

Prima segnalazione in Italia di filariosi cardiopolmonare nel lupo (*Canis lupus*)

Ilaria Pascucci, Rosario Fico, Anna Rita D'Angelo, Sabrina Serini & Cesare Cammà

Riassunto

Questo lavoro costituisce la prima segnalazione di filariosi da *Dirofilaria immitis*, o filariosi cardiopolmonare, nel lupo in Italia. Vista l'eccezionalità del reperto, per la tipizzazione del parassita è stato deciso di affiancare ai metodi tradizionali quali l'osservazione allo stereomicroscopio, metodi diagnostici altamente innovativi quali l'osservazione al microscopio elettronico a scansione e l'identificazione molecolare effettuata tramite l'applicazione di diverse metodiche recentemente sviluppate (*polymerase chain reaction* e sequenziamento). Vengono effettuate alcune considerazioni sull'epidemiologia della patologia, alla luce di questa prima segnalazione in Italia di *D. immitis* in un lupo, avvenuta in un'area geografica in cui la filariosi non è segnalata né nei carnivori domestici, né nei selvatici.

Keywords

Canis lupus, *Dirofilaria immitis*, Elminti, Filariosi, Italia, Parassita.

Introduzione

La filariosi da *Dirofilaria immitis* (Ordine: *Spirurida*, Famiglia: *Onchocercidae*), è una malattia parassitaria sostenuta da elminti che colpisce i carnivori, trasmessa da vettori (*Culicidi*) e diffusa ampiamente nelle zone a clima temperato (2, 9, 23).

Il parassita è stato segnalato in tutti i continenti (1, 9), in Europa i più alti livelli di prevalenza si registrano nel Bacino del Mediterraneo: Nord-Italia, Francia meridionale e Corsica,

Spagna specie nelle isole, Portogallo, Grecia e Turchia.

I nematodi agenti della patologia appartengono alla famiglia *Onchocercidae* specie *D. immitis*.

Gli adulti di *D. immitis* vivono principalmente nel ventricolo destro e nell'arteria polmonare e sue diramazioni, anche se non mancano segnalazioni di localizzazioni erratiche (9).

Sono, inoltre, descritte infestazioni occasionali con femmine sterili nell'uomo caratterizzate da noduli sottocutanei e polmonari (2).

La sintomatologia clinica, caratterizzata da tosse, intolleranza allo sforzo fisico ingravescente, perdita di peso, insufficienza cardiaca, insufficienza epatica, coagulopatia, vomito, ascite, è ben conosciuta e descritta nel cane e nel gatto, al contrario mancano descrizioni di sintomatologia clinica da filariosi nei selvatici. In alcuni casi la presenza di numerosi parassiti nel cuore destro può provocare la morte improvvisa dell'ospite (1, 23).

I principali fattori che influenzano la diffusione e l'epidemiologia della filariosi sono; condizioni climatiche che influiscono sulla biologia dei vettori, densità e disponibilità dei *Culicidi*, loro grado di zoofilia e competenza vettoriale, presenza e densità di ospiti definitivi in grado di fungere da reservoir. La pianura padana presenta le condizioni ecologiche ideali per la persistenza della filariosi (9), all'interno di questo territorio i livelli di prevalenza sono compresi tra il 22% e il 68%, ma possono raggiungere l'80% nel caso non venga effettuata la chemioprofilassi

(19).

A fronte di un'ulteriore estensione dell'areale di diffusione della patologia verso Nord e lungo i fiumi del versante tirrenico (la filariosi è presente in alcune aree della Toscana), probabilmente dovuta alle modificazioni climatiche, è da evidenziare la mancata diffusione della filariosi, almeno nella forma clinica, nell'Italia centro-meridionale, dove la patologia è presente solo in maniera sporadica.

Se il cane è da tempo riconosciuto come il principale reservoir, il ruolo svolto dai canidi e da altri carnivori selvatici nell'epidemiologia della filariosi è ancora da definire: esso sembrerebbe di secondaria importanza, ma è da rilevare che sono alquanto scarse le notizie disponibili in letteratura. A tal proposito è da segnalare lo studio di Marconcini *et al.* condotto in Toscana (15) in questo lavoro 50 volpi (*Vulpes vulpes*) delle 523 esaminate presentavano esemplari adulti di *D. immitis* nelle cavità cardiache, mentre, al contrario solo in pochi esemplari sono stati riscontrati bassi livelli di microfilarie.

Sono presenti invece in tutto l'areale di diffusione della patologia segnalazioni di filariosi nei canidi selvatici, nonché casi sporadici in altri mammiferi selvatici.

Esistono diverse segnalazioni nel continente europeo di *D. immitis* nei carnivori selvatici: adulti di *D. immitis* sono stati segnalati negli anni 1990 nella volpe rossa europea (*Vulpes vulpes*), oltre che in Toscana (15), nella valle dell'Ebro (12) e precedentemente, 1980, alcune volpi abbattute nella provincia di Grosseto erano risultate positive alla ricerca di microfilarie (13).

Solo recentemente (2001) *D. immitis* è stata segnalata per la prima volta nel lupo (*Canis lupus*) in Europa (un unico esemplare femmina di *D. immitis* è stata raccolta da 47 lupi esaminati nel nord-est della Spagna nel periodo 1993-1999) (20), sempre allo stesso periodo risale la segnalazione di *D. immitis* in un lupo (*Canis lupus*) ed in due sciacalli (*Canis aureus*) in Bulgaria (11) al contrario, non esistono segnalazioni di *D. immitis* nel lupo in Italia.

Recentemente (2004) *D. immitis* è stata segnalata nella lontra euro-asiatica (*Lutra lutra*) in esemplari utilizzati in programmi di reintroduzione nell'Europa sud-occidentale (22).

La maggior parte delle segnalazioni in letteratura di *D. immitis* nei selvatici sono riferibili a reperti post-mortem in animali liberi in natura ritrovati morti o tenuti in cattività in giardini zoologici venuti a morte per altre cause.

Negli ultimi anni lo sviluppo di tecniche diagnostiche molecolari, inizialmente sviluppate con il preciso scopo di distinguere i parassiti coinvolti nelle infestazioni occasionali dell'uomo, ha permesso di acquisire sempre maggiori conoscenze sull'epidemiologia delle filariosi da *D. immitis* e da *D. repens*.

Materiali e metodi

A fine novembre 2003 presso la sede centrale di Teramo dell'"Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise G. Caporale" è pervenuta, per essere sottoposta all'accertamento della causa di morte mediante esame anatomo-patologico, una carcassa di lupo (*Canis lupus*) proveniente dal Parco Regionale del Matese (provincia di Caserta). Il lupo presentava evidenti lesioni da morso di canide in diverse zone del corpo, probabili causa della morte. A livello di cuore destro e di arteria polmonare e sue diramazioni erano presenti numerosi nematodi adulti (Fig. 1).

Erano presenti inoltre, aumento di volume del cuore destro ed un diffuso stato di congestione viscerale.

I parassiti integri ed i frammenti degli stessi sono stati raccolti e conservati in etanolo al 70%.

Sulla base della localizzazione, della morfologia e delle dimensioni degli elminti è stata sospettata la filariosi da *D. immitis*. Vista l'eccezionalità del reperto, si tratterebbe del primo caso di filariosi nel lupo (*C. lupus*) in Italia ed una delle primissime descrizioni in Europa verificatosi, inoltre, in un animale

libero in natura, è stato deciso di procedere con l'identificazione su base molecolare.

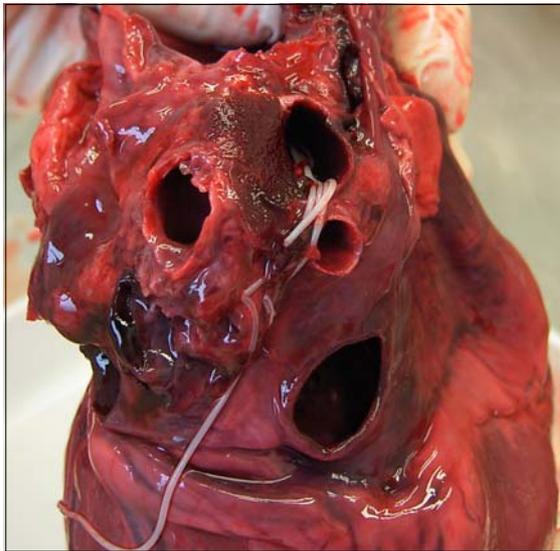


Figura 1
Adulti di *Dirofilaria immitis* nel cuore e nell'arteria polmonare del lupo

E' da sottolineare che l'esemplare di lupo proveniva da un'area geografica in cui non è stata precedentemente descritta la forma clinica di filariosi.

Determinazione dell'età

Durante l'esecuzione dell'esame anatomico patologico è stato prelevato il primo dente premolare inferiore sul quale è stato eseguito l'esame istologico per la determinazione dell'età.

Osservazione allo stereomicroscopio

Un esemplare maschio conservato in etanolo al 70% è stato osservato allo stereomicroscopio ad ingrandimento crescente per l'evidenziazione di alcuni particolari anatomici quali la forma spiralata della coda e la presenza di papille sull'estremità caudale.

Osservazione mediante microscopio elettronico a scansione

Successivamente l'estremità caudale dello stesso esemplare è stata osservata mediante microscopio elettronico a scansione (SEM Zeiss DSM 940-A) previa disidratazione in etanolo, mediante passaggi a concentrazioni crescenti, quindi sottoposta a *critical point drying* ed

infine ricoperta di oro mediante lo *sputter coating*. L'osservazione ad ingrandimenti crescenti da 6 a 210 ha permesso di valutare numero e forma delle papille sull'estremità caudale.

Polymerase chain reaction

Il DNA è stato estratto da un frammento di circa un cm di lunghezza del parassita conservato in etanolo al 70% mediante estrazione in fenolo-cloroformio (18).

L'identificazione del parassita è stata effettuata seguendo diverse metodiche di PCR, descritte seguito, e amplificando contemporanea-mente il DNA estratto da un esemplare di *D. repens*.

- La prima metodica, sviluppata da Favia *et al.* (1996) (7) con il principale scopo di distinguere *D. repens* da *D. immitis* nei campioni biotici provenienti da casi umani è stata modificata come segue: la PCR è stata effettuata utilizzando 2 mM di MgCl₂, 1 U di AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) e 2 µl del DNA estratto su 40 cicli di amplificazione. L'elettroforesi su gel di agarosio permette l'identificazione dei parassiti mediante l'evidenziazione di 2 caratteristiche bande di 348 pb e 747 pb per *D. immitis*, e una banda di 325 pb, più una serie di bande con dimensione uguale a multipli di 175 bp, per *D. repens*.
- La seconda, descritta da Murata *et al.* (2003) (17) sviluppata ed utilizzata per identificare come *D. immitis* esemplari di elminti prelevati dal cuore e dall'arteria polmonare di un leopardo delle nevi (*Uncia uncia*). La reazione di amplificazione è stata modificata usando una concentrazione dei primers pari a 0.2 µM e 1.75U di AmpliTaq Gold (Applied Biosystems). Anche il protocollo PCR è stato modificato: 10 min di denaturazione iniziale a 94°C seguiti da 40 cicli con 30 secondi a 94°C, 30 secondi a 50°C e 30 secondi a 72°C, e una estensione finale di 7 min a 72°C. Tale metodica amplifica un frammento di 656 pb della regione che codifica per la citocromossidasi (COI) del DNA mitocondriale la cui sequenza è conosciuta per molti nematodi. Il prodotto PCR è stato purificato mediante QIAquick gel extraction kit e QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Germany). La

reazione di sequenza del prodotto amplificato purificato è stata eseguita mediante l'utilizzo di big dye terminator kit 3.1 (Applied Biosystems, USA) e successivamente purificata mediante l'utilizzo di Montage™ SEQ₉₆ – sequence reaction cleanup kit (Millipore, USA). L'elettroforesi è stata effettuata sul sequenziatore ABI PRISM 3100 avant (Applied Biosystems, USA). L'analisi delle sequenze è stata effettuata mediante EditSeq and Megalign Software (DNA Star Inc.).

- Infine è stata applicata una terza PCR che amplifica un segmento di 246 pb specifico per *D. repens* (14). Anche in questo caso sono state apportate alcune modifiche: in 50 µl di reazione sono stati aggiunti 1.5 UI di AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) e 2 µl di DNA. La PCR è stata eseguita utilizzando il seguente protocollo: 10 min di denaturazione iniziale a 94°C, seguiti da 40 cicli con 30 secondi a 94°C, 30 secondi a 55°C e 30 secondi a 72°C, e un'estensione finale di 5 min a 72°C.

Risultati

Determinazione dell'età

L'esecuzione dell'esame istologico del primo dente premolare inferiore ha permesso di assegnare al lupo un'età di circa 5 anni.

Osservazione allo stereomicroscopio

L'osservazione allo stereomicroscopio e la scansione tramite il microscopio elettronico hanno permesso l'evidenziazione di alcuni particolari morfologici caratteristici di *D. immitis*, quali la coda spiralata del maschio (Fig. 2) e la presenza di papille sulla estremità caudale (Fig. 3) (21).

Microscopia elettronica a scansione

L'osservazione tramite microscopio elettronico a scansione ha permesso di valutare meglio la morfologia dell'estremità craniale e caudale ed in particolare numero e forma delle papille sulla coda del maschio, da 4 a 6 paia di forma all'incirca ovoidale (21) (Fig. 4 e 5).



Figura 2
Coda spiralata del maschio di *Dirofilaria immitis*

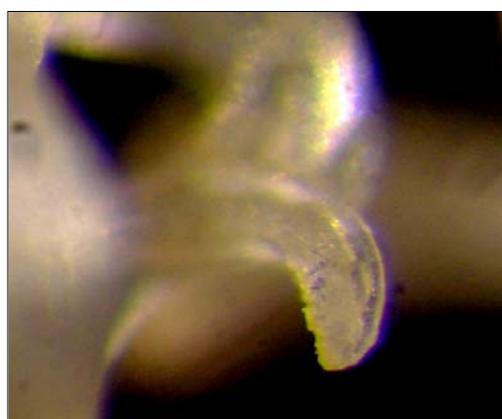


Figura 3
Particolare dell'estremità caudale del maschio di *Dirofilaria immitis*

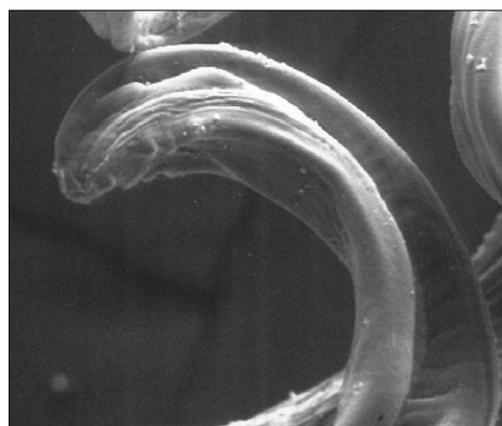


Figura 4
Estremità caudale del maschio di *Dirofilaria immitis*
(200 ingrandimenti 20 kV)

Polymerase chain reaction

Nel caso del primo metodo applicato, la presenza di due prodotti PCR di 348 pb e



Figura 5
Estremità caudale del maschio di *Dirofilaria immitis*
(210 ingrandimenti 10 kV)

747 pb, ha permesso l'identificazione del parassita in esame come appartenente alla

specie *D. immitis* (Fig. 6). Mentre nel caso di *D. repens* la PCR ha prodotto una banda di 325 pb, più una serie di bande con dimensione uguale a multipli di 175 pb (Fig. 7).

La metodica di Murata *et al.* (17) ha permesso di evidenziare la comparsa della caratteristica banda corrispondente ad un frammento di 656 pb (Fig. 8). La sequenza del prodotto PCR ha presentato il 100% di omologia con la sequenza completa del DNA mitocondriale di *D. immitis* depositata in banca dati (AJ537512) e con quella pubblicata da Casiraghi *et al.* nel 2001 (4) (AJ271613). Il DNA estratto dall'esemplare di *D. repens* amplificato con lo stesso metodo PCR e sottoposto a sequenziamento, ha mostrato una omologia di oltre il 99% rispetto alla sequenza di riferimento (AJ271614). Entrambe le sequenze sono state depositate nella banca dati Gen-Bank con i seguenti codici; DQ358815 per *D. immitis* e DQ358814 per *D. repens*.

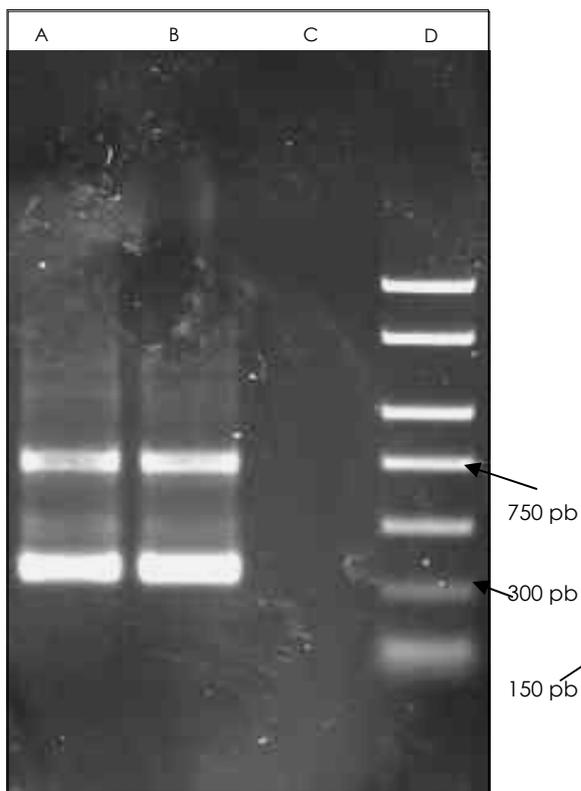


Figura 6
Gel elettroforesi della PCR che distingue *Dirofilaria repens* da *D. immitis* (7)
Corsie A e B: DNA del parassita del lupo
Corsia C: DNA di *Dirofilaria repens*
Corsia D: PCR marker (Sigma)

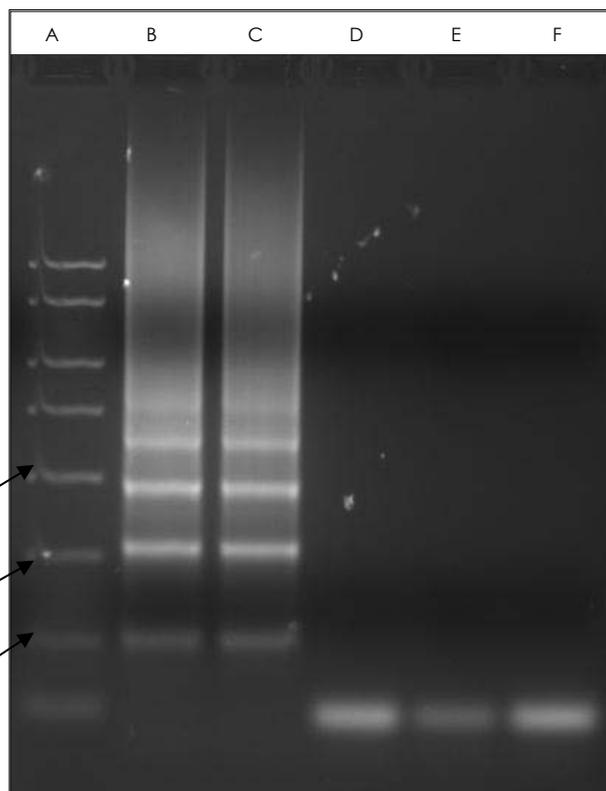


Figura 7
Gel elettroforesi della PCR che distingue *Dirofilaria repens* da *D. immitis* (7)
Corsia A: PCR marker (Sigma)
Corsie B e C: DNA di *Dirofilaria repens*
Corsie D e E: DNA del parassita del lupo
Corsia F: controllo negativo

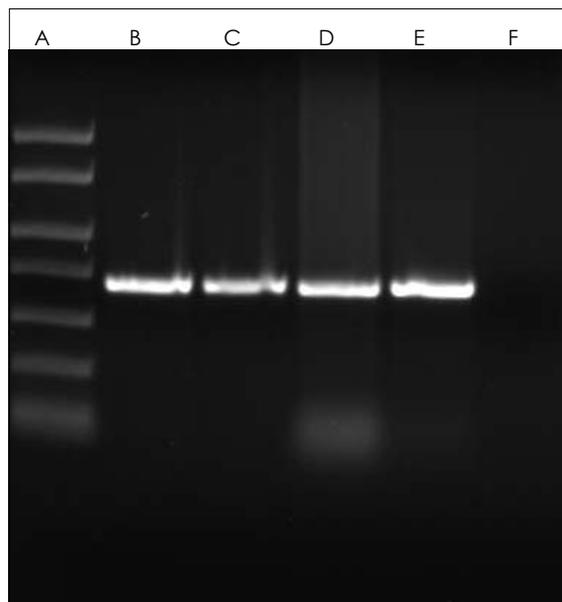


Figura 8
Gel elettroforesi della PCR che amplifica una regione di 656 pb della citocromo-ossidasi (17)
Corsia A: PCR marker (Sigma)
Corsie B e C: DNA del parassita del lupo
Corsie D e E: DNA di *Dirofilaria repens*
Corsia F: controllo negativo

Infine la metodica di Lee *et al.* (14) specifica per *D. repens* ha dato esito negativo nel caso del DNA estratto dai parassiti del lupo, mentre ha dato esito positivo nel caso dell'esemplare di *D. repens* (Fig. 9).

Conclusioni

La descrizione in Italia di filariosi nel Lupo, pur confermando la presenza di *D. immitis* nelle popolazioni di carnivori selvatici italiani già descritta nella volpe, è da considerarsi eccezionale.

Rimane da indagare il ruolo svolto da questa specie nell'epidemiologia della parassitosi poiché, se da un lato è improbabile che le popolazioni di lupo possano svolgere la funzione di serbatoio vista la relativa bassa consistenza, è invece ipotizzabile che in questo ospite, antico antenato del cane domestico, dal punto di vista biologico la parassitosi si possa comportare come nel cane, raggiungendo e mantenendo, cioè, livelli di microfilarieemia elevati e per lungo tempo. D'altro canto è da notare che in questo caso, a differenza della maggior parte dei casi descritti in letteratura

dove il reperto post-mortem di *D. immitis* è del tutto occasionale e non legato alle cause di morte dell'ospite, è possibile che la presenza di filariosi sia stata causa concomitante e favorente la morte del lupo: la presenza di tale patologia, infatti, avrebbe prodotto nell'ospite un'insufficienza cardio-respiratoria subclinica riducendone la tolleranza allo sforzo, rendendolo, quindi, una facile preda per i suoi aggressori.

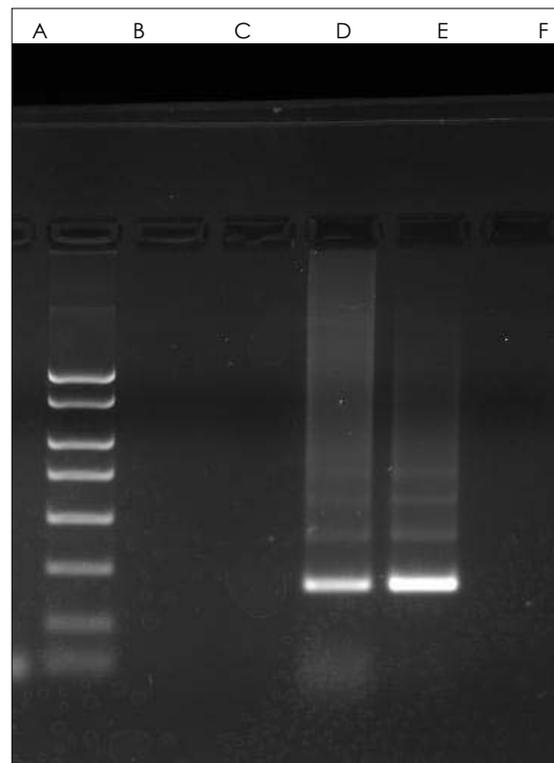


Figura 9
Gel elettroforesi della PCR specifica per *Dirofilaria repens* (14)
Corsia A: PCR marker (Sigma)
Corsie B e C: DNA del parassita del lupo
Corsie D e E: DNA di *Dirofilaria repens*
Corsia F: controllo negativo

Anche la segnalazione di filariosi nell'Italia centro meridionale è un fatto eccezionale, in questa zona, infatti, la patologia è da considerarsi sporadica anche nei carnivori domestici. D'altro canto in letteratura sono presenti segnalazioni di microfilarie anche al di là dell'area di endemia della patologia; microfilarie circolanti appartenenti *D. immitis* e a *D. repens* sono state segnalate in due cani asintomatici in uno studio condotto su 351 cani nell'area circum-vesuviana (6) mentre un recente lavoro(2003) Cancrini *et al.* (3) hanno

descritto la presenza di *D. immitis* e di *D. repens*, evidenziata mediante PCR, in esemplari di *Aedes albopictus* catturati a Focene (Litorale laziale provincia di Roma).

Studi sulla prevalenza della filariosi in Europa mediante l'utilizzo di modelli basati sull'utilizzo della tecnologia GIS (*geographic information systems*) hanno dimostrato, inoltre, che nelle regioni meridionali d'Europa esistono le condizioni favorevoli per la diffusione della filariosi con un numero massimo stimato di 10 generazioni di *D. immitis* per anno nella popolazione di vettori competenti (10). Questi stessi modelli, come del resto altri studi basati sulla raccolta ed analisi delle segnalazioni bibliografiche (24), però, ipotizzano una prevalenza della patologia nell'Europa sud-orientale a livelli più elevati rispetto a quella riscontrata.

Questa discrepanza tra le previsioni modellistiche e la realtà è probabilmente legata all'ampia diffusione nell'Europa meridionale di altre filariosi, sostenute da *Dipetalonema reconditum* e da *D. repens*, secondo Genchi *et al.* (8), quest'ultima specie impedirebbe lo sviluppo contemporaneo di *D. immitis*. Ciò nonostante, è ipotizzabile che in maniera sporadica laddove la prevalenza di *D. repens* non raggiunga livelli elevati e laddove vi sia la circolazione di *D. immitis* si possano manifestare casi di filariosi. Un'ultima, ma

importante considerazione va fatta riguardo le enormi capacità di spostamento del lupo che riconosce un home range di circa 200 km² (5, 16) e può quindi attraversare in periodi brevi diversi ambienti con caratteristiche ecologiche ed epidemiologiche differenti.

La presenza della filariosi nel lupo in Italia oltre che rappresentare un fatto eccezionale e, nelle aree di endemia, una possibile minaccia per questa specie, rende necessario un ulteriore approfondimento delle conoscenze sull'epidemiologia di questa parassitosi nelle popolazioni di carnivori selvatici europei.

L'utilizzo di metodiche molecolari quali la PCR ed il sequenziamento in grado di distinguere tra diverse specie affini per morfologia e distribuzione, si conferma di grande utilità per l'identificazione del parassita soprattutto nel caso di segnalazioni di particolare importanza come quella descritta.

Ringraziamenti

Si ringraziano vivamente il Dr Adriano Argenio, Direttore del Centro Recupero Fauna Selvatica della Provincia di Caserta e la Dr.ssa Gabriella Di Francesco dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale".

Bibliografia

1. Anderson R.C. 2001. Filarioid nematodes. In Parasitic diseases of wild mammals, Second Ed. (W.M. Samuel, M.J. Pybus & A.A. Kocan, eds). Iowa State University Press, Ames, Iowa, 342-356.
2. Cancrini G. 1998. Il vettore. In La filiarisi cardio-polmonare del cane e del gatto. Edizioni SCIVAC, Cremona, 12-23.
3. Cancrini G., Romi R., Gabrielli S., Toma L., Di Paolo M. & Scaramozzino P. 2003. First finding of *Dirofilaria repens* in a natural population of *Aedes albopictus*. *Med Vet Entomol*, **17**, 448.
4. Casiraghi M., Anderson T.J.C., Bandi C., Mazzocchi C. & Genchi C. 2001. A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of Wolbachia endosymbionts. *Parasitology*, **122**, 93-103.
5. Ciucci P., Boitani L., Francisci F. & Andreoli G. 1997. Home range, activity and movements of a wolf pack in central Italy. *J Zool*, **243**, 803-819
6. Cringoli G., Rinaldi L., Veneziano V. & Capelli G. 2001. A prevalence survey and risk analysis of filariasis in dogs from the Mt Vesuvius area of southern Italy. *Vet Parasitol*, **102**, 243-52.
7. Favia G., Lanfrancotti A., Della Torre A., Cancrini G. & Coluzzi M. 1996. Polymerase chain-identification of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis*. *Parasitology*, **113**, 567-571.
8. Genchi C, Solari Basano F., Bandi C., Di Sacco B., Venco L., Vezzosi A. & Cancrini G. 1995. Factors influencing the spread of heartworm in Italy. In Proc. Heartworm Symposium '95, Auburn, Alabama (M.D. Soll & D. Knight II, eds). American Heartworm Society, Batavia, Illinois, 65-71.

9. Genchi C. & Rossi L. 1998. Epidemiologia. In La filariosi cardio-polmonare del cane e del gatto. Edizioni SCIVAC, Cremona, 25-30.
10. Genchi C., Rinaldi L., Cascone C., Mortasino M. & Cingoli G. 2005. Is heartworm disease really spreading in Europe? *Vet Parasitol*, **133**, 137-148.
11. Georgieva D., Kirkova Z. & Ivanov A. 2001. A study on the incidence and diagnosis of dirofilariosis (heartworm disease) in carnivores. *Bulg J Vet Med*, **4**, 231-236.
12. Gortazar C., Villafuerte R., Lucientes J. & Fernandez de Luco D. 1998. Habitat related differences in helminth parasites of red foxes in the Ebro Valley. *Vet Parasitol*, **80**, 75-81.
13. Gradoni L., Pozio E. & Maroli M. 1980. Filariosi nelle volpi nella provincia di Grosseto. *Ann Ist Super Sanità*, **16**, 251-256.
14. Lee S.E., Song K.H., Liu J., Kim M.C., Park B.K., Cho K.W., Hasegawa A. & Kim D.H. 2004. Comparison of the acid-phosphatase staining and polymerase chain reaction for detection of *Dirofilaria repens* infection in dogs in Korea. *J Vet Med Sci*, **66**, 1087-1089.
15. Marconcini A., Magi M., Macchioni G. & Sasseti M. 1996. Filariosi in foxes in Italy. *Vet Res Commun*, **20**, 316-319.
16. Mech, L. D. & Boitani L. 2003. Wolf social ecology. In *Wolves: behavior, ecology, and conservation* (L.D. Mech & L.Boitani, eds). University of Chicago Press, Chicago, 1-31.
17. Murata K., Yanai T., Agatsuma T. & Uni S. 2003. *Dirofilaria immitis* infection of a snow leopard (*Uncia uncia*) in a Japanese zoo with mytocondrial DNA analysis. *J Vet Med Sci*, **65**, 945-947.
18. Sambrook J. & Russel D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, Third Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Chapter 6.4-6.11.
19. Scaramozzino P., Gabrielli S., Di Paolo M., Sala M., Scholl F. & Cancrini G. 2005. Dog filariosis in the Lazio region (central Italy): first report on the presence of *Dirofilaria repens*. *BMC Infect Dis*, **5** (75) (www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?&pubmedid=16185352 ultimo accesso 27 ottobre 2007).
20. Segovia J.M., Torres J., Miquel J., Llaneza L. & Feliu C. 2001. Helminths in the wolf, *Canis lupus*, from north-western Spain. *J Helminthol*, **75**, 183-192.
21. Soulsby E.J.L. 1986. Family *Filaridae*. In *Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals*. Baillière Tindall, London, 307-312.
22. Torres J., Feliu C., Fernandez Moran J., Ruiz-Olmo J., Rosoux R., Santos-Reis M., Miquel J. & Fons R. 2004. Helminth parasites of the Eurasian otter (*Lutra lutra*) in southwest Europe. *J Helminthol*, **78**, 353-359.
23. Traldi G. 1998. Eziologia e ciclo biologico del parassita. In La filariosi cardio-polmonare del cane e del gatto. Edizioni SCIVAC, Cremona, 9-12.
24. Trotz-Williams L.A. & Trees A.J. 2003. Systematic review of the distribution of the major vector-borne parasitic infections in dogs and cats in Europe. *Vet Rec*, **152**, 97-110.