRIANTI et al., 2012). Estudos realizados por Hashem e Badawy (2008) comprovaram presença de anemia hemolítica acompanhada de distúrbios hepáticos e renais em 14 cães parasitados por *A. reconditum*.

O diagnóstico laboratorial de infestações causadas por *D. immitis*, *D. repens* ou *A. reconditum* é alcançado por meio da observação morfológica de microfilárias circulantes (mf-c), detecção de antígenos circulantes (atualmente disponível somente para *D. immitis*), coloração histoquímica ou imuno-histoquímica de mf-c ou por diagnósticos moleculares.

Os procedimentos de detecção de mf incluem a técnica da gota espessa e a técnica de *Knott* modificada, além da observação morfológica das mf em esfregaços sanguíneos corados (KNIGHT, 1977; NEWTON, 1956; IRWIN e JEFFERIES, 2004). A técnica da gota espessa permite avaliar a motilidade das mf, e assim, caracteriza-se como uma ferramenta de diferenciação entre as espécies (KNIGHT, 1977). Enquanto mf de *D. immitis* realizam movimentos ondulantes do tipo serpentiforme, deslocando-se lentamente no campo, as larvas de *A. reconditum* deslocam-se com maior rapidez, movendo-se erráticamente (JONES et al., 2000).

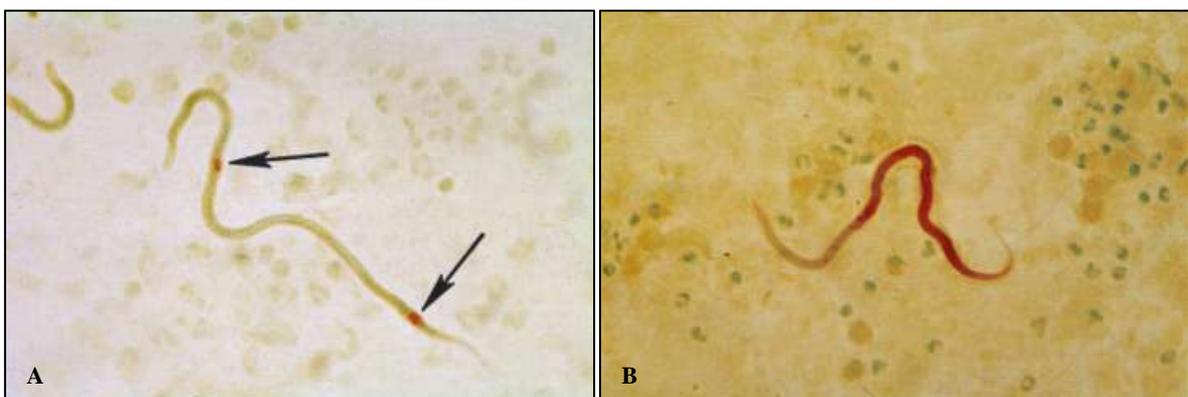
A técnica de *Knott* modificada é considerada o método padrão-ouro, pois é de fácil execução, rápida e de baixo custo que preserva a morfologia e o tamanho das mf, no entanto,

requer pessoal experiente, nem sempre disponível em áreas não endêmicas (CASIRAGHI et al, 2006). Essa técnica consiste na adição de um ml de sangue com EDTA a nove ml de formalina a 2%. Após a centrifugação por 5 minutos em 500 x g (Força Centrífuga Relativa), o sobrenadante deve ser rejeitado e 20µl do sedimento transferido para uma lâmina e coberto com uma lamínula. Posteriormente, a análise morfométrica das mfs deve ser realizada em microscópios de diagnóstico padrão equipado com oculares de medição calibradas com um aumento final de 200-400 x (MAGNIS et al, 2013).

As características morfológicas documentadas demonstram que as mf de *D. repens* apresentam comprimento de $369,44 \pm 10,76\mu\text{m}$ e largura de $8,87 \pm 0,58\mu\text{m}$, com a extremidade anterior cônica e extremidade caudal curvada. Já as mf de *D. immitis* possuem $301,77 \pm 6,29\mu\text{m}$ de comprimento e $6,30 \pm 0,26\mu\text{m}$ de largura, com extremidade anterior cônica e cauda retilínea. Por sua vez, as mf de *A. reconditum* são mais curtas, mais delgadas e possuem a cauda em gancho, apresentando comprimento de $264,83 \pm 5,47\mu\text{m}$ e largura de $4,63 \pm 0,52\mu\text{m}$ (MAGNIS et al, 2013).

O diagnóstico por meio da histoquímica também constitui-se em um método confirmatório, além de ser de fácil execução. Chailifoux e Hunt (1971) identificaram dois tipos distintos de mf por coloração da atividade da fosfatase ácida. Microfilárias de *D. immitis* evidenciam pontos vermelhos nítidos positivos para a fosfatase ácida no poro excretor e no ânus, enquanto que as mf de *A. reconditum* coram-se inteiramente de vermelho (Figura 1). As mfs de *D. repens* mostram atividade da fosfatase ácida exclusivamente no poro anal (PERIBÁÑEZ et al, 2001).

Figura 1 - **A)** Atividade da enzima fosfatase ácida nos poros excretório e anal (setas) em microfilárias de *Dirofilaria immitis*. **B)** Atividade da fosfatase ácida uniforme em microfilárias de *Acanthocheilonema reconditum*.



Fonte: Adaptado de Chailifoux e Hunt (1971).

O diagnóstico molecular, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) permite a discriminação entre os principais nematóides filarídeos encontrados em cães, além de ser altamente específico. Favia et al. (1996); Mar et al. (2002); Rishniw et al. (2006) reportaram a técnica da PCR, utilizando primers espécie-específicos para a discriminação de nematóides filarídeos. Casiraghi et al. (2006) e Ramos et al. (2016) utilizaram a mesma técnica como diagnóstico confirmatório, porém com o uso de primers genéricos, para a diferenciação entre *D. immitis*, *D. repens* e *A. reconditum*.

A terapia varia conforme o filarídeo. Em casos de infecções causadas por *D. immitis*, utiliza-se como tratamento adulticida o dicloridrato de melarsomina, composto orgânico arsenical que tem ação sobre vermes adultos jovens, machos (100%) e fêmeas adultas (96%) (RAYNAUD JP, 1992; ALMOSNY, 2002). Duas formas de tratamento com drogas adulticidas são utilizadas, uma delas é o tratamento completo que consiste em duas injeções de 2,5mg/kg de melarsomina, via intramuscular, com intervalo de 24 horas para animais assintomáticos ou para aqueles que apresentam sintomas discretos (ALMOSNY, 2002).

Um tratamento alternativo fica recomendado para animais sem condições de suportar uma radical eliminação de todos os vermes ao mesmo tempo, que consiste na administração 2,5mg/kg de melarsomina e após um mês se faz o tratamento completo citado anteriormente (ALMOSNY, 2002; NELSON et al, 2005). Em casos de infestações severas indica-se este tratamento alternativo devido à resposta imune severa que pode ocorrer após a morte rápida dos parasitos podendo resultar em tromboembolismo pulmonar e choque anafilático (AMERICAN HEARTWORM SOCIETY, 2005). Durante a terapia adulticida, é recomendado o confinamento por sete dias, para reduzir as graves e possíveis sequelas provocadas após a morte dos parasitos adultos, como o tromboembolia pulmonar (TILLEY et al., 2008).

De acordo com McCall et al. (2001), a lactona macrocíclica, ivermectina, também pode apresentar efeito adulticida quando administrada mensalmente na dose preventiva de 6-12µg/kg durante pelo menos 16-30 meses. Essa mesma dosagem é também considerada microfilaricida, podendo ser administrada por até seis meses, mensalmente, eliminando as microfíliárias gradativamente (ALMOSNY, 2002; NELSON et al., 2005).

A associação da Ivermectina com a tetraciclina, Doxiciclina, também pode ser utilizada no lugar das injeções de melarsomina, reduzindo assim o risco de tromboembolia (MCCALL et al., 2001). Estudos demonstraram que a dosagem de 10mg/kg de Doxiciclina durante 30 dias combinada a 6mcg/kg a cada 15 dias durante seis meses de Ivermectina tem

eficiência de até 73% na terapia adulticida em cães infectados por *D. immitis* (BAZZOCCHI et al, 2008; GRANDI et al, 2010). As lactonas macrocíclicas (selamectina ou moxidectina) são consideradas eficazes para o tratamento microfilaricida em casos de infecções por *D. repens* (FOK et al, 2010; JACSÓ et al, 2010). A moxidectina também tem apresentado efeito adulticida, após uma única administração .

Em casos de infecção por *A. reconditum*, o tratamento com microfilaricida é recomendado para limitar a função de reservatório dos hospedeiros infectados. Estudos sugerem que as lactonas macrocíclicas (ivermectina, selamectina e moxidectina) são eficazes, quando administradas na mesma dose recomendada para *D.immitis* (LINDEMANN et al, 1983b; VENCO, KRAMER e GENCHI, 2005). Em um estudo realizado por Lindemann et al. (1983b) em três cães, o tratamento com Ivermectina na dosagem de 0,25mg/kg por 685-725 dias foi eficaz, sendo que, após dois dias de tratamento, dois cães já não apresentaram mais microfilaremia e um cão, que possuía maior quantidade de microfilárias por ml de sangue (976mf/ml), passou a apresentar microfilaremia de 2mf/ml de sangue.

No Brasil ainda é subestimado o percentual de cães microfilarêmicos e/ou portadores de formas adultas de *A. reconditum*, motivado pela escassa quantidade de publicações existentes a respeito do assunto. No estado da Bahia, Barros, Santos e Almeida (1993) avaliaram 500 amostras de sangue de cães, registrando oito (1,6%) infectadas por microfilárias. Idêntica amostragem examinada em Cuiabá-MS, por Fernandes et al. (1999) comprovou contaminação em três (0,6%). Amostras sanguíneas de 611 cães em Recife-PE avaliadas pelo teste de ELISA e técnica de Knott (1939) modificada por Newton e Wright (1956) identificou 42 (6,9%) animais microfilarêmicos (ALVES et al., 1999). Um inquérito hemoscópico em 1519 cães domiciliados em Maceió-AL, reportou 15 (1,3%) portadores de microfilárias (BRITO et al., 2001).

Amostras do sangue de 256 cães distribuídos em onze municípios da área litorânea do estado do Paraná, avaliadas por Reifur, Thomaz-Soccol e Montiani-Ferreira (2004) mediante visualização direta (gota espessa), técnica de Knott modificada e teste ELISA revelaram a presença de microfilárias de *A. reconditum* em 58 (22,6%) animais. Ainda neste mesmo estado e utilizando as mesmas técnicas de identificação, um estudo realizado por Leite et al. (2012) demonstrou a presença de *A. reconditum* em 30 cães (7,10%) de 422 que foram examinados na cidade de Guaratuba.

Neste contexto, visto que há poucos relatos sobre o assunto e ainda sendo um parasita de baixa patogenicidade, os critérios de sua identificação devem ser sempre considerados para a diferenciação de microfilárias em casos suspeitos de dirofilariose. Desta forma, objetivou-se

descrever o primeiro relato de filariose canina por *A. reconditum* no estado do Rio Grande do Sul, com suas características morfológicas e seu diagnóstico molecular, alertando os médicos veterinários da região sobre a sua ocorrência para que não seja diagnosticada erroneamente como dirofilariose, a qual necessita de um tratamento potencialmente agressivo e dispendioso.

2 MANUSCRITO

Identificação morfológica e molecular de *Acanthocheilonema reconditum* em um canino: relato de caso

Ana Martiele Engelmann¹, Andressa Salvadori Schafer², Cibele Lima Lhamas², Guilherme Lopes Dornelles², Juliana Felipetto Cargnelutti², Silvia Gonzalez Monteiro³, Cinthia Melazzo de Andrade⁴

¹ Residência em Área Profissional de Saúde – Medicina Veterinária, Ênfase em Patologia Clínica, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, CCR, UFSM, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

³ Professor Adjunto do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, CCS, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

⁴ Professor adjunto do Departamento de Clínica de Pequenos Animais, CCR, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: cmelazzomazzanti@gmail.com.

Os resultados que fazem parte desta monografia estão apresentados sob a forma de nota a ser submetido para o periódico Ciência Rural.

1 **Identificação morfológica e molecular de *Acanthocheilonema reconditum* em um canino:**
2 **relato de caso**

3 **Morphological and molecular identification of *acanthocheilonema reconditum* in a**
4 **canine: case report**

5 **Ana Martiele Engelmann^I, Andressa Salvadori Schafer^{II}, Cibele Lima Lhamas^{II},**
6 **Guilherme Lopes Dornelles^{II}, Juliana Felipetto Cargnelutti^{II}, Silvia Gonzalez**
7 **Monteiro^{III}, Cinthia Melazzo de Andrade^{IVV}**

8

9 **- NOTA -**

10 **RESUMO**

11 Os nematoides *Dirofilaria immitis* (*D. immitis*) e *Acanthocheilonema reconditum* (*A.*
12 *reconditum*), também conhecido como *Dipetalonema reconditum*, são os agentes causadores
13 da filariose canina, apresentam distribuição global e produzem microfilárias que circulam no
14 sangue de seus hospedeiros naturais. Este trabalho descreve um caso de infecção por *A.*
15 *reconditum* em um cão, diagnosticado por meio de exame citológico aspirativo por agulha
16 fina (CAAF) de dois nódulos cutâneos e por meio da técnica da gota espessa, sendo
17 confirmado por PCR. Este relato alerta os clínicos veterinários sobre a presença deste parasito
18 na região de Santa Maria/Rio Grande do Sul, assim como ressalta a importância de se
19 diferenciar do seu filarídeo mais semelhante que é a *D. immitis*, uma vez que cães infectados
20 com *A. reconditum* podem vir a ser tratados erroneamente. Além disso, demonstra a
21 importância da avaliação citológica como ferramenta de auxílio ao diagnóstico.

22

23 **Palavras-chave:** Microfilárias, filarídeos, *Dipetalonema reconditum*.

^I Residência em Área Profissional de Saúde – Medicina Veterinária, Ênfase em Patologia Clínica, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

^{II} Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, CCR, UFSM, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

^{III} Professor Adjunto do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, CCS, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

^{IV} Professor adjunto do Departamento de Clínica de Pequenos Animais, CCR, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

24 **ABSTRACT**

25 *Dirofilaria immitis* (*D. immitis*) and *Acanthocheilonema reconditum* (*A. reconditum*),
26 also known as *Dipetalonema reconditum*, nematodes are indicated as the agents of canine
27 filarial infection; they have global distribution and produce microfilariae that circulate in the
28 blood of their natural hosts. This work describes a case of *A. reconditum* infection in a dog,
29 diagnosed by fine needle aspiration cytology (CAAF) of two cutaneous nodules and by the
30 thick gout technique and confirmed by PCR. This report alerts veterinarians about the
31 presence of this parasite in the region of Santa Maria / Rio Grande do Sul, as well as
32 emphasize the importance of differentiating from its most similar filarid that is *D. immitis*,
33 since dogs infected with *A. reconditum* may be treated erroneously. In addition, it
34 demonstrates the importance of cytological evaluation as a diagnostic tool.

35

36 **Keywords:** Microfilariae, Filarial nematodes, *Dipetalonema reconditum*.

37

38 Várias espécies de nematoides filarídeos e suas respectivas microfíliárias têm sido
39 descritas em cães, em várias regiões do mundo (SOULSBY, 1982). Destas, duas espécies,
40 *Dirofilaria immitis* e *Acanthocheilonema reconditum*, merecem destaque devido a sua
41 frequente ocorrência. Os artrópodes hematófagos são os hospedeiros intermediários e os
42 vetores de ambas as espécies, sendo a *D. immitis* transmitida por mosquitos e o *A. reconditum*
43 por pulgas e piolhos (NEWTON & WRIGHT,1956; NELSON, 1962; PENNINGTON &
44 PHELPS,1969).

45 Ambas as parasitoses são pesquisadas e diagnosticadas, rotineiramente, por meio da
46 pesquisa de microfíliárias na circulação (MAGNIS et al., 2013). Desta forma, é de suma
47 importância sua diferenciação, uma vez que a infecção por *D. immitis* em cães pode resultar
48 em doença e morte, enquanto que a infecção por *A. reconditum* é transitória e sem

49 consequências patológicas (KNIGHT, 1987). Além disso, no caso de *D. immitis*, há riscos de
50 transmissão ao homem, tendo como resultado a dirofilariose pulmonar humana, sendo
51 considerada portanto, zoonose (RODRIGUES-SILVA et al., 1995), enquanto que o *A.*
52 *reconditum* raramente tem sido relatado como um agente zoonótico (GREENE et al., 1978,
53 BEAVER et al., 1980, HUYNH et al., 2001).

54 As técnicas de detecção de microfilárias que permitem a identificação morfológica
55 das mesmas, incluem a gota espessa e a técnica de *Knott* modificada (KNIGHT, 1977;
56 NEWTON, 1956). O diagnóstico também pode ser realizado por meio da detecção de
57 proteínas (atualmente disponível somente para *D. immitis*), coloração histoquímica ou
58 imunohistoquímica de microfilárias circulantes ou através de ferramentas moleculares
59 (CHAILIFOUX & HUNT, 1971; FAVIA et al., 1996; MAR et al., 2002; RISHNIW et al.,
60 2006).

61 Neste contexto, visto que há poucos relatos sobre o assunto e sendo um parasito de
62 baixa patogenicidade, os critérios de sua identificação devem ser sempre considerados para a
63 diferenciação das microfilárias de seu filarídeo mais semelhante, a *D. immitis*. Desta forma,
64 objetivou-se descrever o primeiro relato de filariose canina por *A. reconditum* no estado do
65 RS, com suas características morfológicas e seu diagnóstico molecular.

66 Um canino, macho, sem raça definida, com 14 anos de idade, apresentando aumento
67 de volume na região perineal, nódulo no membro pélvico direito, região dorsal e face interna
68 da orelha, foi atendido no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Santa Maria (HVU
69 – UFSM). Foram solicitados hemograma e bioquímica sérica, citologia aspirativa por agulha
70 fina (CAAF), ultrassonografia abdominal, além de radiografia torácica.

71 Na ultrassonografia abdominal, evidenciou-se a presença de cisto parapróstático.
72 Observou-se também que a próstata apresentava dimensões aumentadas e parênquima

73 heterogêneo, achados que sugerem hiperplasia prostática benigna ou neoplasia. A radiografia
74 torácica revelou achados compatíveis com senilidade (padrão intersticial/bronquial).

75 A CAAF do aumento de volume perineal foi sugestiva de adenoma/adenocarcinoma
76 de glândula perineal, enquanto que o mesmo procedimento realizado no membro pélvico foi
77 compatível com mastocitoma. O material do nódulo costal e da face interna da orelha, ao
78 serem avaliados em aumento de 100x, demonstrou a presença de microfilárias com cauda em
79 gancho e gancho cefálico, o que morfológicamente é sugestivo de microfilária de *A.*
80 *reconditum*, sendo o resultado da CAAF sugestivo de processo inflamatório supurativo por
81 infecção por microfilária e neoplasia de células redondas, respectivamente.

82 O hemograma revelou neutrofilia e eosinofilia discretas. Ainda na análise do
83 esfregaço sanguíneo observou-se a presença de microfilárias semelhantes às observadas na
84 CAAF (Figuras 1A e 1B). Por meio da técnica da gota espessa e da análise microscópica do
85 microcapilar de hematócrito constatou-se que as microfilárias realizavam movimentos
86 erráticos e se deslocavam com rapidez. Hipoalbuminemia e discreto aumento da atividade da
87 enzima fosfatase alcalina (FA) foram verificados na bioquímica sérica.

88 A partir desses achados, foi instituído o tratamento com Ivermectina na dose de
89 0,25mg/kg, por via oral, durante 14 dias. Após esse período, o animal foi submetido à
90 orquiectomia com ablação escrotal como tratamento para redução do tumor da glândula
91 perineal e exérese dos nódulos do membro pélvico, da região costal e da face interna da
92 orelha, cuja avaliação histopatológica revelou mastocitoma de segundo grau, hamartoma
93 fibroanexo com tricogranuloma e histiocitoma, respectivamente.

94 No retorno, quinze dias depois, ao exame físico, constatou-se que o animal se
95 apresentava prostrado, hipotérmico, com 5% de desidratação, mau estado nutricional e que
96 perdera 2,5kg de massa corpórea. Observou-se também que havia deiscência da sutura no
97 local da exérese do nódulo do membro pélvico direito. Na mesma ocasião, foram coletadas

98 amostras de sangue para realização de hemograma e bioquímica sérica, nos quais se
99 evidenciou leucocitose por neutrofilia e monocitose, hipoalbuminemia moderada e aumento
100 da atividade sérica da FA. Ao exame microscópico do esfregaço sanguíneo e do microcapilar,
101 verificou-se, respectivamente, a presença de discreta toxicidade em neutrófilos e de
102 microfilárias. Diante desses achados, o animal foi internado para reposição hídrica,
103 antibioticoterapia (Cefalotina e Enrofloxacina), terapia microfilaricida (Ivermectina) e
104 tratamento da ferida aberta no membro pélvico direito. Após sete dias de internação, o
105 paciente apresentou melhora, recebendo alta médica.

106 Dois meses depois, o animal retornou ao HVU – UFSM para atendimento,
107 apresentando anorexia, adipsia, vômitos recorrentes e diarreia incontinente, fétida e de
108 coloração esverdeada há dois dias. Novos exames foram solicitados, os quais não
109 evidenciaram alterações, apenas a presença de microfilárias no exame da gota espessa e na
110 análise microscópica do microcapilar. Nessa ocasião, foi instituído o tratamento com
111 Ranitidina xarope e Metoclopramida. Dentro de cinco dias o cão veio a óbito em casa, não
112 sendo feita necropsia.

113 As lâminas resultantes do esfregaço sanguíneo, da capa leucocitária e da citologia
114 foram encaminhadas para o Laboratório de Parasitologia da UFSM para avaliação
115 morfométrica das microfilárias. Por meio de um programa para processamento de imagens
116 científicas (ZEN 2), mediu-se o comprimento (243,5 μ m) e a largura (4,175 μ m) da
117 microfilária.

118 Para a realização da reação em cadeia pela polimerase foi utilizado sangue total
119 acondicionado em tubo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). A extração de
120 DNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito por REBOUÇAS (2008), com algumas
121 modificações. O DNA da amostra de sangue foi analisado por amplificação de um fragmento

122 do gene 12S (330 bp) utilizando um conjunto de iniciadores descritos por OTRANTO et al.
123 (2011).

124 O produto de PCR foi purificado utilizando o kit PureLink Quick Gel Extraction and
125 PCR Purification Combo (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos da América) de acordo
126 com as instruções do fabricante, e o DNA purificado foi submetido ao sequenciamento de
127 nucleotídeos pelo método Sanger utilizando o equipamento ABI-Prism 3500 Genetic
128 Analyzer (Applied Biosystems). A sequência consenso foi obtida através da análise no
129 programa Staden package (STADEN, 1996), e em seguida foi submetida à análise no
130 software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL et al., 1997) para
131 comparação com as sequências depositadas no GenBank.

132 O sequenciamento de nucleotídeos do amplicom revelou uma identidade de 98-
133 100% com sequências de *Acanthocheilonema reconditum* depositadas no Genbank, e menor
134 identidade com outras espécies de *Acanthocheilonema* (90-95%), *Dirofilaria* (88-90%)
135 e *Onchocerca* (87-88%), indicando que a amostra analisada pertence à espécie *A. reconditum*.

136 De acordo com KNIGHT (1987); BOREHMAN & ATWELL (1985), normalmente
137 a infecção por *A. reconditum* destaca-se por apresentar caráter transitório e sem consequências
138 patológicas, sendo diagnosticada na maioria das vezes de forma acidental como ocorreu neste
139 caso, pois o que induziu ao tutor a procurar atendimento médico veterinário foi a presença do
140 nódulo perineal ulcerado. No estudo realizado por LEITE et al. (2012), os cães infectados por
141 *A. reconditum* não apresentaram sinais clínicos, apenas microfilaremia.

142 De acordo com HASHEM e BADAWEY (2008), há produção de neutrofilia e
143 monocitose devido ao aumento da demanda dessas células para a remoção fagocitária de
144 produtos de degradação de tecidos ou de microfilárias e que a linfocitose pode ser decorrente
145 da constante estimulação antigênica. As concentrações das imunoglobulinas IgE e IgG podem

146 aumentar em infecções por parasitos nematoides que migram na circulação e nos tecidos do
147 hospedeiro (YAMAGATA et al., 1995).

148 De acordo com LILLIEHOOK & TVEDTEN (2003), o parasitismo é a principal
149 causa de eosinofilia, sendo esta induzida principalmente por parasitos que apresentam uma
150 fase migratória ou invasiva em seu ciclo de vida, como é o caso dos parasitos *Toxocara canis*,
151 *Ancylostoma ceylanicum*, *Ancylostoma caninum* e *D. immitis*. No entanto, cães com
152 mastocitoma podem desenvolver eosinofilia devido a fatores quimiotáticos e interleucinas
153 (IL-5) produzidos pelos mastócitos (ABBAS et al., 2000).

154 A hipoalbuminemia possivelmente esteja relacionada com o processo inflamatório
155 que envolvia o nódulo perineal ulcerado e a deiscência do nódulo removido no membro
156 pélvico direito. Durante um processo inflamatório, o fígado passa a produzir outras proteínas
157 que incluem a haptoglobina, proteína C-reativa, amiloide sérico A e α_1 -glicoproteína em
158 detrimento da produção da albumina (VILLIERS & BLACKWOOD, 2005).

159 Provavelmente o quadro clínico do animal se agravou em função de uma possível
160 síndrome paraneoplásica relacionada com o mastocitoma e não pela infecção por *A.*
161 *reconditum*. De acordo com ROGERS (1996), sinais clínicos como anorexia, vômito com
162 hematoquezia, desconforto abdominal e diarreia com melena podem ser secundários a
163 desordens paraneoplásicas. Segundo FOX et al. (1990), a histamina presente nos grânulos
164 citoplasmáticos liberados pelos mastócitos neoplásicos estimula os receptores gástricos H2,
165 levando à secreção excessiva de ácido clorídrico e à hipermotilidade gástrica, explicando a
166 presença dos vômitos recorrentes e da diarreia intermitente que o animal apresentava.

167 De acordo com OTRANTO et al. (2013), mesmo o fato da infecção por *A.*
168 *reconditum* ser considerada clinicamente irrelevante, o tratamento com microfilaricida é
169 recomendado para limitar a função de reservatório dos hospedeiros infectados. Em um estudo
170 realizado por LINDEMANN et al. (1983b) em três cães, o tratamento com Ivermectina na

171 dosagem de 0,25mg/kg por 685-725 dias foi eficaz, sendo que, após dois dias de tratamento,
172 dois cães já não apresentaram mais microfilaremia e um cão, que possuía maior quantidade de
173 microfilárias por ml de sangue (976 mf/ml), passou a apresentar microfilaremia de 2 mf/ml de
174 sangue. Neste caso, essa mesma dose não foi eficaz, porém, como o tratamento
175 microfilaricida foi domiciliar, não é possível afirmar que esse medicamento foi administrado
176 corretamente.

177 O diagnóstico da infecção por filarídeos em cães é extremamente importante,
178 porque uma vez detectada mfs no sangue, estas devem ser identificadas, pois a presença de
179 *A. reconditum* não implica em terapia tão dispendiosa e potencialmente agressiva como para
180 *D. immitis* (KITTLESON, 1999). Os principais aspectos a serem considerados para
181 diferenciação morfológica destas espécies são as dimensões, forma da cauda (em gancho ou
182 reta), presença ou ausência de gancho cefálico, assim como o padrão de movimentação das
183 microfilárias.

184 De acordo com BOBADE e al. (1981) e MAGNIS et al. (2013), as mfs de *A.*
185 *reconditum* possuem gancho cefálico e uma cauda em gancho, característica esta evidenciada
186 na extensão sanguínea. As medidas do comprimento e da largura encontradas neste trabalho
187 corroboram com os achados de MAGNIS et al. (2013), CRINGOLI et al. (2001) e RAMOS
188 et al. (2016), respectivamente $264,83 \pm 5,47$ (μm), $4,63 \pm 0,52$ (μm); $265,2 \pm 10,1$ (μm),
189 $5,01 \pm 0,49$ (μm); $272,3 \pm 4,3$ (μm), $4,1 \pm 0,3$ (μm). Ainda, o padrão de movimentação das
190 microfilárias observados na análise da gota espessa e na análise microscópica do microcapilar
191 de hematócrito são compatíveis com o padrão de deslocamento de microfilárias de *A.*
192 *reconditum* descrito por BOBADE et al. (1981) e por JONES et al. (2001).

193 O diagnóstico molecular, por meio da (PCR) permite a discriminação entre os
194 principais nematoides filarídeos encontrados em cães, além de ser altamente específico.
195 FAVIA et al. (1996); MAR et al. (2002); RISHNIW et al.(2006) reportaram a técnica da PCR,

196 utilizando *primers* espécie-específicos para a discriminação de nematódeos filarídeos.
197 CASIRAGHI et al. (2006) e RAMOS et al. (2016) utilizaram a mesma técnica como
198 diagnóstico confirmatório, porém com o uso de *primers* genéricos, para a discriminação dos
199 filarídeos *D. immitis*, *D. repens* e *A. reconditum*, sendo esse mesmo tipo de *primer* empregado
200 para confirmar a infecção por *A. reconditum*. Uma vez que a sequência de DNA amplificada
201 teve identidade mais elevada com *A. reconditum* do que com outras espécies e gêneros, o
202 sequenciamento confirmou o agente etiológico.

203 Conclui-se com este relato, a importância de se alertar os clínicos veterinários sobre
204 a presença deste parasito na região de Santa Maria/RS, assim como a importância de se
205 diferenciar do seu filarídeo mais semelhante que é a *D. immitis*, uma vez que cães infectados
206 com *A. reconditum* podem vir a ser tratados erroneamente, podendo desenvolver efeitos
207 adversos secundários a terapia. Além disso, demonstrar a importância da avaliação citológica
208 como ferramenta de auxílio ao diagnóstico, pois se não fossem observadas as microfírias
209 nas preparações das aspirações dos nódulos, provavelmente não teria sido diagnosticada a
210 infecção por este parasito.

211

212 REFERÊNCIAS

213

214 ABBAS, A.K. et al. **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia: WB Saunders;
215 2000. 560p.

216 ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein
217 database search programs. **Nucleic Acids Research**, n.25, p. 3389-3402, 1997.

218 BLACKWOOD, L. et al. European consensus document on mast cell tumours in dogs and
219 cats. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.10, p.1-29, 2012. Disponível em:<

- 220 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5829.2012.00341.x/epdf>. Acesso em: 10
221 jan. 2017. doi: 10.1111/j.14765829.2012.00341.x.
- 222 BEAVER, P.C. et al. Dipetalonema from the eye of a man in Oregon, USA. A case report.
223 **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v.29, p.369-372, 1980.
- 224 BOBADE, P. A. et al. A case of canine filariasis due to *Dipetalonema reconditum* (Grassi
225 1889) in Nigeria. **Journal of Small Animal Practice**, v.22, p.201-206, 1981.
- 226 BOREHAM, P. F.; ATWELL, R. B. *Dipetalonema reconditum* in dogs with microfilaraemia.
227 **Australian Veterinary Journal**, v. 62, p.27–28, 1985.
- 228 CASIRAGHI, M. et al. A simple molecular method for discriminating common filarial
229 nematodes of dogs (*Canis familiaris*). **Veterinary Parasitology**, v.141, p.368-372, 2006.
230 Disponível em:< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706003529>>.
231 Acesso em: 16 nov. 2016. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.06.006.
- 232 CHALIFOUX L.; HUNT R.D. Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis* and
233 *Dipetalonema reconditum*. **Journal of the American Veterinary Medical**, v.158, p.601–
234 605, 1971. Disponível em:<
235 <http://cal.vet.upenn.edu/projects/parasit06/paraav/labs/APSofmffjavma158-601-605.pdf>>.
236 Acesso em: 28 nov. 2016.
- 237 CRINGOLI, G. et al. A prevalence survey and risk analysis of filariosis in dogs from the Mt.
238 Vesuvius area of southern Italy. **Veterinary Parasitology**, v.102, p.243–252, 2001.
239 Disponível em:< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401701005295>>.
240 Acesso em: 11 nov. 2016. doi: 10.1016/S0304-4017(01)00529-5.
- 241 FAVIA, G. et al. Polymerase chain reaction-identification of *Dirofilaria repens* and
242 *Dirofilaria immitis*. **Parasitology**, v.113, p.567–571, 1996. Disponível em:<
243 [https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/div-classtitlepolymerase-chain-
244 reactionidentification-of-span-classitalicdirofilaria-repensspan-and-span-classitalicdirofilaria-](https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/div-classtitlepolymerase-chain-reactionidentification-of-span-classitalicdirofilaria-repensspan-and-span-classitalicdirofilaria-)

- 245 [immitisspandiv/336FE967E7356BA975EFBFFFFFD6856E](https://doi.org/10.1017/S0031182000067615)>. Acesso em: 16 nov. 2016. doi:
246 10.1017/S0031182000067615.
- 247 FOX, L.E, et al. Plasma histamine and gastrin concentrations in 17 dogs with mast cell
248 tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.4, p.242, 1990. Disponível em:<
249 [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.19391676.1990.tb03116.x/abstract;jsessionid=0C](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.19391676.1990.tb03116.x/abstract;jsessionid=0C7A8483C5D3B7A39EC2B124FA8BB11B.f01t02)
250 [7A8483C5D3B7A39EC2B124FA8BB11B.f01t02](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.19391676.1990.tb03116.x/abstract;jsessionid=0C7A8483C5D3B7A39EC2B124FA8BB11B.f01t02)>. Acesso em: 02 jan 2017. doi:
251 10.1111/j.1939-1676.1990.tb03116.x.
- 252 GREENE, B.M. et al. Circulating non-human microfilaria in a patient with Systemic Lupus
253 Erythematosus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 27, p.905-909,
254 1978.
- 255 HASHEM, M.; BADAWEY, A. I.I. Blood cellular and biochemical studies on filariasis of
256 dogs. **Research Journal of Animal Sciences**, v.2, p.128-134, 2008. Disponível em:<
257 <http://docsdrive.com/pdfs/medwelljournals/rjnasci/2008/128-134.pdf>>. Acesso em 17 nov.
258 2016.
- 259 HUYNH, T. et al. *Dipetalonema reconditum* in the human eye. **British Journal of**
260 **Ophthalmology**, v.85, p.1391-1392, 2001. Disponível em: <
261 <http://bjo.bmj.com/content/85/11/1384.2.full>>. Acesso em: 16 nov. 2016. doi:
262 10.1136/bjo.85.11.1384i.
- 263 JONES, T. C. et al. **Patologia Veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000, 1415 p.
- 264 KITTLESON, M.D.; KIENLE, R.D. **Small Animal Cardiovascular Medicine**. Mosby,
265 1999. 603p.
- 266 KNIGHT, D. H. Heartworm heart disease. **Advances in Veterinary Sciences and**
267 **Comparative Medicine**, London, v.21, p. 107-149, 1977.
- 268 KNIGHT, D. H. Heartworm heart disease. *Advances in Veterinary Sciences and Comparative*
269 *Medicine*, v.21, p.107-149, 1977. KNIGHT, D. H. Heartworm infection. **The Veterinary**

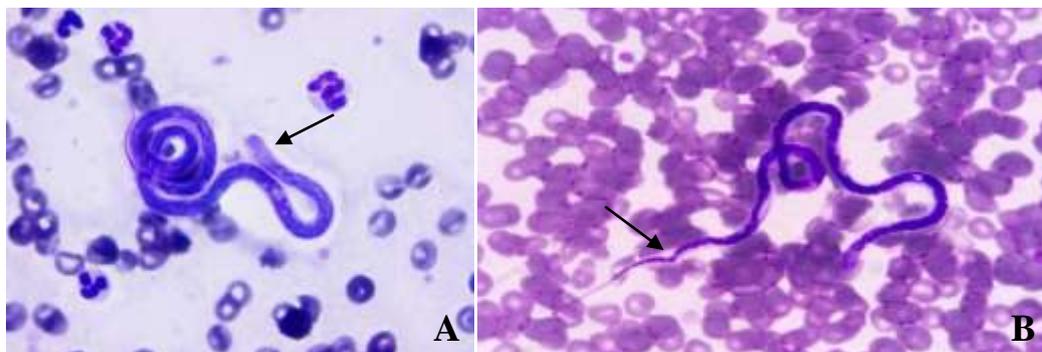
- 270 **Clinics of North America. Small Animals Practice**, v.17, p.1463-1518, 1987. Disponível
271 em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616\(87\)50012-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616(87)50012-2)>. Acesso em: 16 nov. 2016. doi:
272 10.1016/S0195-5616(87)50012-2.
- 273 LEITE, L. C. et al. Infecção de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*, Linnaeus, 1758) da
274 região metropolitana de Guaratuba, Paraná, Brasil por microfilárias circulantes de
275 *Acanthocheilonema reconditum* (Grassi, 1899). **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, p.1149-
276 1155, 2012. Disponível em:<
277 <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/8970/10849>>. Acesso em:
278 16 nov. 2016. doi: 10.5433/1679-0359.2012v33n3p1149 2012.
- 279 LINDEMANN, B.A. et al. Clinical responses of dogs to experimentally induced
280 *Dipetalonema reconditum* infection. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago,
281 v.44, p.2170–2172, 1983a.
- 282 LINDEMANN, B.A.; MCCALL, J.W. Microfilaricidal activity of ivermectin against
283 *Dipetalonema reconditum*. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.6,
284 p.74-76, 1983b. Disponível em: <
285 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jvp.1983.6.issue-1/issuetoc>>. Acesso em 16 nov.
286 2016. doi: 10.1111/j.1365-2885.1983.tb00457.x.
- 287 LILLIEHOOK , I.; TVEDTEN, H. Investigation of hypereosinophilia and potential
288 treatments. **The Veterinary Clinical of North America: Small Animal Practice**, v.33,
289 p.1359-1378, 2003. Disponível
290 em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195561603000974>>. Acesso: em 10
291 jan. 2017. doi:10.1016/S0195-5616(03)00097-4.
- 292 MAGNIS, J. et al. Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the
293 Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and
294 *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. **Parasites & Vectors**,

- 295 v.6, p.78-84, 2013. Disponível em: <
296 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3598535/>>. Acesso em: 11 nov. 2016. doi:
297 10.1186/1756-3305-6-48.
- 298 MAR, P.H. et al. Specific polymerase chain reaction for differential diagnosis of *Dirofilaria*
299 *immitis* and *Dipetalonema reconditum* using primers derived from internal transcribed spacer
300 region 2 (ITS2). **Veterinary Parasitology**, v.106, p.243–252, 2002. Disponível em:<
301 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401702000328>>. Acesso em: 11 nov.
302 2016. doi: 10.1016/S0304-4017(02)00032-8.
- 303 NELSON, G.S. *Dipetalonema reconditum* (Grassi, 1889) from the dog with a note on its
304 development in the flea, *Ctenocephalides felis* and the louse, *Heterodoxus spiniger*. **Journal**
305 **of Helminthology**, v.36, p.297–308, 1962. Disponível em:
306 <https://doi.org/10.1017/S0022149X00023968>>. Acesso em: 20 de nov. 2016. doi:
307 10.1017/S0022149X00023968.
- 308 NEWTON, W.L.; WRIGHT, W.H. The occurrence of the dog filariid other than *Dirofilaria*
309 *immitis* in the United States. **International Journal for Parasitology**, v.42, p.246–258, 1956.
- 310 OTRANTO, D. et al. Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe, **Parasites &**
311 **Vectors**, v.6, p.1-14, 2013. Disponível em:<
312 <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-6-16>>. Acesso em
313 28 nov. 2016. doi:10.1186/1756-3305-6-16.
- 314 PENNINGTON, N. E.; PHELPS, C. A. Canine filariasis on Okinawa, Ryukyu Islands.
315 **Journal of Medical Entomology**, v.6, p. 59–67, 1969.
- 316 RAMOS, R.A.N. et al. Filarioids infecting dogs in northeastern Brazil. **Veterinary**
317 **Parasitology**, v.226, p.26-29, 2016. Disponível em:<
318 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401716302333>>. Acesso em 16 nov.
319 2016. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.06.025.

- 320 REBOUÇAS, N. A. **Biologia Molecular Aplicada à Medicina Veterinária**, 2008.
321 Disponível em:<[http://www.i2bio.org/wp-content/uploads/BIOLOGIA-MOLECULAR-](http://www.i2bio.org/wp-content/uploads/BIOLOGIA-MOLECULAR-APLICAD)
322 [APLICAD](http://www.i2bio.org/wp-content/uploads/BIOLOGIA-MOLECULAR-APLICAD) [A-A-MEDICINA-FUNDAMENTOS-TEORICOS-E-](http://www.i2bio.org/wp-content/uploads/BIOLOGIA-MOLECULAR-APLICAD)
323 [METODOLOGICIOAS.pdf](http://www.i2bio.org/wp-content/uploads/BIOLOGIA-MOLECULAR-APLICAD)>. Acesso em: 02 jan. 2017.
- 324 RISHNIW, M. et al. Discrimination between six species of canine microfilariae by a single
325 polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, v.135, p.303–314, 2006. Disponível
326 em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401705004966>>. Acesso em: 11
327 nov. 2016. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.10.013.
- 328 RODRIGUES-SILVA, R. Human pulmonary dirofilariasis: A review. **Revista do Instituto**
329 **de Medicina Tropical de São Paulo**, v.35, p.523-530, 1995. Disponível em:<
330 <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46651995000600009>>. Acesso em: 28 nov. 2016. doi:
331 10.1590/S0036-46651995000600009.
- 332 ROGERS, K. S. MAST CELL TUMORS: Dilemmas of Diagnosis and Treatment. The
333 **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.26, p.87-102, 1996.
334 Disponível em:<
335 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195561696500082?via%3Dihub>>.
336 Acesso em: 10 jan. 2017. doi: 10.1016/S0195-5616(96)50008-2.
- 337 SOULSBY, E.J.L. **Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals**. London:
338 Baillière Tindall, 1982, 809p.
- 339 STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology**, v.5, p.233-
340 241, 1996. doi: 10.1007/BF02900361.
- 341 VILLIERS, E. & BLACKWOOD, L. **BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical**
342 **Pathology**. England: Wiley-Blackwell, 2005, 456p.

343 YAMAGATA, G.R. et al. Diethylcarbamazine-induced *Dirofilaria immitis* larval death, as
344 indicated by immunoglobulin E concentration, in dogs with concurrent *Ancylostoma caninum*
345 infection. **American Journal Veterinary Research**, v.56, p.174 – 178, 1995.

346



347

348
349 Figura 1- Microfilária de *Acanthocheilonema reconditum* (A) Capa flogística de amostra
350 sanguínea de cão com presença da microfilária com destaque para a extremidade anterior
351 cônica (seta). (B) Esfregaço sanguíneo de cão com presença de microfilária com destaque
352 para cauda em gancho (seta). Microscopia óptica (aumento de 1000x, coloração: panótico
353 rápido).

354

3 CONCLUSÃO

A infecção pelo filarídeo *A. reconditum* não apresenta consequências patológicas, sendo diagnosticada na maioria das vezes de forma acidental. As dimensões, forma da cauda (em gancho ou reta), presença ou ausência de gancho cefálico, assim como o padrão de movimentação das microfilárias constituem-se nos principais aspectos a serem considerados para a diferenciação entre as microfilárias de *Dirofilaria immitis* e *Dirofilaria repens*.

Este trabalho apresenta relevante contribuição nos casos de microfilaremia na região de Santa Maria - RS, servindo como um alerta para os clínicos veterinários sobre a presença deste parasito e da possibilidade de encontrá-lo em preparações citológicas realizadas por meio de punção aspirativa por agulha fina.

BIBLIOGRAFIA

ABBAS, A.K. et al. **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia: WB Saunders; 2000. 560p.

ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. 1. ed. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária Ltda., 2002. 135p.

ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, n.25, p. 3389-3402, 1977.

ALVES, L. C. et al. Survey of canine heartworm in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, n.5, p. 587–590, 1999.

Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02761999000500004&script=sci_arttext>.

Acesso em: 4 dez. 2016. DOI:10.1590/S0074-02761999000500004.

AMERICAN HEARTWORM SOCIETY. **2005 guidelines for the diagnosis, prevention and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs**, Wilmington, 2005.

Disponível em:< www.heartwormsociety.org>. Acesso em: 3 jan. 2017.

ARANDA, C. et al. Canine filariasis. Importance and transmission in the Baix Lobregat area, Barcelona (Spain). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.77, n.4, p. 267–275, 1998.

Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401798001095>>.

Acesso em: 4 dez. 2016. DOI:10.1016/S0304-4017(98)00109-5.

BAIN, O.; BEAUCOURNU, J. C. Larves infestantes de *Dipetalonema* sp. chez des puces récoltées des renards du sud-oests de la France. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, Paris, v.49, n. 1, p. 123-125, 1974.

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.

BAZZOCCHI, C. et al. Combined ivermectin and doxycycline treatment has microfilaricidal and adulticidal activity against *Dirofilaria immitis* in experimentally infected dogs, **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.38, p.1401–1410, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751908001033>>. Acesso em: 02 jan. 2017. DOI: 10.1016/j.ijpara.2008.03.002.

BEAVER, P.C. et al. *Dipetalonema* from the eye of a man in Oregon, USA. A case report. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, [S.L.: s.n.], v. 29, n. 3, p. 369-372, 1980.

BEAVER, P. C. Intraocular filariasis: a brief review. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, [S.L.: s.n.],v. 40, n. 1, p. 40-45, 1989.

BOBADE, P. A. et al. A case of canine filariasis due to *Dipetalonema reconditum* (Grassi 1889) in Nigeria. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v.22, p.201-206, 1981.

BOREHAM, P. F.; ATWELL, R. B. *Dipetalonema reconditum* in dogs with microfilaraemia. **Australian Veterinary Journal**, [S.L.: s.n.], v. 62, n. 1, p. 27–28, 1985.

BRIANTI, E. et al. New insights into the ecology and biology of *Acanthocheilonema reconditum* (Grassi, 1889) causing canine subcutaneous filariosis. **Parasitology**, London, v.139, n.4, p. 530–536, 2012. DOI: 10.1017/S0031182011002198.

BRITO, A. C.; VILA-NOVA, M. C.; ROCHA, D. A. M.; COSTA, L. G.; ALMEIDA, W. A. P.; LOPES JUNIRO, R. R.; FONTES, G.; ROCHA, E. M. M.; REGIS, L. Prevalência de filariose canina causada por *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum* em Maceió, Alagoas, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 6, p. 1497-1504, 2001. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-311X2001000600021&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 16 nov. 2016. DOI:10.1590/S0102-311X2001000600021.

CASIRAGHI, M. et al. A simple molecular method for discriminating common filarial nematodes of dogs (*Canis familiaris*). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.141, n.3-4, p. 368-372, 2006. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706003529>>. Acesso em: 16 nov. 2016. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.06.006.

CHALIFOUX L.; HUNT R.D. Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum*. **Journal of the American Veterinary Medical**, [S.L.: s.n.], v.158, n.5, p. 601–605, 1971.

CRINGOLI, G. et al. A prevalence survey and risk analysis of filariosis in dogs from the Mt. Vesuvius area of southern Italy. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.102, n. 3, p. 243–252, 2001. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401701005295> >. Acesso em: 11 nov. 2016. DOI: 10.1016/S0304-4017(01)00529-5.

FARNELL, D. R.; FAULKNER, D. R. Prepatent period of *Dipetalonema reconditum* in experimentally-infected dogs. **International Journal for Parasitology**, [S.L.: s.n.], v. 64, n. 3, p. 565–567, 1978. Disponível em: < <http://sci-hub.cc/10.2307/3279818>>. Acesso em: 17 nov. 2016. DOI: 10.2307/3279818.

FAVIA, G. et al. Polymerase chain reaction-identification of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis*. **Parasitology**, London, v.113, n.6, p. 567–571, 1996. Disponível em: < <https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/div-classtitlepolymerase-chain-reactionidentification-of-span-classitalicdirofilaria-repensspan-and-span-classitalicdirofilaria-immitisspandiv/336FE967E7356BA975EFBFFFFD6856E> >. Acesso em: 16 nov. 2016. DOI: 10.1017/S0031182000067615.

FERNANDES, C. G. N.; MOURA, S. T.; DIAS, A. R.; VIEIRA FILHO, W. S. Ocorrência de dirofilariose canina na região da Grande Cuiabá, estado de Mato Grosso – Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 36, n. 5, p. 258-261,

1999. Disponível em: < <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/5738>>. Acesso em: 16 nov. 2016. DOI:10.1590/S1413-95961999000500007.

FOK E. et al. Elimination of *Dirofilaria* (syn. Noctiella) *repens* microfilariae in dogs with monthly treatments of moxidectin 2.5% / imidacloprid 10% (Advocate, Bayer) spot-on. **Parasitology Research**, v.106, n.5, p. 1141–1149, 2010. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00436-010-1783-4>>. Acesso em: 02 jan. 2017. DOI:10.1007/s00436-010-1783-4.

FOX, L.E, et al. Plasma histamine and gastrin concentrations in 17 dogs with mast cell tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v.4, p.242, 1990. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.19391676.1990.tb03116.x/abstract;jsessionid=0C7A8483C5D3B7A39EC2B124FA8BB11B.f01t02>>. Acesso em: 02 jan 2017. DOI: 10.1111/j.1939-1676.1990.tb03116.x.

GRANDI, G. et al. A combination of doxycycline and ivermectin is adulticidal in dogs with naturally acquired heartworm disease (*Dirofilaria immitis*), **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.169, p.347-351, 2010. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401710000440>>. Acesso em: 02 jan. 2017. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.01.025.

GENCHI, C. et al. Is heartworm disease really spreading in Europe? **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.133, p.137–148, 2005. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440170500141X>>. Acesso em: 28 nov. 2016. DOI:10.1016/j.vetpar.2005.04.009.

GREENE, B.M.; OTTO, G.F.; GREENOUGH III, W. B. Circulating non-human microfilaria in a patient with Systemic Lupus Erythematosus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S.L.: s.n.], v. 27, n. 5, p. 905-909, 1978.

HASHEM, M.; BADAWY, A. I.I. Blood cellular and biochemical studies on filariasis of dogs. **Research Journal of Animal Sciences**, [S.L.: s.n.], v. 2, n. 5, p. 128-134, 2008. Disponível em: < <http://docsdrive.com/pdfs/medwelljournals/rjnasci/2008/128-134.pdf>>. Acesso em 17 nov. 2016.

HUYNH, T.; THEAN, J.; MAINI, I. *Dipetalonema reconditum* in the human eye. **British Journal of Ophthalmology**, London, v. 85, n. 11, p. 1391-1392, 2001. Disponível em: < <http://bjo.bmj.com/content/85/11/1384.2.full>>. Acesso em: 16 nov. 2016. DOI: 10.1136/bjo.85.11.1384i.

IRWIN, P.J.; JEFFERIES, R. Arthropod-transmitted diseases of companion animals in Southeast Asia. **Trends in Parasitology**, Oxford, v.20, n.1, p. 27-34, 2004. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065308X08002042>>. Acesso em: 16 nov. 2016. DOI: 10.1016/S0065-308X(08)00204-2.

JACSÓ, O. et al. Preliminary findings on the efficacy of selamectin in the treatment of dogs naturally infected with *Dirofilaria repens*. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapeste, v.58, p. 405–412, 2010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1556/AVet.58.2010.4.1>>. Acesso em: 02 jan. 2017. DOI:10.1556/AVet.58.2010.4.1.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000, 1415 p.

KITTLESON, M.D.; KIENLE, R.D. **Small Animal Cardiovascular Medicine**. Mosby, 1999. 603p.

KNIGHT, D. H. Heartworm heart disease. **Advances in Veterinary Sciences and Comparative Medicine**, London, v.21, p. 107-149, 1977.

KNIGHT, D. H. Heartworm heart disease. *Advances in Veterinary Sciences and Comparative Medicine*, v.21, p.107-149, 1977. KNIGHT, D. H. Heartworm infection. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animals Practice**, Philadelphia, v.17, p.1463-1518, 1987. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616\(87\)50012-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616(87)50012-2)>. Acesso em: 16 nov. 2016. DOI: 10.1016/S0195-5616(87)50012-2.

KORKEJIAN, A.; EDESON, J. F. Studies on naturally occurring filarial infections in dogs in Lebanon. I. *Dipetalonema reconditum*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Acra, v. 72, n.1, p. 65–78, 1978. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00034983.1978.11719281> >. Acesso em: 4 dez. 2016. DOI: 10.1080/00034983.1978.11719281.

LEITE, L. C. et al. Infecção de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*, Linnaeus, 1758) da região metropolitana de Guaratuba, Paraná, Brasil por microfilárias circulantes de *Acanthocheilonema reconditum* (Grassi, 1899). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.33, p.1149-1155, 2012. Disponível em:< <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/8970/10849>>. Acesso em: 16 nov. 2016. DOI: 10.5433/1679-0359.2012v33n3p1149 2012.

LILLIEHOOK , I.; TVEDTEN, H. Investigation of hypereosinophilia and potential treatments. **The Veterinary Clinical of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.33, p.1359-1378, 2003. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195561603000974>>. Acesso: em 10 jan. 2017. DOI:10.1016/S0195-5616(03)00097-4.

LINDEMANN, B.A.; EVANS, T.L.; MCCALL, J.W. Clinical responses of dogs to experimentally induced *Dipetalonema reconditum* infection. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.44, n.11, p. 2170–2172, 1983a.

LINDEMANN, B.A.; MCCALL, J.W. Microfilaricidal activity of ivermectin against *Dipetalonema reconditum*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Oxford, v.6, p. 74-76, 1893b.

MAGNIS, J. et al. Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. **Parasites & Vectors**, London, v.6, n.48, p. 78-84, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3598535/> >. Acesso em: 11 nov. 2016. DOI: 10.1186/1756-3305-6-48.

MAR, P.H. et al. Specific polymerase chain reaction for differential diagnosis of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* using primers derived from internal transcribed spacer region 2 (ITS2). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 106, n. 3, p. 243–252, 2002. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401702000328>>. Acesso em: 11 nov. 2016. DOI: 10.1016/S0304-4017(02)00032-8.

MAZZOTTI, L.; CHABAUD, A.G. Presence of *Dipetalonema reconditum* in dogs in Mexico. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, Masson, v. 37, p. 673–674, 1962.

MCCALL, J.W. et al. Further evidence of clinical prophylactic (reach-back) and adulticidal activity of monthly administration of ivermectin and pyrantel pamoate (Heartgard Plus) in dogs experimentally infected with heartworms. In: AMERICAN HEARTWORM SOCIETY. **Recent Advances in Heartworm Disease, Symposium**, 01. ed. Batavia, IL: R. L. Seward, 2001, p.189–200.

MCCALL, J.W. et al. Heartworm disease in animals and humans. **Advances in Parasitology**, London, v.66, p. 193–285, 2008. Disponível em: < https://www.researchgate.net/profile/Luigi_Venco/publication/5363210_Chapter_4_Heartworm_Disease_in_Animals_and_Humans/links/576a7d9808ae0d12c680236e.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2016. DOI: 10.1016/S0065-308X(08)00204-2.

MINNAAR, W. N.; KRECEK, R. C. Helminths in dogs belonging to people in a resource-limited urban community in Gauteng, South Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Durbanville, v.68, n.2, p. 111–117, 2001. Disponível em: < <http://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/18483/17minnaar2001.pdf?sequence=3>>. Acesso em: 4 dez. 2016.

MONTEIRO, S.G. Parasitologia na Medicina Veterinária. 1. ed. São Paulo: Roca, 2011, 356p.

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

NELSON C.T. et al. Guidelines for the diagnosis, prevention and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.133, p. 255–266, 2005.

NEWTON, W.L.; WRIGHT, W.H. The occurrence of the dog filariid other than *Dirofilaria immitis* in the United States. **International Journal for Parasitology**, [S.L.: s.n.], v.42, n.3, p. 246–258, 1956.

ORTEGA-MORA, L.M. et al. Survey of the prevalence of canine filariasis in Spain. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v.11, n.1, p.63–68, 1991. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587705800455>>. Acesso em: 11 nov. 2016. DOI: 10.1016/S0167-5877(05)80045-5.

OTRANTO, D. et al. Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe, **Parasites & Vectors**, London, v.6, p.1-14, 2013. Disponível em:<

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-6-16>>. Acesso em 28 nov. 2016. DOI:10.1186/1756-3305-6-16.

PERIBANEZ M.A. et al. Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Acanthocheilonema dracunculoides* microfilariae by staining with a commercial kit, Leucognost-SP^R. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.102, n.1-2, p. 173–175, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401701005167>>. Acesso em: 11 nov. 2016. DOI: 10.1016/S0304-4017(01)00516-7.

PENNINGTON, N. E.; PHELPS, C. A. Canine filariasis on Okinawa, Ryukyu Islands. **Journal of Medical Entomology**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 59–67, 1969.

RAMOS, R.A.N. et al. Filarioids infecting dogs in northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.226, p. 26-29, 2016. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401716302333>>. Acesso em 16 nov. 2016. DOI: 10.1016/j.vetpar.2016.06.025.

RAYNAUD J. P. Thiacetarsamida (adulticide) Versus Melarsomine (RM 340) Developed as Macrofilaricide (adulticid and larvicide) to Cure Canine Heartworm Infection in Dogs. **Annales de recherches veterinaires**, Paris, v. 23, n. 1, p. 1-25, 1992.

REBOUÇAS, N. A. Biologia Molecular Aplicada à Medicina Veterinária, 2008. Disponível em:<<http://www.i2bio.org/wp-content/uploads/BIOLOGIA-MOLECULAR-APLICAD A-A-MEDICINA-FUNDAMENTOS-TEORICOS-E-METODOLOGICIOAS.pdf>>. Acesso em: 02 jan. 2017.

REIFUR, L., THOMAZ-SOCCOL, V.; MONTIANI-FERREIRA, F. Epidemiological aspects of filariosis in dogs on the coast of Paraná state, Brazil: with emphasis on *Dirofilaria immitis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.122, n.4, p. 273–286, 2004. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401704002067>>. Acesso em: 11 nov. 2016. DOI: 10.1016/j.vetpar.2004.05.017.

RISHNIW, M. et al. Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.135, n. 3-4, p. 303–314, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401705004966>>. Acesso em: 11 nov. 2016. DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.10.013.

RODRIGUES-SILVA, R. Human pulmonary dirofilariasis: A review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.35, p.523-530, 1995. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46651995000600009>>. Acesso em: 28 nov. 2016. DOI: 10.1590/S0036-46651995000600009.

ROGERS, K. S. Mast Cell Tumors: Dilemmas of Diagnosis and Treatment. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.26, p.87-102, 1996. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195561696500082?via%3Dihub>>. Acesso em: 10 jan. 2017. DOI: 10.1016/S0195-5616(96)50008-2.

STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology**, Burlington, v.5, p.233-241, 1996. DOI: 10.1007/BF02900361.

SOULSBY, E.J.L. **Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals**. London: Baillière Tindall, 1982, 809p.

TILLEY, L.P.; SMITH, J.R.; FRANCIS, W.K. **Consulta Veterinária em 5 Minutos: Espécie Canina e Felina**. 5. ed. São Paulo: Manole, 2008, 1560p.

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. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 77-80, 2007. Disponível em:< <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26644/28427>>. Acesso em 17 nov. 2016. DOI: 10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2007.26644.

VENCO, L.; KRAMER, L.; GENCHI, C. Heartworm disease in dogs: unusual clinical cases. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.133, n. 2-3, p. 207–218, 2005. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401705001512>>. Acesso em: 02 jan. 2017. DOI:10.1016/j.vetpar.2005.04.010.

VILLIERS, E. & BLACKWOOD, L. **BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology**. England: Wiley-Blackwell, 2005, 456p.

YAMAGATA, G.R. et al. Diethylcarbamazine-induced *Dirofilaria immitis* larval death, as indicated by immunoglobulin E concentration, in dogs with concurrent *Ancylostoma caninum* infection. **American Journal Veterinary Research**, Chicago, v.56, p.174 – 178, 1995.