

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

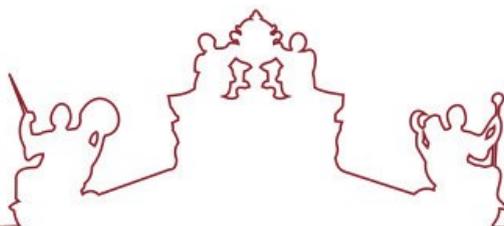
Dissertação

Estudo epidemiológico sobre a prevalência de filárias cutâneas em cães e gatos nas regiões de Elvas e centro de Lisboa

Marina Isabel Marques Martins

Orientador (es) | Helder Carola Espiguiha Cortes
António José Carola Espiguiha Cortes
Rodrigo Alexandre Sá da Costa Marques Bom

Évora 2020



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Dissertação

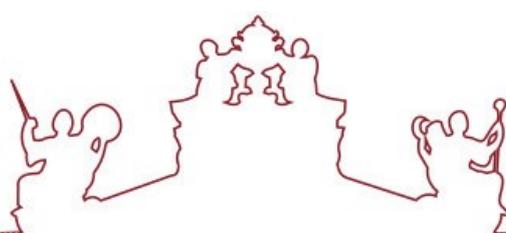
Estudo epidemiológico sobre a prevalência de filárias
cutâneas em cães e gatos nas regiões de Elvas e centro de
Lisboa

Marina Isabel Marques Martins

Orientador (es) | Helder Carola Espiguiha Cortes
António José Carola Espiguiha Cortes
Rodrigo Alexandre Sá da Costa Marques Bom

Évora 2020





A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de ciências e Tecnologia:

Presidente / Margarida Simões (Universidade de Évora)

Vogais / Helder Carola Cortes (Universidade de Évora) (Orientador)
Sérgio Eduardo Ramalho Sousa (Escola Universitária Vasco da Gama) (Arguente)

Évora 2020



*A todas as pessoas que lutam pelos seus sonhos...
Que um dia tenham a oportunidade em alcançá-los.
Assim como eu estou neste momento.*

Agradecimentos

Ao meu orientador, o Professor Dr. Helder Cortes, por ter aceite o meu pedido e orientado nesta última fase do curso.

Aos meus orientadores externos, Dr. Rodrigo Bom e Dr. António Cortes por me ajudarem a crescer na profissão e a mostrarem a sua perspetiva da mesma.

A toda a minha família, em especial aos meus pais, que foram os meus pilares ao longo destes anos, por me deixarem voar, por estarem sempre lá quando foi preciso, por me terem conseguido dar esta oportunidade, pois sei que sem eles não iria conseguir suportar os encargos exigidos. Ao meu irmão pelos bons conselhos e por me “melgar” como ele sabe. À minha cunhada Joana por ser uma querida e por estar sempre disponível. À minha sobrinha Margarida que alegra sempre a sua tia babada.

Ao meu namorado Nuno por acreditar em mim e pela paciência gasta nestes últimos anos, por estar do meu lado nos altos e baixos. À amiga Lurdes por me aturar estes anos e também pelo apoio.

A todos os meus companheiros de armas, pois contribuíram para o meu crescimento, em especial aos meus queridos amigos César, Inês e Laura, pela partilha de momentos muito felizes mas também no desespero de algumas horas. Aos meus colegas de casa Gonçalo, Beatriz, Tiago por terem feito parte da minha família académica e pelos bons momentos passados naquela casa. À Raquel e à Nancy pelos bons momentos que passámos no estágio.

Aos meus amigos de longa data, Tânia e Rúben por me terem apoiado nesta jornada, e por estarem sempre prontos para ir beber um copo para relaxar. Ao amigo Francisco, que também fez parte deste percurso, onde quer que esteja. À minha Verocas, por ter estado sempre lá, pelos bons momentos, pelas nossas caminhadas de partilha e convívio.

Aos amigos e companheiros da Banda e Orquestra da Sociedade Recreativa de Casaínhos, por me terem recebido sempre de braços abertos quando estava na “terrinha” para ir dar “uns toques” no saxofone. Ao maestro e amigo Diogo por todos os conselhos, pelos cafés ao sábado de manhã e pelo apoio dado ao longo destes anos.

À doutora Andreia, pela disponibilidade e por todas as oportunidades que me proporcionou muito antes de eu sonhar que ia para a universidade.

Aos doutores António, Rita e Joana por me terem auxiliado a concluir esta última etapa do curso.

Estudo epidemiológico sobre a prevalência de filárias cutâneas em cães e gatos nas regiões de Elvas e centro de Lisboa

Resumo:

O número de casos de filariose em animais e humanos tem vindo a aumentar por todo o mundo. Estes parasitas possuem um ciclo de vida indireto tendo um artrópode hematófago como hospedeiro intermediário. O parasita *Onchocerca lupi* pode afetar cães, gatos e humanos, provocando sintomas oculares. A espécie *Cercopithifilaria* spp. é outra filária que afeta cães onde a patogenicidade ainda está por esclarecer. A região do mediterrâneo proporciona as condições para a transmissão e desenvolvimento dos parasitas no hospedeiro definitivo, tendo sido reportados casos em Portugal.

O presente trabalho analisou a presença de microfilárias cutâneas em cães e gatos dos parasitas *Onchocerca lupi* e *Cercopithifilaria* spp. nas regiões de Elvas e centro de Lisboa. Foi feita a pesquisa dos mesmos através de biópsias de pele em cães e gatos. Uma amostra em Lisboa foi positiva para *Cercopithifilaria* spp..

Palavras-chave: *Onchocerca lupi*, *Cercopithifilaria* spp., parasita, biópsia, pele.

Epidemiological study about prevalence of cutaneous filariasis in dogs and cats on regions of Elvas and Lisbon's center

Abstract:

The number of cases of filariasis in animals and humans has been increasing worldwide. These parasites have an indirect life cycle with a hematophagous arthropod as an intermediate host. The *Onchocerca lupi* parasite can affect dogs, cats and humans, causing acute and chronic eye symptoms. *Cercopithifilaria* spp. is another filarial worm that affects dogs but her pathogenicity has yet to be clarified. The Mediterranean region offers conditions for the transmission and development of parasites in the definitive host, with cases reported in Portugal.

The present work analyzed the presence of cutaneous microfilarial worms in dogs and cats of the parasites *Onchocerca lupi* and *Cercopithifilaria* sp. in the regions of Elvas and Lisbon. Research was carried out using skin snips in dogs and cats. A sample in Lisbon town was positive for *Cercopitifilaria* spp.,

Key words: *Onchocerca lupi*, *Cercopithifilaria* spp., parasite, biopsy, skin.

Índice

Agradecimentos	iv
Resumo	vi
Índice	viii
Índice de figuras	xi
Índice de Tabelas	xii
Lista de abreviaturas	xiv
1 Relatório de Estágio	15
1.1 Clínica Veterinária de Santo Onofre	15
1.2 Hospital Veterinário das Laranjeiras	16
2 Introdução	18
3 Filarioses em mamíferos	20
3.1 <i>Onchocerca lupi</i>	21
3.1.1 Ciclo de vida	22
3.1.2 Morfologia	25
3.1.2.1 Machos	26
3.1.2.2 Fêmeas	26
3.1.2.3 Microfilárias	27
3.1.3 Sintomas e patogenia	28
3.1.4 Diagnóstico	30
3.1.4.1 Biópsia cutânea e observação do sedimento	30
3.1.4.2 Histopatologia	31
3.1.4.3 Caracterização molecular	31
3.1.4.4 Testes Sorológicos	32
3.1.4.5 Exames Imagiológicos	33
3.1.5 Tratamento e controlo de infeção por <i>Onchocerca lupi</i>	33
3.1.6 Epidemiologia do parasitismo por <i>Onchocerca lupi</i>	36
3.1.7 <i>Onchocerca lupi</i> em Portugal	36
3.2 <i>Cercopithifilaria</i> spp.	37

3.2.1	Ciclo de vida.....	38
3.2.2	Morfologia.....	40
3.2.2.1	<i>Cercopithifilaria baina</i>	40
3.2.2.1.1	Machos.....	40
3.2.2.1.2	Fêmeas.....	41
3.2.2.1.3	Microfilárias.....	42
3.2.2.2	<i>Cercopithifilaria grassii</i>	42
3.2.2.2.1	Fêmeas e Machos.....	43
3.2.2.2.2	Microfilárias.....	43
3.2.2.3	<i>Cercopithifilaria</i> sp. II sensu Otranto et al. 2013.....	44
3.2.3	Sintomas e patogenia.....	44
3.2.4	Diagnóstico.....	46
3.2.4.1	Biópsia cutânea e observação do sedimento.....	46
3.2.4.2	Histopatologia.....	46
3.2.4.3	Caraterização molecular.....	47
3.2.5	Tratamento e controlo de infeção por <i>Cercopithifilaria</i> spp.	47
3.2.6	Controlo químico de vetores.....	48
3.2.7	Controlo não-químico de vetores.....	49
3.2.8	Epidemiologia do parasitismo por <i>Cercopithifilaria</i> spp.	49
3.2.9	<i>Cercopithifilaria</i> spp. em Portugal.....	50
4	Lactonas macrocíclicas.....	50
5	Rastreo de parasitismo por filárias em cães e gatos.....	52
5.1	Materiais e métodos.....	52
5.2	Distribuição das amostras.....	53
5.3	Caraterização dos animais.....	54
5.3.1	Região de Elvas.....	55
5.3.2	Lisboa.....	62
5.4	Resultados da colheita.....	68
6	Discussão.....	70

6.1	<i>Onchocerca lupi</i>	70
6.2	<i>Cercopithifilaria</i> spp.....	75
7	Conclusão.....	78
8	Bibliografia	81

Índice de figuras

Figura 1- Distribuição de Filarídeos na Europa das espécies <i>Acanthocheilonema reconditum</i> , <i>Cercopithifilaria</i> spp., <i>Onchocerca lupi</i> (<i>O. lupi</i>) e <i>Thelazia callipaeda</i>	21
Figura 2 - Ilustração da morfologia das formas adultas de <i>O. lupi</i>	25
Figura 3 - Microfilária de <i>O. lupi</i> encontrada no sedimento obtido por biópsia.	28
Figura 4 - Nódulo subconjuntival localizado no canto medial do olho esquerdo de um cão infetado por <i>O. lupi</i>	29
Figura 5 - Carraças da espécie <i>Rhipicephalus sanguineus</i> . Vista dorsal.	39
Figura 6 - Vista lateral de macho adulto da espécie <i>Cercopithifilaria baina</i> e observado através de microscópio ótico.	41
Figura 7 - Vista lateral de fêmea adulta e microfilária da espécie <i>Cercopithifilaria baina</i> e observada através de microscópio ótico.	42
Figura 8 - Microfilárias da espécie <i>Cercopithifilaria grassii</i> observadas a microscópio ótico.	43
Figura 9 - Microfilária de <i>Cercopithifilaria</i> sp. II observada através de microscópio ótico.	44
Figura 10 - Cadela de raça cruzada de Golden retriever com lesões cutâneas provocadas por <i>Cercopithifilaria baina</i> e.	45
Figura 11 - Mapa de Elvas com menção da localização habitacional dos animais pertencentes ao estudo.	53
Figura 12 - Mapa de Lisboa com a localização habitacional dos animais pertencentes ao estudo.	54
Figura 13 - Localidade de residência (da região de Lisboa) do cão onde foi obtida a amostra positiva do estudo. Mapa obtido através da aplicação My maps.	69
Figura 14 - Parasita do género <i>Cercopithifilaria</i> spp. observado no microscópio ótico com magnificação de 100x.	69
Figura 15 - Parasita do género <i>Cercopithifilaria</i> spp. observado no microscópio ótico com magnificação de 100x.	70

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Número total de animais rastreados	54
Tabela 2 - Animais com idades inferiores a dois anos na região de Elvas.....	56
Tabela 3 - Distribuição do tipo de alojamento na região de Elvas.....	57
Tabela 4 - Relação entre o tipo de alojamento e o acesso à via pública na região de Elvas	57
Tabela 5 - Relação entre o acesso à via pública e o número de passeios diários na região de Elvas	58
Tabela 6 - Relação entre o tipo de alojamento, o acesso à via pública e a proximidade de arbustos na região de Elvas	58
Tabela 7 - Animais com idades inferiores a dois anos na região do centro de Lisboa...	63
Tabela 8 - Distribuição do tipo de alojamento na região do centro de Lisboa.....	64
Tabela 9 - Relação entre o tipo de alojamento e o acesso à via pública na região do centro de Lisboa	64
Tabela 10 - Relação entre o acesso à via pública e o número de passeios diários na região do centro de Lisboa	64
Tabela 11 - Relação entre o tipo de alojamento, o acesso à via pública e a proximidade de arbustos na região do centro de Lisboa	65
Tabela 12 - Resultados obtidos das amostras colhidas na região de Elvas e Lisboa.....	68

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Grupos etários dos cães nas amostras da região de Elvas.....	55
Gráfico 2 - Grupos etários dos gatos nas amostras da região de Elvas	55
Gráfico 3 - Cães com acesso à via pública e o estado de desparasitação na região de Elvas.....	59
Gráfico 4 - Cães desparasitados com acesso à via pública e o tipo de desparasitante usado nos mesmos na região de Elvas	59
Gráfico 5 - Gatos com e sem acesso à via pública e o estado de desparasitação na região de Elvas	60
Gráfico 6 - Gatos com e sem acesso à via pública e tipo de desparasitante na região de Elvas.....	60
Gráfico 7 - Ectoparasiticidas usados na região de Elvas.	61
Gráfico 8 - Microfilaricidas usados na região de Elvas.....	61
Gráfico 9 - Grupos etários dos cães nas amostras da região do centro de Lisboa.....	62
Gráfico 10 - Grupos etários dos gatos nas amostras da região do centro de Lisboa	62
Gráfico 11 - Cães com acesso à via pública e o estado de desparasitação na região do centro de Lisboa	65
Gráfico 12 - Cães com acesso à via pública e o tipo de desparasitante na região do centro de Lisboa	66
Gráfico 13 - Gatos com e sem acesso à via pública e o estado de desparasitação na região do centro de Lisboa.	66
Gráfico 14 - Gatos com e sem acesso à via pública e o tipo de desparasitante na região do centro de Lisboa	67
Gráfico 15 - Ectoparasiticidas usados na região do centro de Lisboa.....	67
Gráfico 16 - Microfilaricidas usados na região do centro de Lisboa.....	68

Lista de abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
BVD	Diarreia Viral Bovina
CAMV	Centros de Atendimento Médico-Veterinário
<i>Cercopithifilaria sp. II</i>	<i>Cercopithifilaria sp. II sensu</i> Otranto et al., 2013
CIDR	Libertação Interna Controlada de Droga (Controlled Internal Drug Release)
cPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Convencional
EUA	Estados Unidos da América
Ex.	Exemplo
IBR	Rinotraqueite Infeciosa Bovina
L1	Primeiro estadio larvar do parasita
L2	Segundo estadio larvar do parasita
L3	Terceiro estadio larvar do parasita
L4	Quarto estadio larvar do parasita
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
<i>O. lupi</i>	<i>Onchocerca lupi</i>
<i>O. volvulus</i>	<i>Onchocerca volvulus</i>
PAAF	Punção Aspirativa por Agulha Fina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PRID	Dispositivo Intravaginal de Libertação de Progesterona (Progesterone Releasing Intravaginal Device)
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RM	Ressonância Magnética
SIAC	Sistema de Informação de Animais de Companhia
TAC	Tomografia Axial Computorizada

1 Relatório de Estágio

O estágio foi composto por duas partes, a primeira desenvolvida em Elvas de setembro a dezembro de 2019 acompanhando o Dr. António Cortes e a sua equipa no dia-a-dia da clínica de espécies pecuárias e de pequenos animais.

A segunda fase do estágio de janeiro a março de 2020, foi na área metropolitana de Lisboa concentrando a atenção na prática clínica de pequenos animais. Esta fase permitiu consolidar conhecimentos adquiridos na universidade e observar uma realidade completamente diferente da região de Elvas (onde os cães são muitas vezes animais de campo estando no monte a guardar o gado ou os gatos nos armazéns da palha a evitar pragas de roedores). Mesmo que haja capacidade económica dos produtores para fazer exames de diagnóstico mais específicos e mais caros, não é demonstrada a mesma disponibilidade a fazê-lo. O paradoxo existente entre os dois locais onde foi feito estágio, deve-se muito ao facto do Hospital Veterinário das Laranjeiras ser um hospital localizado no centro de Lisboa. Nesta zona existe maior número de animais de estimação, um maior poder económico e o valor da relação entre tutor e animal de estimação tem um grande peso, permitindo usar técnicas de diagnóstico mais precisas e avançadas.

1.1 Clínica Veterinária de Santo Onofre

Na vertente das espécies pecuárias foram feitas visitas a explorações do Alto Alentejo e Espanha. Foi uma parte muito importante do estágio onde pude observar várias práticas da medicina veterinária e consolidar o conhecimento em diversas vertentes. Foram observados vários tipos de procedimentos na área de espécies pecuárias, nomeadamente: vacinação profilática (leptospirose, clostridiose, doença de Aujeszky, diarreia viral bovina (BVD), rinotraqueite infecciosa bovina (IBR), clamidiose), tuberculinização e colheita de sangue para diagnóstico de brucelose, aplicação de implantes hormonais como CIDRs (Controlled Internal Drug Release) e PRIDs (Progesterone Releasing Intravaginal Device), sincronização deaios em bovinos e caprinos, inseminação artificial em bovinos, diagnóstico de gestação em bovinos por palpação transretal e em caprinos pelo uso de ecografia abdominal, exames andrológicos a touros, procedimentos cirúrgicos (resolução de deslocamento de abomaso, cesariana em bovinos e ovinos, auxílio em partos eutócicos e distócicos, fetotomia, resolução de prolapsos uterinos e vaginais, descorna de vitelos e

novilhos) manejo de vitelos no pós-parto, tratamento de diarreias neonatais em vitelos, tratamento de metrites e retenções placentárias em bovinos, tratamento de queratoconjuntivite infecciosa bovina (por *Moraxella bovis*), necropsias, eutanásias entre outros.

Na clínica de pequenos animais observaram-se práticas profiláticas comuns do dia-a-dia como vacinação e desparasitação, aplicação de microchip de identificação eletrónica e registo na plataforma informática do Sistema de Informação de Animais de Companhia (SIAC). Acompanhou-se o tratamento de patologias cutâneas (atopia canina, dermatite miliar felina, feridas cutâneas provocadas por mordeduras ou por auto traumatismo (*Hot spot*), piodermatites e pododermatites), tratamento de lesões oculares como úlceras de córnea em cães, diarreia crónica em cães, doença renal crónica em cães e gatos, insuficiência cardíaca congestiva em cães, tratamento de processos infecciosos como otites por *Malassezia* e por ácaros (*Otodectes cynotis*) em cães e gatos, piómetras em cadelas, diarreias provocadas por *Parvovirus* em cachorros, infeções provocadas por *Leishmania infantum* em cães, infeções urinárias em cães e gatos, prática de exames complementares como raio-X, urianálise, citologias, esfregaços de sangue, hemograma e bioquímicas; procedimentos práticos como aplicação de algálias, colheita de sangue para análises, colocação de cateteres e colocação de sistema de soro, punção aspirativa por agulha fina (PAAF); cirurgias como orquiectomia e ovariohisterectomia em cães e gatos, mastectomia em cadelas, correção de otohematoma em cães, herniorrafia perineal, nodulectomia, destartarização, colocação ortopédica de cavilhas de Steinmann, e eutanásia.

1.2 Hospital Veterinário das Laranjeiras

Foi possível observar diferentes tipos de patologias em várias áreas da clínica de pequenos animais tais como: neurologia (epilepsia idiopática canina), oncologia (linfoma multicêntrico canino, mastocitoma canino, carcinoma mamário felino e canino, hemangiosarcoma esplénico canino), endocrinologia (pancreatite crónica canina, hipotireoidismo canino, hipertireoidismo felino, diabetes mellitus canino), dermatologia (acne felino, piodermatite canina, dermatite atópica canina, pododermatite canina, otite externa canina e felina), oftalmologia (herpes vírus felino, glaucoma canino, úlcera indolente canina), gastroenterologia (enterite crónica, corpos estranhos), urologia (cistite

bacteriana canina, urólitiase canina), entre outros. Foram observadas diferentes técnicas complementares de diagnóstico como o raio-X, ecografia, lavagens bronco-alveolares, hemograma, bioquímicas, urianálise, citologia e esfregaço de sangue. Utilizaram-se metodologias de tratamento pelo uso de quimioterapia, drenagem de derrames torácicos e colocação de dreno, alimentação por tubo de esofagostomia e transfusão sanguínea. Houve a observação e aplicação de procedimentos práticos como colocação de cateteres venosos e algalias urinárias, preparação de sistemas de soro, colocação de pensos, colheita de sangue para análises e PAAF. Ainda foi possível acompanhar e assistir a cirurgias eletivas como ovariohisterectomias e orquiectomias em canídeos e felídeos mas também outro tipo de cirurgias de tecidos moles como drenagem e correção de otomatomato, gastrotomia enterotomia e remoção de corpo estranho, mastectomia total e regional, correção de hérnias discais (hemilaminectomias, ventral-slots), destartarizações e extração dentária e, na área da ortopedia como correção de fratura de mandíbula, avanço da tuberosidade da tíbia para correção de rutura do ligamento cruzado cranial e amputação de membro anterior.

2 Introdução

Nos últimos anos o número de casos de infecção por filarias em cães e humanos tem vindo a aumentar, existindo assim uma crescente preocupação sobre este tipo de doença (Otranto and Eberhard, 2011; Otranto et al., 2013b). A filariose corresponde a uma infecção por parasitas nematodes pertencentes ao filo Nematoda, ordem Spirurida, subordem Spirurina e família Filariidae e Onchocercidae (Tahir et al., 2019), causando doença nos hospedeiros. Muitos destes agentes causam patologia clínica grave nos animais, como é o exemplo da espécie mais conhecida *Dirofilaria immitis*, provocando patogénese cardiopulmonar (Tahir et al., 2019). Uma das filarioses mais preocupantes para a saúde humana é a causada pela espécie *Onchocerca volvulus*, afetando mais de 17,7 milhões de pessoas nas regiões tropicais, causando a designada “cegueira dos rios” (Otranto and Eberhard, 2011; Mutafchiev et al., 2013).

No presente trabalho vão ser abordadas as filárias da espécie *Onchocerca lupi* (*O. lupi*) e *Cercopithifilaria* spp. Estes são agentes de filariose em cães, sendo que o primeiro é reconhecido como agente de zoonose desde 2011 (Otranto et al., 2011b, 2012c; Grácio et al., 2015). Foram ainda reportados recentemente três casos de infecção parasitária por *O. lupi* em gatos (Labelle et al., 2011; Maia et al., 2015).

Estes parasitas são caracterizados por apresentarem um ciclo de vida indireto, existindo um hospedeiro intermediário e o hospedeiro definitivo (Tahir et al., 2019). O hospedeiro intermediário normalmente é um artrópode, suspeitando-se que no caso da espécie *O. lupi* sejam moscas do género *Simulium* e *Culicoides*, tendo sido identificado nos Estados Unidos da América (EUA) ácido desoxirribonucleico (ADN) de *O. lupi* em simulídeos (Hassan et al., 2015). No caso das espécies do género *Cercopithifilaria* os vetores são carraças da espécie *Rhipicephalus sanguineus* (Tahir et al., 2019).

No caso de *O. lupi*, as formas adultas localizam-se principalmente no tecido conjuntivo da esclera e da conjuntiva ocular, podendo provocar sintomas agudos como lacrimejamento, blefarite, conjuntivite (Labelle et al., 2013). Ainda pode levar a sintomas crónicos como a formação de granulomas onde se encontram os parasitas no seu interior, provocando exoftalmia, conjuntivite, edema periorbital entre outros (Sréter and Széll, 2008). Os sintomas apresentados são semelhantes nos cães e nos humanos (Otranto et al., 2011b).

As formas adultas de *Cercopithifilaria* spp. localizam-se no tecido conjuntivo da derme e a sua patogenia ainda é pouco conhecida. Manifestaram-se alguns casos com lesões eritematosas na pele associados a esse parasitismo. Existem suspeitas ainda não confirmadas de que poderá ser um agente causal de poliartrite (Gabrielli et al., 2014; Boyd et al., 2019).

Com ampla distribuição geográfica, os relatos de onchocercose canina têm sido mencionados em várias partes do globo, nomeadamente na Europa central (Suíça, Hungria, Alemanha), no Sul da Europa (Portugal e Grécia) e nos Estados Unidos (Otranto et al., 2013b, 2015b). No caso de *Cercopithifilaria* spp. foram referidos casos de cães positivos na Europa mediterrânica, nomeadamente em Espanha, Portugal e Itália, mas também na Suíça, nos Estados Unidos e no Brasil (Almeida and Vicente, 1984; Otranto et al., 2013a; Cortes et al., 2014; Boyd et al., 2019).

A região do mediterrâneo é uma zona propícia para este tipo de doenças, na medida em que o clima temperado proporciona as condições necessárias para o desenvolvimento dos hospedeiros intermediários e consequentemente a transmissão destes parasitas para o hospedeiro definitivo (Tahir et al., 2019). Nestas regiões aumenta a preocupação não só pelo carácter zoonótico, mas também pela possibilidade de propagação para áreas não endémicas. A facilidade de distribuição deve-se também ao facto de muitos destes parasitas afetarem cães e gatos que funcionam como reservatórios (Tahir et al., 2019). Em Portugal já foram reportados casos de onchocercose canina e felina e cercopithifilariose canina na zona do Algarve (Otranto et al., 2013d; Cortes et al., 2014; Maia et al., 2015).

O presente trabalho tem por objetivo fazer uma análise epidemiológica da prevalência de filárias cutâneas em cães e gatos nas regiões de Lisboa e Elvas, possibilitando uma comparação entre o ambiente rural e citadino. Feita esta comparação, poderão ser analisados os possíveis fatores de risco, prevenção e a compreensão de possíveis medidas de controlo para estas infeções.

Neste estudo, recolheram-se amostras de pele de cães e gatos em ambas as regiões. Cada amostra foi acompanhada de um registo de informação de cada animal, nomeadamente a morada, a espécie, o sexo, a idade, a raça, o tipo de alojamento, acesso à rua, o número de passeios diários e informação sobre a desparasitação. Para análise das amostras foi feita a visualização do sedimento obtido de cada amostra com microscópio ótico a fim de

identificar microfílarias de forma qualitativa e quantitativa. Posteriormente foram analisados os resultados e os fatores que possam estar implicados com os mesmos.

3 Filarioses em mamíferos

Os filarídeos estão agrupados em duas famílias Onchocercidae e Filariidae (Tahir et al., 2019). Parasitam tecidos e espaços tecidulares de todos os grupos de vertebrados, exceptuando os peixes (Anderson, 2000).

As espécies *Dirofilaria immitis* e *Dirofilaria repens*, dos filarídeos mais bem caracterizados, são causadores de patologia cardiopulmonar e subcutânea, respetivamente (Tahir et al., 2019). Afetam canídeos domésticos e selvagens mas também são agentes zoonóticos. Temos outro exemplo de um agente que afeta tanto carnívoros, leporídeos e humanos, a *Thelazia callipaeda* provocando thelaziose ocular nos hospedeiros. Existem outras duas espécies de parasitas com localização subcutânea em cães, o caso de *Acanthocheilonema dracunculoides* e *Acanthocheilonema reconditum* (Tahir et al., 2019). Alguns destes parasitas são reportados por todo o mundo (exemplo das do género *Dirofilaria* com ampla distribuição geográfica), incluindo na Europa (Figura 1) (Otranto et al., 2013b; Tahir et al., 2019).

Estes parasitas possuem um ciclo de vida indireto, sendo transmitidos ao hospedeiro por algum tipo de vetor, mais concretamente por artrópodes hematófagos. Alguns vetores dos filarídeos ainda não são totalmente conhecidos, o caso de *O. lupi* em que se suspeita que o seu vetor seja a mosca negra (*Simulium* spp.) (Tahir et al., 2019). Existem ainda outro tipo de vetores onde estão incluídas as carraças, transmissoras de filarídeos das espécies *Cercophithifilaria* spp. e *Acanthocheilonema dracunculoides*, as pulgas e piolhos vetores do parasita *Acanthocheilonema reconditum*, os mosquitos que veiculam *Dirofilaria* spp. e drosofilídeos transmissores de *Thelazia callipaeda* (Tahir et al., 2019). O presente trabalho vai abordar a espécie *O. lupi*, parasita ocular de cães, humanos e possivelmente gatos e no género *Cercophithifilaria* spp., filarídeo presente no tecido subcutâneo de cães.

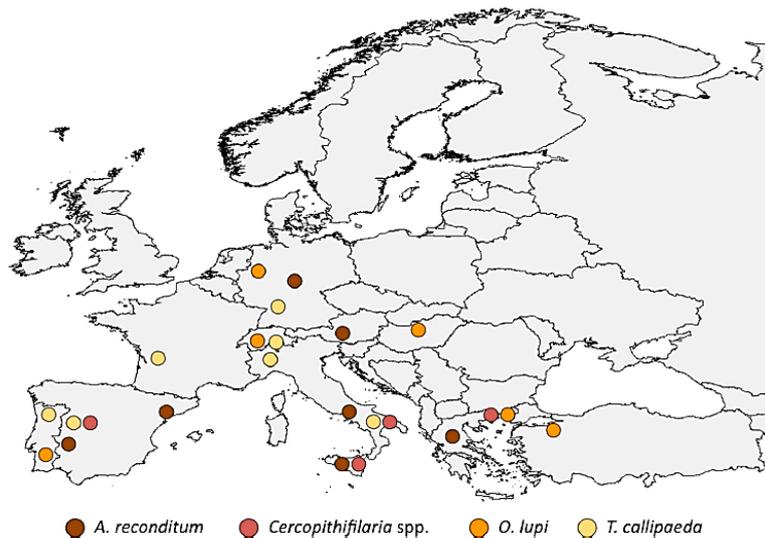


Figura 1- Distribuição de Filarídeos na Europa das espécies *Acanthocheilonema reconditum*, *Cercopithifilaria* spp., *Onchocerca lupi* (*O. lupi*) e *Thelazia callipaeda*. Fonte: Otranto et al., 2013b

3.1 *Onchocerca lupi*

Onchocerca lupi é um parasita pertencente à ordem Spirurida, sub-ordem Spirurina, família Onchocercidae e género *Onchocerca* (Otranto et al., 2013c; Tahir et al., 2019). O género *Onchocerca* caracteriza-se por apresentar cerca de 30 espécies que têm maioritariamente como hospedeiros definitivos espécies unguladas (Klei and Rajan, 2006). Dentro do mesmo género, existe uma espécie que tem como hospedeiro definitivo a espécie humana, *Onchocerca volvulus* e o caso de *O. lupi* (uma espécie pouco estudada com meio século de identificação), que se entende ter como principal hospedeiro definitivo o cão (Sréter and Széll, 2008; Grácio et al., 2015), tendo sido na última década reconhecida como zoonose. A origem do género *Onchocerca* remota a Era geológica do Mioceno, fase em que a maior parte dos hospedeiros definitivos surgem, exemplo dos cervídeos e bóvidos (Klei and Rajan, 2006; Sréter and Széll, 2008). *O. lupi* foi descrito em 1967 por Rodonaja pela primeira vez, que o encontrou na esclera de um lobo (*Canis lupus cubanensis*) na Geórgia (Sréter and Széll, 2008). Inicialmente, alguns autores suspeitavam que a onchocercose canina fosse uma infeção acidental com localização ectópica de *Onchocerca lineatis*, filária de bovinos com localização característica no ligamento gastrosplénico (Egyed et al., 2001; Sréter and Széll, 2008; Labelle et al., 2013). No entanto Egyed et al. caracterizou morfológica e molecularmente *O. lupi*, verificando a

sua singularidade nas duas áreas confirmando a clara distinção em relação aos parasitas de onchocercose bovina (Egyed et al., 2001). Houve a tentativa de infecção experimental de cães com *Onchocerca linealis* mas sem sucesso (Zarfoss et al., 2005). O número de hospedeiros para as diferentes espécies do género *Onchocerca* é reduzido, verificando-se que apenas poderá ocorrer infecção por *Onchocerca* em hospedeiros acidentais que apresentem elevada relação de proximidade com o hospedeiro definitivo, como é o caso de *Onchocerca volvulus* humano identificado num chimpanzé (Sréter and Széll, 2008).

3.1.1 Ciclo de vida

Tal como as restantes espécies do género *Onchocerca*, *O. lupi* apresenta um ciclo de vida indireto, tendo um hospedeiro intermediário e um hospedeiro definitivo (Sréter and Széll, 2008; Grácio et al., 2015). No entanto, pouco se sabe sobre o seu ciclo de vida (Sréter and Széll, 2008; Hassan et al., 2015). Distingue-se o cão como hospedeiro definitivo uma vez que foram identificadas fêmeas grávidas no tecido conjuntivo ocular (Hassan et al., 2015). Também foram identificados no tecido periorbital machos adultos e uma grande quantidade de microfilárias na pele correspondentes a formas larvares imaturas (Mutafchiev et al., 2013; Otranto et al., 2013c). Existe a possibilidade de outras espécies do género *Canis* serem hospedeiros definitivos, no entanto após o primeiro caso identificado de *O. lupi* num lobo, os restantes foram identificados exclusivamente em cães (Labelle et al., 2013).

Em 2011 foram reportados dois casos de onchocercose em gatos nos EUA onde se identificaram fêmeas grávidas no tecido ocular dos animais, sugerindo também a possibilidade dos gatos serem hospedeiros definitivos. No entanto, sendo os dois animais FeLV positivos e conseqüentemente imunocomprometidos, esta questão requer um estudo mais aprofundado, pois sugere-se que este imunocomprometimento também possa estar associado à causa de onchocercose felina (Labelle et al., 2011). Também foi feito um estudo em Portugal onde houve a deteção de um gato assintomático com microfilárias na pele (Maia et al., 2015).

O hospedeiro intermediário deste parasita não foi ainda identificado (Hassan et al., 2015). Estudos indicam que, tal como em outras espécies do género *Onchocerca*, haja uma forte possibilidade da mosca negra (*Simulium* spp.) ser um dos hospedeiros intermediários

(Sréter and Széll, 2008; Hassan et al., 2015). Nos países onde foram reportados casos de onchocercose canina nomeadamente Portugal, Hungria, Alemanha e Suíça, existe em comum uma espécie de mosca negra, *Simulium reptans*, havendo fortes suspeitas que este seja um dos possíveis vetores (Otranto et al., 2013b). Nos EUA, foram capturadas moscas negras da espécie *Simulium tribulatum* onde se verificou que estas eram positivas para infeção por *O. lupi*, ainda que não se tenha identificado o hospedeiro definitivo onde estas se tinham alimentado, nem tão pouco o estado de desenvolvimento dessas larvas. A técnica usada para identificação dos nemátodes foi por amplificação e identificação de ADN do parasita por reação em cadeia da polimerase (PCR), no entanto esta não permitiu diferenciar formas parasitárias viáveis de não viáveis bem como formas infetantes das não infetantes (Hassan et al., 2015). Existe também a possibilidade de mosquitos do género *Culicoides*, serem hospedeiros intermediários da espécie *O. lupi* (Otranto et al., 2013b), no entanto não há evidência científica do mesmo fazendo-se apenas uma extrapolação pelo que se sabe dos outros agentes de onchocercose (Otranto et al., 2013c). Estes possíveis vetores apresentam um ciclo de vida com atividade superior na primavera e verão (Maia et al., 2015).

Grande parte das espécies do género *Simulium* são caracterizadas por depositarem os ovos em zonas aquíferas com água corrente com alto teor de oxigénio como rios e pequenas quedas de água (Hoerauf, 2011). Entre 150 a 600 ovos são depositados em rochas e vegetação submersas eclodindo passados 6 a 12 dias (Shearer and Wall, 2001). Posteriormente as larvas mantêm-se em zonas com elevada corrente filtrando pequenas partículas como algas e bactérias (Shearer and Wall, 2001; Hoerauf, 2011). Estas vão passar por oito estádios até se tornarem moscas adultas, podendo demorar um período que vai de algumas semanas a um ano (Shearer and Wall, 2001). Tanto os machos como as fêmeas adultas alimentam-se de néctar de plantas. No entanto, as fêmeas de algumas dessas espécies necessitam de uma fonte proteica adicional para a maturação completa dos ovos, carecendo para isso de ingestão de sangue sendo as prováveis transmissoras de *O. lupi* para o hospedeiro definitivo (Shearer and Wall, 2001). Normalmente as diferentes espécies não se afastam mais do que um raio de cinco quilómetros da zona de eclosão dos ovos (Adler and McCreadie, 2019).

O ciclo de vida de grande parte dos nematodes do género *Onchocerca* é semelhante. O hospedeiro intermediário, uma mosca hematófaga ao alimentar-se de sangue do

hospedeiro definitivo ingere formas larvares imaturas, as microfilárias (L₁) que se desenvolvem no seu interior até ao terceiro estado larvar (L₃) que por sua vez é a forma infetante (McLean et al., 2017). Quando a mosca volta novamente a alimentar-se, inocula estas formas infetantes L₃ para o hospedeiro definitivo (Grácio et al., 2015; McLean et al., 2017). O período de incubação dentro do hospedeiro definitivo de todas as espécies de *Onchocerca* é longo, podendo ser de alguns meses a alguns anos (Otranto et al., 2015b; Edelmann et al., 2018). Esta característica pode justificar o facto de os casos de onchocercose canina ocorrerem em animais adultos (Sréter and Széll, 2008; Otranto et al., 2015b).

No caso concreto de *O. lupi*, as formas adultas do nematode são frequentemente encontradas em nódulos do tecido conjuntivo da esclera, enquanto que as microfilárias que poderão infetar os vetores encontram-se localizadas no tecido conjuntivo da pele (Otranto et al., 2013b, 2013c).

Verificou-se ainda que existe uma elevada correlação entre a atividade alimentar do possível hospedeiro intermediário e a localização e concentração do nematode na pele do hospedeiro definitivo. A presença de microfilárias na pele dos cães é superior nas regiões da cabeça e região interescapular, zonas estas coincidentes com as zonas de preferência de alimentação das moscas de *Simulium* spp. (Otranto et al., 2013c). Verificou-se que existe um aumento da concentração de microfilárias durante a tarde, coincidindo com um dos períodos de maior atividade alimentar deste possível vetor (Shearer and Wall, 2001; Otranto et al., 2013c).

Tal como na maioria das filárias, o ciclo de vida de *O. lupi* depende de uma bactéria endossimbionte (Egyed et al., 2002b, 2002a; Landmann et al., 2011). Esta bactéria, designada por *Wolbachia pipientis*, é uma bactéria intracelular gram negativa que possui uma relação de simbiose com uma grande variedade de nematodes e insetos (Egyed et al., 2002a; McLean et al., 2017). Esta é transmitida às microfilárias por via materna, estando presente em todos os estadios de desenvolvimento dos nematodes (Egyed et al., 2002a). Existe uma forte relação filogenética entre o parasita *O. lupi* e a bactéria *Wolbachia* (Egyed et al., 2002b). Isto deve-se à longa coevolução histórica e coespeciação entre elas (Egyed et al., 2002b). *O. lupi* e outras filárias necessitam desta bactéria para o seu desenvolvimento, fertilidade e viabilidade (Egyed et al., 2002a). Detetou-se *Wolbachia* endossimbionte em machos, fêmeas adultas e microfilárias intrauterinas, estando

localizadas essencialmente nas cordas laterais da região da hipoderme destas três formas parasitárias (Egyed et al., 2002a). Nas fêmeas de *O. lupi*, *Wolbachia* ainda foi detetada nos ovários, nos oócitos e nos embriões em desenvolvimento (Landmann et al., 2011). Verificou-se uma distribuição desigual das bactérias ao longo do corpo do parasita, não tendo sido identificadas bactérias desta espécie em todas as secções do mesmo (Egyed et al., 2002a). Reconhecendo a suscetibilidade da bactéria a antibióticos como as tetraciclina, existem diversos estudos que analisam esta relação simbiótica e a possibilidade de tratamento indireto da onchocercose canina atuando sobre a bactéria (Egyed et al., 2002a).

3.1.2 Morfologia

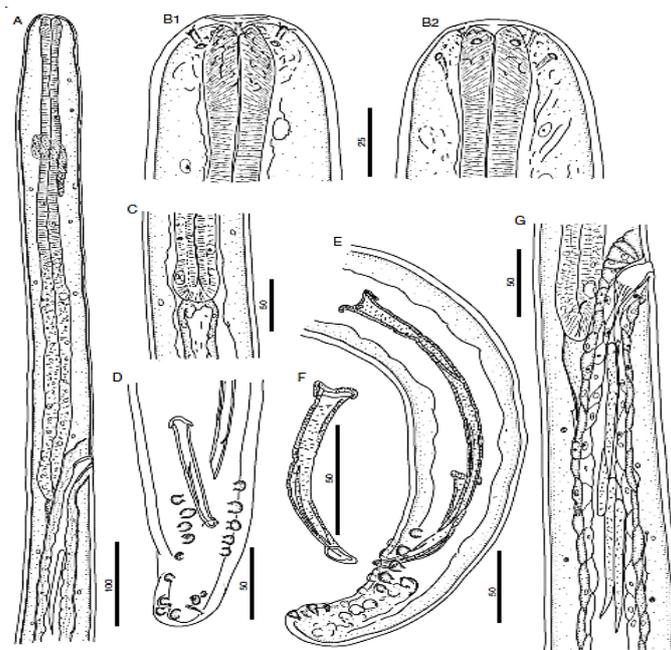


Figura 2 - Ilustração da morfologia das formas adultas de *O. lupi*. Barra de escala em μm . Fonte: Mutafchiev et al., 2013.

Legenda: A) Fêmea, porção anterior, vista lateral. B) Fêmea, extremidade cefálica, vista lateral (B1) e dorsoventral (B2) respetivamente. C) Macho Junção esófago-intestinal. D) Macho, cauda, vista lateral. E) Macho, extremidade posterior, vista sinistral. F) Macho, espícula direita, vista dextral. G) Fêmea, porção terminal do sistema genial.

3.1.2.1 Machos

Os machos da espécie *O. lupi* podem apresentar um comprimento de 43-50 milímetros (mm) e um diâmetro de 0,1-0,2 mm (Egyed et al., 2001; Sréter and Széll, 2008). São de coloração branca, delgados e frágeis (Sréter and Széll, 2008; Otranto et al., 2011a; Mutafchiev et al., 2013). A extremidade anterior é romba (Egyed et al., 2001). A camada cuticular apresenta estrias transversas suaves com 4-5 micrómetros (μm) de espessura (Sréter and Széll, 2008). A porção da cauda (Figura 2, letra D) mede entre 80-90 μm de comprimento e 50-59 μm de diâmetro (Sréter and Széll, 2008). As papilas caudais são grandes sendo uma pré-anal na linha média ventral, dois pares pré-anais, um par de perianais e quatro pares de papilas pós-anais (Egyed et al., 2001). Apresentam duas espículas (Figura 2, letra E e F). A espícula esquerda apresenta uma curvatura ligeira e tubular com terminação em cunha medindo entre 160-203 μm (Sréter and Széll, 2008), e com uma porção proximal robusta, amplamente cuticularizada e ligeiramente torcida com a porção terminal chanfrada em forma de lâmina (Egyed et al., 2001). A espícula do lado direito é nitidamente mais curta medindo 75-94 μm de comprimento, curva, tubular, com uma zona proximal bastante cuticularizada e com a porção distal afilada (Sréter and Széll, 2008). A parte terminal do macho é enrolada numa volta (Egyed et al., 2001).

3.1.2.2 Fêmeas

Dada a dificuldade de extração completa de uma fêmea do interior dos nódulos, o comprimento real da mesma não é conhecida (Sréter and Széll, 2008). No entanto foram obtidos valores de 100-165mm de comprimento do fragmento mais longo medido até à data (Sréter and Széll, 2008). Segundo Egyed et al. houve tentativa de extração de fêmeas através de tratamentos enzimáticos mas sem sucesso (Egyed et al., 2001). Estas são de coloração branca como os machos, longas, delgadas e frágeis medindo 0,2-0,4 mm de diâmetro (Sréter and Széll, 2008). A extremidade anterior (Figura 2 letra A) é arredondada envolvida por um escudo cuticular quadrangular que envolve o orifício bucal, zona esta onde se localiza o primeiro anel de papilas (Egyed et al., 2001). A vulva (Figura 2 letra G) está localizada a 638-1000 μm da extremidade anterior (Sréter and Széll, 2008). Possui vagina retilínea com 24 μm de comprimento (Mutafchiev et al., 2013). O aparelho

ovoejetor (Figura 2 letra G) é retilíneo dirigido caudalmente com paredes musculares fracas e com 3,4 mm de comprimento (Mutafchiev et al., 2013). A cauda é arredondada com estrias transversas na cutícula (Sréter and Széll, 2008).

A cutícula apresenta duas camadas distintas: a camada externa com protuberâncias em forma de anel que podem ser interrompidas ou ramificadas para as cordas laterais (Egyed et al., 2001; Sréter and Széll, 2008). Na porção anterior essas protuberâncias são pequenas e próximas entre elas, tornando-se mais altas e separando-se entre si à medida que progredimos para a porção caudal (Egyed et al., 2001; Sréter and Széll, 2008). Na porção posterior, estas protuberâncias diminuem de tamanho e não se evidenciam estrias nas extremidades do corpo do parasita. Na porção média do corpo estas protuberâncias são arredondadas com 3-5 μm de altura e espaçadas entre 7-12 μm (Sréter and Széll, 2008). A camada cuticular inferior às protuberâncias possui estrias tendo em média uma estria ventralmente a cada protuberância ou entre protuberâncias contíguas (Sréter and Széll, 2008). Na porção média as estriações são alongadas e arredondadas com 4-7 μm de espessura e 20-34 μm de comprimento (Egyed et al., 2001).

3.1.2.3 Microfilárias

Com um comprimento entre 100-111 μm e uma largura de 4-6 μm as microfilárias de *O. lupi* (Figura 3) apresentam cauda com extremidade afilada dobrada para um dos lados (Egyed et al., 2001). A extremidade anterior apresenta-se com um abrupto arredondamento, com um pequeno dente, e apresenta na primeira linha transversa dois a três núcleos (Tahir et al., 2019). O corpo apresenta dois a quatro núcleos por linha (Egyed et al., 2001; Sréter and Széll, 2008). A cauda vai afunilando gradualmente chegando a uma porção da mesma em que a coluna de núcleos é reduzida a uma única linha de três (Sréter and Széll, 2008).



Figura 3 - Microfilária de *O. lupi* encontrada no sedimento obtido por biópsia. Barra de escala 50 μ m. Fonte: Otranto et al., 2013c.

3.1.3 Sintomas e patogenia

Os parasitas adultos de *O. lupi* têm localização característica no tecido conjuntivo da esclera e da conjuntiva, levando mais tarde à formação de nódulos (Otranto et al., 2013b). Estas localizações estão presentes quer no possível hospedeiro definitivo, o cão, mas também nos casos de onchocercose humana e felina, hospedeiros menos frequentes deste parasita (Labelle et al., 2011; Ilhan et al., 2013; Otranto et al., 2015a). Nos cães e gatos podemos ter casos de onchocercose sintomática e assintomática (Maia et al., 2015; Otranto et al., 2015b). Na onchocercose canina, a sintomatologia está dividida em duas formas: a aguda e a crónica (Sréter and Széll, 2008). Na forma aguda evidenciam-se sintomas como conjuntivite, blefarite, lacrimejamento, desconforto ocular, fotofobia, descarga ocular, exoftalmia e cegueira sem granuloma ou nódulo a envolver o parasita (Zarfoss et al., 2005; Sréter and Széll, 2008; Labelle et al., 2013; Mutafchiev et al., 2013). Na forma crónica os sintomas apresentados podem ser exoftalmia, congestão conjuntival, descarga ocular, edema periorbital, lacrimejamento e nódulos em forma de feijão ou ervilha com os parasitas no seu interior (Figura 4) (Sréter and Széll, 2008). Estes nódulos podem localizar-se em diferentes zonas como terceira pálpebra, espaço retrobulbar, fásia orbital e pálpebra. Normalmente estes nódulos apresentam uma superfície irregular associada ao enrolamento dos parasitas adultos (Sréter and Széll, 2008). No caso concreto de onchocercose felina foram verificados em ambos os casos glaucoma (Labelle et al., 2011). A forma como os parasitas chegam ao olho ainda é desconhecida.

Pensa-se que parte dos filarídeos oculares de diferentes espécies migrem através do nervo ótico e outros através da corrente sanguínea (Otranto and Eberhard, 2011).

Num estudo feito na Grécia e em Portugal, verificou-se que os sete cães diagnosticados em Portugal não evidenciaram qualquer sintoma (Otranto et al., 2013d). Outro estudo feito em Portugal também verificou que o único gato positivo para infeção (numa população de 155 animais) não tinha manifestação de sinais clínicos (Maia et al., 2015). Pode ainda ocorrer casos de onchocercose assintomática quando a localização do nódulo é retrobulbar (Franchini et al., 2014; Otranto et al., 2015b).

Nos humanos os sintomas são semelhantes aos identificados nos cães com a presença de nódulos que podem ser desde indolores a bastante dolorosos e com diferentes graus de inflamação (Otranto et al., 2011b; Otranto and Eberhard, 2011; Otranto et al., 2012c; Giannelli et al., 2014). Existe uma associação entre a presença de glaucoma e onchocercose humana, podendo estar associado a vários fatores, nomeadamente à diminuição da drenagem de humor aquoso devido à formação de sinequias periféricas e por aumento de pressão nos ductos de drenagem devido a inflamação crónica (Labelle et al., 2011).

Ainda foram relatados casos de onchocercose com nódulos de localização aberrante tais como o caso de uma criança de 22 meses que apresentou um nódulo no canal medular e um caso de um cão com um nódulo laríngeo (Eberhard et al., 2013; Alho et al., 2016).



Figura 4 - Nódulo subconjuntival localizado no canto medial do olho esquerdo de um cão infetado por *O. lupi*. Fonte: Otranto et. al., 2015a.

3.1.4 Diagnóstico

Uma vez que *O. lupi* é um parasita que afeta animais mas também possui caráter zoonótico, tem havido um crescente interesse pela procura de diferentes técnicas de diagnóstico (Otranto and Eberhard, 2011; Giannelli et al., 2014). A técnica mais usada hoje em dia para identificação é através de biópsia cutânea que é considerada uma técnica invasiva e morosa (Franchini et al., 2014). Tem havido a procura de novas técnicas de diagnóstico para tornar este processo mais prático. Em 2016 foi identificada uma proteína em *O. lupi* que poderá ser utilizada como marcador, podendo-se desenvolver assim um teste sorológico (Campbell et al., 2016).

Em 2011 foi referido na Turquia o primeiro caso de onchocercose humana causado por *O. lupi* (Otranto et al., 2011b). Este facto sugere que muitos casos de onchocercose humana causados por *O. lupi* não tenham sido devidamente identificados, visto que este agente não pertence à lista de diagnósticos diferenciais para nódulos oculares (Otranto et al., 2012c, 2013b; Grácio et al., 2015).

3.1.4.1 Biópsia cutânea e observação do sedimento

A técnica clássica para identificação de *Onchocerca volvulus* é a colheita de um pequeno fragmento de pele seguido de identificação de microfilárias por microscopia ótica. O mesmo procedimento tem sido usado para a identificação de microfilárias de *O. lupi* (Otranto et al., 2013c, 2013d; Giannelli et al., 2014; Otranto et al., 2015b). É considerada uma das técnicas mais sensíveis de identificação de onchocercose canina assintomática (Otranto et al., 2015b). As amostras podem ser colhidas através de uma pequena biópsia, recorrendo a uma lâmina de bisturi ou puch de biópsia, colhendo uma amostra com área aproximada de 0,2 x 0,2 x 0,2 cm para um tubo com solução salina isotónica que é incubada a 37°C durante 12 horas (Otranto et al., 2013c, 2013d). A colheita das amostras de pele nas regiões interescapular e cabeça sobretudo no período da tarde tem maior probabilidade de evidenciar a presença dos parasitas (Otranto et al., 2013c). Após o período de incubação o sedimento é observado no microscópio ótico fazendo-se a caracterização morfológica das formas larvares dos parasitas (Otranto et al., 2013d). Apesar desta técnica possuir uma elevada sensibilidade, é um procedimento invasivo que

induz alguma relutância na aceitação por parte dos tutores (Franchini et al., 2014; Otranto et al., 2015b). Também apresenta uma elevada quantidade de falsos negativos quando a colheita de amostras é feita no período pré-patente da infeção (Otranto et al., 2013d).

3.1.4.2 Histopatologia

A identificação histopatológica é muitas das vezes a única forma de diagnóstico de onchocercose humana provocada por *O. lupi* (Otranto and Eberhard, 2011). Esta técnica também é válida para a espécie canina. Este procedimento caracteriza-se pela excisão cirúrgica dos nódulos oculares que contêm as formas adultas que são fixados numa solução de formalina a 4% e embebidos num bloco de parafina (Mutafchiev et al., 2013). Posteriormente as secções obtidas são coradas com coloração de hematoxilina-eosina. A observação de secções de nódulos com parasitas permite diferenciar machos de fêmeas, identificar fêmeas gestantes e ainda identificar microfilárias mais ou menos imaturas no útero grávido das mesmas. Ainda é possível caracterizar os tecidos envolventes e diferenciar tipos celulares, nomeadamente células inflamatórias (Mutafchiev et al., 2013). A identificação histopatológica de parasitas machos é mais difícil em relação às fêmeas, visto que estes não possuem reação inflamatória envolvente, sugerindo que a reação granulomatosa que envolve as fêmeas deve-se à libertação de microfilárias do útero e que a reação inflamatória descrita nos casos de onchocercose deve-se a esse mesmo facto (Mutafchiev et al., 2013). De facto esta reação inflamatória provocada pelas microfilárias no olho é evidenciada em *Onchocerca volvulus* sendo responsável pelo desenvolvimento de cegueira em humanos (Hoerauf, 2011).

3.1.4.3 Caracterização molecular

A caracterização molecular é muitas vezes um processo de confirmação da espécie após a classificação morfológica dos parasitas adultos e das microfilárias (Egyed et al., 2001; Labelle et al., 2011; Otranto et al., 2011b, 2013d). Através de fragmentos dos parasitas, é feita uma amplificação de genes conhecidos por PCR, tais como a subunidade 5 de NADH (Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina) desidrogenase e subunidade 1 do citocromo c oxidase mitocondrial dos parasitas (Otranto et al., 2012c; Latrofa et al.,

2018). A sequência destes genes é conhecida e está registada no GenBank (plataforma pública de dados e anotações sobre sequências de nucleótidos e sua tradução em proteínas). Isto permite o desenvolvimento de *primers* (sequências de ácidos nucleicos iniciadores da replicação de ADN) usados em PCR convencional (cPCR) e sondas TaqMan (sequência de ácidos nucleicos marcada com corante fluorescente) usadas em PCR quantitativo (qPCR) (Otranto et al., 2015b; Latrofa et al., 2018). Verificou-se em estudos de filogenia que existe variabilidade do gene 1 do citocromo c oxidase de acordo com a origem do parasita, o que permite diferenciar qual o país de origem do mesmo (Otranto et al., 2013d). Um estudo publicado em abril de 2018 verificou que a técnica de qPCR apresenta uma sensibilidade e especificidade elevada na detecção de *O. lupi*. Revela-se assim uma técnica mais vantajosa em relação ao cPCR sendo este último, mais laborioso e moroso em relação ao qPCR (Latrofa et al., 2018). Nesse mesmo estudo o qPCR deu positivo em parasitas de diferentes localizações geográficas e com variabilidade intraespecífica, sendo assim uma boa técnica de vigilância (Latrofa et al., 2018).

3.1.4.4 Testes Sorológicos

Na tentativa de estudar uma técnica menos invasiva para diagnóstico de infecção por *O. lupi*, em março de 2014 foi publicado um estudo em que se aplicou o teste sorológico Og4C3 de detecção de *Onchocerca gibsoni* em cães infetados com *O. lupi* e dos seis animais presentes no estudo, três foram positivos, pelo que esta técnica necessita de uma análise mais aprofundada sobre a sensibilidade e especificidade do teste (Giannelli et al., 2014). Em 2016, Campbell et al. analisaram uma proteína intitulada de paramiosina que é exclusiva de invertebrados. Neste caso concreto, foi analisada a paramiosina específica de *O. lupi* onde, através de técnicas de bioinformática, se identificaram anticorpos específicos para a proteína em questão (Campbell et al., 2016). Esta descoberta proporcionará o desenvolvimento de um teste sorológico, colmatando algumas desvantagens inerentes a outras técnicas (biópsia cutânea). Sugere-se ainda o possível desenvolvimento de uma vacina a partir desta proteína (Campbell et al., 2016).

3.1.4.5 Exames Imagiológicos

A ecografia é um exame complementar não invasivo, de baixo custo que apresenta elevada utilidade no diagnóstico de onchocercose canina em animais assintomáticos com presença de nódulos retrobulbares que não são identificados por exame oftalmológico (Franchini et al., 2014).

Nos humanos foi reportada a utilização de outras técnicas de diagnóstico complementar no diagnóstico de *O. lupi* tais como a ressonância magnética (RM) e a tomografia axial computadorizada (TAC) (Otranto et al., 2012c; Eberhard et al., 2013; Ilhan et al., 2013). Em 2013 foi diagnosticado através de ressonância magnética um nódulo no interior do canal medular de uma criança de 22 meses de idade com sinais de dor e rigidez cervical. Após biópsia suspeitando-se de tecido neoplásico, verificou-se tratar de um nódulo parasitário. De facto, essa biópsia resultou na morte do único parasita adulto, resolvendo a situação clínica (Eberhard et al., 2013). Nos animais também foi avaliada a utilidade destas três técnicas sendo que a TAC demonstrou maior detalhe em pequenas mineralizações oculares e retrobulbares em relação à RM. A ecografia foi considerado o meio de diagnóstico mais válido, seguro e menos invasivo (Franchini et al., 2014).

3.1.5 Tratamento e controlo de infeção por *Onchocerca lupi*

Para o tratamento de onchocercose ocular causada por *O. lupi* têm sido testadas diferentes abordagens, apresentando a remoção cirúrgica uma maior eficácia até à data em todas as espécies (Sréter and Széll, 2008; Otranto and Eberhard, 2011; Otranto et al., 2013b; Tahir et al., 2019). O procedimento cirúrgico apesar de ser uma técnica para remoção dos nódulos oculares permite a manutenção do parasitismo, podendo levar a recorrências, caso haja parasitas noutras localizações (Egyed et al., 2001; Otranto et al., 2013b; McLean et al., 2017). Em muitos casos o tratamento cirúrgico pode não ser uma opção por motivo da localização anatómica, exemplo de nódulos a nível retrobulbar e laríngeo reportados em cães e no canal medular na criança de 22 meses (Eberhard et al., 2013; Alho et al., 2016).

Não existe tratamento médico específico contra *O. lupi* sendo que os fármacos aplicados têm por base o conhecimento da terapêutica de outras filárias (Tahir et al., 2019). O

tratamento farmacológico é aplicado de forma isolada quando não é possível o uso de terapêutica cirúrgica (Alho et al., 2016). Tem surgido a utilização de adulticidas como a melarsomina e lactonas macrocíclicas microfilaricidas como a ivermectina associadas à utilização de antibióticos (Tahir et al., 2019). No caso reportado nos EUA na criança de 22 meses, após ter sido feita biópsia do nódulo, foi feita a aplicação de ivermectina a 150 µg/kg/dose a cada 3 meses durante 5 anos para reduzir a recorrência e possibilidade de desenvolvimento de microfilárias que possam estar presentes na pele (Eberhard et al., 2013). Foram reportados casos de prurido e edema periorbital em cães após a administração de melarsomina a 2,5 mg/kg intramuscular por dois dias consecutivos associando-se à destruição das formas adultas (Zarfoss et al., 2005; McLean et al., 2017). O uso de antibióticos como as tetraciclina tem demonstrado sucesso no tratamento de infecção por *O. lupi* tendo por base a eliminação da bactéria endossimbionte dos parasitas, a *Wolbachia* (Landmann et al., 2011; Bouchery et al., 2013). Dentro do grupo das tetraciclina, a doxiciclina é a que tem sido usada mais frequentemente (Bouchery et al., 2013; McLean et al., 2017; Edelmann et al., 2018). Verificou-se que o uso de tetraciclina no tratamento de infecções por *Onchocerca volvulus* levava a uma depleção no número de bactérias endossimbiontes e conseqüentemente, à apoptose de células da linha germinativa de adultos e células somáticas de embriões, microfilárias e formas larvares em estadio quatro (L₄) (Landmann et al., 2011; Bouchery et al., 2013). Uma vez que este fármaco leva à destruição das células uterinas das fêmeas e bloqueio da espermatogênese de machos de *Onchocerca volvulus*, ocorre esterilidade permanente das formas adultas. Com o bloqueio da embriogênese, há uma diminuição do desenvolvimento de microfilárias, diminuindo o seu número na pele e por sua vez uma diminuição da ingestão por parte de vetores (Landmann et al., 2011; Bouchery et al., 2013). Pensa-se que *Wolbachia* possua um mecanismo anti-apoptótico direto e indireto (Landmann et al., 2011). O possível mecanismo direto está associado à presença de moléculas na bactéria que bloqueiam a apoptose celular (Landmann et al., 2011; Bouchery et al., 2013). Indiretamente, a eliminação de *Wolbachia* provoca defeitos no citoesqueleto da hipoderme e conseqüentemente o não aprovisionamento de metabolitos essenciais para os parasita. Pensa-se também que a bactéria proteja o parasita do stress oxidativo provocado pelas elevadas concentrações de ferro no parasita através da bacterioferrina, um quelante de ferro (Landmann et al., 2011).

Os corticosteroides tópicos e sistêmicos também têm sido usados como anti-inflamatório nos casos de onchocercose animal e humana no tratamento da inflamação e urticária respectivamente (Sréter and Széll, 2008; Eberhard et al., 2013; Edelmann et al., 2018; Tahir et al., 2019).

Tanto em humanos como em animais existe a associação do tratamento médico e cirúrgico, fazendo a excisão do nódulo que contém os parasitas e posteriormente, a administração de uma lactona macrocíclica (Grácio et al., 2015; McLean et al., 2017).

Evidenciam-se resultados controversos acerca desta associação em cães (McLean et al., 2017). Um ano após o tratamento cirúrgico seguido de tratamento com ivermectina e melarsomina os animais não mostraram sinais de recorrência (Komnenou et al., 2002). Por outro lado em 2017 Mclean et al. verificaram que 67% (dez) dos animais do estudo tiveram recorrência dos sintomas. Desses dez, quatro tiveram um protocolo de excisão cirúrgica do nódulo seguida de tratamento com dicloridrato de melarsomina 2,5 mg/kg intramuscular uma vez por dia dois dias consecutivos, ivermectina 1% subcutânea a 50 ou 150 µg/kg um mês após a aplicação de melarsomina com associação de doxiciclina 5-10mg/kg oral por 4 semanas repetindo a cada 3 meses durante um ano (McLean et al., 2017).

Sem métodos preventivos identificados como efetivamente eficazes, pensa-se que a administração mensal de milbemicina oxima em cães, uma lactona macrocíclica microfilaricida, durante 6 meses de abril a outubro reduza o risco de infecção por *O. lupi* pois coincide com a época de maior atividade da mosca negra. É também sugerida a utilização de repelentes para reduzir a ingestão de sangue por parte dos vetores e consequentemente a infecção por *O. lupi* (Tahir et al., 2019). Os agentes com efeito repelente contra a mosca negra e outras espécies de moscas que se alimentam de sangue do hospedeiro são os organofosforados ou piretroides, mas como a sua eficácia é temporária, a sua aplicação deve ser regular (Shearer and Wall, 2001).

3.1.6 Epidemiologia do parasitismo por *Onchocerca lupi*

A distribuição geográfica da infeção por *O. lupi* tem vindo a aumentar um pouco por todo o mundo (Grácio et al., 2015). Em cães, já foram descritos casos nos EUA, na Europa nomeadamente na Grécia, em Portugal, na Alemanha e na Suíça (Otranto et al., 2013b, 2013d, 2015a). Na onchocercose canina evidencia-se apenas a infeção de animais adultos, podendo ser justificado pelo longo período pré-patente (Sréter and Széll, 2008; Otranto et al., 2015b). Também foi descrito em dois gatos nos EUA e um em Portugal (Labelle et al., 2011; Maia et al., 2015). Os casos de onchocercose canina e felina mencionados em Portugal ocorreram na região do Algarve (Otranto et al., 2013d; Maia et al., 2015). Nos humanos foram reportados casos de onchocercose por *O. lupi* nos EUA, na Turquia, no Irão, na Alemanha e na Tunísia (Otranto et al., 2012c; Eberhard et al., 2013; Ilhan et al., 2013; Grácio et al., 2015). O primeiro caso reportado de infeção por *O. lupi* em humanos foi na Turquia em 2011, onde não existe descrição de onchocercose canina até à data (Otranto et al., 2011b, 2012c; Grácio et al., 2015). Pensa-se que a vasta distribuição geográfica do parasita esteja associada à presença do possível vetor nas zonas onde foram descritos casos de onchocercose mas também devido à propagação desse mesmo vetor para novas zonas (Otranto et al., 2013b). Especula-se sobre a possibilidade da propagação estar relacionada com alterações climáticas e também com uma complexidade de outros fatores que favorecem a maior distribuição de vetores cuja identidade desconhecemos (Otranto et al., 2013b; Tahir et al., 2019). Temos o exemplo da espécie *Simulium reptans* que existe na maior parte das regiões da Europa onde ocorreram casos de onchocercose (Otranto et al., 2013b). Em maio de 2015 na Califórnia foi feito um estudo que verificou infeção de moscas da espécie *Simulium tribulatum* com nemátodes de *O. lupi*, havendo fortes indícios desta espécie de mosca negra representar um possível vetor nessa região (Hassan et al., 2015).

3.1.7 *Onchocerca lupi* em Portugal

Em Portugal, verificou-se a existência de *O. lupi* na região do Algarve. Entre 2011 e 2012 foi efetuado um estudo em que foram colhidas 84 amostras cutâneas de cães vadios no

período do outono na região de Olhão (Algarve). Das amostras obtidas, sete animais (7%) foram positivos para a presença de microfilárias cutâneas (Otranto et al., 2013d).

Também foi reportado no Algarve um caso de um cão de raça cruzada com dificuldade respiratória por nódulo parasitário laríngeo, tendo sido positivo para infecção por *O. lupi* (Alho et al., 2016).

Um estudo publicado em dezembro de 2015 por Maia et al. verificou a presença de microfilárias da espécie *O. lupi* num gato na região de Faro. De 155 amostras obtidas de gatos vadios, apenas uma (0,65%) deu positiva. Este animal também se apresentava assintomático (Maia et al., 2015).

3.2 *Cercopithifilaria* spp.

Tal como no género *Onchocerca*, os nematodes do género *Cercopithifilaria* são parasitas que pertencem à ordem Spirurida, sub-ordem Spirurina e família Onchocercidae (Cortes et al., 2014). Pensa-se que este género tenha surgido na Eurásia a meio da época do Mioceno há cerca de 12 milhões de anos (Bain et al., 2002). Apresenta 28 espécies diferentes que parasitam diferentes tipos de hospedeiros, tais como carnívoros, ungulados, marsupiais e roedores (Bain et al., 2002; Otranto et al., 2013a). Nos canídeos temos duas espécies conhecidas: *Cercopithifilaria grassii* e *Cercopithifilaria bainaie* (Otranto et al., 2012a, 2013e). Existe também uma espécie de microfilária, a *Cercopithifilaria* sp. II *sensu* Otranto et al. 2013 (*Cercopithifilaria* sp. II) que ainda não foi classificada taxonomicamente, visto que ainda não se caracterizaram as formas adultas destes parasitas (Otranto et al., 2013a, 2013e). A primeira descrição de *Cercopithifilaria* sp. em cães foi feita por Noé em Roma em 1907. A primeira espécie identificada designava-se *Filaria grassii* (a atual *Cercopithifilaria grassii*) que era caracterizada pelas suas microfilárias “gigantescas” (Otranto et al., 2013a). Este nematode é descrito por apresentar formas adultas no tecido subcutâneo e microfilárias na derme (Otranto et al., 2013a; Tahir et al., 2019). Ao contrário da espécie *O. lupi*, este parasita não foi reconhecido como agente zoonótico e exhibe baixa patogenicidade nos cães (Otranto et al., 2013b; Tahir et al., 2019).

3.2.1 Ciclo de vida

O género *Cercopithifilaria* apresenta um ciclo de vida indireto, apresentado um hospedeiro intermediário e um hospedeiro definitivo (Brianti et al., 2012; Tahir et al., 2019). As espécies que tentamos rastrear neste trabalho são as que têm como hospedeiro definitivo o cão, *Cercopithifilaria grassii*, *Cercopithifilaria baina*e e a microfilária *Cercopithifilaria* sp. II *sensus* Otranto et al. 2013. Foi identificada a carraça da espécie *Rhipicephalus sanguineus* como hospedeiro intermediário destes nematodes (Brianti et al., 2012; Tahir et al., 2019).

Em maio de 2013, foi publicado um estudo que avaliou a possibilidade da espécie *Ixodes ricinus* também servir como hospedeiro intermediário do agente. Colheram-se carraças da espécie referida que se alimentaram de cães infetados por *Cercopithifilaria baina*e (Ramos et al., 2013). Fez-se pesquisa de ADN do nematode dentro da carraça através da técnica de PCR detetando-se das 174 ninfas da amostra, quatro positivas para *Cercopithifilaria baina*e. No entanto, não foram detetadas formas larvares em desenvolvimento nas carraças (Ramos et al., 2013).

As carraças da espécie *Rhipicephalus sanguineus* (Figura 5) pertencem à Família Ixodidae, Subfamília Rhipicephalinae e são carraças hematófagas com um escudo duro que levou à designação de “carraças duras” para os parasitas desta Família (Nicholson et al., 2019; Shearer and Wall, 2001). Esta também pode ser referida como “carraça castanha do cão” (Bain et al., 2002). São cosmopolitas e podem apresentar linhagens de clima temperado e tropical com diferenças biológicas entre elas (Nicholson et al., 2019). O ciclo de vida destes agentes apresenta quatro fases: ovo, larva com seis patas, ninfa com oito patas e por fim a forma adulta também com oito patas (Shearer and Wall, 2001; Nicholson et al., 2019). Entre cada fase o parasita faz longas refeições intercalando com fases de vida livre fora do hospedeiro que podem corresponder até 90% do tempo do ciclo de vida do mesmo (Shearer and Wall, 2001; Nicholson et al., 2019). Nesta espécie, o cão representa o hospedeiro onde ocorrem as refeições em todos os estadios de desenvolvimento. Porém, foram referidos pequenos mamíferos e humanos infetados com esta espécie de carraça (Nicholson et al., 2019). Em climas temperados, esta espécie apresenta uma maior atividade no período entre o fim da primavera até ao início do outono (Dantas-Torres, 2008). *Rhipicephalus sanguineus* é um ixodídeo que procura ativamente

os seus hospedeiros para se poder alimentar. No entanto este tipo de estratégia não é exclusiva, podendo adaptar-se conforme as condições que lhes são apresentadas (Dantas-Torres, 2008). Sendo uma espécie de artrópode bastante versátil, podem apresentar comportamento exofílico, vivendo em zonas exteriores arbustivas, mas também endofílico habitando nas casas das pessoas, em orifícios de zonas habitacionais e nos tapetes (Dantas-Torres, 2008).



Figura 5 - Ixodídeos da espécie *Rhipicephalus sanguineus*. Vista dorsal. Fonte: Nicholson et al., 2019
Legenda: A) Fêmea. B) Macho

A infecção das carraças por *Cercopithifilaria* spp. ocorre transtadialmente da fase de ninfa para adulto pela ingestão de microfilárias aquando a sua alimentação (Brianti et al., 2012). As formas larvares do nematode desenvolvem-se num período de 30 dias até ao terceiro estadio larvar (L₃), a forma infetante do parasita (Tahir et al., 2019). Quando ocorre a ingestão de sangue pelas carraças adultas, há a libertação das formas infetantes para a derme dos cães onde se desenvolvem até às formas adultas que se localizam no tecido subcutâneo (Otranto et al., 2012b; Tahir et al., 2019). Tanto fêmeas como machos da espécie de *Rhipicephalus sanguineus* podem ser transmissores de *Cercopithifilaria* spp. em cães (Otranto et al., 2012b).

Verificou-se que a distribuição das microfilárias no corpo do cão é desigual, havendo maior número nas regiões da cabeça, orelhas e interescapular, zonas estas coincidentes com as de adesão da carraça ao hospedeiro (Otranto et al., 2012a).

3.2.2 Morfologia

3.2.2.1 *Cercopithifilaria baina*

O parasita *Cercopithifilaria baina* apresenta um corpo delgado e delicado com uma cutícula fina e suave, com uma forma cônica da extremidade anterior onde existem quatro papilas labiais externas, quatro papilas cefálicas sub-medianas e um par de anfíbias. A abertura bucal apresenta-se pequena e redonda e é envolvida por uma cápsula bucal em forma de anel achatado (Otranto et al., 2013e). Tem um esôfago achatado dorsoventralmente onde exibe um anel nervoso na região anterior e terço médio, acompanhando o comprimento do mesmo. A cauda apresenta curvatura ventral com três processos cuticulares na extremidade, um comprido e cônico localizado dorsalmente e outros dois laterais (Otranto et al., 2013e).

3.2.2.1.1 Machos

Os machos (Figura 6) têm um comprimento de 11,99 mm e ao longo do mesmo vão se identificar-se três a quatro intumescências aos 181 μm , 88,2 μm e 2,765 μm . A largura do corpo ao nível da junção esôfago-intestinal e a nível da cloaca corresponde a 43-93 μm e 38,7-46,3 μm respectivamente (Otranto et al., 2013e). Detém uma cápsula bucal (Figura 6 letra A) com uma altura de 1,5-2,4 μm e uma largura de 6,7-7,0 μm . A área rugosa é uma zona caracterizada ventralmente pelas suas cerca de 80 bandas transversas de tamanho similar com estriações finas longitudinais, sendo uma zona com um comprimento de 41,9-575,6 μm . A flexura testicular está localizada a 401-780,3 μm em relação à extremidade anterior. Na região pré-cloacal ventral contém uma papila caudal e cinco a seis pares de papilas subventrais. As espículas (Figura 6 letra C) estão inseridas numa cauda enrolada em forma de espiral (Figura 6 letra B), sendo que destas duas, a direita possui um esporão dorsal e a esquerda tem uma terminação em forma de gancho (Otranto et al., 2013e).

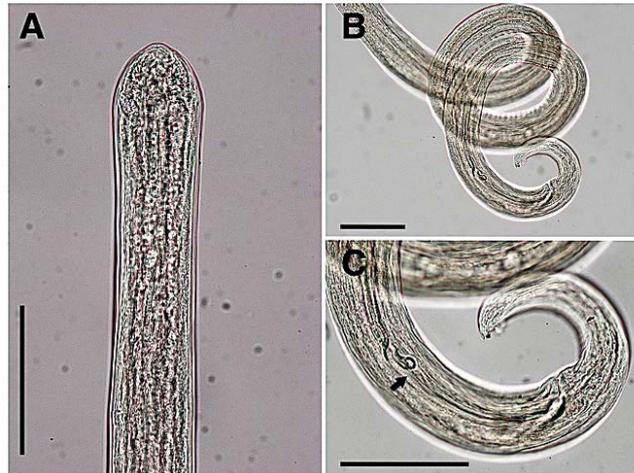


Figura 6 - Vista lateral de macho adulto da espécie *Cercopithifilaria binae* observado através de microscópio ótico. Fonte: (Otranto et al., 2013e).
Legenda: A) Porção anterior. B) Porção posterior enrolada em espiral. C) Porção posterior com identificação de espículas.

3.2.2.1.2 Fêmeas

A fêmea desta espécie detém um comprimento de 17,25 mm e ao longo do mesmo evidenciam-se quatro intumescências a 203 μm , a 485 μm , a 1,6 μm e 2,206 μm . Na junção esófago-intestinal o corpo possui uma largura de 78-120 μm . Na zona anal (Figura 7 letra B) a largura do corpo é de 35,4-42,0 μm . A cápsula bucal tem uma altura de 3,0-3,2 μm com um comprimento de 15,9-16,8 μm . A vulva (Figura 7 letra A) possui uma forma de fenda e está localizada anteriormente ao sistema reprodutor que é composto por dois ovários. A vagina do parasita possui um comprimento de 57,5-69,7 μm e 32,8-35,3 μm de largura. O aparelho ovojetor está orientado caudalmente e apresenta paredes musculares circulares e com 1,0 mm de comprimento (Otranto et al., 2013e).

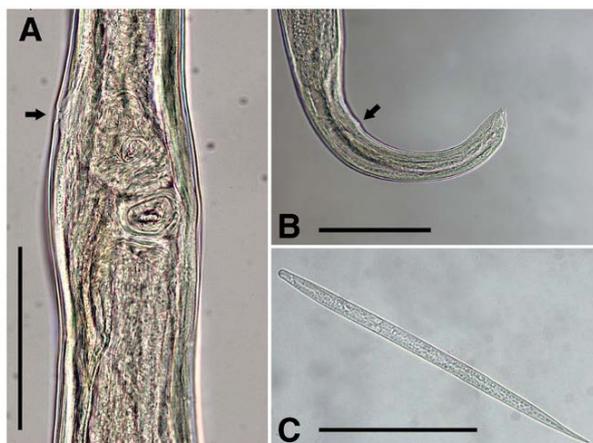


Figura 7 - Vista lateral de fêmea adulta e microfilária da espécie *Cercopithifilaria baina* observada através de microscópio ótico. Barra de escala = 100 μ m Fonte: (Otranto et al., 2013e).

Legenda: A) Vagina e vulva (seta). B) Cauda e ânus (seta). C) Microfilária.

3.2.2.1.3 Microfilárias

Estas formas larvares (Figura 7 letra C) apresentam uma cutícula espessa envolvida por estriações transversas, tendo a particularidade de serem isentas de bainha. Possuem achatamento dorso-ventral e corpo curto com cerca de 185 μ m de comprimento. A região da extremidade cefálica é arredondada formando uma protuberância com um pequeno gancho. A largura do corpo é estável com cerca de 6,6 μ m, excetuando a região da extremidade posterior em forma de cone formando a uma cauda afilada (Otranto et al., 2013e).

3.2.2.2 *Cercopithifilaria grassii*

A morfologia das formas adultas do nematode *Cercopithifilaria grassii* foi descrita pela primeira vez por Noé em 1907, no entanto existe ainda pouca informação detalhada acerca da mesma (Otranto et al., 2013e).

3.2.2.2.1 Fêmeas e Machos

As fêmeas apresentam 17,0-21,0 mm de comprimento com um anel nervoso a 215 μm da extremidade anterior. A vulva localiza-se a 600 μm em relação à porção posterior. Têm uma cauda com 220 μm de comprimento. Os machos apresentam um comprimento de 7,0-8,0 mm (Otranto et al., 2013e).

3.2.2.2.2 Microfilárias

As microfilárias da espécie *Cercopithifilaria grassii* (Figura 8) são descritas em 1907 como “gigantescas”, visto que apresentam um corpo cilíndrico com comprimento de 645-670 μm e 15-17 μm de largura. A extremidade anterior (Figura 8 letra B) possui um pequeno gancho no lado esquerdo estando incluída na região cefálica que detém uma forma bulbosa e arredondada. A cutícula destes nematodes é espessa e estriada interrompida no plano lateral. Na região posterior (Figura 8 letra C) do parasita é observada uma cauda comprida e cônica, cuticular e sem estrias nos últimos 20 μm . As regiões do poro excretor e ânus que estão localizado a 185 μm da extremidade anterior e a 118 μm da extremidade posterior respectivamente (Otranto et al., 2013a).

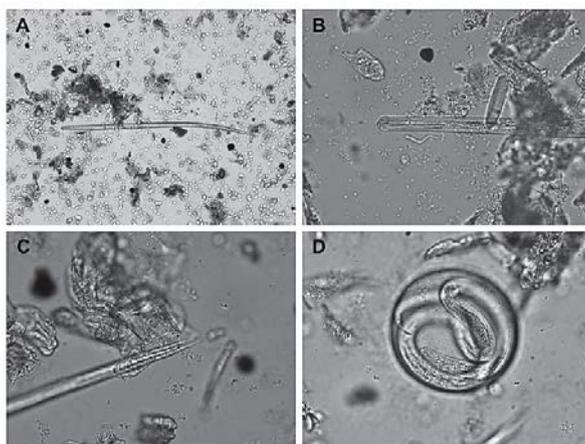


Figura 8 - Microfilárias da espécie *Cercopithifilaria grassii* observadas a microscópio ótico. Fonte: (Otranto et al., 2013a).

Legenda: A) Vista geral. B) Região cefálica bulbosa. C) Cauda cuticular sem estrias. D) Forma larvar no interior de ovo.

3.2.2.3 *Cercopithifilaria* sp. II sensu Otranto et al. 2013

Como mencionado anteriormente, as formas adultas deste parasita ainda não foram identificadas, existindo apenas conhecimento da morfologia das formas imaturas (Figura 9). Esta microfilária caracterizada pelo seu comprimento de cerca de 280 μm e forma navicular quando a sua observação é feita dorso-ventralmente devido às asas laterais. Já quando é feita a sua observação lateral, a forma do parasita é filiforme. Estas asas laterais iniciam-se a 10 μm da extremidade anterior e posteriormente fundem-se formando um espesso cone cuticular. A extremidade posterior tem uma forma cônica. Ao longo do corpo são observadas estrias transversas interrompidas lateralmente, que vão ficando mais justas à medida que se aproximam da porção terminal. A extremidade anterior tem um pequeno gancho cefálico subterminal. Na vista dorso-ventral a porção do corpo não cuticulada é atenuada de forma constante, no entanto na visão lateral esta inicia com um estreitamento bem demarcado (Otranto et al., 2013a).

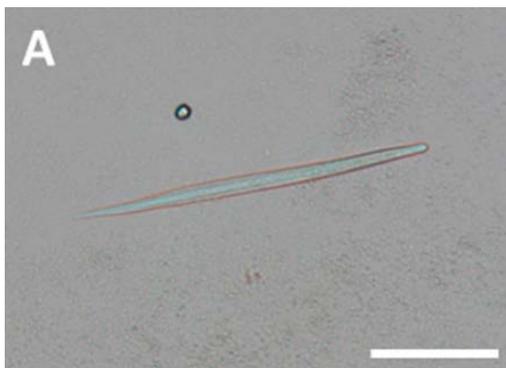


Figura 9 - Microfilária de *Cercopithifilária* sp. II observada através de microscópio ótico. Barra de escala = 100 μm . Fonte: (Cortes et al., 2014).

3.2.3 Sintomas e patogenia

A ocorrência de sintomatologia associada a infecções por *Cercopithifilaria* spp. em cães é baixa e com pouco significado clínico, havendo um grande número de animais assintomáticos (Cortes et al., 2014; Tahir et al., 2019). No entanto, foram descritos casos em que houve o surgimento de lesões cutâneas eritematosas e de poliartrite em cães positivos para infecção por *Cercopithifilaria* spp. (Otranto et al., 2013a; Gabrielli et al.,

2014; Boyd et al., 2019). Em 2019 Boyd et al. descreveram um caso de uma cadela de raça cruzada de Golden retriever (Figura 10) com manifestação de placas anulares rosadas a eritematosas localizadas na região dorsal da cabeça (Figura 10 letras A) e B)) e zonas eritematosas com alopecia e ulceradas na comissura medial de ambos os olhos (Figura 10 letras C) e D)) (Boyd et al., 2019). Outro caso publicado em 2014 por Gabrielli et al. relata o caso de um cão de 7 anos de raça indefinida com apresentação clínica de relutância ao movimento, letargia e claudicação. Após ter sido feita aspiração de líquido sinovial foi feita a sua citologia identificando um aumento do número de células mononucleares e microfírias de *Cercopithifilaria baina* vivas e ativas (Gabrielli et al., 2014). No entanto, não se confirmou de forma definitiva que o parasita era o agente causal da poliartrite mantendo-se os sintomas e as microfírias após três semanas de tratamento com milbemicina. Infelizmente o seguimento do animal foi interrompido pois faleceu em consequência de complicações pós-cirúrgicas da exérese de um tumor (Gabrielli et al., 2014). Existe pouca informação sobre a patogenicidade deste parasita pelo que é necessário um estudo mais aprofundado da relação entre infecção por *Cercopithifilaria* spp. e o surgimento de sinais clínicos (Otranto et al., 2013a).



Figura 10 - Cadela de raça cruzada de Golden retriever com lesões cutâneas provocadas por *Cercopithifilaria baina*. Fonte: (Boyd et al. 2019).
Legenda: A)-B) Placas ulceradas e eritematosas na região da cabeça. C)-D) zona de erosão, alopecia e eritema em ambas as comissuras mediais oculares.

3.2.4 Diagnóstico

3.2.4.1 Biópsia cutânea e observação do sedimento

A biópsia cutânea é a técnica mais utilizada para diagnóstico de *Cercopithifilaria* spp. em cães (Otranto et al., 2013a; Cortes et al., 2014; Tahir et al., 2019), identificando microfilárias através observação do sedimento por microscopia ótica (Otranto et al., 2013a; Cortes et al., 2014). É feita a exérese de uma amostra de pele com dimensão aproximada de 0,2x0,2x0,2 cm (Otranto et al., 2013a; Cortes et al., 2014). As amostras são colocadas em tubos, geralmente do tipo *Eppendorf*, com uma solução salina isotónica. É feita a incubação das amostras a 30°C durante 12 horas para posteriormente ser feita a observação do sedimento e caracterização morfológica dos parasitas (Cortes et al., 2014). Estudos verificaram uma distribuição desigual das microfilárias no corpo dos cães, havendo maior concentração nalgumas zonas como a cabeça, pescoço e orelhas (Otranto et al., 2012a). Estas zonas devem ser as selecionadas na colheita das amostras de pele (Otranto et al., 2012a, 2013a; Cortes et al., 2014).

3.2.4.2 Histopatologia

Quando se observam alterações macroscópicas da pele nomeadamente lesões pruriginosas, dermatite papular e placas eritematosas, a histopatologia é muitas das vezes a técnica utilizada (Otranto et al., 2012a, 2013a; Cortes et al., 2014; Boyd et al., 2019). A biópsia de pele pode ser efetuada com lâmina de bisturi ou com punch de biópsia (oito mm), seguidamente fixada numa solução tamponada de formalina a 4%, embebida em parafina e processada para observação em microscópio ótico (Otranto et al., 2012a). Normalmente é feita coloração com hematoxilina-eosina (Otranto et al., 2012a; Boyd et al., 2019).

Esta técnica permite a observação das formas parasitárias mas também das alterações histopatológicas dos tecidos. Pode ser verificada muitas vezes congestão do plexo superficial epidérmico e infiltração de células inflamatórias nos tecidos que envolvem o parasita, nomeadamente por neutrófilos, eosinófilos e linfócitos (Otranto et al., 2012a, 2013a; Boyd et al., 2019).

3.2.4.3 Caraterização molecular

Tal como no caso do parasita *O. lupi*, a caraterização molecular de *Cercopithifilaria* spp. é usada como meio de confirmação da espécie dos parasitas após a observação dos mesmos (Otranto et al., 2011a, 2013a). É feita a amplificação de genes conhecidos através da técnica de PCR convencional (Otranto et al., 2011a). Neste caso concreto, faz-se a amplificação de fragmentos de genes alvo como *cox1* e 12s mitocondrial usando primers (sequências de ácidos nucleicos iniciadores da replicação de ADN) produzidos apartir da informação fornecida pelo GenBank (Otranto et al., 2011a, 2013a; Cortes et al., 2014).

3.2.5 Tratamento e controlo de infeção por *Cercopithifilaria* spp.

Não existe um protocolo específico para tratamento de infeções por *Cercopithifilaria* spp. (Tahir et al., 2019). No caso descrito por Boyd et al. em 2019 sobre a cadela cruzada de Golden retriever, foram feitos três tratamentos com prednisolona oral na dose de 0,56 mg/kg uma vez por dia durante sete dias para reduzir a inflamação e aplicação de uma combinação de imidacloprid com moxidectina em spot-on aplicada entre as escápulas a cada duas semanas. Houve resolução das lesões cutâneas, surgindo recorrência somente quando esta passou a aplicação mensal. Reduziu-se o intervalo de tempo na aplicação do spot-on para três semanas, resolvendo as recidivas das lesões durante pelo menos um ano (Boyd et al., 2019).

No caso da poliartrite crónica também foi utilizada a milbemicina oxima, uma lactona macrocíclica microfilaricida, na dose de 0,5mg/kg uma vez por dia a cada sete dias durante três semanas, não se observando sucesso no tratamento, pois passado um mês foi feita identificação de microfilárias no sedimento de uma amostra cutânea (Gabrielli et al., 2014).

A melhor forma de controlo de infeção por *Cercopithifilaria* spp. é através do controlo dos vetores com ectoparasiticidas, pois se não houver ingestão de sangue do cão pelas carraças, estas não inoculam as formas infetantes do parasita não ocorrendo infeção (Tahir et al., 2019).

Para o controlo de carraças, é importante não esquecer que 90% do tempo de vida do parasita é passado no ambiente, pelo que a abordagem à sua eliminação deve ser

multimodal, tratando o animal mas também o ambiente envolvente (Dantas-Torres, 2008; Nicholson et al., 2019).

Pode existir uma associação do controlo químico e não-químico dos vetores (Dantas-Torres, 2008).

3.2.6 Controlo químico de vetores

O controlo químico é baseado no uso de princípios ativos acaricidas, como os do grupo das formamidinas (por exemplo do amitraz), os fenilpirazois (por exemplo o fipronil), os piretroides (por exemplo a deltametrina e a permetrina) que atuam sob o sistema nervoso do parasita (Dantas-Torres, 2008). Este tipo de agentes podem ser usados sob diferentes apresentações, como pipetas spot-on, shampôs, coleiras, entre outros (Dantas-Torres, 2008; Nicholson et al., 2019).

O amitraz atua na carraça pela ligação a recetores da octopamina do sistema nervoso do parasita, levando a tremores, convulsões e conseqüentemente à morte dos mesmos (Prullage et al., 2011). Os piretroides têm ação através do bloqueio dos canais de sódio do sistema neuromuscular resultando em convulsões e morte (Narahashi, 1971).

Recentemente surgiram novos agentes inseticidas-acaricidas da classe das isoxazolininas para controlo de carraças (Beugnet et al., 2015). Temos o exemplo do fluralaner e o afloxaner que, tal como o fipronil, atuam na carraça provocando um excesso de estimulação neuronal através da ligação com os recetores ácido γ -aminobutirico e glutamato (Prullage et al., 2011; Beugnet et al., 2015). Estes apresentam formulação oral e um período longo de ação, pelo que o afloxaner tem duração de um mês e o fluralaner tem duração de ação de três meses (Beugnet et al., 2015).

A utilização destes agentes pode ser eficaz na eliminação mas também no controlo de carraças nos cães (Dantas-Torres, 2008; Beugnet et al., 2015).

O controlo ambiental com agentes acaricidas é aconselhado, visto que as carraças possuem grande parte da atividade fora do hospedeiro. Fatores como a área total onde o animal se encontra, o efeito residual do agente acaricida e as condições ambientais serão preponderantes para a eficácia do tratamento. Caso seja uma casa com elevado grau de infestação, o uso de agentes acaricidas é recomendado (Dantas-Torres, 2008).

O uso deste tipo de agentes deve ser feito de forma consciente de forma a reduzir os impactos ambientais, nomeadamente efeitos tóxicos para humanos e para outros animais, mas também o desenvolvimento de resistências por parte dos mesmos (Dantas-Torres, 2008; Nicholson et al., 2019).

3.2.7 Controlo não-químico de vetores

O controlo do ambiente pode ser feito através de técnicas que não impliquem o uso de agentes químicos, modificando o habitat onde as carraças se encontram (Dantas-Torres, 2008). Sendo assim, para esta técnica é importante o corte de relva, ervas infestantes, encerramento de orifícios onde os parasitas se poderiam esconder. Outra medida importante é a inspeção e consequente remoção de carraças dos cães de estimação que deve ser feita periodicamente com utilização de luvas (Dantas-Torres, 2008).

Existem alguns tipos de microorganismos, como o exemplo de fungos da espécie *Beauveria bassiana* e *Metarhizium ansopliar* que demonstraram efeito contra carraças da espécie *Rhipicephalus sanguineus* e que poderiam ser um potencial biocida contra os mesmos (Reis et al., 2008). O maior obstáculo à sua utilização é a forma de produção para o seu uso prático (Dantas-Torres, 2008).

3.2.8 Epidemiologia do parasitismo por *Cercopithifilaria* spp.

As espécies do género *Cercopithifilaria* que afetam a espécie canina já foram descritas em diferentes zonas do globo (Otranto et al., 2012a, 2013e). Como mencionado anteriormente, o primeiro caso identificado de infeção foi em Roma, publicado por Noé em 1907, sendo *Cercopithifilaria grassii* (anteriormente *Filaria grassii*) a primeira espécie descrita em cães (Otranto et al., 2013a). Na zona do mediterrâneo, (Espanha e Itália) foram encontradas microfíliarias das espécies *Cercopithifilaria bainaie*, *Cercopithifilaria* sp. II (Otranto et al., 2013a). Ainda na zona mediterrânea, foram identificados casos de infeção por *Cercopithifilaria bainaie*, *Cercopithifilaria grassii* e *Cercopithifilaria* sp. II em cães no sul de Portugal (Algarve) (Cortes et al., 2014). No Brasil foi publicado um caso de infeção por *Cercopithifilaria bainaie* no Rio de Janeiro (Almeida and Vicente,

1984). Nos EUA (Flórida) foi reportado um caso originado pela espécie *Cercopithifilaria bainae* (Boyd et al., 2019).

Pensa-se que a ampla disseminação do parasita esteja relacionada com a distribuição cosmopolita do hospedeiro intermediário, *Rhipicephalus sanguineus* (Otranto et al., 2012a; Nicholson et al., 2019).

3.2.9 *Cercopithifilaria* spp. em Portugal

A presença de *Cercopithifilaria* spp. em Portugal foi descrita pela primeira vez em 2014 por Cortes et al.. Foram coletadas 102 amostras de pele de cães de dois abrigos da região do Algarve. Dessas 102 amostras, 24 (23,5%) foram positivas. As espécies encontradas foram as de *Cercopithifilaria bainae*, *Cercopithifilaria grassii* e *Cercopithifilaria* sp. II. Verificou-se a infecção de cães por uma única espécie de *Cercopithifilaria* sp., mas também infecções mistas provocadas pelas diferentes espécies mencionadas (Cortes et al., 2014).

4 Lactonas macrocíclicas

As lactonas macrocíclicas são moléculas usadas para controlo de diversos tipos de parasitas, nomeadamente nematodes filarídeos, nematodes gastrointestinais, carraças, ácaros entre outros (Nolan and Lok, 2012). Entre as diferentes lactonas macrocíclicas, quatro são usadas frequentemente em cães e gatos com diferentes formas de apresentação. Temos o caso da moxidectina e da selamectina que usualmente estão disponíveis comercialmente para uso tópico e em apresentação oral, temos normalmente a ivermectina e a milbemicina oxima (Nolan and Lok, 2012). Adicionalmente, quer a ivermectina, quer a moxidectina podem ser usadas sob a forma injetável (Nolan and Lok, 2012). A ivermectina é a única que está aprovada para uso em humanos (Wolstenholme et al., 2016).

De um modo geral, as lactonas macrocíclicas têm efeitos microfilaricidas superiores, reduzindo o número de microfilárias em circulação. Estas também podem provocar esterilidade a longo prazo das formas adultas. No caso concreto da moxidectina, que ainda

está a ser alvo de estudo, parece demonstrar melhores resultados na sua eficácia sobre as formas adultas (Wolstenholme et al., 2016).

Evidências demonstraram que o mecanismo de ação destas moléculas estará relacionado com o bloqueio de canais de cloreto dependente do glutamato presentes nos neurónios motores, interneurónios e células musculares da faringe dos parasitas (Moreno et al., 2010; Wolstenholme et al., 2016). Estes canais estão também presentes nos tecidos reprodutivos de parasitas adultos. Sugere-se então que a esterilidade dos nematodes adultos esteja associada à inibição da libertação de secreções uterinas por bloqueio destes canais (Wolstenholme et al., 2016). Já a ação sobre as microfilárias remete para canais de cloreto dependentes do glutamato presentes no poro excretor/secretor, responsáveis pela produção de proteínas que facilitam a evasão do sistema imunológico do hospedeiro (Moreno et al., 2010).

Anteriormente, pensava-se que só por si, as lactonas macrocíclicas provocavam paralisia do parasita e conseqüente a sua morte. No entanto, as doses normalmente utilizadas *in vivo* são duas a três vezes inferiores do que as usadas *in vitro* para provocar este efeito filaricida. Estas apenas reduzem a mobilidade do parasita e pensa-se que esta inibição esteja associada à ação sobre recetores neuromusculares específicos ácido γ -aminobutírico (Wolstenholme et al., 2016). Propõe-se então que o efeito letal sobre os parasitas esteja ligado à ação potenciadora das lactonas macrocíclicas sobre o sistema imunitário do hospedeiro que desempenha um papel fundamental na eliminação dos nematodes. Pensa-se que o caso da ivermectina, quando usada nas doses convencionais, potencie um aumento da ativação de neutrófilos e células mononucleares do sangue periférico (ex. linfócitos e monócitos) que atuam sobre o parasita (Wolstenholme et al., 2016). Pensa-se que esta molécula também atue sobre o sistema imunitário do hospedeiro potenciando a inibição da libertação de moléculas imunomodulatórias pelo parasita (Wolstenholme et al., 2016).

A aplicação de lactonas macrocíclicas quer para o controlo de *O. lupi*, quer para *Cercopithifilaria* sp. é baseada no uso para o controlo de outros filarídeos, o exemplo mais demarcado é *Dirofilaria immitis*, o nematode do coração, para o qual estas moléculas foram produzidas inicialmente (Nolan and Lok, 2012). A sua utilização em filárias que afetam humanos (ex.: *Onchocerca volvulus*) tem sido um sucesso no tratamento dos mesmos (Basáñez et al., 2008). A aplicação de ivermectina no tratamento de *O. volvulus*

levou a morte das microfilárias já pré-existentes. Também houve uma redução das formas imaturas em circulação, não por efeitos embriotóxicos, mas sim por impedir a libertação das mesmas do útero grávido das fêmeas. Este potencial embrioestático leva à morte das formas larvares no útero dos nematodes (Basáñez et al., 2008).

A sua utilização como uso profilático ainda está a ser alvo de estudo e apenas a milbemicina oxima é recomendada nos cães para controlo de *O. lupi* (Tahir et al., 2019).

5 Rastreio de parasitismo por filárias em cães e gatos

5.1 Materiais e métodos

O estudo foi realizado em cães e gatos que se deslocaram a CAMV (Centros de Atendimento Médico-Veterinário) das regiões de Elvas e centro de Lisboa onde os tutores habitavam. Em Elvas foram obtidas amostras no período entre março de 2019 e dezembro de 2019 e em Lisboa no período de janeiro de 2020 a julho de 2020.

As amostras foram obtidas por biópsia de pele com recurso a lâmina de bisturi durante procedimentos cirúrgicos efetuados em cada CAMV, nomeadamente ovariectomias, castrações, mastectomias, ortopedias, entre outros. As biópsias foram feitas nas regiões onde se efetuaram as incisões cirúrgicas, reduzindo assim a relutância por parte dos tutores ao permitir a participação dos seus animais no estudo. O consentimento e pedido de autorização por parte dos tutores foi feito através de uma declaração de aceitação assinada pelos mesmos. Cada amostra foi acompanhada de um inquérito com algumas informações específicas de cada animal que seriam relevantes para o estudo em causa.

As amostras de pele obtidas foram de um tamanho aproximado de 0,01 cm³ (0,2x0,2x0,2 cm). Após a sua colheita, estas foram colocadas em tubos de *Eppendorf* de 1,5 ml, com solução salina isotónica e seguidamente incubadas a uma temperatura de 30°C durante 12 horas. Foram depois colocadas à temperatura ambiente e 24 horas após a colheita, as amostras foram acondicionadas em álcool a 70% a fim de preservar as amostras e eventuais formas larvares que elas tivessem.

Para a análise das amostras, no Laboratório de Parasitologia Victor Caeiro na Universidade de Évora, foram colocados 50 µl do sedimento das amostras numa lâmina

de microscópio e observadas ao microscópio ótico com magnificação de 40x e 100x. A observação teve como objetivo a identificação qualitativa e quantitativa de microfilárias.

5.2 Distribuição das amostras

Como é possível identificar na figura 11, o número de animais analisados na região de Elvas foi superior dentro dos limites da cidade, apesar de haver casos em aldeias da periferia, exemplo de Vila Fernando, Vila Boim, Santa Eulália e São Vicente e Ventosa. A zona é caracterizada pela fusão de ambiente citadino e rural característico das cidades alentejanas. Em todos os locais existem pequenos ribeiros que aumentavam o seu caudal durante o inverno e a primavera e que durante o verão se apresentavam sem água.



Figura 11 - Mapa de Elvas com menção da localização habitacional dos animais pertencentes ao estudo

Legenda: ● - Localização habitacional dos animais do estudo

No caso de Lisboa, como evidenciado na figura 12, os animais possuíam uma maior dispersão, sendo o concelho de Loures quem apresenta maior número de amostras. Em menor número temos os concelhos de Mafra, Sintra, Cascais e Lisboa. Ocorrendo uma maior dispersão na localização dos animais, houve animais que viviam em locais mais rurais como nos casos dos concelhos de Mafra e Loures e animais com habitação em locais mais urbanos, como é o caso dos animais dos concelhos de Cascais, Sintra e Lisboa. As habitações dos animais pertencentes ao concelho de Loures localizavam-se perto de

pequenos ribeiros com aumento do caudal na época das chuvas mas também afluentes de maior caudal que vão terminar no rio Trancão, um dos afluentes do rio Tejo. Os animais do estudo pertencentes aos concelhos de Lisboa e Cascais, estavam a uma distância inferior a 5 quilómetros do rio Jamor que termina no rio Tejo. Em Sintra, os animais apresentavam várias ribeiras nas imediações e rios, exemplo do Rio Touro. Na zona de Mafra tal como nas outras regiões existem várias ribeiras, o rio Lizandro e o rio do Sobral, a passar próximo dos locais de habitação.



Figura 12 - Mapa de Lisboa com a localização habitacional dos animais pertencentes ao estudo

Legenda: ● - Localização habitacional dos animais do estudo

5.3 Caracterização dos animais

Tabela 1 - Número total de animais rastreados

Resultados	Elvas	Lisboa	Total
Nº de gatos	21 (42%)	18 (44%)	39 (42%)
Nº de cães	29 (58%)	23 (56%)	52 (57%)
Total	50 (100%)	41 (100%)	91 (100%)

O número total de amostras obtido nas regiões de Elvas foi de 50 e em Lisboa 41.

Em Elvas, 58% pertenciam a cães e 42% a gatos (Tabela 1). Em Lisboa, 56% eram de cães e 44% referiam-se a gatos (Tabela 1).

5.3.1 Região de Elvas



Gráfico 1- Grupos etários dos cães nas amostras da região de Elvas

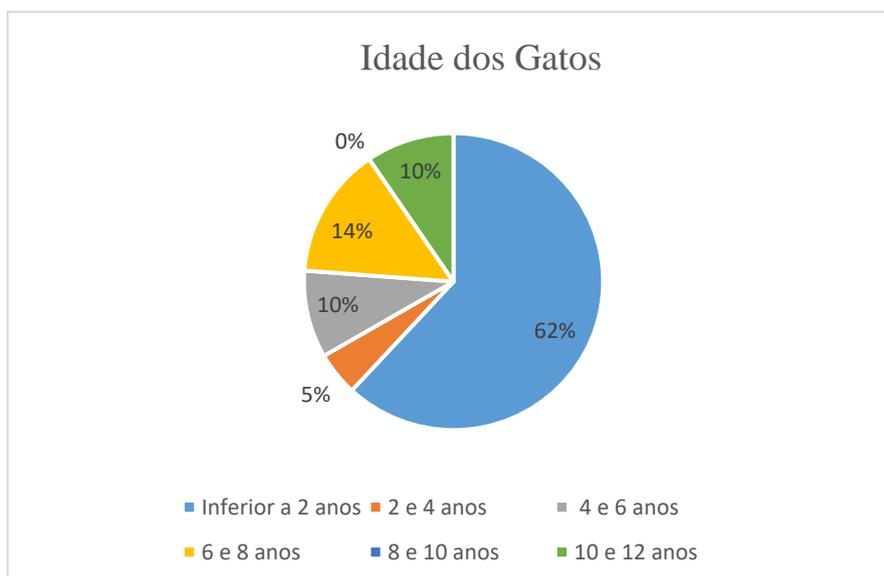


Gráfico 2 - Grupos etários dos gatos nas amostras da região de Elvas

Em Elvas, o número de amostras obtidas em cães (Gráfico 1) foi superior nos animais inferiores a dois anos e entre os dois e quatro anos, perfazendo um número de sete (24%) amostras em cada. Entre os quatro e os seis anos, foi obtido um número de cinco (17%) amostras. Nas idades compreendidas entre os seis e os oito anos de idade foram obtidas duas (7%) amostras de pele. No intervalo de idade entre os oito e dez anos entre os dez a doze anos, houve um número de cinco (17%) e três (10%) amostras respetivamente.

O número de amostras em gatos destacou-se mais nos animais com idades inferiores a dois anos (Gráfico 2), obtendo-se um número de treze (62%) das amostras. Colheu-se uma (5%) num animal com dois anos, duas (10%) amostras de animais com idades compreendidas entre os quatro e os seis anos e por fim duas (10%) amostras em animais com idade entre os dez e os doze anos.

Os cães com idades inferiores a dois anos (24% dos cães da amostra) (Tabela 2) tinham um (14%) animal com idade inferior a seis meses. Havia dois (29%) indivíduos com idades compreendidas entre os seis e os doze meses, entre os doze e os dezoito haviam três (43%) animais e finalmente no intervalo de idade dos dezoito aos vinte e quatro meses tínhamos um (14%) indivíduo.

Com idade inferior a dois anos (62% dos gatos da amostra), apenas existiam gatos (Tabela 2) com idades entre os seis e doze meses e dezoito e entre os vinte e quatro meses, com sete (54%) e seis (46%) animais respetivamente.

Tabela 2 - Animais com idades inferiores a dois anos na região de Elvas

Idade (meses)	Espécie (Nº animais)	
	Cães	Gatos
0-6 meses	1 (14%)	0
6-12 meses	2 (29%)	7 (54%)
12 -18 meses	3 (43%)	6 (46%)
18 - 24 meses	1 (14%)	0
Total < 2 anos	7 (24%)	13 (62%)

Em relação ao tipo de alojamento as percentagens são iguais em ambas as espécies, havendo 38% (11 cães e oito gatos) com alojamento exterior e 62% (18 cães e 13 gatos) em alojamento interior (Tabela 3). Interpreta-se alojamento exterior como pequenas

habitações adequadas para animais, exemplo de casotas, onde estes animais têm contacto com o meio ambiente. No caso do alojamento interior, entende-se como coabitação com os tutores dentro de casa.

Tabela 3 - Distribuição do tipo de alojamento na região de Elvas.

Espécie	Tipo de Alojamento (Nº de animais)	
	Exterior	Interior
Cães	11 (38%)	18 (62%)
Gatos	8 (38%)	13 (62%)

Em Elvas, quer os cães que apresentavam alojamento exterior, quer os que coabitavam com os tutores tinham acesso à via pública (Tabela 4). Este acesso à rua, corresponde ao passeio higiénico do animal.

Todos os gatos com habitação exterior possuíam acesso à rua e oito (62%) dos animais desta espécie com alojamento interior tinham acesso à via pública (Tabela 4).

Tabela 4 - Relação entre o tipo de alojamento e o acesso à via pública na região de Elvas

	Cães Alojamento		Gatos Alojamento	
	Exterior	Interior	Exterior	Interior
C/ acesso à rua	11 (100%)	18 (100%)	8 (100%)	8 (62%)
S/ acesso à rua	0	0	0	5 (38%)

Como mencionado anteriormente, todos os cães tinham acesso à rua mas com frequência diferente, havendo um (3%) dos animais a ir duas vezes por dia, doze (42%) a irem três vezes e finalmente dezasseis (55%) cães frequentavam a via pública mais do que três vezes por dia (Tabela 5). No caso dos dezasseis gatos com acesso à via pública, possuíam-no de forma indeterminada, e como tal todos apresentavam uma frequência superior às três vezes diárias (Tabela 5).

Tabela 5 - Relação entre o acesso à via pública e o número de passeios diários na região de Elvas

Nº de vezes	Cães Acesso à rua		Gatos Acesso à rua	
	C/ acesso	S/ acesso	C/ acesso	S/ acesso
1	0	0	0	0
2	1 (3%)	0	0	0
3	12 (42%)	0	0	0
>3	16 (55%)	0	16 (100%)	0
Total	29 (100%)	0	16 (76%)	5 (24%)

Em ambas as espécies, os animais com acesso à rua, apresentavam contacto com arbustos (Tabela 6).

Tabela 6 - Relação entre o tipo de alojamento, o acesso à via pública e a proximidade de arbustos na região de Elvas

	Tipo de alojamento	
	Exterior	Interior
Cães Acesso à rua e arbustos	11 (100%)	18 (100%)
Gatos Acesso à rua e arbustos	8 (100%)	8 (100%)

Em relação à desparasitação, vinte e um (72%) dos cães estavam com a desparasitação em dia (Gráfico 3) sendo que destes 72%, dezanove (90%) apresentavam apenas desparasitação com ação contra ectoparasitas (Gráfico 4), mais concretamente carraças, que são os vetores de interesse para o estudo. Nenhum deles possuía desparasitação exclusiva microfilaricida bem como uma associação de um agente microfilaricida com outro ectoparasiticida. Ainda existiam dois (10%) animais desparasitados mas sem ação contra os parasitas em questão.

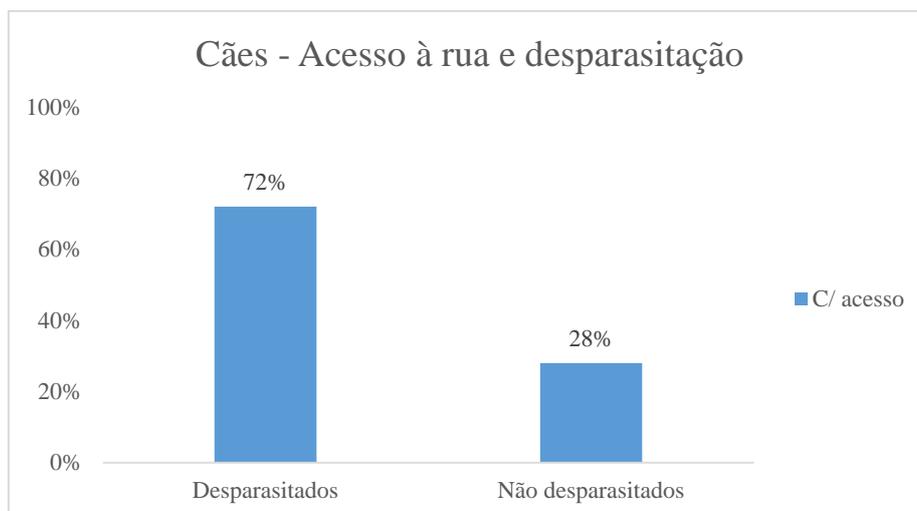


Gráfico 3 - Cães com acesso à via pública e o estado de desparasitação na região de Elvas

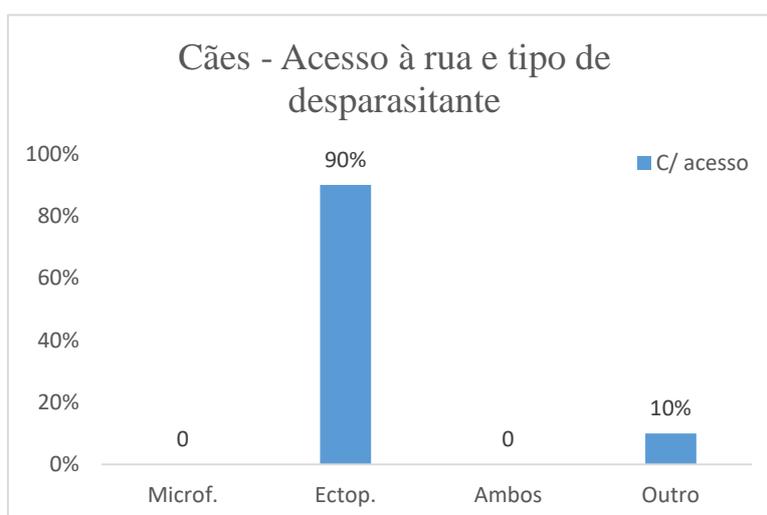


Gráfico 4 - Cães desparasitados com acesso à via pública e o tipo de desparasitante usado nos mesmos na região de Elvas
 Legenda: Microf.: Microfilaricida. Ectop.: Ectoparasiticida

Dos gatos que tinham acesso ao exterior, 11 (69%) estavam desparasitados (Gráfico 5), sendo que destes, apenas quatro (36%) tinham um agente microfilaricida, e um (9%) um agente ectoparasiticida com ação contra carraças (Gráfico 6). Dos animais desparasitados, seis (55%) tinham outro tipo de desparasitação que não apresentava interesse para o estudo em causa (Gráfico 6). Os gatos que não possuíam acesso à rua estavam todos desparasitados (Gráfico 5), sendo que um (20%) apresentava desparasitação

microfilaricida exclusiva e um (20%) possuía a associação de um agente microfilaricida com outro ectoparasiticida (Gráfico 6).

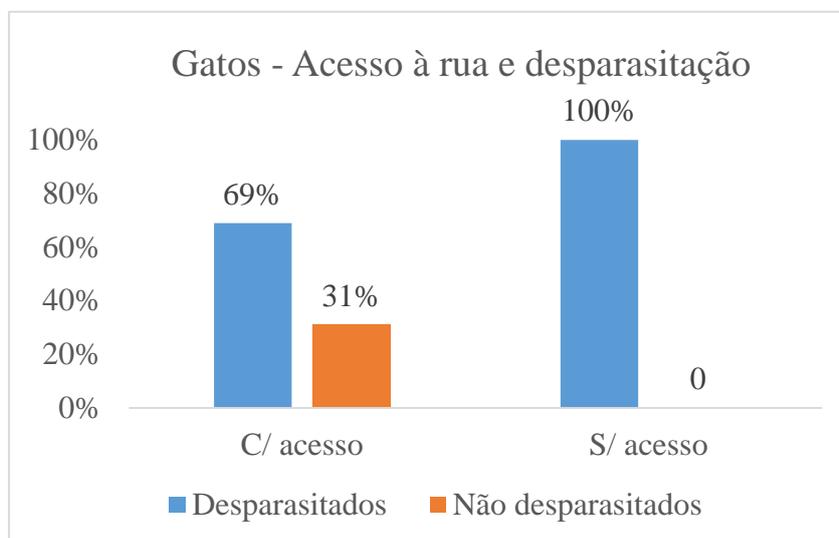


Gráfico 5 - Gatos com e sem acesso à via pública e o estado de desparasitação na região de Elvas

Por fim, três (60%) gatos desparasitados, possuíam desparasitação para outro tipo de espécies alvo que não as de interesse para o presente trabalho (Gráfico 6).

Nos animais desparasitados com princípios ativos de interesse para o estudo, o ectoparasiticida mais usado nos cães a flumetrina (47%), seguido da permetrina (32%), fluralaner (16%) e afloxaner (5%) (Gráfico 7).

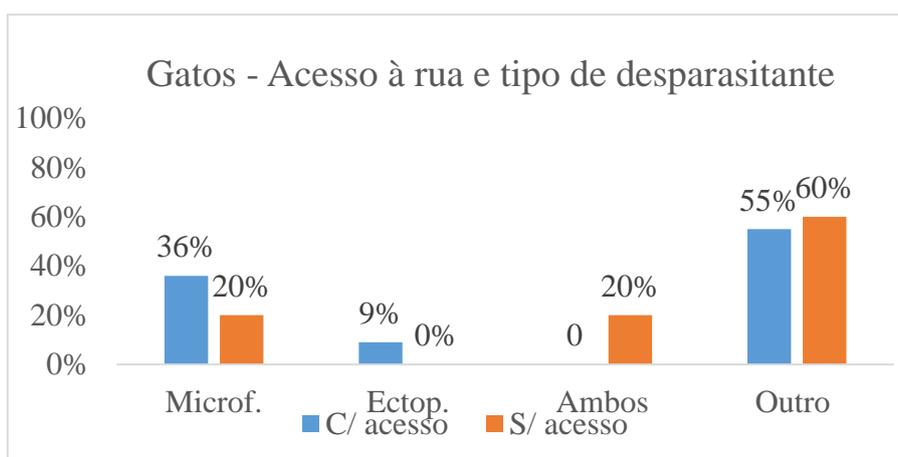


Gráfico 6 - Gatos com e sem acesso à via pública e tipo de desparasitante na região de Elvas.

Legenda: Microf.: Microfilaricida. Ectoparasiticida; Ectoparasiticida.

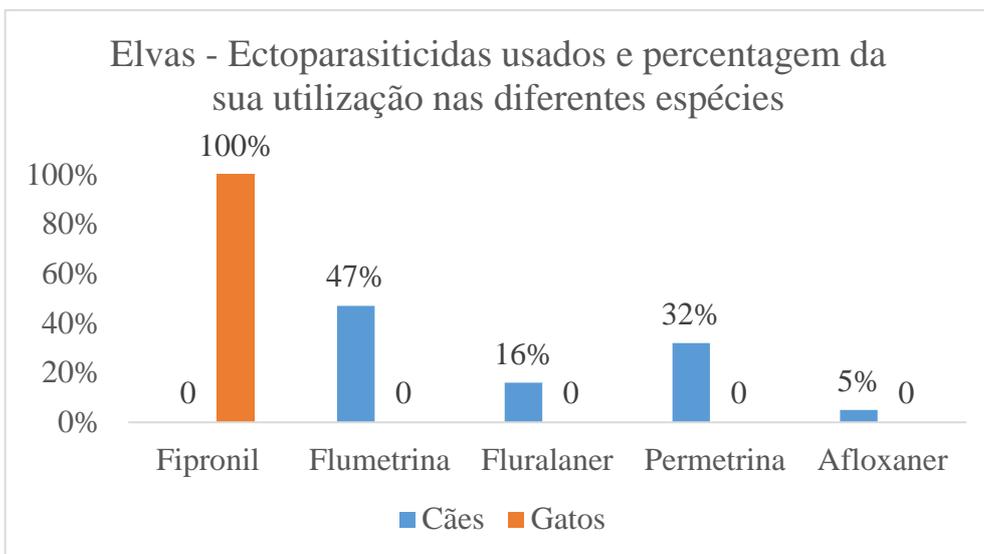


Gráfico 7 - Ectoparasiticidas usados na região de Elvas.

Nos gatos houve uso exclusivo de fipronil (100%). Verifica-se que não houve cães a usar o fipronil (0%).

Não houve o uso de agentes microfilaricidas por cães. Dentro dos microfilaricidas usados nos gatos (Gráfico 8), a moxidectina foi a mais frequente (83%) seguida da eprinomectina (17%).

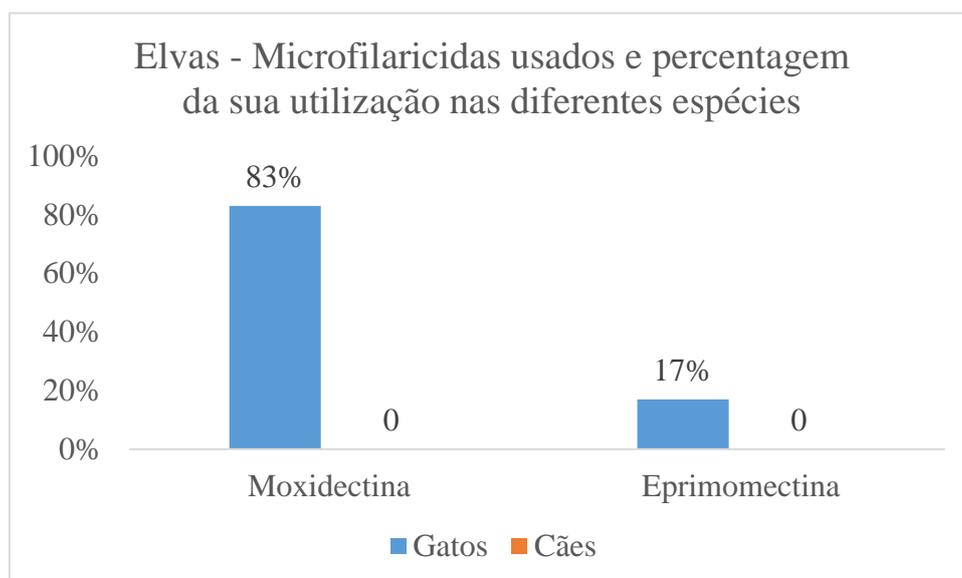


Gráfico 8 - Microfilaricidas usados na região de Elvas

5.3.2 Lisboa

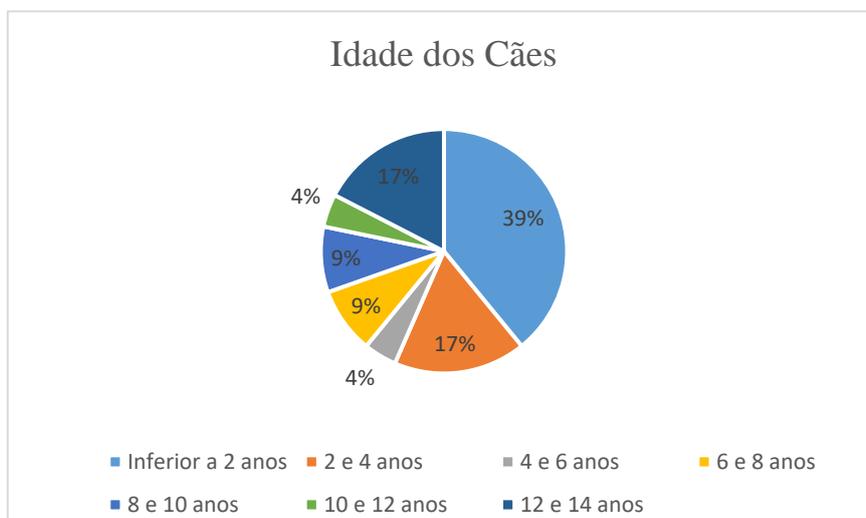


Gráfico 9 - Grupos etários dos cães nas amostras da região do centro de Lisboa

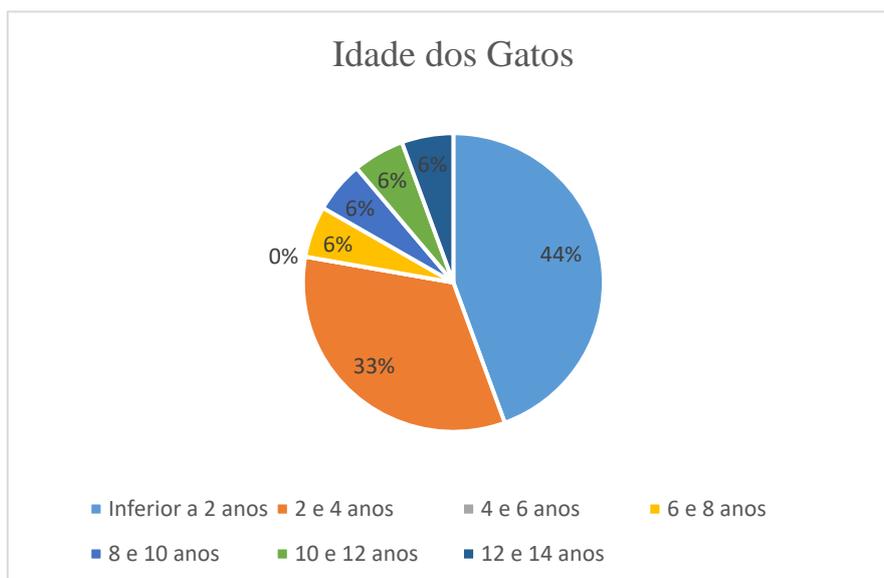


Gráfico 10 - Grupos etários dos gatos nas amostras da região do centro de Lisboa

O número de amostras obtidas em cães na região de Lisboa (Gráfico 9) foi superior em animais com idade inferior a dois anos, totalizando nove (39%) animais. No intervalo de dois e quatro anos de idade, foram obtidas quatro (17%) amostras. Apenas foi obtida uma (4%) amostra num animal com quatro anos. Nos intervalos de seis a oito anos e de oito a

dez anos, foram obtidas duas (9%) amostras em cada. Entre os dez e doze anos houve um (4%) animal incluído no estudo e por fim, no intervalo dos doze aos catorze anos foram obtidas quatro (17%) amostras.

Houve maior número de amostras em gatos com idades inferiores a dois anos, perfazendo um total de oito (44%). Entre os dois e os quatro anos foram obtidos um número de seis (33%) amostras em gatos. À exceção do intervalo de idades seguinte que não teve animais, as restantes idades tiveram uma (6%) amostra em cada (Gráfico 10).

Dentro do intervalo de idades inferiores a dois anos (39% dos cães da amostra) (Tabela 7), temos quatro (44%) cães com idade entre os seis e os doze meses. Entre os doze e os dezoito temos dois (22%) animais e no intervalo dos dezoito e os vinte e quatro meses de idade temos três (33%) cães.

No que diz respeito às idades dos gatos (44% dos gatos da amostra) (Tabela 7), temos um (12,5%) animal com idade inferior a seis meses e entre os seis e os doze meses. Com cinco (62,5%) gatos, temos o intervalo de idades de doze e dezoito meses e finalmente, com um individuo (12,5%), temos o intervalo de idades dos dezoito aos vinte e quatro meses.

Tabela 7 - Animais com idades inferiores a dois anos na região do centro de Lisboa

Idade (meses)	Espécie (Nº animais)	
	Cães	Gatos
0-6 meses	0	1 (12.5%)
6-12 meses	4 (44%)	1 (12.5%)
12 -18 meses	2 (22%)	5 (62.5%)
18 - 24 meses	3 (33%)	1 (12.5%)
Total < 2	9 (39%)	8 (44%)

Quanto ao tipo de alojamento, seis (26%) cães tinham alojamento exterior, enquanto dezassete (74%) dos restantes coabitam com os tutores (Tabela 8).

No caso dos gatos, seis (33%) dos animais do estudo viviam no exterior e 12 (67%) dentro de casa (Tabela 8).

Tabela 8 - Distribuição do tipo de alojamento na região do centro de Lisboa

Espécie	Tipo de Alojamento (Nº de animais)	
	Exterior	Interior
Cães	6 (26%)	17 (74%)
Gatos	6 (33%)	12 (67%)

Como é possível observar na tabela 9, todos os cães tinham acesso à via pública, no entanto um (4%) dos animais tinham acesso uma vez por dia, nove (40%) dos animais iam duas vezes por dia à rua, seis (26%) iriam três vezes por dia e finalmente sete (30%) dos animais do estudo com mais de três idas ao espaço público (Tabela 10).

Nos seis gatos com acesso à rua (Tabela 9), todos os animais frequentavam mais de três vezes por dia, uma vez que os gatos tinham livre acesso ao espaço (Tabela 10).

Tabela 9 - Relação entre o tipo de alojamento e o acesso à via pública na região do centro de Lisboa

	Cães Alojamento		Gatos Alojamento	
	Exterior	Interior	Exterior	Interior
C/ acesso à rua	6 (100%)	17 (100%)	6 (100%)	0
S/ acesso à rua	0	0	0	12 (100%)

Tabela 10 - Relação entre o acesso à via pública e o número de passeios diários na região do centro de Lisboa

Nº de vezes	Cães Acesso à rua		Gatos Acesso à rua	
	C/ acesso	S/ acesso	C/ acesso	S/ acesso
1	1 (4%)	0	0	0
2	9 (40%)	0	0	0
3	6 (26%)	0	0	0
>3	7 (30%)	0	6 (100%)	0
Total	23 (100%)	0	6 (33%)	12 (67%)

Tal como em Elvas, todos os animais com acesso à via pública, têm acesso a arbustos (Tabela 11).

Tabela 11 - Relação entre o tipo de alojamento, o acesso à via pública e a proximidade de arbustos na região do centro de Lisboa

	Tipo de alojamento	
	Exterior	Interior
Cães Acesso à rua e arbustos	6 (100%)	17 (100%)
Gatos Acesso à rua e arbustos	6 (100%)	0

Como mencionado anteriormente, todos os cães tinham acesso à rua e dezassete (74%) dos mesmos estavam desparasitados (Gráfico 11). Dos animais desparasitados, doze (70%) tinham um desparasitante adequado contra carraças, dois (12%) tinham uma associação de um agente microfilaricida e de outro ectoparasiticida. Ainda inserido neste grupo, três (18%) dos animais possuíam outro tipo de desparasitação (Gráfico 12).

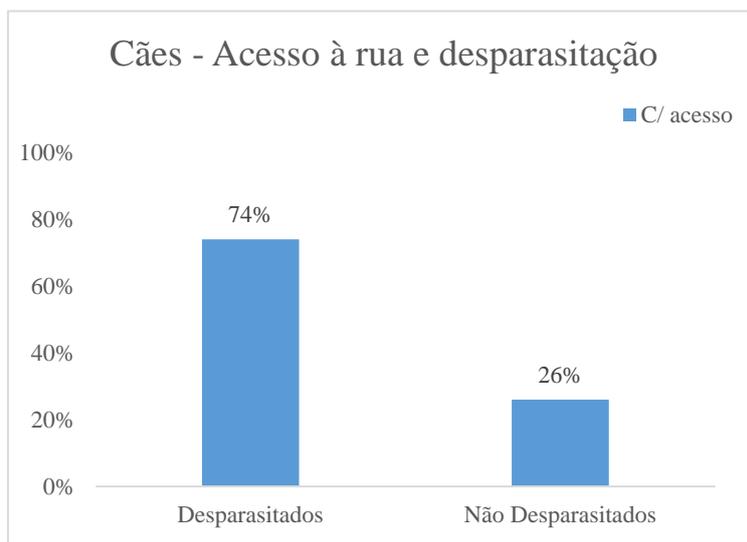


Gráfico 11 - Cães com acesso à via pública e o estado de desparasitação na região do centro de Lisboa

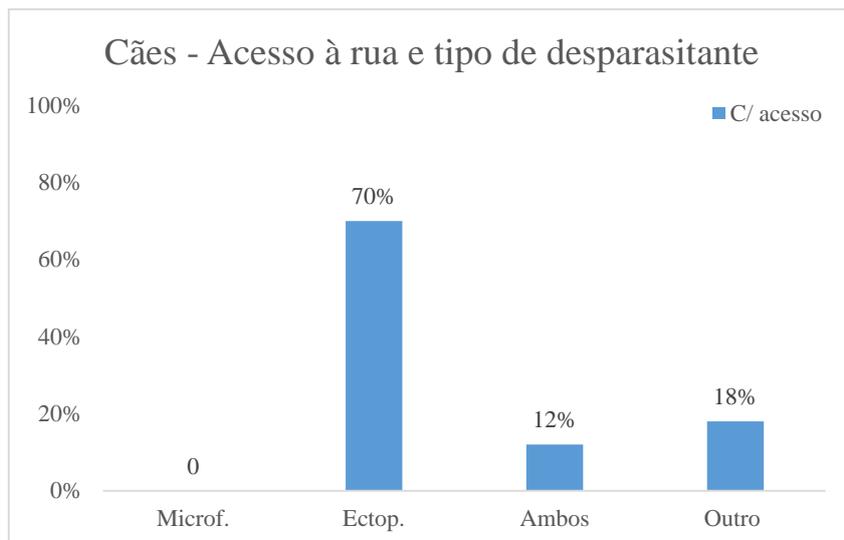


Gráfico 12 - Cães com acesso à via pública e o tipo de desparasitante na região do centro de Lisboa

Legenda: Microf.: Microfilaricidas. Ectop.: Ectoparasiticidas

Dos gatos com acesso à rua, dois (33%) exibiam desparasitação exclusiva contra microfilárias (Gráfico 13 e 14). Já os gatos sem acesso detinham sete (58%) animais desparasitados e destes, três (43%) eram desparasitados por um microfilaricida, outros três (43%) por uma associação de microfilaricida com um ectoparasiticida. Por fim, os existia um (14%) animal desparasitado por outro tipo de princípios ativos.

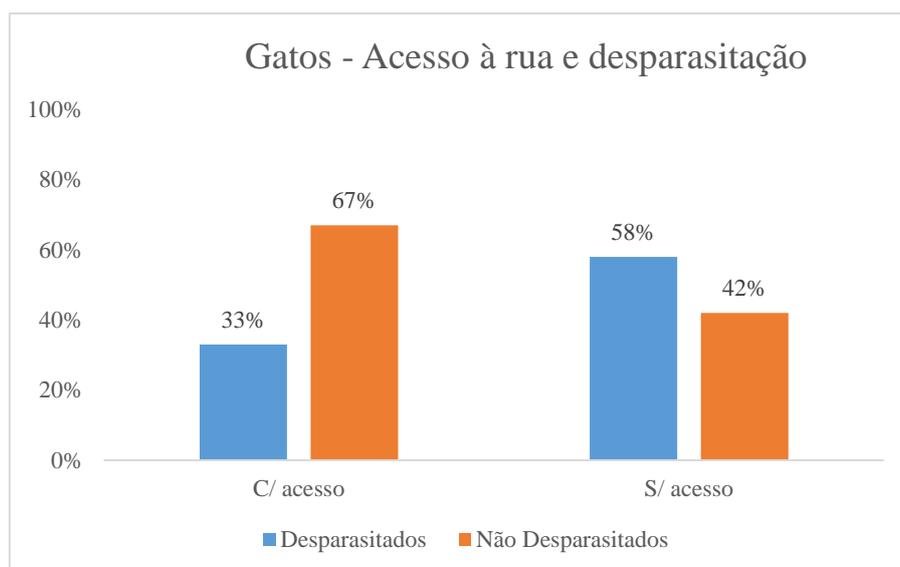


Gráfico 13 - Gatos com e sem acesso à via pública e o estado de desparasitação na região do centro de Lisboa.

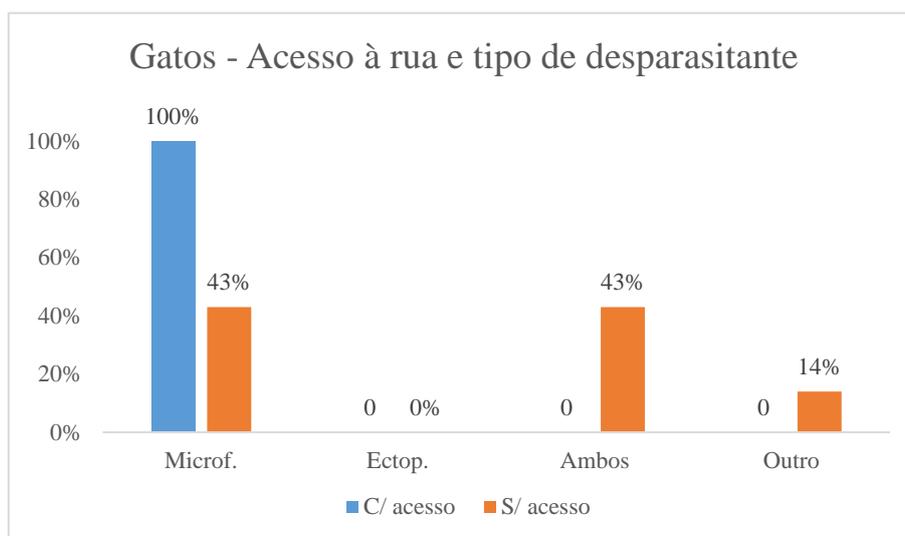


Gráfico 14 - Gatos com e sem acesso à via pública e o tipo de desparasitante na região do centro de Lisboa

Legenda: Microf.: Microfilaricidas. Ectop.: Ectoparasiticidas

Na região de Lisboa, houve uma maior variedade de princípios ativos utilizados (Gráfico 15), sendo o uso de permetrina nos cães superior aos demais (38%), seguida da flumetrina (22%), o piriproxifen (17%), o afloxaner (11%) e finalmente a deltametrina e o fluralaner em igualdade de uso (6%). No caso concreto dos gatos o fipronil foi o mais utilizado (40%) e em igualdade de uso (20%) temos o piriproxifen, sarolaner e o lotilaner.

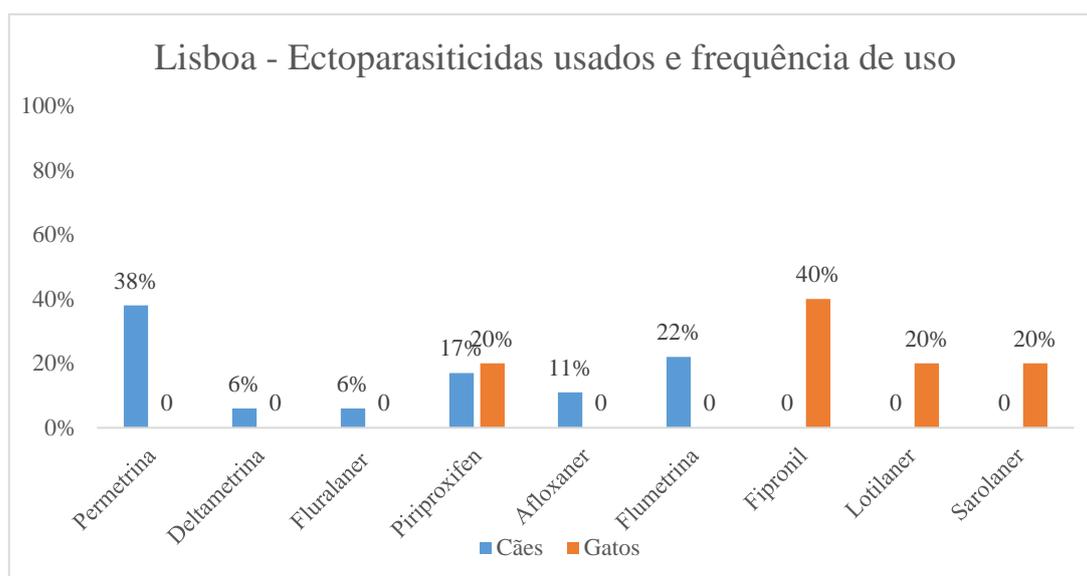


Gráfico 15 - Ectoparasiticidas usados na região do centro de Lisboa

Dentro dos microfilaricidas usados (Gráfico 16), para os cães recorreu-se apenas a dois princípios ativos: a milbemicina oxima e a ivermectina com igualdade de percentagem (50%). Nos gatos houve uma maior variabilidade de agentes microfilaricidas usados, pelo que a milbemicina oxima foi a mais usada (46%), seguida da selamectina (27%), a eprinomectina (18%) e finalmente a moxidectina (9%).

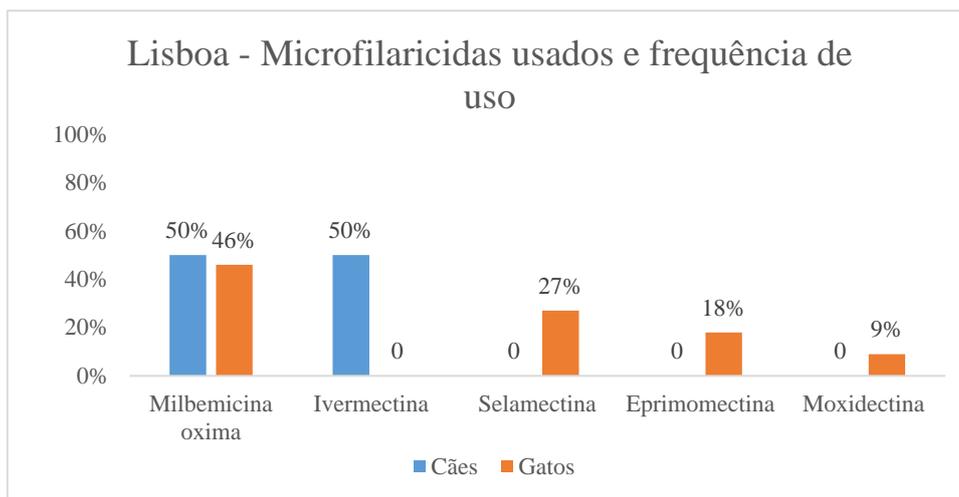


Gráfico 16 - Microfilaricidas usados na região do centro de Lisboa

5.4 Resultados da colheita

Tabela 12 - Resultados obtidos das amostras colhidas na região de Elvas e Lisboa

Resultados da colheita	Elvas		Lisboa	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Cães	0	29 (100%)	1 (4%)	22 (96%)
Gatos	0	21 (100%)	0	18 (100%)

Dentro das amostras colhidas (Tabela 12), apenas uma (4%) amostra de Lisboa foi positiva para a presença de microfilárias. Dentro desta mesma amostra, foi encontrada uma única microfilária. Esta amostra foi obtida em Lisboa, no mês de junho de 2020. O

animal era uma cadela de raça Podengo com idade de 7 anos residente na aldeia da Manjoeira (Figura 13), concelho de Loures. Possuía alojamento exterior e consequentemente acesso a arbustos, com acesso à via pública mais de três vezes diárias e não estava desparasitada.



Figura 13 - Localidade de residência (da região de Lisboa) do cão onde foi obtida a amostra positiva do estudo. Mapa obtido através da aplicação My maps

Legenda:  - Localidade de residência

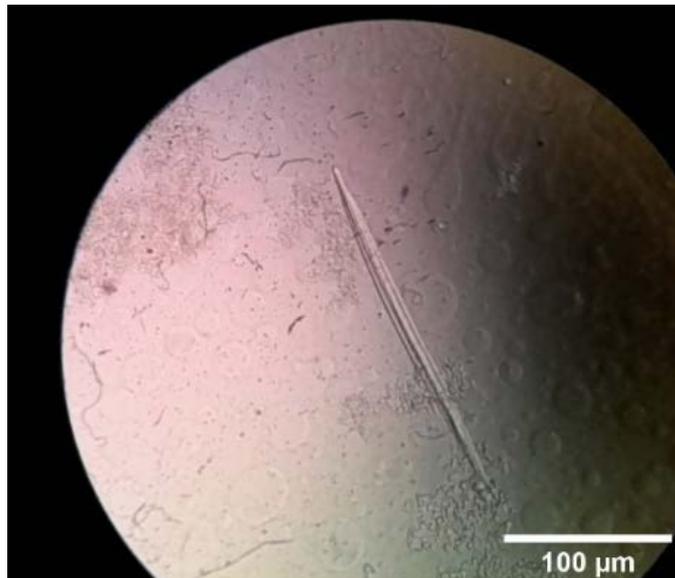


Figura 14 - Parasita do género *Cercopitífilaria* spp. observado no microscópio ótico com magnificação de 100x. Imagem original.



Figura 15 - Parasita do género *Cercopithifilaria* spp. observado no microscópio ótico com magnificação de 100x. Imagem original.

A microfilaria encontrada pertence ao género *Cercopithifilaria* (Figura 14 e 15), segundo o seu comprimento de 232 μm , largura de 12,1 μm , e asas laterais que lhe conferem uma forma navicular característica dos parasitas desta espécie podemos afirmar que é uma microfilaria da espécie *Cercopithifilaria* sp. II.

6 Discussão

6.1 *Onchocerca lupi*

Epidemiologia

Pensa-se que nas zonas onde foram descritos casos de onchocercose a distribuição geográfica deste parasita esteja relacionada com a presença e propagação do possível vetor para novas zonas (Otranto et al., 2013b).

Seria espectável serem encontrados alguns indivíduos parasitados, dadas as condições propícias para o desenvolvimento dos possíveis vetores de *O. lupi* na zona mediterrânea, nomeadamente, a nível de clima (Adler and McCreadie, 2019; Tahir et al., 2019), não tendo sido identificadas até ao momento diferenças significativas entre a região do Alentejo, a de Lisboa e o Algarve. Sabe-se que o possível vetor do parasita *O. lupi* não se

afasta mais do que um raio de cinco quilómetros da zona de eclosão dos ovos (Adler and McCreadie, 2019). No presente estudo, verificou-se que todos os animais viviam numa área favorável ao desenvolvimento de vetores.

Número de animais da amostra

Comparando com estudos de vigilância epidemiológica feitos anteriormente em Portugal (Otranto et al., 2013d; Maia et al., 2015), o número de animais usado neste estudo foi inferior. Só por si, o número de amostras não é a explicação dos resultados obtidos no estudo, visto que no estudo feito no Algarve (Otranto et al., 2013d), estava inserida uma pesquisa do parasita *O. lupi* na Grécia, com um número de 23 (27% das amostras obtidas no Algarve) cães. Comparando o número de amostra de pele colhidas no Algarve em dois estudos anteriores (Otranto et al., 2013d; Maia et al., 2015) com o número obtido no presente trabalho, estão representados 61% dos cães (52/84) e 25% (39/155) dos gatos (Tabela 1).

Idade dos animais

A espécie do nematode *O. lupi* tem sido identificada em animais com mais de um ano de idade e pensa-se que este facto esteja associado ao seu longo período de incubação, que vai de alguns meses até anos (Otranto et al., 2015b; Edelmann et al., 2018).

Tendo em conta o longo período de incubação, existe pouca probabilidade dos animais com menos de um ano serem positivos, excluindo-se assim deste estudo três (9%) cães e sete (33%) gatos de Elvas e quatro (17%) cães e dois (11%) gatos de Lisboa.

Região do corpo onde é feita a biópsia

O ritmo circadiano sugere a existência de um vetor que parasite intermitentemente o hospedeiro, e que a concentração de microfilárias no corpo do animal seja superior nas zonas de alimentação desse vetor (região da cabeça e região interescapular) e durante a tarde, fase do dia em que há maior atividade dos vetores (Otranto et al., 2013c)

No estudo foram colhidas amostras maioritariamente na região do abdómen, onde ocorreram grande parte das incisões cirúrgicas. A localização da zona de biópsia não foi

a mais recomendada, permitiu contornar alguma relutância em autorizar incisões extra por parte dos tutores e minimizar a lesão nos animais. As concentrações de parasitas que foram colhidos em amostras de pele de quatro animais na região da cabeça e região umbilical foram similares (Széll et al., 2001).

A fase do dia em que foram colhidas as amostras não foi padronizada, uma vez que a colheita foi feita mediante a disponibilidade dos tutores e da calendarização dos procedimentos cirúrgicos pelos CAMV. Este fator poderá condicionar a concentração de parasitas nas amostras de pele reduzindo assim a probabilidade de obtenção de amostras positivas para aquelas que foram colhidas durante a manhã.

As amostras de pele foram obtidas quer numa região geográfica, quer noutra, num grande período de tempo, sendo que as amostras de Elvas foram obtidas na primavera, verão e outono. As amostras de Lisboa foram obtidas no inverno, primavera e verão. Os possíveis vetores do parasita possuem uma atividade superior na primavera e no verão mas após a alimentação do vetor e transmissão das formas infetantes, o período de incubação é longo até que se observem as microfírias resultantes desta infeção (Edelmann et al., 2018). Podemos verificar assim que as amostras poderiam ser positivas em qualquer fase do ano mas em diferentes contextos. Uma vez que o período pré-patente do parasita pode ser superior a um ano (no caso de *O. lupi*), em áreas endémicas, se os animais não forem desparasitados com fármacos com ação sobre filárias, é expectável que exista infeção por este tipo de parasitas, decorrente de anterior parasitismo (no presente ano ou em anos anteriores) por vetores (Edelmann et al., 2018).

Presentemente, a técnica mais sensível para identificação de microfírias de *O. lupi* em animais assintomáticos é a biópsia cutânea (Otranto et al., 2015b). No entanto, como mencionado anteriormente, existe uma elevada quantidade de falsos negativos caso haja colheita de amostras no período pré-patente da infeção (Otranto et al., 2013d).

Alojamento dos animais e hábitos quotidianos

Os animais que apresentam um número superior de passeios à rua, terão maior probabilidade de contacto com vetores de parasitas. Verificou-se que todos os animais do estudo têm na proximidade uma fonte de água num raio inferior a cinco quilómetros. Estas condições favorecem o desenvolvimento de simulídeos, os prováveis vetores de *O. lupi* e um maior risco de infeção dos hospedeiros definitivos (Adler and McCreadie, 2019;

Hoerauf, 2011). Em Elvas, todos os cães tinham acesso à rua mais de duas vezes por dia e desses vinte e nove animais, onze (38%) têm habitação exterior e dezoito (62%) vivem no interior de habitações. Os cães que vivem no exterior, estão constantemente sujeitos a exposição ao vetor, havendo uma maior probabilidade de contacto nestes animais. Já nos gatos, como os animais que têm acesso ao exterior é feito de forma indeterminada, temos dezasseis (76%) dos vinte e um animais com maior probabilidade de exposição ao parasita.

Tal como em Elvas, todos os cães de Lisboa têm acesso à rua, mas apenas seis (26%) animais vivem no exterior e os restantes dezassete (74%) coabitam com os seus tutores. Apenas um animal vai uma única vez por dia à rua e os restantes vinte e dois vão mais do que uma única vez. Isto permitiria que mesmo os animais que vivem mais protegidos no interior de casa, tivessem pelo menos uma vez ao dia contacto com o vetor, ainda que por curto período de tempo. No caso concreto dos gatos, apenas seis animais teriam uma maior exposição a vetores.

Condição profilática dos indivíduos

Pensa-se que a melhor técnica para prevenir o desenvolvimento da infeção provocada por *O. lupi* seja através da administração de milbemicina oxima em cães, especialmente durante o período de maior atividade dos possíveis vetores (de abril a outubro) (Tahir et al., 2019). Também existe a possibilidade de utilização de repelentes para os vetores como medida de prevenção da infeção (Tahir et al., 2019). Dos piretroides usados, a permetrina é a que apresenta alguma eficácia relativamente a simúlideos (Shemanchuk and Taylor, 1984). No entanto, a eficácia conhecida foi apenas testada em ruminantes, não existindo estudos que comprovem a sua eficácia em cães (Khan, 1981). Estes poderão ser considerados como medida adjuvante à prevenção, assumindo que os animais não estão efetivamente protegidos pelo uso exclusivo deste tipo de agente (Tahir et al., 2019). Nos gatos não se utilizam piretroides como repelente de vetores, dado o elevado risco de intoxicação para esta espécie (Boland and Angles, 2010).

As lactonas macrocíclicas parecem ter efeito microfilaricida (Nolan and Lok, 2012) e, não havendo estudos que refutem o contrário, podemos assumir apenas a milbemicina oxima como medida preventiva eficaz (Tahir et al., 2019).

No estudo efetuado, em Elvas nenhum cão estava desparasitado com microfilaricida. Dos gatos desparasitados, 36% (4/12) dos que tinham acesso à rua e 20% (2/5) dos não possuíam acesso, estavam desparasitados com um agente microfilaricida. O microfilaricida mais usado foi a moxidectina (cinco animais) seguida da eprinomectina (um animal). Não esquecendo o efeito repelente que possa haver em alguns ectoparasiticidas, dos cães desparasitados, 79% (15/29) foram desparasitados por um piretroide.

Apesar da flumetrina ser um piretroide sintético, não foram encontrados estudos da sua eficácia contra os vetores em questão, havendo assim 32% (seis) de cães desparasitados. Em Lisboa, apenas 12% (2/17) dos cães desparasitados possuíam desparasitação microfilaricida, estando associada a um agente ectoparasiticida, um com permetrina e outro com afloxaner. Já no caso dos gatos, todos (dois) os que tinham acesso à rua e que estavam desparasitados, estavam com um agente microfilaricida: um gato com selamectina e outro com milbemicina oxima. Dos gatos que viviam dentro de casa, 43% (3/7) possuíam desparasitação com microfilaricida e ainda existiam outros 43% (3/7), aos quais tinha sido aplicada uma associação de um microfilaricida com um ectoparasiticida. Os agentes com ação microfilaricida usados nos cães foram a milbemicina oxima e a ivermectina (um animal em cada) e nos gatos temos por ordem decrescente de uso a milbemicina oxima (cinco animais), a selamectina (três) e a eprinomectina (dois). Um dos gatos possuía associação de selamectina com moxidectina. Quanto ao uso de ectoparasiticidas, dos cães desparasitados (74%), 70% (12/17) foram exclusivamente com um ectoparasiticida e 12% (2/17) dos animais com uma associação de um microfilaricida com um ectoparasiticida. No caso concreto dos gatos, dos 43% (3/7) sem acesso à rua e desparasitados possuíam uma associação de um microfilaricida com um ectoparasiticida. Sabendo que os piretroides apresentam efeito repelente contra a mosca negra, 38% (sete animais) dos cães usavam permetrina e 6% (seis) deltametrina.

Poder-se-á concluir que em Elvas os animais não estão protegidos contra o parasita, e que em Lisboa é aplicado tratamento profilático eficaz contra o parasita a seis animais (cinco gatos e um cão) do grupo em estudo.

A não observação de microfilárias de *O. lupi* pode estar associada a uma combinação de fatores, juntamente com o número reduzido de amostras. Os animais que reuniram as condições mais propícias para albergar este parasita são: animais com idades superiores

a um ano, com alojamento exterior e não desparasitados com milbemicina oxima. Dentro destes parâmetros, temos 12 dos 50 animais (nove cães e três gatos) em Elvas, que representam 24% da amostra. Em Lisboa esse grupo de animais (do total de 41 observados), juntou seis biopsias (três cães e três gatos), o que representa 15% das amostras. Comparativamente ao número de animais dos estudos feitos no Algarve (Otranto et al., 2013d; Maia et al., 2015), isto representa 11% e 4% dos cães de Elvas e Lisboa respetivamente e 1% dos gatos de cada região.

Tendo em conta que nos estudos mencionados do Algarve a percentagem de gatos positivos foi de 0.65% (dos 155 gatos, um foi positivo) e 8% (dos 84 cães, sete deram positivo) dos cães, não seriam espectáveis animais positivos nesta amostra para *O. lupi* considerando o número reduzido de elementos que apresentavam as condições mais favoráveis para o surgimento de infeção.

6.2 *Cercopithifilaria* spp.

Epidemiologia

O vetor de *Cercopithifilaria* spp. é uma carraça da espécie *Rhipicephalus sanguineus* que apresenta distribuição cosmopolita e, sendo característica de climas temperados, apresenta todas as condições para proporcionar a transmissão do nematode em Portugal (Dantas-Torres, 2008; Nicholson et al., 2019)..

A época do ano em que foram obtidas as amostras não é um fator condicionante (Otranto et al., 2012a). Nos países de clima temperado, existe uma maior atividade do vetor nos meses do final da primavera até ao início do outono. Observa-se assim uma maior probabilidade de aparecimento e deteção de infeção passados aproximadamente seis meses, o possível período de incubação do parasita (Dantas-Torres, 2008; Otranto et al., 2012a). A amostra positiva do estudo corrobora este fator, tendo sido obtida no mês de junho, conjecturando que a infeção tenha ocorrido no outono anterior (novembro ou dezembro). Também seria possível que as amostras obtidas nos meses de inverno possuíssem uma maior probabilidade de corresponderem a animais infetados. Isto deve-se ao possível contacto dos animais com carraças nos períodos da primavera e verão que iriam consequentemente apresentar infeção nos meses de outono e inverno (Otranto et al., 2012a). Verificou-se que esta espécie de carraças apresenta uma grande versatilidade

habitacional podendo existir em qualquer uma das zonas visadas neste estudo, quer da região de Lisboa, quer na região de Elvas (Dantas-Torres, 2008)

Número de animais

A presença de *Cercophitifilaria* spp. foi descrita em Portugal através de um estudo onde foram colhidas 102 amostras a animais nas quais 24 foram positivas para microfilárias deste género, perfazendo uma percentagem de aproximadamente 23% (Cortes et al., 2014). Noutro estudo feito numa zona da Grécia, onde se recolheram 23 amostras em cães onde uma delas foi positiva (Otranto et al., 2012b). Logo, *per si*, o número de indivíduos incluídos na amostra é importante, mas não é fator eliminatório da possibilidade de se encontrarem microfilárias, estando dependente da prevalência da infeção nessa população.

Idade dos animais

Tendo em conta que o período de incubação destes parasitas é bastante inferior ao de *O. lupi*, é espectável que surjam animais parasitados com idades inferiores a um ano (Otranto et al., 2012a), logo a idade não seria um obstáculo, tendo em conta que o animal mais jovem do estudo apresenta quatro meses.

Região do corpo onde é feita a biópsia

Tal como acontece no caso de *O. lupi*, existe desigualdade na distribuição dos parasitas nas diferentes regiões do corpo (Otranto et al., 2012a). As zonas onde existe maior concentração de parasitas e onde é aconselhada a colheita das amostras será também na região da cabeça, pescoço e orelhas (Otranto et al., 2012a). Como mencionado anteriormente, este requisito não foi cumprido para reduzir a relutância por parte dos tutores ao entrar no estudo. No entanto, verificou-se que, mesmo em pequena percentagem, é possível encontrar parasitas na região ventral do animal (Otranto et al., 2012a). O caso concreto da amostra positiva do estudo, foi de uma cadela ovário-histerectomizada onde a amostra foi obtida na região abdominal junto da linha branca onde é feita a incisão cirúrgica.

A biópsia cutânea e observação do sedimento, foi a técnica usada no estudo. É a mais usada para pesquisa deste tipo de parasitas em animais assintomáticos (Otranto et al., 2013a; Tahir et al., 2019).

Alojamento dos animais e hábitos quotidianos

O vetor de *Cercopithifilaria* spp. possui uma grande capacidade de adaptação a diferentes tipos de habitats, pelo que nas fases de vida não parasitárias podem encontrar-se em zonas arbustivas e até próximas de onde vive o hospedeiro. Por isso, os animais que possuem acesso a arbustos e que estão mais expostos ao ambiente exterior, possuem uma maior probabilidade de contacto com carrças (Dantas-Torres, 2008).

Dentro do grupo com maior exposição temos em Elvas 38% (11) e em Lisboa 26% (seis) dos cães e com alojamento no exterior. Os animais que coabitam com os tutores também têm acesso à rua mas com reduzido período de exposição e, dada a maior interação com os seus proprietários, mais facilmente a presença de ixodídeos é reconhecida e os mesmos são alvo de remoção pelo seu tutor ou, levados a um profissional (médico veterinário) para que atue adequadamente no controlo deste parasitismo. O animal do estudo no qual foi possível identificar microfíliarias de *Cercopithifilaria* spp. vivia no exterior e tinha acesso à rua mais de três vezes por dia, corroborando o que foi dito anteriormente.

Condição profilática dos indivíduos

O controlo mais eficaz da infeção por *Cercopithifilaria* spp. é feito com uso de ectoparasiticidas para reduzir a probabilidade do vetor se alimentar e conseqüentemente transmitir filárias ao hospedeiro (Tahir et al., 2019). Verificou-se o sucesso de tratamento com microfiláricida moxidectina mas apenas com a sua aplicação a cada três semanas, contrariamente à aplicação mensal recomendada pelo fabricante (Boyd et al., 2019).

Em Elvas, 90% (19) dos cães desparasitados estavam com um ectoparasiticida. O princípio ativo mais usado foi a flumetrina (9/19), seguido da permetrina (6/19), do fluralaner (3/19) e finalmente o afloxaner (1/19).

Em Lisboa, 70% (12) dos cães desparasitados estavam com um ectoparasiticida e ainda 12% (dois) com uma associação de microfiláricida com um ectoparasiticida. Com uma maior diversidade de princípios ativos, a permetrina (7/12) foi a mais usada, seguida da

flumetrina (4/12), o piriproxifen (3/12 todos associados a permetrina), afloxaner (dois animais em que um deles tem associação com flumetrina) e finalmente a deltametrina (1/12) e o fluralaner (1/12).

O animal positivo no estudo, além de possuir exposição ao parasita, não possuía qualquer tipo de desparasitação, aumentando a janela de probabilidades para infeção.

O resultado obtido para este tipo de parasita seria o esperado tendo em conta todos os fatores mencionados anteriormente. O grau de exposição ao parasita e desparasitação são os fatores mais importantes para que a infeção ocorra e perdure com sucesso. Se agruparmos os animais do estudo que possuíam maior exposição ao parasita incluindo os cães que habitavam no exterior, e sem qualquer tipo de desparasitação, teríamos três (10%) animais em Elvas e três (13%) em Lisboa. Ou seja, seriam apenas 2% dos animais de cada região com um grau de exposição semelhante à dos animais avaliados no estudo feito por Cortes et al. em 2012 e publicado em 2014 (Cortes et al., 2014).

Além destes fatores, dado as amostras não terem sido obtidas nas zonas do corpo onde há maior concentração do parasita, podemos ter diminuído a probabilidade de obtenção de resultados positivos.

7 Conclusão

A comunidade científica está alertada para o risco de parasitismo por *O. lupi*, quer para os animais, quer para os humanos, no entanto é necessário um maior investimento em diferentes domínios. Já no caso de *Cercopithifilaria* spp. a importância clínica ainda não foi devidamente esclarecida, pelo que é essencial um estudo mais aprofundado acerca deste ponto, para o qual todos os médicos veterinários, na sua prática clínica em pequenos animais, devem contribuir.

A elucidação dos vetores de *O. lupi*, nas diferentes regiões do mundo é essencial para analisar de forma mais eficaz a situação epidemiológica das zonas, mas também para analisar o risco de surgimento de infeção em regiões indemnes. Com o conhecimento do vetor, poder-se-á implementar estratégias de controlo dos mesmos, tal como é feito para *Onchocerca volvulus* (Hoerauf, 2011).

Tendo em conta que muitos animais são assintomáticos, servindo como reservatório, a análise epidemiológica deve ser feita de forma rigorosa para avaliar a real dimensão do

problema. Ainda neste âmbito, é essencial esclarecer o papel dos gatos como hospedeiro em relação a *O. lupi*, desempenhando o papel de reservatório e agente disseminador do parasita.

O desenvolvimento de técnicas de diagnóstico menos traumáticas, nomeadamente testes sorológicos (Campbell et al., 2016), e a sua disponibilidade comercial, são importantes para reduzir algum tipo de oposição por parte dos tutores a proceder ao diagnóstico por métodos diretos e invasivos. O tipo de teste também deve ter como objetivo a redução do número de falsos negativos para os casos de onchocercose (Otranto et al., 2013d). Sem outro tipo de publicações neste âmbito, não existe até à data testes sorológicos com especificidade e sensibilidade estudadas para o diagnóstico de *O. lupi*.

A sensibilização quer dos médicos veterinários, quer dos médicos de medicina humana para estas infeções por filárias é essencial, especialmente para o parasitismo por *O. lupi*, atendendo ao potencial zooantroponótico, que no Algarve apresenta uma prevalência de 10% em cães (Otranto et al., 2013d). Muitas vezes as infeções parasitárias não são diagnosticadas, não por os animais não estarem infetados, mas porque este tipo de doenças não abrange a lista de diagnósticos diferenciais para enfermidades oculares e cutâneas.

Quer o tratamento, quer o controlo da filariose humana e animal está pouco estudada, sendo necessário conhecer o verdadeiro papel das diferentes lactonas macrocíclicas no tratamento e prevenção.

Com este trabalho, foi possível analisar alguns fatores que poderão estar implicados na infeção dos animais por microfilárias. O estudo seria mais enriquecido através da inserção de outras variáveis pertinentes, nomeadamente o período de tempo que os animais não apresentavam desparasitação, a última vez que o animal possuiu uma carraça ou se alguma vez o teve. Em projetos futuros deverão ser utilizadas técnicas padronizadas (exemplo da zona do corpo onde é feita a biópsia cutânea e o período do dia) e com um maior número de animais sujeitos às mesmas condições. Tendo um número reduzido de amostras, o estudo não é representativo da situação epidemiológica das regiões mencionadas. Podemos verificar que o número de animais que agrupavam as mesmas condições e levariam a um maior número de positivos, era reduzida. O número reduzido de amostras deveu-se também a algum tipo de relutância por parte de alguns tutores que não permitiram a obtenção da amostra de pele do seu animal. Somando a este fator, os

problemas logísticos associados à situação epidemiológica provocada pelo vírus sars-Cov2, e a consequente pandemia de Covid-19, da qual resultou também num reduzido número de amostras recolhidas, num maior período de tempo.

O resultado deste estudo demonstrou que a exposição aos fatores de risco é importante para o surgimento de infeção. Também permitiu reportar pela primeira vez, a presença de *Cercopithifilaria* spp. na região de Lisboa. Em todo o caso, é importante salientar que, a maior valorização dos animais de companhia (nomeadamente o cão e gato) que resultam numa maior proximidade ao humano e, a coabitação no seu lar, associado à desparasitação frequente (muitas vezes recorrendo a fármacos com ação sobre adultos ou estados larvares destas filárias), contribuem para minimizar o parasitismo em número significativo de animais.

8 Bibliografia

- Adler, P.H., McCreadie, J.W., 2019. Chapter 14 - Black Flies (Simuliidae), in: Mullen, G.R., Durden, L.A. (Eds.), *Medical and Veterinary Entomology* (Third Edition). Academic Press, pp. 237–259. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814043-7.00014-5>
- Alho, A.M., Cruz, L., Coelho, A., Martinho, F., Mansinho, M., Annoscia, G., Lia, R.P., Giannelli, A., Otranto, D., de Carvalho, L.M., 2016. Aberrant laryngeal location of *Onchocerca lupi* in a dog. *Parasitol. Int.* 65, 218–220. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.12.010>
- Almeida, G., Vicente, J.J., 1984. *Cercopithifilaria Baina* sp. n. Parasita de Canis Familiaris (L.) (Nematoda, Filarioidea). *Atlas Soc Biol Rio Jan.*
- Anderson, R.C., 2000. *Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission*, Second edição. ed. Oxford University Press, Wallingford, Oxon, UK ; New York, NY.
- Bain, O., Uni, S., Takaoka, H., 2002. A Synthetic Look at a Twenty Years Old Taxon, *Cercopithifilaria*; Its Probable Evolution. *MEDIMOND* 365–368.
- Basáñez, M.-G., Pion, S.D.S., Boakes, E., Filipe, J.A.N., Churcher, T.S., Boussinesq, M., 2008. Effect of single-dose ivermectin on *Onchocerca volvulus*: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 8, 310–322. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70099-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70099-9)
- Beugnet, F., Liebenberg, J., Halos, L., 2015. Comparative efficacy of two oral treatments for dogs containing either afoxolaner or fluralaner against *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* and *Dermacentor reticulatus*. *Vet. Parasitol.* 209, 142–145. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.002>
- Boland, L.A., Angles, J.M., 2010. Feline permethrin toxicity: retrospective study of 42 cases. *J. Feline Med. Surg.* 12, 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2009.09.018>
- Bouchery, T., Lefoulon, E., Karadjian, G., Nieguitsila, A., Martin, C., 2013. The symbiotic role of *Wolbachia* in *Onchocercidae* and its impact on filariasis. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19, 131–140. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12069>
- 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-e20. <https://doi.org/10.1111/vde.12701>
- 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.* 183, 330–337. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.031>
- Campbell, B., Cortes, H., Annoscia, G., Giannelli, A., Parisi, A., Latrofa, M.S., Dantas-Torres, F., Cardoso, L., Otranto, D., 2016. Paramyosin of canine *Onchocerca lupi*: usefulness for the diagnosis of a neglected zoonotic disease. *Parasit. Vectors* 9. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1783-z>

- Cortes, H.C.E., Cardoso, L., Giannelli, A., Latrofa, M.S., Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2014. Diversity of *Cercopithifilaria* species in dogs from Portugal. *Parasit. Vectors* 7, 261. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-261>
- Dantas-Torres, F., 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Vet. Parasitol.* 152, 173–185. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.030>
- Eberhard, M.L., Ostovar, G.A., Chundu, K., Hobohm, D., Feiz-Erfan, I., Mathison, B.A., Bishop, H.S., Cantey, P.T., 2013. Zoonotic *Onchocerca lupi* infection in a 22-month-old child in Arizona: first report in the United States and a review of the literature. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 88, 601–605. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0733>
- Edelmann, M.L., Jager, M., Espinheira, F., Ledbetter, E.C., 2018. In vivo confocal microscopy for detection of subconjunctival *Onchocerca lupi* infection in a dog. *Vet. Ophthalmol.* 21, 632–637. <https://doi.org/10.1111/vop.12547>
- Egyed, Z., Sréter, T., Széll, Z., Beszteri, B., Oravecz, O., Márialigeti, K., Varga, I., 2001. Morphologic and genetic characterization of *Onchocerca lupi* infecting dogs. *Vet. Parasitol.* 102, 309–319. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(01\)00541-6](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00541-6)
- Egyed, Z., Sréter, T., Széll, Z., Nyirő, G., Dobos-Kovács, M., Márialigeti, K., Varga, I., 2002a. Electron microscopic and molecular identification of *Wolbachia* endosymbionts from *Onchocerca lupi*: implications for therapy. *Vet. Parasitol.* 106, 75–82. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00029-8](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00029-8)
- Egyed, Z., Sréter, T., Széll, Z., Nyiro, G., Márialigeti, K., Varga, I., 2002b. Molecular phylogenetic analysis of *Onchocerca lupi* and its *Wolbachia* endosymbiont. *Vet. Parasitol.* 108, 153–161. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00186-3](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00186-3)
- Franchini, D., Giannelli, A., Di Paola, G., Cortes, H., Cardoso, L., Lia, R.P., Campbell, B.E., Dantas-Torres, F., Lenoci, D., Assad, E.A., Ricciardi, M., Valastro, C., Cavaliere, L., Di Bello, A., Otranto, D., 2014. Image diagnosis of zoonotic onchocercosis by *Onchocerca lupi*. *Vet. Parasitol.* 203, 91–95. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.007>
- Gabrielli, S., Giannelli, A., Brianti, E., Dantas-Torres, F., Bufalini, M., Fraulo, M., La Torre, F., Ramos, R.A.N., Cantacessi, C., Latrofa, M.S., Cancrini, G., Otranto, D., 2014. Chronic polyarthritis associated to *Cercopithifilaria baina* infection in a dog. *Vet. Parasitol.* 205, 401–404. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.06.027>
- Giannelli, A., Cantacessi, C., Graves, P., Becker, L., Campbell, B.E., Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2014. A preliminary investigation of serological tools for the detection of *Onchocerca lupi* infection in dogs. *Parasitol. Res.* 113, 1989–1991. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3844-6>
- Grácio, A.J.S., Richter, J., Komnenou, A.T., Grácio, M.A., 2015. Onchocerciasis caused by *Onchocerca lupi*: an emerging zoonotic infection. Systematic review. *Parasitol. Res.* 114, 2401–2413. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4535-7>
- Hassan, H.K., Bolcen, S., Kubofcik, J., Nutman, T.B., Eberhard, M.L., Middleton, K., Wekesa, J.W., Ruedas, G., Nelson, K.J., Dubielzig, R., De Lombaert, M., Silverman, B., Schorling, J.J., Adler, P.H., Unnasch, T.R., Beeler, E.S., 2015. Isolation of *Onchocerca lupi* in Dogs and Black Flies, California, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 789–796. <https://doi.org/10.3201/eid2105.142011>
- Hoerauf, A.M., 2011. CHAPTER 106 - Onchocerciasis, in: Guerrant, R.L., Walker, D.H., Weller, P.F. (Eds.), *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens*

- and Practice (Third Edition). W.B. Saunders, Edinburgh, pp. 741–749.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-3935-5.00106-3>
- Ilhan, H.D., Yaman, A., Morishima, Y., Sugiyama, H., Muto, M., Yamasaki, H., Hasegawa, H., Lebe, B., Bajin, M.S., 2013. *Onchocerca lupi* infection in Turkey: a unique case of a rare human parasite. *Acta Parasitol.* 58, 384–388.
<https://doi.org/10.2478/s11686-013-0152-8>
- Khan, M.A., 1981. Protection of pastured cattle from black flies (Diptera: Simuliidae): Improved weight gains following a dermal application of phosmet. *Vet. Parasitol.* 8, 327–336. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(81\)90065-0](https://doi.org/10.1016/0304-4017(81)90065-0)
- Klei, T.R., Rajan, T.V. (Eds.), 2006. *The Filaria*, 2002 edition. ed. Springer.
- Kommenou, A., Eberhard, M.L., Kaldrymidou, E., Tsalie, E., Dessiris, A., 2002. Subconjunctival filariasis due to *Onchocerca* sp. in dogs: report of 23 cases in Greece. *Vet. Ophthalmol.* 5, 119–126. <https://doi.org/10.1046/j.1463-5224.2002.00235.x>
- Labelle, A.L., Daniels, J.B., Dix, M., Labelle, P., 2011. *Onchocerca lupi* causing ocular disease in two cats. *Vet. Ophthalmol.* 14 Suppl 1, 105–110.
<https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2011.00911.x>
- Labelle, A.L., Maddox, C.W., Daniels, J.B., Lanka, S., Eggett, T.E., Dubielzig, R.R., Labelle, P., 2013. Canine ocular onchocercosis in the United States is associated with *Onchocerca lupi*. *Vet. Parasitol.* 193, 297–301.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.002>
- Landmann, F., Voronin, D., Sullivan, W., Taylor, M.J., 2011. Anti-filarial activity of antibiotic therapy is due to extensive apoptosis after *Wolbachia* depletion from filarial nematodes. *PLoS Pathog.* 7, e1002351.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002351>
- Latrofa, M.S., Annoscia, G., Colella, V., Cavalera, M.A., Maia, C., Martin, C., Šlapeta, J., Otranto, D., 2018. A real-time PCR tool for the surveillance of zoonotic *Onchocerca lupi* in dogs, cats and potential vectors. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, e0006402. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006402>
- Maia, C., Annoscia, G., Latrofa, M.S., Pereira, A., Giannelli, A., Pedroso, L., Otranto, D., 2015. *Onchocerca lupi* Nematode in Cat, Portugal. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 2252–2254. <https://doi.org/10.3201/eid2112.150061>
- McLean, N.J., Newkirk, K., Adema, C.M., 2017. Canine ocular onchocerciasis: a retrospective review of the diagnosis, treatment, and outcome of 16 cases in New Mexico (2011-2015). *Vet. Ophthalmol.* 20, 349–356.
<https://doi.org/10.1111/vop.12433>
- Moreno, Y., Nabhan, J.F., Solomon, J., Mackenzie, C.D., Geary, T.G., 2010. Ivermectin disrupts the function of the excretory-secretory apparatus in microfilariae of *Brugia malayi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 20120–20125.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1011983107>
- Mutafchiev, Y., Dantas-Torres, F., Giannelli, A., Abramo, F., Papadopoulos, E., Cardoso, L., Cortes, H., Otranto, D., 2013. Redescription of *Onchocerca lupi* (Spirurida: Onchocercidae) with histopathological observations. *Parasit. Vectors* 6, 309. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-309>
- Narahashi, T., 1971. Mode of action of pyrethroids. *Bull. World Health Organ.* 44, 337–345.
- Nicholson, W.L., Sonenshine, D.E., Noden, B.H., Brown, R.N., 2019. Chapter 27 - Ticks (Ixodida), in: Mullen, G.R., Durden, L.A. (Eds.), *Medical and Veterinary*

- Entomology (Third Edition). Academic Press, pp. 603–672.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814043-7.00027-3>
- Nolan, T.J., Lok, J.B., 2012. Macrocyclic lactones in the treatment and control of parasitism in small companion animals. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13, 1078–1094. <https://doi.org/10.2174/138920112800399167>
- Otranto, D., Brianti, E., Abramo, F., Gaglio, G., Napoli, E., Latrofa, M.S., Ramos, R.A., Dantas-Torres, F., Bain, O., 2012a. Cutaneous distribution and localization of *Cercopithifilaria* sp. microfilariae in dogs. *Vet. Parasitol.* 190, 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.05.016>
- Otranto, D., Brianti, E., Dantas-Torres, F., Miró, G., Latrofa, M.S., Mutafchiev, Y., Bain, O., 2013a. Species diversity of dermal microfilariae of the genus *Cercopithifilaria* infesting dogs in the Mediterranean region. *Parasitology* 140, 99–108. <https://doi.org/10.1017/S0031182012001357>
- Otranto, D., Brianti, E., Dantas-Torres, F., Weigl, S., Latrofa, M.S., Gaglio, G., Cauquil, L., Giannetto, S., Bain, O., 2011a. Morphological and molecular data on the dermal microfilariae of a species of *Cercopithifilaria* from a dog in Sicily. *Vet. Parasitol.* 182, 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.043>
- 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., 2012b. On a *Cercopithifilaria* sp. transmitted by *Rhipicephalus sanguineus*: a neglected, but widespread filarioid of dogs. *Parasit. Vectors* 5, 1. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-1>
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Brianti, E., Traversa, D., Petrić, D., Genchi, C., Capelli, G., 2013b. Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. *Parasit. Vectors* 6, 16. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-16>
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Cebeci, Z., Yeniad, B., Buyukbabani, N., Boral, O.B., Gustinelli, A., Mounir, T., Mutafchiev, Y., Bain, O., 2012c. Human ocular filariasis: further evidence on the zoonotic role of *Onchocerca lupi*. *Parasit. Vectors* 5, 84. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-84>
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Giannelli, A., Abramo, F., Ignjatović Čupina, A., Petrić, D., Cardoso, L., Mutafchiev, Y., Cortes, H., 2013c. Cutaneous distribution and circadian rhythm of *Onchocerca lupi* microfilariae in dogs. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2585. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002585>
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Giannelli, A., Latrofa, M.S., Papadopoulos, E., Cardoso, L., Cortes, H., 2013d. Zoonotic *Onchocerca lupi* infection in dogs, Greece and Portugal, 2011-2012. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 2000–2003. <https://doi.org/10.3201/eid1912.130264>
- Otranto, D., Eberhard, M.L., 2011. Zoonotic helminths affecting the human eye. *Parasit. Vectors* 4, 41. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-41>
- Otranto, D., Giannelli, A., Latrofa, M.S., Dantas-Torres, F., Trumble, N.S., Chavkin, M., Kennard, G., Eberhard, M.L., Bowman, D.D., 2015a. Canine Infections with *Onchocerca lupi* Nematodes, United States, 2011-2014. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 868–871. <https://doi.org/10.3201/eid2105.141812>
- Otranto, D., Giannelli, A., Scotty Trumble, N., Chavkin, M., Kennard, G., Latrofa, M.S., Bowman, D.D., Dantas-Torres, F., Eberhard, M.L., 2015b. Clinical case presentation and a review of the literature of canine onchocercosis by *Onchocerca lupi* in the United States. *Parasit. Vectors* 8, 89. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0699-3>

- Otranto, D., Sakru, N., Testini, G., Gürlü, V.P., Yakar, K., Lia, R.P., Dantas-Torres, F., Bain, O., 2011b. Case report: First evidence of human zoonotic infection by *Onchocerca lupi* (Spirurida, Onchocercidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84, 55–58. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0465>
- Otranto, D., Varcasia, A., Solinas, C., Scala, A., Brianti, E., Dantas-Torres, F., Annoscia, G., Martin, C., Mutafchiev, Y., Bain, O., 2013e. Redescription of *Cercopithifilaria baina* Almeida & Vicente, 1984 (Spirurida, Onchocercidae) from a dog in Sardinia, Italy. *Parasit. Vectors* 6, 132. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-132>
- Prullage, J.B., Tran, H.V., Timmons, P., Harriman, J., Chester, S.T., Powell, K., 2011. The combined mode of action of fipronil and amitraz on the motility of *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet. Parasitol.*, Special issue: Fipronil, amitraz and (S)-methoprene - a novel ectoparasiticide combination for dogs 179, 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.041>
- Ramos, R.A.N., Giannelli, A., Brianti, E., Annoscia, G., Cantacessi, C., Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2013. Tick vectors of *Cercopithifilaria baina* in dogs: *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* versus *Ixodes ricinus*. *Parasitol. Res.* 112, 3013–3017. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3474-4>
- Reis, R.C.S., Fernandes, É.K.K., Bittencourt, V.R.E.P., 2008. Fungal Formulations to Control *Rhipicephalus sanguineus* Engorged Females. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1149, 239–241. <https://doi.org/10.1196/annals.1428.030>
- Shearer, D., Wall, R., 2001. *Veterinary Ectoparasites: Biology, Pathology and Control* Second Edition, 2nd ed. Blackwell Science.
- Shemanchuk, J.A., Taylor, W.G., 1984. Protective action of fenvalerate, deltamethrin, and four stereoisomers of permethrin against black flies (*Simulium* spp.) attacking cattle. *Pestic. Sci.* 15, 557–561. <https://doi.org/10.1002/ps.2780150605>
- Sréter, T., Széll, Z., 2008. Onchocercosis: a newly recognized disease in dogs. *Vet. Parasitol.* 151, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.09.008>
- Széll, Z., Sréter, T., Erdélyi, I., Varga, I., 2001. Ocular onchocercosis in dogs: aberrant infection in an accidental host or lupi onchocercosis? *Vet. Parasitol.* 101, 115–125. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00507-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00507-6)
- Tahir, D., Davoust, B., Parola, P., 2019. Vector-borne nematode diseases in pets and humans in the Mediterranean Basin: An update. *Vet. World* 12, 1630–1643. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1630-1643>
- Wolstenholme, A.J., Maclean, M.J., Coates, R., McCoy, C.J., Reaves, B.J., 2016. How do the macrocyclic lactones kill filarial nematode larvae? *Invertebr. Neurosci.* IN 16, 7. <https://doi.org/10.1007/s10158-016-0190-7>
- Zarfoss, M.K., Dubielzig, R.R., Eberhard, M.L., Schmidt, K.S., 2005. Canine ocular onchocerciasis in the United States: two new cases and a review of the literature. *Vet. Ophthalmol.* 8, 51–57. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2005.00348.x>