



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

RASTREIO DE *LEISHMANIA INFANTUM* EM CÃES ASSINTOMÁTICOS
NA REGIÃO DE MAFRA

SÍLVIA MARIA MARTINS CURADO ARMÉS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Professor Doutor Virgílio da Silva Almeida

Professor Doutor José Augusto Farraia e
Silva Meireles

Professora Doutora Isabel Maria Soares
Pereira da Fonseca de Sampaio

Doutor Nuno Alberto Palma Pinheiro da Silva

ORIENTADOR

Doutor Nuno Alberto Palma Pinheiro da Silva

CO-ORIENTADOR

Professora Doutora Isabel Maria Soares Pereira
da Fonseca de Sampaio

2010

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

RASTREIO DE *LEISHMANIA INFANTUM* EM CÃES ASSINTOMÁTICOS
NA REGIÃO DE MAFRA

SÍLVIA MARIA MARTINS CURADO ARMÉS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Professor Doutor Virgílio da Silva Almeida

Professor Doutor José Augusto Farraia e
Silva Meireles

Professora Doutora Isabel Maria Soares
Pereira da Fonseca de Sampaio

Doutor Nuno Alberto Palma Pinheiro da
Silva

ORIENTADOR

Doutor Nuno Alberto Palma Pinheiro da Silva

CO-ORIENTADOR

Professora Doutora Isabel Maria Soares Pereira
da Fonseca de Sampaio

2010

LISBOA

Agradecimentos

Agradeço à minha co-orientadora, a Professora Doutora Isabel Pereira da Fonseca, da Faculdade de Medicina Veterinária, pela sua disponibilidade e ajuda, essenciais à elaboração da minha tese de dissertação de Mestrado.

Agradeço à Clínica Veterinária de Mafra e em especial ao Dr. Nuno Palma por me ter recebido e orientado durante o meu estágio curricular.

Agradeço à empresa Merial pelo apoio financeiro à realização da minha tese de dissertação de Mestrado.

Agradeço à Professora Doutora Ana Duarte pela realização da técnica de PCR e informação fornecida acerca desta técnica.

Agradeço à Dra. Lídia Gomes pelo seu apoio na execução dos protocolos de imunofluorescência indirecta.

Agradeço a todos aqueles que directa ou indirectamente contribuíram para a realização de todo o meu trabalho.

Resumo

Rastreio de *Leishmania infantum* em cães assintomáticos na região de Mafra

A leishmaniose canina é uma doença parasitária de distribuição mundial provocada por um protozoário, que em Portugal, pertence à espécie *L. infantum* e é transmitido por vectores do género *Phlebotomus*.

Nas zonas endémicas os cães infectados com *L. infantum* e assintomáticos são infectantes para o flebótomo vector numa proporção similar aos sintomáticos, contudo a comunidade veterinária não está devidamente alertada para a sua existência e importância. Este trabalho contribui para realçar a importância destes animais na transmissão de *L. infantum*. Neste âmbito foi realizado um rastreio de infecção por *L. infantum* em cães assintomáticos numa amostra de 80 cães habitantes na região de Mafra, Portugal. Este trabalho foi o primeiro realizado exclusivamente em cães assintomáticos em Portugal na região de Mafra. Através da técnica de IFI detectou-se que 8,75% (7/80) dos cães testados possuíam anticorpos anti-leishmania. Num dos cães positivos foi realizado PCR a partir de amostras cutâneas para detecção de ADN de *L. infantum*. Embora o resultado tenha sido negativo, a presença de parasitas no organismo do animal não pode ser excluída. Procurou-se também avaliar possíveis factores de risco.

O controlo da leishmaniose canina apoia-se no esclarecimento da comunidade veterinária e dos proprietários de cães.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*, cães, assintomáticos, IFI, rastreio, Mafra

Abstract

***Leishmania infantum* infection survey in asymptomatic dogs in Mafra area**

Canine leishmaniosis is a parasitic disease of worldwide distribution caused by a protozoan transmitted by insects of *Phlebotomus* genus.

In endemic areas asymptomatic dogs infected by *L.infantum* are able to infect sandflies in a similar proportion as the symptomatic ones, however the veterinary community is not duly alert to its existence and importance. This study contributes to emphasize the importance of these animals in *L. infantum* transmission. A survey of 80 asymptomatic dogs living in Mafra region, Portugal was carried out to investigate the presence of *L. infantum* infection. This was the first study ever done on exclusive asymptomatic dogs in Mafra, Portugal. The IFI technique detected that 8,75% (7/80) of the tested dogs had anti-*Leishmania* antibodies. Skin PCR was made in one of the positive dogs to detect *L. infantum* DNA. Though PCR result was negative the presence of the parasite in the dog body can not be ruled out. Risk factors were investigated.

Canine leishmaniosis control supports on owners and veterinary community information.

Key-words: *Leishmania infantum*, dogs, asymptomatic, IFI, survey, Mafra

Índice geral

Agradecimentos.....	i
Resumo	iii
Abstract	v
Índice geral.....	vii
Índice de figuras, gráficos e tabelas.....	xi
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	xiii
Introdução.....	1
I - Descrição das actividades efectuadas no estágio curricular.....	3
II - Revisão bibliográfica sobre leishmaniose canina.....	7
1. Perspectiva Histórica Mundial e em Portugal.....	7
2. Caracterização do parasita	7
2.1. Ciclo de Vida	9
3. Caracterização do vector	12
4. Principais vias de transmissão.....	14
4.1. Transmissão pelo vector.....	14
4.2. Transmissão por transfusão sanguínea	14
4.3. Transmissão vertical.....	15
4.4. Transmissão sexual.....	15
4.5. Transmissão por <i>Ripicephalus sanguineus</i>	15
4.6. Transmissão por <i>Ctenocephalides felis</i>	15
5. Epidemiologia da leishmaniose canina	15
5.1. Epidemiologia da leishmaniose canina em Portugal	16
6. Resposta imunológica.....	17
6.1. Resposta humoral.....	18
6.2. Resposta celular	18
7. Importância dos cães assintomáticos	19
8. Diagnóstico.....	22
8.1. Quadro Clínico.....	23

8.1.1.	Lesões cutâneas.....	23
8.1.1.1.	Formas localizadas.....	23
8.1.1.2.	Formas generalizadas.....	24
8.1.1.3.	Outras formas cutâneas.....	25
8.1.2.	Lesões sistémicas e gerais.....	26
8.1.2.1.	Sinais clínicos inespecíficos.....	26
8.1.2.2.	Sinais clínicos específicos.....	27
8.2.	Diagnóstico laboratorial.....	28
8.2.1.	Diagnóstico parasitológico.....	28
8.2.1.1.	Exame parasitológico directo.....	28
8.2.1.2.	Exame parasitológico cultural.....	29
8.2.2.	Inoculação experimental em animais.....	29
8.2.3.	Xenodiagnóstico.....	29
8.2.4.	Diagnóstico histopatológico.....	29
8.2.5.	Reacção em Cadeia da Polimerase – PCR.....	30
8.2.6.	Pesquisa de anticorpos - Sorologia.....	31
8.2.6.1.	Imunofluorescência indirecta – IFI.....	32
8.2.6.2.	Teste de aglutinação directa (DAT).....	33
8.2.6.3.	Enzimaimunoensaio – ELISA.....	33
8.2.7.	Teste de Montenegro – Avaliação da resposta celular.....	33
8.3.	Métodos complementares de diagnóstico.....	34
8.3.1.	Hemograma e proteínas plasmáticas.....	34
8.3.2.	Análise da urina.....	34
9.	Tratamento.....	35
9.1.	Análogos das Purinas – Pirazolopiridinas: Alopurinol.....	36
9.2.	Antibióticos.....	37
9.2.1.	Anfotericina B.....	37
9.2.2.	Paramomicina (Aminosidina).....	37
9.3.	Compostos antimoniais.....	38
9.4.	Diamidinas.....	39

9.5.	Derivados do Imidazol	39
9.5.1.	Ketoconazol.....	40
9.5.2.	Metronidazol.....	40
9.6.	Fármacos imunomoduladores.....	40
9.6.1.	Fármacos imunossupressores.....	40
9.6.2.	Fármacos imunoestimulantes	41
9.6.2.1.	Levamisol	41
9.6.2.2.	Citoquinas	41
9.7.	Miltefosina	41
9.8.	Péptidos antimicrobianos.....	42
9.9.	Transportadores de moléculas de fármacos	43
9.10.	Tratamento sintomático.....	43
9.10.1.	Domperidona	43
9.11.	Trifuralina.....	44
9.12.	Outros Tratamentos	44
9.12.1.	Buparvacuona.....	44
9.12.2.	Enrofloxacina	44
9.12.3.	Marbofloxacina.....	44
9.13.	Dieta	45
10.	Profilaxia	45
11.	Prognóstico	47
12.	Importância zoonótica	47
III – Rastreamento de <i>Leishmania infantum</i> em cães assintomáticos na região de Mafra		49
1.	Objectivo.....	49
2.	Material e Métodos	49
2.1.	Caracterização da área geográfica do estudo.....	49
2.2.	Caracterização climática da zona de Mafra	50
2.3.	Caracterização da amostra.....	50
2.3.1.	História pregressa e exame físico.....	50
2.3.2.	Sexo	51

2.3.3.	Idade	51
2.3.4.	Raça.....	52
2.3.5.	Aptidão	52
2.3.6.	Local de habitação.....	53
2.3.7.	Proveniência.....	53
2.3.8.	Prevenção da picada do insecto vector	54
2.4.	Colheita e processamento das amostras	54
2.4.1.	Obtenção de soro para realização da técnica de IFI	54
2.4.2.	Execução de hemograma e análises bioquímicas	54
2.4.3.	Execução de esfregaço sanguíneo.....	55
2.4.4.	Raspagem cutânea.....	55
2.5.	Técnica de imunofluorescência indirecta (IFI).....	55
2.6.	PCR.....	56
2.7.	Análise estatística dos resultados.....	58
3.	Resultados.....	58
3.1.	Detecção de animais infectados com <i>L. infantum</i> pela técnica de imunofluorescência indirecta (IFI).....	58
3.2.	Resultados das análises hematológicas, bioquímicas e proteinograma.....	64
3.3.	Esfregaço de sangue	64
3.4.	Pesquisa da ADN de <i>L. infantum</i> por PCR.....	65
3.5.	Teste do χ^2 para determinação da relação entre a aptidão de caça e a infecção assintomática por <i>L. infantum</i>	65
4.	Discussão	65
5.	Conclusão.....	79
	Bibliografia	80
	Anexos	86

Índice de figuras, gráficos e tabelas

Gráfico 1 - Frequência relativa das espécies observadas nas consultas.....	3
Gráfico 2 - Frequência absoluta de especialidades nas consultas observadas	4
Gráfico 3 - Frequência relativa de exames complementares de diagnóstico efectuados/observados.....	5
Gráfico 4 - Frequência absoluta de tipos de cirurgia assistidas.....	6
Figura 5 - Formas amastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	9
Figura 6 - Ciclo de vida de <i>Leishmania infantum</i>	11
Figura 7 - <i>Phlebotomus spp</i>	14
Figura 8 - Lesão de cancro de inoculação na ponta nasal	24
Figura 9 - Hiperqueratose nasal.....	25
Figura 10 - Despigmentação da ponta nasal.....	25
Figura 11 - Onicogrifose	26
Figura 12 - Animal com leishmaniose canina evidenciando magreza	27
Figura 13 - Mapa do concelho de Mafra e dos distritos de Portugal.....	49
Gráfico 14 - Frequência relativa do sexo dos cães da amostra.	51
Gráfico 15 - Frequência absoluta da idade em anos dos cães da amostra	51
Gráfico 16 - Frequência absoluta da raça dos cães da amostra	52
Gráfico 17 - Frequência relativa da aptidão dos cães da amostra.....	52
Gráfico 18 - Frequência relativa do local de habitação dos cães da amostra.....	53
Gráfico 19 - Frequência absoluta da proveniência dos cães da amostra por freguesia.....	53
Gráfico 20 - Frequência relativa do tipo de prevenção contra a picada do insecto vector realizada nos cães da amostra	54
Figura 21 - Aspecto da técnica da IFI do resultado positivo	58
Tabela 22 - Caracterização da amostra em estudo e resultados da IFI	59
Figura 23 - Mapa da frequência relativa de cães positivos na técnica de IFI na diluição de 1/40 distribuído pela freguesia de origem	63
Figura 24 - Mapa da frequência relativa de cães positivos na técnica de IFI na diluição de 1/20 distribuído pela freguesia de origem	63
Tabela 25 - Resultados das análises hematológicas, bioquímicas e proteinograma do cão nº24.	64

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

°C	–	Graus Celsius
%	–	Porcentagem
χ^2	–	Qui quadrado
μg	–	Micrograma
μl	–	Microlitro
μm	–	Micrómetro
ADN	–	Ácido desoxirribonucleico
ALT	–	Alanina aminotransferase
aprox.	–	Aproximadamente
ARN	–	Ácido ribonucleico
AST	–	Aspartato aminotransferase
ATP	–	Trifosfato de adenosina
BUN	–	Ureia sanguínea (“blood urea nitrogen”)
CHCM	–	Concentração hemoglobina corpuscular média
cm	–	Centímetro
Cut-off	–	Limiar de positividade
CVM	–	Clínica veterinária de Mafra
DAT	–	Aglutinação directa
Dr.	–	Doutor
ELISA	–	Enzyme linked immunosorbent assay
et al.	–	e outros
FAS	–	Fosfatase alcalina
GTP	–	Guanosina trifosfato
h	–	Horas
HCM	–	Hemoglobina corpuscular média
HIV	–	Vírus da Imunodeficiência Humana
HVL	–	Leishmaniose visceral humana
IFI	–	Imunofluorescência indirecta
IFN- γ	–	Interferão gama
Ig	–	Imunoglobulina
IL	–	Interleucina
IND	–	Raça indeterminada
kg	–	Quilograma
km	–	Quilómetro
km ²	–	Quilómetros quadrados

kPCR	–	<i>Kinetic polymerase chain reaction</i>
L	–	Litro
<i>L. infantum</i>	–	<i>Leishmania infantum</i>
LPG	–	Lipofosfoglicano
mg	–	Miligrama
ml	–	Mililitro
mm	–	Milímetro
mm ²	–	Milímetros quadrados
MON	–	Montepellier
N	–	Nº de indivíduos da amostra
Nº	–	Número
nm	–	Nanómetros
<i>P.</i>	–	<i>Phlebotomus</i>
PAAF	–	Punção aspirativa por agulha fina
PBS	–	Tampão fosfato salino
PCR	–	Polymerase chain reaction Reacção em cadeia da polimerase
PMBC	–	Células mononucleares do sangue periférico
pmol	–	Picomole
qPCR	–	PCR quantitativa
RT-PCR	–	PCR em tempo real
Sb	–	Estibogluconato
seg	–	Segundo
Spp	–	Espécies
Th	–	Células T efectoras (T helper cell)
TNF-α	–	Factor de necrose tumoral
UI	–	Unidade Internacional
VCM	–	Volume corpuscular médio

Introdução

As leishmanioses são um grupo de doenças provocadas por várias espécies de protozoários flagelados que pertencem ao género *Leishmania* e que afectam fundamentalmente o Homem e o cão. Presentemente as leishmanioses são a terceira doença transmitida por vectores mais importante, sendo a malária e a filariose linfática as duas primeiras (Reithinger & Davies, 2002, citados por Cardoso, 2006).

As suas manifestações podem ir desde quadros cutâneos passageiros até quadros viscerais de resolução fatal. Normalmente distinguem-se três formas da doença: a leishmaniose visceral ou Kala-azar (*L. infantum*), que se encontra na Índia e ao redor do Mediterrâneo; a leishmaniose cutânea (*L. tropica*) ou “Botão do Oriente” ou “Botão de Alepo” que se encontra principalmente no Médio Oriente e ao redor do Mediterrâneo; e a leishmaniose mucocutânea da América Latina (*L. brasilienses*, *L. mexicana*) que se encontra na América do Sul. Estas formas são idênticas quanto à morfologia, mas diferem na constituição enzimática e ADN, na sua afinidade para os tecidos do hospedeiro, e nas espécies de insectos que as podem transmitir (Rochette, 2003).

A leishmaniose canina tem distribuição mundial. No Velho Mundo a maioria dos casos ocorrem na Bacia do Mediterrâneo e Portugal. No Novo Mundo é endémica na América do Sul e Central (Foster & Foil, 2003).

No Velho Mundo a maioria dos casos é provocada por *Leishmania infantum* enquanto que no Novo Mundo é provocada por *Leishmania chagasi* (Solano-Gallego et al., 2009).

O protozoário *Leishmania* é transmitido por insectos do género *Phlebotomus* no Velho Mundo e por insectos do género *Lutzomia* no Novo Mundo. As infecções são mais prevalentes nos meses mais quentes, quando a população dos insectos vectores estão aumentadas (Foster & Foil, 2003). Esta doença caracteriza-se pelo parasitismo de células do sistema fagocitário do hospedeiro pelo parasita (Campillo et al., 1999).

Os roedores e os cães são reservatórios primários de *Leishmania* spp, o Homem e os gatos são hospedeiros acidentais e os flebótomos são os vectores (Nelson & Couto, 2006).

O principal reservatório de *L. infantum* na bacia do Mediterrâneo é o cão, no qual a infecção se pode manifestar de formas muito diversas desde processos patológicos graves, crónicos e insidiosos que terminam na morte do animal até processos de resolução espontânea (Campillo et al., 1999).

Quando um flebótomo fêmea pica um cão infectado ingere sangue e com ele as formas amastigotas. No aparelho digestivo deste hospedeiro invertebrado vai ocorrer a transformação de amastigota aflagelado em promastigota flagelado e a sua multiplicação. Quando o flebótomo fêmea voltar a se alimentar num cão vai inocular os promastigotas. Uma vez no hospedeiro vertebrado os promastigotas perdem o seu flagelo e transformam-se de novo em amastigotas, multiplicando-se no interior dos macrófagos do cão. Este cão irá ficar doente caso não consiga elaborar uma resposta imunitária competente.

A leishmaniose canina é uma doença de difícil tratamento. Os fármacos existentes raramente eliminam as leishmanias na totalidade, ocorrendo em regra recidivas. Ainda que o cão fique clinicamente curado permanece portador do parasita e deste modo infectante para outros animais e Homem.

Muitos cães das áreas endémicas são portadores de infecções assintomáticas (Greene, 2006). Os cães infectados com *L. infantum* e assintomáticos têm a mesma capacidade infectante que os cães sintomáticos. É de suma importância proceder-se ao diagnóstico precoce pois quanto mais cedo os cães assintomáticos forem identificados menor disseminação da doença ocorrerá. Estes animais quando detectados deverão ser protegidos da picada do flebótomo de modo a interromper o ciclo de transmissão do parasita, não deverão ser utilizados como dadores de sangue e com base em estudos recentes também não deverão ser utilizados como reprodutores. A identificação dos cães infectados assintomáticos é importante também em termos epidemiológicos, de modo a aferir a verdadeira prevalência da infecção do parasita nas várias áreas estudadas. Caso ocorra a depressão do sistema imunitário do cão assintomático a doença poder-se-á manifestar.

A leishmaniose canina é uma parasitose com dupla repercussão. Por um lado do ponto de vista veterinário, pela sua incidência elevada, dificuldade de diagnóstico precoce e relativa falta de eficácia do tratamento, constitui uma doença altamente problemática; por outro lado do ponto de vista da saúde pública dado o seu carácter zoonótico, pois o cão é o principal reservatório de *L. infantum* para as infecções humanas (Campillo *et al.*, 1999). Ainda assim, o risco de transmissão de um canídeo para um humano é muito baixo, se bem que exista risco de infecção nas pessoas imunodeprimidas (Rochette, 2003).

O presente trabalho encontra-se dividido em três partes. Na primeira parte é feita uma breve descrição das actividades realizadas ao longo do estágio curricular, a segunda parte consiste numa revisão bibliográfica sobre a temática da leishmaniose canina, incidindo a terceira parte no rastreio de *Leishmania infantum* em cães assintomáticos na região de Mafra.

I - Descrição das actividades efectuadas no estágio curricular

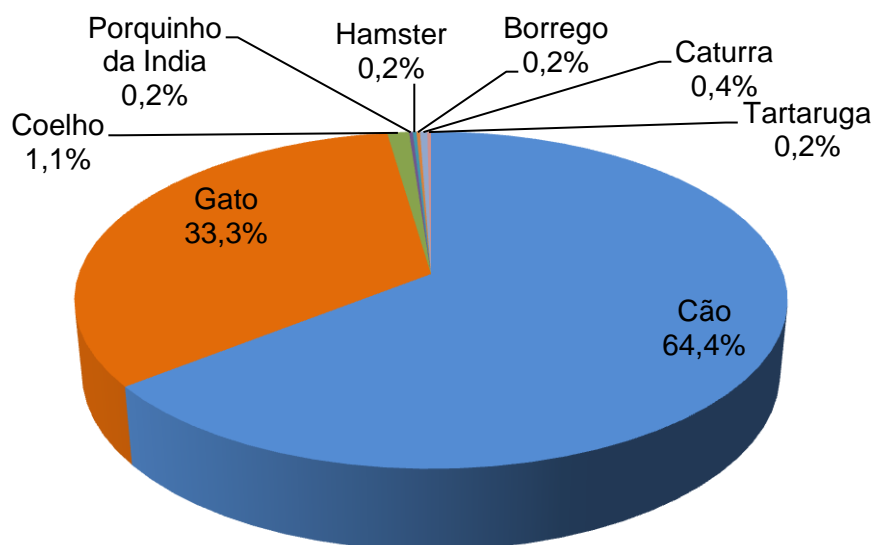
A componente prática do estágio curricular foi realizada na Clínica Veterinária de Mafra (CVM) no período compreendido entre 1 de Agosto de 2009 e 1 de Dezembro de 2009 com uma carga horária total de 703 horas.

As actividades desenvolvidas durante o estágio abrangeram todas aquelas realizadas na Clínica Veterinária de Mafra. Nas consultas a autora acompanhou o médico veterinário na anamnese e exame físico do animal, realizando também os exames complementares de diagnóstico.

No internamento administrou medicação, efectuou pensos, monitorizou, alimentou e passeou os animais internados.

Ao longo do período do estágio a espécie que surgiu para consulta com maior frequência relativa foi a canina (64,4% - 336/522) seguida pela espécie felina (33,3% - 174/522). Os animais exóticos foram pouco frequentes (2,1% - 11/522). De destacar ainda, pelo inusitado da situação, a consulta na clínica de um borrego levado à trela pelo seu dono.

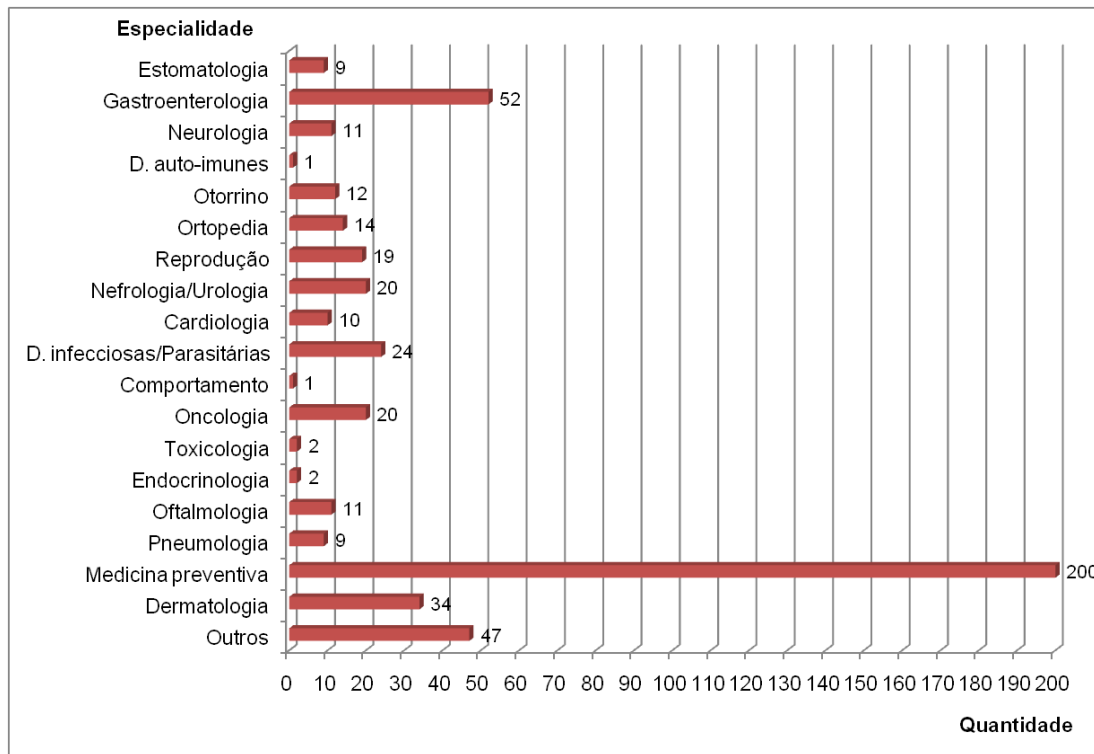
Gráfico 1 - Frequência relativa das espécies observadas nas consultas



Do total de 498 consultas assistidas, 40,2% (200/498) pertenceram à área de medicina preventiva, onde se incluem a vacinação e a desparasitação, seguida pela área de gastroenterologia, acompanhamento pós-cirúrgico e dermatologia. É com agrado que a autora regista a elevada frequência relativa das consultas de medicina preventiva, pois tal comprova a cada vez maior preocupação dos proprietários em proteger os seus animais. Nas consultas de seguimento de cirurgia foram efectuados pensos e remoção de

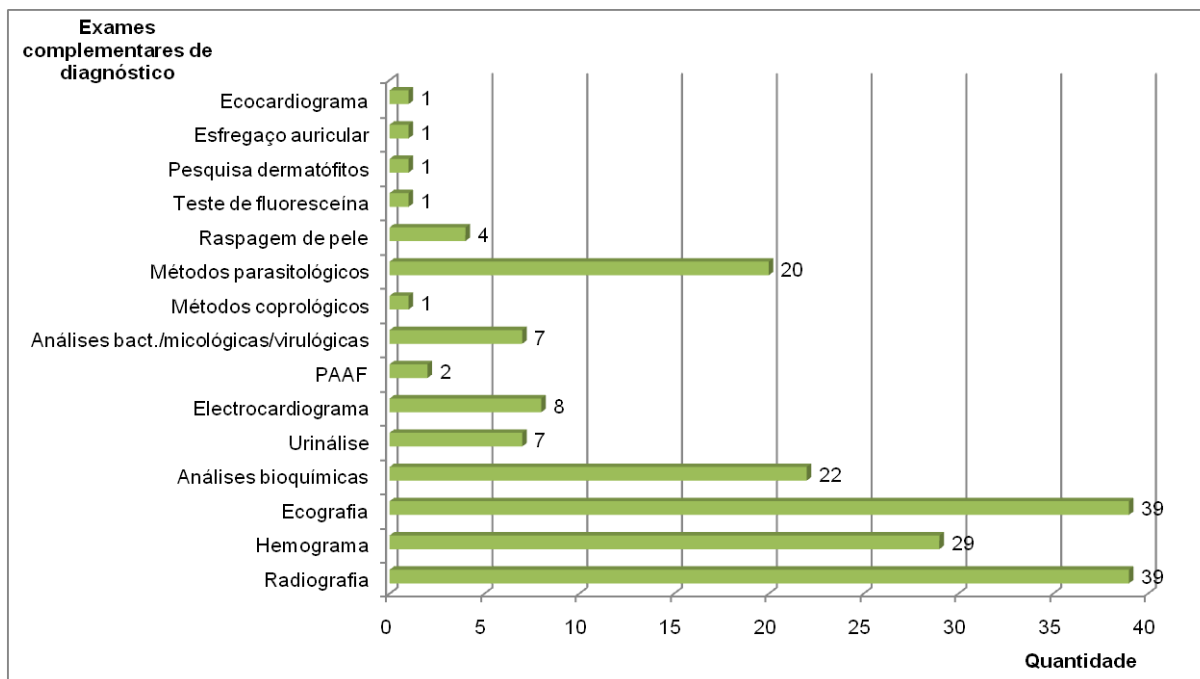
pontos/agrafos. É de realçar que cada animal pode apresentar mais do que uma doença, pelo que pode ser observado em mais de uma especialidade.

Gráfico 2 - Frequência absoluta de especialidades nas consultas observadas



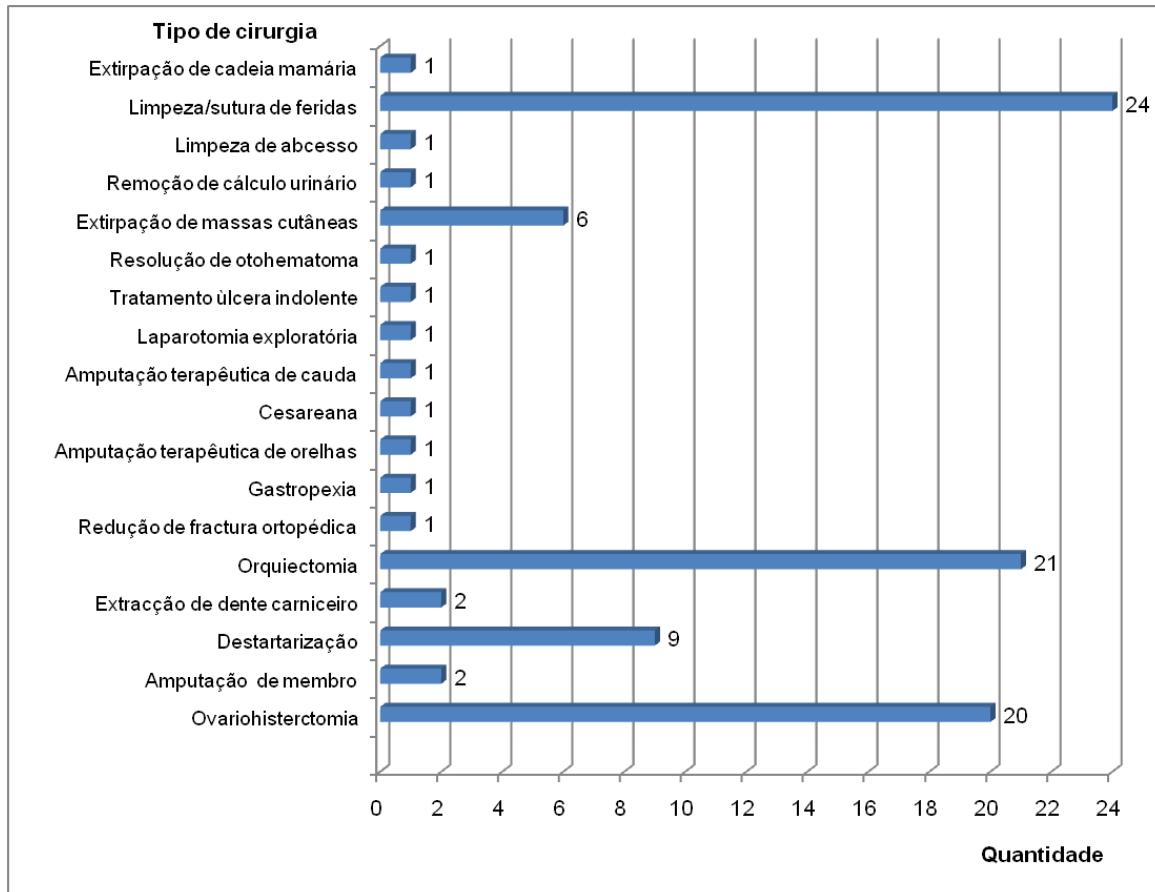
No âmbito dos exames complementares de diagnóstico a autora teve a oportunidade de participar na área de imagiologia, onde efectuou o posicionamento do animal e a revelação das películas de radiografia e assistiu também a diversas ecografias; executou hemogramas e análises bioquímicas. A radiografia e a ecografia foram os meios complementares de diagnóstico mais utilizados, seguidas pelo hemograma (realizado no aparelho “Hospitex Diagnostic”, modelo “Hema sScreen 18”) e análises bioquímicas sanguíneas (realizadas no aparelho “Biochemical systems international srl”, modelo “clin check plus vet”).

Gráfico 3 - Frequência relativa de exames complementares de diagnóstico efectuados/observados



Na área da cirurgia envolveu-se activamente em todas as etapas, participando na preparação pré-operatória do animal, auxílio do cirurgião, monitorização da anestesia e fornecendo os cuidados pós-operatórios. A limpeza/sutura de feridas encontra-se no topo da tabela dos procedimentos cirúrgicos realizados. A sua elevada frequência explica-se provavelmente por Mafra ser ainda uma zona predominantemente rural, onde a maioria dos animais está livre, pelo que ocorrem pequenos acidentes e confrontos com outros animais com bastante frequência.

Gráfico 4 - Frequência absoluta de tipos de cirurgia assistidas



A orquiectomia e a ovariohisterectomia foram também das cirurgias mais comumente realizadas. A orquiectomia é muitas vezes efectuada pois os donos querem evitar o comportamento sexual e todos os problemas a ele associados. Quanto à ovariohisterectomia, é uma cirurgia bastante solicitada pois para além da motivação de diminuição do comportamento sexual, há provavelmente cada vez maior consciencialização dos proprietários para os benefícios que esta cirurgia pode trazer quando realizada em animais jovens. Verifica-se que no caso da orquiectomia foi o gato a espécie em que mais se realizou esta cirurgia, enquanto que no caso da ovariohisterctomia foi a cadela.

II - Revisão bibliográfica sobre leishmaniose canina

1. Perspectiva Histórica Mundial e em Portugal

Thomas-Soccol *et al* (1993) formulou uma teoria para a origem das leishmanias, que baseando-se no ADN mitocondrial de vinte espécies diferentes de leishmanias do mundo afirma que a origem das leishmanias remonta aos períodos Cretáceo e Jurássico, há 120 milhões de anos, quando os continentes estavam ainda unidos na Pangeia (Altamirano-Enciso, Marzochi, Moreira, Schubach & Marzochi, 2003).

No Novo Mundo, as referências à leishmaniose humana surgem sob a forma de peças de cerâmica pré-Incas oriundas do Equador e Peru que datam entre 400-900 anos d.C., onde são visíveis representações de lesões na pele e deformações faciais típicas da leishmaniose cutâneas ou mucocutânea (Stanford University, 2010 disponível em <http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2006/Leishmaniasis/history.htm>).

No Velho Mundo os primeiros relatos escritos alusivos à doença datam do séc. I d.C.

A leishmaniose visceral foi descrita no Homem por Sir William Boog Leishman, um patologista britânico especialista em doenças tropicais, em Maio de 1903, tendo-lhe dado o nome de “Dum Dum Fever”. Dois meses depois Donovan realiza o mesmo feito, baptizando a doença de “Kala-azar” ou “Febre Negra” (Altamirano-Enciso *et al.*, 2003). Mais tarde a doença foi denominada de leishmaniose em honra a Leishman (Botelho, 1986).

A leishmaniose no cão foi descrita pela primeira vez por Nicolle e Comte em 1908 na Tunísia. Estes investigadores relataram a presença de formas amastigotas (Silva, Paula, Cabrera & Carreira, 2005; Wéry, 1995) e classificaram pela primeira vez os cães como reservatório da infecção humana por leishmania (Tafari, 2009).

Nicolle e Comte propuseram o termo *Leishmania infantum* para denominar o agente etiológico pois a doença era diagnosticada apenas em crianças com menos de 5 anos.

Em Portugal a doença foi descrita pela primeira vez no Homem em 1910 em Lisboa pelo Dr. Dionísio Álvares numa criança de 9 anos de idade (Rodrigues, 1921). A primeira referência à doença no cão foi feita em 1911 por Alvares e Pereira da Silva também na região Metropolitana de Lisboa (Pereira, 2008).

Em 1912 foi descrita pela primeira vez leishmaniose em gatos na Argélia por Sergent *et al*, mas em Portugal tal aconteceu somente em 1994 por Costa Durão *et al*.

2. Caracterização do parasita

No Homem distinguem-se três tipos principais de leishmanioses: cutânea, mucocutânea e visceral. No cão não existe uma distinção tão clara nas manifestações originadas pelas leishmanias, e assim os cães tendem a apresentar uma síndrome viscero-cutânea. No Velho Mundo o agente da doença no cão é *L. infantum* (*L. chagasi* na América). Contudo, existem outras espécies de *Leishmania* como *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. peruviana* que têm

sido encontradas no cão, mas estas não causam a doença, pelo que é possível que este animal actue como reservatório também nestes casos (Tomás & Romão, 2008).

A leishmaniose canina é provocada por *Leishmania infantum*, um protozoário do Reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, sub-filo Mastigophora, ordem Kinetoplastidae, sub-ordem Trypanosomatina, família Trypanosomatidae e género *Leishmania* (Campillo *et al.*, 1999).

Na bacia do Mediterrâneo o zimodema (grupo de organismos de *Leishmania* que têm o mesmo perfil de migração electroforética de isoenzimas) mais frequente de *Leishmania infantum* é o Montpellier-1 (MON-1), que é responsável por 90% dos casos de leishmaniose humana. No cão a maioria dos zimodemas são também MON-1 (Dereure *et al.*, 1999, citado por Cardoso, 2006). Na região do Alto-Douro foram isoladas, a partir de *P. ariasi*, duas estirpes pertencentes ao zimodema MON-24 (Pires *et al.*, 1991, citados por Faria, 2007).

O parasita *Leishmania* passa por duas formas principais ao longo do seu desenvolvimento: promastigota e amastigota.

A forma promastigota é extracelular e flagelada e encontra-se no insecto vector. É fusiforme, com cerca de 15x3 µm e exhibe um flagelo livre na sua região anterior que pode atingir cerca de 20 µm de comprimento (Tomás & Romão, 2008). Os promastigotas localizam-se nas peças bucais e probóscide do insecto vector (Campillo *et al.*, 1999).

A forma amastigota (

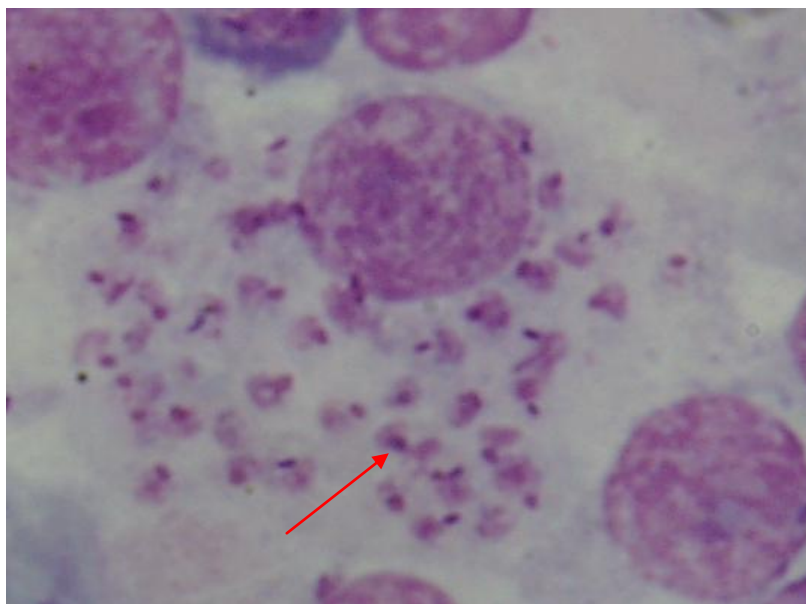
Figura 5) é ovóide ou redonda e mede 2,5 a 5 µ de comprimento e 1,5 a 2µm de largura (Greene, 2006), tendo um flagelo rudimentar, que não se observa na microscopia óptica convencional. Os amastigotas constituem o estadio responsável pela disseminação da infecção no cão ou em qualquer outro hospedeiro vertebrado (Tomás & Romão, 2008).

A estrutura básica de *Leishmania* é a de uma célula eucariótica, possuindo um núcleo com nucléolo central, limitado pela membrana nuclear. Possui mitocôndria que em parasitas que não estão em multiplicação é tubular e se estende ao longo de todo o corpo, retículo endoplasmático, na sua maioria disposto em volta do núcleo e complexo de Golgi na região anterior do parasita.

Os Kinetoplastidae têm órgãos específicos: o cinetoplasto, glissomas e acidocalcissomas.

Em ambas as formas de *Leishmania* existe o cinetoplasto, que corresponde ao ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial que condensa numa única região da célula, perto de origem do flagelo. Nos glissomas realiza-se a glicólise. Os acidocalcissomas são organelos com pH ácido que intervêm em fenómenos de sinalização, no equilíbrio do pH e na osmoregulação (Tomás & Romão, 2008).

Figura 5 - Formas amastigotas de *Leishmania infantum* (seta) (ampliação de 1300x aprox.) (original)



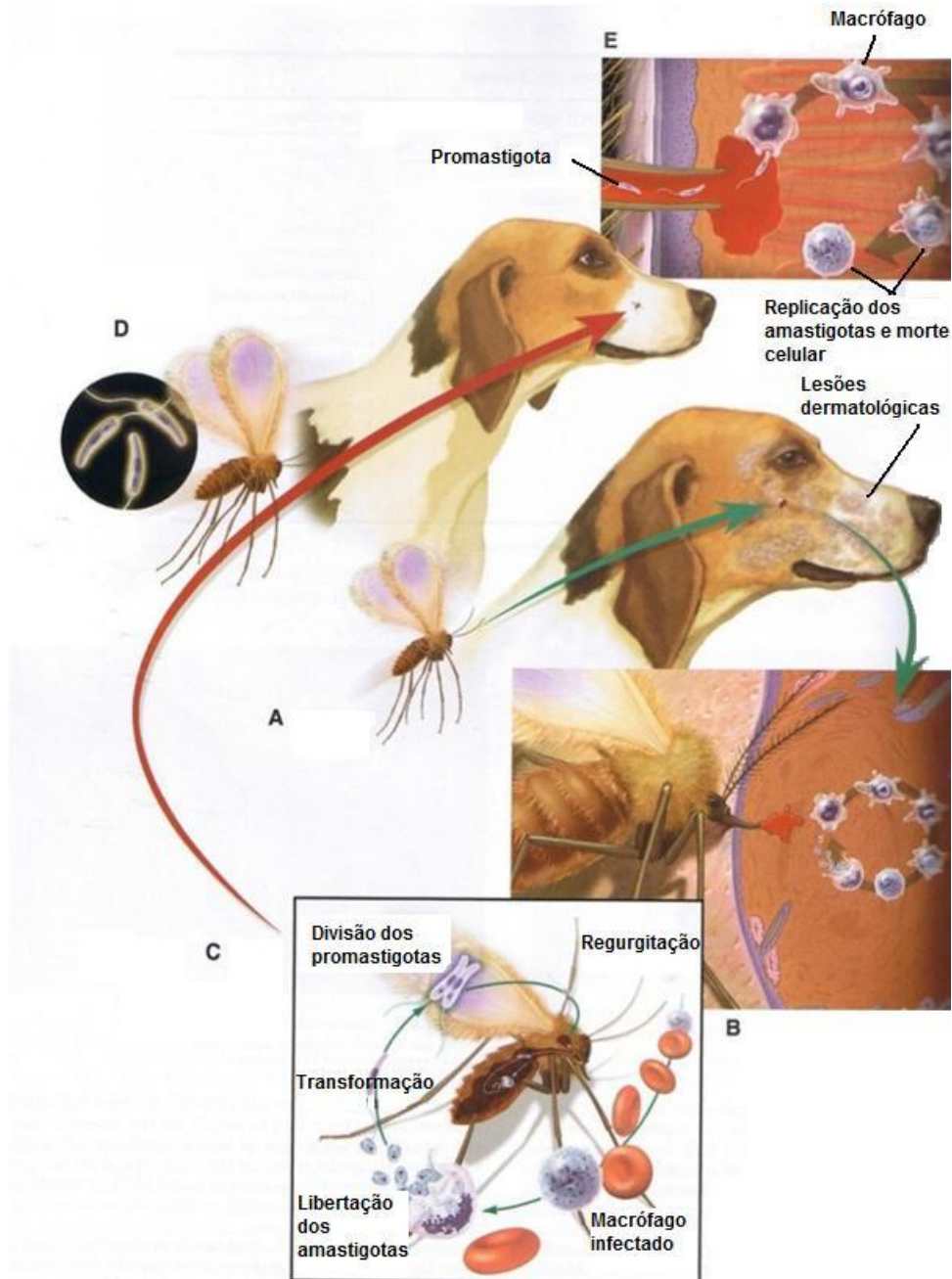
2.1. Ciclo de Vida

As espécies do género *Leishmania* têm um ciclo de vida heteroxeno pois realizam parte do seu ciclo biológico no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado - numerosas espécies do género *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomia* no Novo Mundo – na sua forma promastigota e outra parte no hospedeiro vertebrado, na sua forma amastigota, principalmente no interior dos seus macrófagos (Tomás & Romão, 2008; Matute, Esteban, Barrientos & Moreno, 2007). Quando o flebótomo fêmea parasitado pica um vertebrado, inocula, juntamente com a sua saliva, os promastigotas existentes na sua probóscide. Uma vez dentro dos capilares da pele do hospedeiro vertebrado, os promastigotas metacíclicos são fagocitados por células dendríticas e macrofágicas da pele. Numa primeira fase também penetram em neutrófilos mas aí não se dividem (Tomás & Romão, 2008). O parasita é fagocitado pelos macrófagos, que o englobam num vacúolo parasitóforo na tentativa de o eliminar através de uma cascata de metabolitos derivados do oxigénio, como o óxido nítrico, e da libertação de hidrolases lisossomais para o interior do vacúolo. A leishmania tem a capacidade de se evadir destas reacções inespecíficas do macrófago de modo a sobreviver e multiplicar no seu interior (Matute *et al.*, 2007). Uma vez terminada a internalização no macrófago o promastigota diferencia-se em amastigota (Tomás & Romão, 2008) num prazo de 24 horas (Campillo *et al.*, 1999). Os amastigotas começam um ciclo de multiplicação que produz um grande número de parasitas que vão ocupando o citoplasma celular e finalmente originam a rotura do macrófago. Os amastigotas libertados são fagocitados por outros macrófagos que se distribuem através do sangue e linfa para outras regiões do corpo, como a medula óssea, baço, fígado (Tomás & Romão, 2008) e gânglios linfáticos (Rochette,

2003). No sangue periférico e pele, os amastigotas estão à disposição, podendo ser ingeridos pelo insecto vector (Campillo *et al.*, 1999). Esta situação pode persistir durante meses a anos, sendo o período de incubação da leishmaniose canina de um mês a seis anos (Rochette, 2003). A progressão de doença depende da capacidade de sobrevivência dos amastigotas às reacções que ocorrem no interior do macrófago, da virulência dos protozoários e da eficiência da resposta imunitária do cão (Matute *et al.*, 2007). Apesar do parasita apresentar uma série de estratégias para limitar a acção microbicida do macrófago, o hospedeiro vertebrado consegue muitas vezes impedir o estabelecimento do parasita e/ou interferir no seu desenvolvimento. Vários factores contribuem para isto, mas em última análise a eliminação de *Leishmania* está dependente da capacidade do hospedeiro em produzir uma resposta imunitária adequada (Tomás & Romão, 2008).

Assim que um flebótomo pica o hospedeiro infectado ingere os macrófagos parasitados, que rapidamente são destruídos e assim libertam os amastigotas. Nas próximas 24h os amastigotas vão multiplicar-se ou iniciar o processo de diferenciação em promastigotas no intestino do insecto. Os promastigotas multiplicam-se por divisão binária e localizam-se livres no lúmen do intestino ou fixos na sua parede através do flagelo. A fase final do ciclo no vector é a diferenciação dos promastigotas metacíclicos que possuem capacidade infectante para o vertebrado. O tempo necessário para completar o ciclo no insecto depende da espécie de *Leishmania*, do vector e das condições ambientais, variando entre 6-14 dias (Campillo *et al.*, 1999). Durante a sua vida - cerca de três meses - o flebótomo infectado pica raposas, ratazanas e cães e seres humanos (Rochette, 2003).

Figura 6 - Ciclo de vida de *Leishmania infantum* (adaptado de Greene, 2006); A- O flebótomo não infectado alimenta-se num hospedeiro infectado com *L. infantum* e B- ingere os macrófagos infectados. C- Os amastigotas são libertados no intestino do flebótomo e D- são transformados em promastigotas que aí se replicam. E- Os promastigotas são regurgitados durante a refeição sanguínea do flebótomo infectado, transmitindo a infecção a um novo hospedeiro.



A manutenção do ciclo biológico da leishmania depende da capacidade dos promastigotas de colonizarem o aparelho digestivo do hospedeiro intermediário e da capacidade dos amastigotas de estabelecerem um parasitismo intracelular no macrófago do hospedeiro vertebrado (Campillo *et al.*, 1999).

3. Caracterização do vector

Os flebotomos - em inglês “sand flies” ou “sandflies” - são insectos muito pequenos, com comprimento corporal de 1,5 a 3 mm, com sedas de revestimento abundantes (Afonso & Alves-Pires, 2008) que recobrem todo o corpo, inclusive patas, asas e antenas (Matute *et al.*, 2007). São constituídos por cabeça, tórax e abdómen.

Os vectores de *Leishmania* pertencem à ordem Diptera, Família Psychodidae e Subfamília Phlebotominae, pertencendo ao género *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomia* no Novo Mundo. Na Europa *Phlebotomus perniciosus* e *P. ariasi* são as espécies mais importantes como vectores de *L. infantum* e no Novo Mundo o vector é a espécie *Lutzomia longipalpis* (Cardoso, 2006).

Em Portugal, *P. ariasi* e *P. perniciosus* são os vectores de *L. infantum* (Alves-Pires *et al.*, 2001). *P. perniciosus* tem preferência por paisagens acidentadas e encontra-se cada vez com mais frequência em altitudes superiores a 1200 m, localizando-se preferencialmente em piso climático mediterrâneo semiárido (Matute *et al.*, 2007).

O ciclo natural da infecção por *Leishmania* envolve um flebotomo como vector e um hospedeiro vertebrado. Os flebotomos fêmeas acolhem as formas promastigotas da *Leishmania* no seu intestino e transmitem, durante a sua refeição sanguínea, o parasita ao hospedeiro vertebrado – o Homem ou um animal selvagem ou doméstico - onde se desenvolve a forma amastigota.

Ambos os sexos dos flebotomos alimentam-se de soluções açucaradas, mas apenas as fêmeas são hematófagas, pois a sangue é necessário para a produção dos ovos (Mencke *et al.*, 2003). Assim, são as fêmeas as responsáveis pela transmissão do parasita. O número de refeições sanguíneas necessárias para uma fêmea completar o seu ciclo trofogónico varia com a espécie e condições climáticas, mas regra geral uma refeição é suficiente (Afonso & Alves-Pires, 2008). Cada refeição sanguínea desencadeia um novo processo de postura. Os açúcares procedem de plantas e insectos e constituem a sua dieta energética.

As espécies vectoras de leishmania são antropozófilas, ainda que pareçam tender a alimentar-se com mais facilidade em gado e canídeos do que no ser humano (Matute *et al.*, 2007).

O ciclo de vida tem duração variável, dependendo da temperatura, humidade e fotoperíodo, sendo em laboratório de cerca de 45 dias. Ocorre em meio terrestre – ovo, larva (4 estados) e pupa - e no meio aéreo – adultos (Afonso & Alves-Pires, 2008). É realizada uma metamorfose completa com quatro estados larvares terrestres, pupas sésseis e fêmeas hematófagas. Na latitude de Espanha são as larvas de estado 4 que entram em letargia, coincidindo com as estações mais frias. As larvas dos flebotomos desenvolvem-se nos seguintes biótopos: tocas, fendas em paredes e muros, fendas profundas no terreno, estábulos, currais, jardins, sarjetas, bueiro, construções em ruínas, minas, entulhos, estrumeiras, depósitos, etc. Todos estes locais têm em comum temperaturas moderadas e

estáveis, iluminação escassa ou nula, humidade relativa alta e constante, e um elevado conteúdo em matéria orgânica em decomposição, de origem animal ou vegetal que lhes serve de alimento (Matute *et al.*, 2007).

A actividade da maioria das fêmeas de flebotomos é crepuscular ou nocturna, conforme a espécie e época do ano (Afonso & Alves-Pires, 2008), apresentando uma actividade cicardiana clara (Mencke, Volf, Volfova & Stanneck, 2003). Na região Mediterrânea e Ásia os flebotomos são activos nos meses quentes, da Primavera até ao Outono (Greene, 2006) de Abril a Outubro, mas nos trópicos e sub-trópicos o ciclo de vida destes insectos ocorre durante todo o ano (Cardoso, 2006).

A dispersão dos flebotomos varia com a espécie e os locais de habitação (Afonso & Alves-Pires, 2008), mas em geral não se deslocam grandes distâncias. Estudos mostraram que raramente se afastam mais de 1 km dos seus locais de reprodução (Greene, 2006), deslocando-se contra o vento, a pouca altura do solo, mediante voos de curta duração em que percorrem poucos metros. A mobilidade dos flebotomos tem relação directa com a disponibilidade de vertebrados de sangue quente para se alimentarem e de locais adequados de repouso e postura. A luz parece exercer uma atracção moderada sobre estes insectos (Matute *et al.*, 2007).

Ao longo do dia quente descansam longe da luz solar em locais relativamente frescos e húmidos, como caves, estábulos, fendas ou tocas de roedores (Mencke *et al.*, 2003).

Os flebotomos tipicamente picam o cão - ou outro mamífero hospedeiro numa zona com pouco pêlo, pois é-lhes mais fácil recolher o sangue (Mencke *et al.*, 2003; Afonso & Alves-Pires, 2008). Zonas como focinho, orelhas, abdómen (Afonso & Alves-Pires, 2008), em volta dos olhos e da boca são locais típicos desta actuação (Mencke *et al.*, 2003).

O flebotomo é telmofágico, rasgando a pele do cão com as suas mandíbulas e recolhendo o sangue da gotícula formada chamada de lago hemolinfático, depositando simultaneamente os promastigotas metacíclicos (Afonso & Alves-Pires, 2008).

Existem pelo menos duas razões porque os flebotomíneos são vectores de leishmania:

1 - O seu intestino médio é necessário para o desenvolvimento de parte do ciclo biológico do parasita (Cardoso, 2006). Os promastigotas ligam-se especificamente a receptores do intestino do flebotomo. Quando esta ligação não ocorre os parasitas que inicialmente se replicaram no lúmen do intestino são excretados com as fezes e assim não alcançam a quantidade necessária para infectar o hospedeiro vertebrado durante a segunda refeição do flebotomo (Greene, 2006).

2 - A saliva do vector tem componentes -anticoagulantes, vasodilatadores e enzimas com propriedades anti-inflamatórias, anti-hemostáticas e anestésicas que auxiliam o estabelecimento da infecção no local da picada no hospedeiro vertebrado, sendo

importantes para a transmissão e actuando como ampliadores da infecção parasitária (Cardoso, 2006; Mencke *et al.*, 2003).

Para além destas duas razões há que referir que no decorrer do ciclo de vida de *Leishmania* spp no flebótomo vector, o parasita forma um rolhão na válvula estemodeal, que bloqueia a via alimentar e interfere com as bombas faríngeas e cibarial. Isto vai fazer com que o flebótomo efectue várias tentativas para realizar uma refeição sanguínea, o que se revela um factor potenciador para a transmissão dos parasitas. Assim, um único flebótomo infectante, por exemplo, pode infectar vários cães numa só noite (Afonso & Alves-Pires, 2008).

Figura 7 - *Phlebotomus* spp (ampliação de 23x aprox.) (original)



4. Principais vias de transmissão

4.1. Transmissão pelo vector

A transmissão da leishmaniose é reconhecida como sendo marcadamente dependente do vector invertebrado. Contudo já foram descritas outras formas de transmissão de *L. infantum*.

4.2. Transmissão por transfusão sanguínea

Freitas *et al.* (2006) demonstraram que *L. Infantum* pode ser transmitida por transfusão sanguínea, pois os amastigotas presentes nas células mononucleares são transmitidos para o animal receptor e conservam o seu potencial infectante. A transmissão de *L. infantum* através de transfusão sanguínea foi documentada em cães da América do Norte, incluindo um relato de transmissão através de sangue proveniente de um banco de sangue da Pennsylvania. A manifestação da doença adquirida por transfusão sanguínea depende, tal como na infecção natural, do estabelecimento de um equilíbrio entre o parasita e as defesas imunológicas e genética do hospedeiro (Freitas, Melo, Costa-Val & Michalick, 2006).

4.3. Transmissão vertical

Foi descrita transmissão vertical a partir de cadelas grávidas infectadas para os seus fetos através da placenta (Silva *et al.*, 2009).

A possibilidade de transmissão transplacentária de *Leishmania* foi confirmada por Rosypal e Lindsay (2005), citados por Magno da Silva *et al.* (2009) usando um modelo murino.

4.4. Transmissão sexual

Silva *et al.* (2009) afirmam que a transmissão sexual de *L. Infantum* a partir de cães naturalmente infectados para cadelas susceptíveis pode ocorrer na ausência do vector biológico natural.

4.5. Transmissão por *Ripicephalus sanguineus*

Dantas-Torres *et al.* (2010) comprovaram a existencia de ADN de *L. infantum* nas glândulas salivares de *Ripicephalus sanguineus*. São necessários mais estudos para validar a hipótese de esta espécie ser vector de *L. infantum* (Paz *et al.*, 2009).

4.6. Transmissão por *Ctenocephalides felis*

Ferreira, Fattori, Souza e Lima (2008) afirmam que as pulgas podem ser vectores de *Leishmania* spp, contudo são necessários mais estudos para esclarecer acerca do papel das pulgas no ciclo de vida do protozoário (Ferreira *et al.*, 2008).

5. Epidemiologia da leishmaniose canina

A leishmaniose visceral zoonótica distribui-se fundamentalmente em três zonas geográficas: Brasil, China e Bacia do Mediterrâneo (Matute *et al.*, 2007).

Baseado em estudos de seroprevalência realizados em Espanha, França, Itália e Portugal é estimado que 2,5 milhões de cães destes países estejam infectados com leishmaniose na forma visceral (Greene, 2006).

Os canídeos silváticos (raposas, lobos e chacais) fazem parte do ciclo silvático desta doença (Alvar, Cañavate, Molina, Moreno & Nieto, 2004, citados por Matute *et al.*, 2007). A raposa é considerada o elo de ligação entre o ciclo silvático e o doméstico (Andrade *et al.*, 2002, citados por Matute *et al.*, 2007). *L. infantum* foi detectada em ratazanas, cavalos, bovinos (Lobsiger *et al.*, 2010) e gatos (Martín-Sánchez, Acedo, Muñoz-Pérez, Pesson, Marchal & Morillas-Márquez, 2007; Pennisi, 2002; Hervás *et al.*, 1999), não se conhecendo bem o significado epidemiológico destes hospedeiros.

Em áreas endémicas o factor sexo não constitui um factor de risco (Pereira, 2008). Contudo, Denerolle (1996) e Ciaramella *et al.* (1997), citados por Miranda, Roura, Picado, Ferrer & Ramis (2008) referiram que os machos pareciam ser mais afectados pela leishmaniose canina (Miranda, Roura, Picado, Ferrer & Ramis, 2008).

A caracterização da leishmaniose canina quanto à idade e raça não é totalmente consensual. Num estudo realizado por Abranches *et al.* (1991) citado por Pereira (2008) verificou-se que as raças mais afectadas foram o Pastor Alemão e o Doberman e que dos 11,9% cães doentes tinham idades entre os três e seis anos e 13,7% dos animais tinham idade superior a 9 anos (Pereira, 2008).

Miranda *et al.* (2008) realizaram um estudo no qual concluíram que as raças mais afectadas foram o Pastor Alemão, Rottweiler e Boxer e as idades dos animais doentes tinham uma distribuição bimodal, com um primeiro pico nos jovens adultos, com 2 a 4 anos e o segundo pico em animais com mais de sete anos.

5.1. Epidemiologia da leishmaniose canina em Portugal

Em Portugal a leishmaniose canina constitui uma razão muito frequente para a consulta veterinária. A prevalência necessária para uma zona ser considerada endémica é de 2.5% (Rioux *et al.*, 1971, citados por Cardoso, 2006). Assim, uma vez que Portugal tem uma seroprevalência de 6%, é considerado um país endémico de leishmaniose canina (Neves *et al.*, 2009).

Segundo um estudo realizado por Casimiro, Calheiros, Santos e Kovats (2006) em Portugal actualmente o risco de transmissão de *L. infantum* é médio. São previstas mudanças climáticas para todo o território nacional, com o aumento do número de dias com temperaturas favoráveis à actividade de *Phlebotomus perniciosus* – o flebótomo responsável pela maioria das infecções por *Leishmania infantum* em Portugal. Assim, é preconizado que o risco de transmissão de leishmaniose em Portugal irá tornar-se alto (Casimiro *et al.*, 2006). Num estudo realizado por Pereira da Fonseca, Santos, Diaz, Bordeaux e Oliveira (2008a) 110 clínicos veterinários foram inquiridos se na sua opinião o número de casos novos e de seguimento de leishmaniose canina teria diminuído, aumentado ou estabilizado. A maioria dos clínicos (56/110) concordou que o número de casos novos e de seguimento aumentou. Quanto às manifestações clínicas, com base em dois estudos realizados (Cardoso e Mendão, 2009; Pereira da Fonseca *et al.*, 2008a) em Portugal em 2007 não é possível chegar a nenhuma conclusão absoluta, pois apresentam resultados díspares. O estudo realizado por Cardoso e Mendão (2009) no qual realizaram um inquérito a 105 centros de atendimento médico veterinário afirma que a descamação cutânea é o sinal mais frequente nos animais com leishmaniose canina, com uma percentagem de 66,7%, seguido por perda de peso ou emagrecimento (53,3%) e linfadenopatia localizada ou generalizada (44,8%) (Cardoso & Mendão, 2009). Já o estudo realizado por Pereira da Fonseca, Santos, Diaz, Bordeaux e Oliveira (2008b) em 141 cães afirma que a alopecia (89%) é a manifestação mais frequente seguida pela perda de peso (85%) e descamação (77%).

Num estudo realizado em 2006 em Portugal Continental por Neves, Cardoso, Afonso e Campino (2007) com o intuito de aferir o que os proprietários de cães sabiam acerca desta

zoonose parasitária verificou-se que 40% a 70% dos donos de cães não conheciam a leishmaniose canina, 55% a 80% não sabiam qual o resultado do tratamento, 60% a 75% não sabiam como prevenir a doença, 70% a 85% não sabiam quais os sinais clínicos típicos e 75% a 90% não sabiam tratar-se de uma zoonose. Apenas 6% a 12% demonstraram ter conhecimento satisfatório acerca da leishmaniose canina. O nível de conhecimento era maior nas áreas geográficas onde o risco de infecção para o cão é considerado superior e nas áreas urbanas (Neves *et al.*, 2007).

Num estudo realizado em 2002 foi determinada a prevalência de infecção nos cães domésticos e errantes, sendo de 18,4% nos primeiros e 21,6% nos segundos. Segundo os autores estes resultados sustentam a importância do papel dos cães errantes na transmissão de *Leishmania infantum* em Lisboa (Sofia Cortes *et al.*, 2007).

6. Resposta imunológica

O ciclo de vida de *Leishmania infantum* no mamífero começa com a inoculação de promastigotas metacíclicos no local da picada do flebótomo fêmea.

Ocorre então uma resposta primária inespecífica ou inata na qual os parasitas terão de enfrentar as moléculas do complemento, anticorpos e células fagocíticas, que resulta na destruição de até 80% dos promastigotas.

Esta resposta não evita, porém que um determinado número de parasitas se evadam da lise mediada pelo complemento. Tal é conseguido pois as leishmanias têm a capacidade de inactivar a forma C3b, transformando-a em C3bi (Carcelén *et al.*, 2007). Revestido pelo C3bi, o promastigota penetra nos macrófagos através da proteína CR3 (Yao, Donelson & Wilson, 2003, citado por Rosa, 2009).

A inactivação da fracção C3b permite também que ocorra o aumento da síntese da proteína de superfície gp63, o que impede a deposição do complexo lítico C5b-C9 (Carcelén *et al.*, 2007).

Outro mecanismo de sobrevivência está relacionado com a capacidade dos promastigotas metacíclicos de aumentarem a expressão de um lipofosfoliglicano (LPG) que actua como uma barreira à inserção do complemento na superfície do parasita (McConville, Turco, Ferguson & Sacks, 1992, citados por Carcelén *et al.*, 2007).

Quando os promastigotas são fagocitados pelos macrófagos e incluídos em fagossomas vão se fundir com os lisossomas, provocando acidificação do pH e aumento da actividade hidrolítica. Como mecanismo de resistência as unidades repetidas de LPG na superfície do parasita inibem transitoriamente a maturação do fagossoma, o que permite a diferenciação de formas amastigotas, que são resistentes às hidrolases (Dermine, Scianimanico, Privé, Descoteaux & Desjardins, 2000, citados por Carcelén *et al.*, 2007).

No decurso desta evasão à digestão celular intervêm outros mecanismos desenvolvidos por *Leishmania*: expressão de glucoesfingolípidos perante a expressão de enzimas lisossomais;

inibição da proteína Quinase C durante a respiração oxidativa; eliminação de radicais de oxigénio pela superóxido dismutase, também presente nos amastigotas (Russell, Xu & Chakraborty, 1992, citados por Carcelén *et al.*, 2007).

Para além do atrás referido, os amastigotas de modo a poderem sobreviver e reproduzir-se no interior dos macrófagos, recorrem ainda às seguintes estratégias: modulam a produção de citoquinas, diminuem a capacidade de apresentação de antígenos e bloqueiam as moléculas co-estimuladoras necessárias para a activação das células T antígeno-específicas (Carcelén *et al.*, 2007).

Quando a resposta inata não é suficiente para eliminar ou neutralizar o parasita é activada a imunidade adaptativa.

6.1. Resposta humoral

Os linfócitos B são activados através da ligação directa do antígeno com agentes patogénicos. Esta activação vai fazer com que estas células proliferem e se diferenciem em células plasmáticas que produzem anticorpos. Os anticorpos agrupam-se em 5 classes ou isotipos: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM. A IgG apresenta quatro subclasses: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 (Santos-Gomes, Rodrigues & Marques, 2008).

Santos-Gomes *et al.* (2008) afirmam que níveis elevados de anticorpos produzidos são associados ao desenvolvimento da doença e a pior prognóstico. Animais resistentes ou assintomáticos não revelam ou revelam reduzida produção de anticorpos anti-leishmania (Pinelli *et al.*, 1994, Cabral *et al.*, 1998, Leandro *et al.*, 2001, citados por Santos-Gomes *et al.* 2008), enquanto que os animais sintomáticos produzem níveis elevados de IgGs totais anti-leishmania das subclasses IgG1 e IgG2 (Iniesta *et al.*, 2005, citados por Santos-Gomes *et al.* 2008). Deplazes *et al.* (1995), citado por Barbiéri (2006) afirmam que as subclasses IgG1 e IgG2 têm sido consideradas como um indicador da progressão da leishmaniose canina mais fiável do que as IgG totais. A produção elevada de imunoglobulinas não protege o animal e é potencialmente prejudicial, levando à produção de complexos antígeno-anticorpo (Santos-Gomes *et al.*, 2008). Estes irão depositar-se em vários locais, originando muitas das lesões características da doença, tais como glomerulonefrites.

6.2. Resposta celular

A resposta celular é mediada por linfócitos T. A imunidade protectora contra a *Leishmania* é mediada pelos linfócitos CD4+ do tipo Th1 (Baneth *et al.*, 2008).

Os linfócitos Th CD4+ do tipo Th1 produzem interferão γ (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2), (Santos-Gomes *et al.*, 2008), factor de necrose tumoral (TNF- α) (Carcelén *et al.*, 2007) entre outros; os linfócitos Th2 produzem IL-4 e IL-10 entre outros (Santos-Gomes *et al.*, 2008). Citocinas como (IFN- γ), IL-2 e TNF- α segregados pelos linfócitos T activados CD4+ induzem actividade macrofágica anti-leishmania (Baneth, Koutinas, Solano-Gallego, Bourdeau & Ferrer, 2008).

Leishmania Infantum parece induzir respostas Th1 e Th2, nas quais o controlo da replicação do parasita, a progressão da doença ou a cura são determinados pelo balanço entre estas duas respostas (Baneth *et al.*, 2008).

A resposta com níveis elevados de anticorpos que é seguida pela presença de complexos imunes circulantes está presente nos casos de susceptibilidade à infecção por *Leishmania infantum*, enquanto que as respostas onde há controlo são mediadas pelas células T e existe uma produção moderada de anticorpos, que com o passar do tempo tende a ser mínima ou a desaparecer (Carcelén *et al.*, 2007).

7. Importância dos cães assintomáticos

A infecção por *Leishmania infantum* na população canina está amplamente difundida (Tafari, 2009). Nas zonas endémicas 60 a 70 % dos cães estão infectados por *L. infantum* (López, 2007b; Ferrer, 2004).

As formas clínicas da leishmaniose canina podem ser classificadas como: Infecção sintomática; infecção assintomática patente; infecção sub-patente (Oliva, 2006),

O período de incubação desta doença varia desde alguns meses até vários anos ou até toda a vida do animal (Moreno & Alvar, 2002, citados por Dantas-Torres, 2007; Marignac *et al.*, 2004; Greene, 2006). Após a picada pelo flebótomo segue-se uma fase em que o cão está assintomático mas os seus níveis de anticorpos anti-leishmania sobem, ao que se segue uma de duas situações, ou o cão é susceptível à doença, torna-se sintomático e morre se não tratado ou é resistente ao parasita, sendo denominado de assintomático (Sideris, Papadopoulou, Dotsika & Karagouni, 1999).

A administração de fármacos imunossupressores, outros fármacos, uma doença imunossupressora grave (Baneth *et al.*, 2008), má-nutrição, infecções, e/ou outras parasitoses concomitantes e neoplasias podem levar à activação da infecção latente e ao desenvolvimento de sinais clínicos (Ferrer, 2004).

Tanto os cães sintomáticos como os assintomáticos podem albergar *L. infantum* no seu sangue e pele (Moshfe *et al.*, 2009). Moshfe *et al.* (2009) realizaram um estudo que mostrou que os cães infectados com *L. infantum* e assintomáticos provavelmente têm um papel na transmissão de *L. infantum* nas áreas endémicas. O número alargado de cães infectados em áreas endémicas e assintomáticos pode ter relação com a sua constante exposição aos parasitas e ao desenvolvimento de imunidade protectora, especialmente em cães mais idosos (Moshfe *et al.*, 2009). Contudo, Sideris *et al.* (1999) afirmaram que também existe a possibilidade de os cães mais idosos passarem da condição de assintomáticos para sintomáticos mais rapidamente do que em outras idades e assim diminuir as taxas de infecção na população assintomática.

O número de animais assintomáticos é muito maior do que o número de animais portadores de infecções sintomáticas (Maia, 2005; Solano, 2008; Tafari, 2009; López, 2007b; Ferrer,

2004; Matute *et al.*, 2007), sendo que os cães assintomáticos são infectantes para os flebótomos numa proporção similar aos sintomáticos (Molina *et al.*, 1994, Travi *et al.*, 2001, Courtenay *et al.*, 2002, citados por Manna *et al.*, 2006).

Vários autores afirmam que as raças autóctones das zonas endémicas são mais resistentes a desenvolver os sintomas de leishmaniose canina (Papadopoulou *et al.*, 2005; Ferrer, 2008).

Tal como referido atrás, nem todos os cães natural ou experimentalmente infectados com *Leishmania* desenvolvem doença (Greene, 2006; Ferrer, 2008). Após a infecção alguns cães conseguem controlar o parasita e não desenvolvem doença durante anos ou até por toda a vida, enquanto que outros cães infectados apresentam doença progressiva (Moreno & Alvar, 2002, citados por Manna *et al.*, 2006). A resposta imunitária elaborada pelos cães aquando da infecção parece ser o factor mais importante na determinação de qual o caminho que essa infecção irá seguir, isto é se se irá desenvolver doença ou se a infecção irá permanecer assintomática (Greene, 2006). Cães infectados de modo natural são capazes de realizar uma resposta imunitária protectora (Sideris *et al.*, 1999). Os cães infectados aparentemente são caracterizam-se pela presença de uma resposta imunitária celular específica contra o parasita e resposta humoral leve (Solano, 2008) na qual apresentam seronegatividade ou fraca positividade (com títulos no limiar da positividade) (Ferrer, 2004). Cães infectados gravemente doentes possuem uma resposta humoral exagerada e resposta celular específica reduzida ou ausente (Solano, 2008).

O desenvolvimento da infecção depende da capacidade de os macrófagos destruírem o parasita. Esta actividade é determinada pelo equilíbrio entre um conjunto heterogéneo de citoquinas. Os linfócitos T e as citoquinas desempenham um papel crucial pois determinam se a infecção irá evoluir para um estado imunitário protector ou para uma doença declarada e progressiva (Pinelli *et al.*, 1994, Pinelli *et al.*, 1995, citados por Manna *et al.*, 2006).

A resolução da infecção por leishmania é dependente das células T e mediada por macrófagos activados pelas citoquinas derivadas das células T (Liew & O'Donnell, 1993, citados por Chamizo, Moreno & Alvar, 2005).

Chamizo *et al.* (2005) afirmam que os cães infectados com *L. Infantum* assintomáticos produzem resposta Th1 e Th2, contudo existe uma predominância da resposta Th1 que confere imunidade contra o parasita. Atestam também que a resposta Th1 induz actividade leishmanicida macrofágica, o que protege os cães contra a progressão da infecção e desenvolvimento da doença (Chamizo *et al.*, 2005).

Estudos feitos acerca da resposta imunitária em cães experimentalmente infectados com *L. Infantum* mostraram que a imunidade protectora relaciona-se com a produção de IL-2, TNF- α (Chamizo *et al.*, 2005; Moreno & Alvar, 2002, citados por Manna *et al.*, 2006) e IFN- γ por parte das células mononucleares do sangue periférico (PMBC) conjuntamente com a

activação de células T citotóxicas específicas para o parasita (Moreno & Alvar, 2002, citados por Manna *et al.*, 2006).

Para além disto a activação dos macrófagos pelo IFN- γ resulta na produção de óxido nítrico, o que medeia a morte dos parasitas intracelulares (Pinelli *et al.*, 1999; Gradoni & Ascenzi, 2004, citados por Manna *et al.*, 2006). O óxido nítrico parece estar envolvido na protecção a longo prazo contra a infecção por *L. Infantum* (Panaro *et al.*, 2008).

O desenvolvimento de doença é associado à produção das interleucinas IL 10, IL 2 e IL 18 (Manna *et al.*, 2006).

Manna *et al.* (2006) afirmam que nos cães infectados com *L. infantum* e assintomáticos a pele representa um reservatório de amastigotas quando o hospedeiro é imunocompetente e existe um equilíbrio entre o parasita e o hospedeiro e que a quantificação dos parasitas na pele é um recurso fiável para o diagnóstico de infecção com *L. infantum*, enquanto que a quantificação de ADN de leishmania nos gânglios linfáticos é necessária para a previsão da evolução da doença. A quantificação do ADN do sangue de cães infectados assintomáticos não parece ser útil para a gestão clínica da infecção.

Os cães infectados com *L. infantum* possuem um elevado parasitismo cutâneo por formas amastigotas de *Leishmania*, aumentando a possibilidade de transmissão (Ashford, 1996; Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006, citados por Dantas-Torres, 2007).

Guarga *et al.* (2000) citados por Moshfe *et al.* (2009) afirmam que a pele saudável dos cães infectados é mais atractiva para os flebótomos.

O estudo de Manna *et al.* (2006) permitiu ainda chegar às seguintes conclusões:

No sangue dos cães que progrediram para doença o IFN- γ e IL-2 não foram detectados na primeira observação, enquanto que após o surgimento de sinais clínicos os seus níveis já foram detectados. Estes resultados sugerem que níveis altos de IFN- γ e de IL-2 sem a presença de sinais clínicos podem conferir resistência aos cães face ao progresso da doença. A resposta do tipo Th2 tornou-se dominante à medida que os cães progrediram para doença clínica. Assim, com base neste estudo pode-se afirmar que os parâmetros IFN- γ e IL-2 são úteis para aferir o progresso de infecção. Por outro lado, a partir deste mesmo estudo de Manna *et al.* (2006) concluiu que a IL-10 não é patognomónica de doença activa em cães naturalmente infectados. O papel da IL-4 na progressão da infecção não está definido, sendo que neste estudo permaneceu sempre em níveis elevados em ambos os grupos de estudo.

A IL-12 só foi detectada no grupo dos cães assintomáticos cuja infecção evoluiu para doença no momento em que os sinais clínicos surgiram, enquanto a IL-18 apresentou níveis altos em ambos os grupos, decrescendo 24 meses após a primeira observação no grupo dos cães assintomáticos infectados que não manifestaram sinais durante todo o estudo. Com base nestas observações pode-se afirmar que enquanto a IL-12 representa um

marcador activo da doença, a IL-18 não está envolvida nos mecanismos que levam à passagem de animal assintomático para sintomático.

Podemos assim concluir que existe uma correlação entre o estado clínico, os níveis de citocinas, e a carga parasitária de leishmania nos tecidos dos cães infectados. No momento da primeira observação, os cães infectados assintomáticos que mais tarde progrediram para doença apenas expressaram a citocina IL-18, e ao fim de 6 meses apresentavam uma resposta Th-2 dominante. No caso dos cães assintomáticos que permaneceram sem sintomas durante um período prolongado, no momento da primeira observação apresentaram dominância da resposta Th1 mediada por IL-2, IFN- γ e IL-18 (Manna *et al.*, 2006).

A produção de citocinas de resistência ou de susceptibilidade parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento da infecção em cães infectados de modo natural (Manna *et al.*, 2006). Manna *et al.* (2006) sugerem a partir dos seus resultados que a determinação da quantidade de ADN parasitário em amostras de tecidos e a avaliação dos níveis de citocinas podem representar uma ferramenta fiável para prever o desenvolvimento da doença.

A monitorização dos cães assintomáticos é relevante para a avaliação epidemiológica da leishmaniose Canina em áreas endémicas e para o controlo da infecção nas populações canina e humana (Miró *et al.*, 2008). A identificação dos cães assintomáticos é uma tarefa complexa. Otranto *et al.* (2009) afirmam que não existe um teste *gold standart* para este diagnóstico de infecção por *L. infantum*, devendo ser executados outros testes em simultâneo. Os testes serológicos não são os mais indicados para o diagnóstico de cães expostos ou recentemente infectados. Otranto *et al.* (2009) afirmam que a PCR é o método mais sensível para a detecção do cão à exposição à picada do flebótomo e/ou infecção. Contudo, nem os testes serológicos nem os moleculares podem prever a evolução da infecção (Otranto *et al.*, 2009).

8. Diagnóstico

O diagnóstico de infecção por *L. Infantum* é realizado por vários motivos:

- Confirmar a doença, isto é, aferir se um cão com sinais clínicos e/ou alterações clinicopatológicas compatíveis com leishmaniose canina tem de facto esta doença;
- Investigar a presença de infecção no âmbito de estudos epidemiológicos, rastreando cães saudáveis que vivam em zonas endémicas;
- A pedido dos donos, de modo a prevenir a transmissão através de transfusão sanguínea;
- Para evitar a exportação de cães infectados para países não-endémicos
- Monitorizar a resposta ao tratamento.

É assim importante distinguir infecção por *Leishmania* de leishmaniose e aplicar diferentes técnicas de diagnóstico conforme o caso.

O diagnóstico de leishmaniose é complexo uma vez que o quadro clínico e as alterações clinicopatológicas são extensos e inespecíficos (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Por conseguinte deve-se realizar uma abordagem integrada, baseando-se na história clínica do animal e nos resultados dos meios de diagnóstico laboratoriais (Maia, 2005). Além disso, não existem testes de laboratório 100% sensíveis ou específicos. Por este motivo, existem muitas técnicas de diagnóstico: serológicas, citológicas, culturais, moleculares e outras técnicas imunológicas (Solano, 2008).

Ferrer (2008) afirma que a forma mais simples de estabelecer o diagnóstico da leishmaniose canina é pela combinação da presença dos sinais clínicos característicos da doença com um método de serologia quantitativa em que haja um título elevado de anticorpos. Afirma ainda que em casos duvidosos se pode reforçar o diagnóstico recorrendo a PCR (*Ferrer*, 2008).

8.1. Quadro Clínico

O quadro clínico, ainda que muito variável e pouco específico, é válido para orientar o diagnóstico (Riquelme, Martínez, Chávez & Cañavate, 2007). O aspecto e a severidade dos sinais clínicos dependem da resposta imunológica do cão e do estado de evolução da doença (Oliva, 2006). Deve ser sempre feita uma anamnese minuciosa que abarque dados epidemiológicos relevantes como o local de habitação, a aptidão, o período de tempo de exposição ao vector, a zona geográfica onde o animal habita, a procedência (Miró & Fraile, 1999, citados por Riquelme *et al.*, 2007) e deslocações do animal a zonas endémicas de leishmaniose canina (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

8.1.1. Lesões cutâneas

As lesões cutâneas são as manifestações clínicas mais frequentes da leishmaniose canina (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Podem ocorrer na ausência aparente de outros sinais óbvios de doença. Contudo, na presença de manifestações dermatológicas de leishmaniose deve ser presumido o envolvimento visceral, uma vez que os parasitas se disseminam pelo organismo do animal antes das lesões cutâneas se desenvolverem (Greene, 2006).

8.1.1.1. Formas localizadas

Cancro de inoculação

É uma lesão cutânea que aparece no ponto de inoculação do flebótomo (Ocanã, Noguer, Rodríguez & Miró, 2007). É normalmente um nódulo com 1 a 3 cm de diâmetro, sem pêlo, ligeiramente doloroso (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008), assimétrico e não pruriginoso (Ocanã *et al.*, 2007). Surge nos 20 dias seguintes à infecção e assume

diferentes aspectos clínicos desde a inoculação até ao momento em que é detectado: Lesão eritemo-escamosa; lesão úlcero-crostosa; lesão cicatricial (Ocanã *et al.*, 2007). Desaparece espontaneamente ao fim de um a seis meses (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Normalmente localiza-se em locais isentos de pêlo como os lábios, face interna dos pavilhões auriculares, união da trufa com a ponta nasal, zona glabra do abdómen, etc (Ocanã *et al.*, 2007).

Figura 8 - Lesão de cancro de inoculação na ponta nasal (adaptado de Ocanã *et al.*, 2007)



8.1.1.2. Formas generalizadas

Surgem quando há disseminação sistémica do parasita. As lesões são simétricas, crónicas, não pruriginosas ou causam um leve prurido e há ausência de resposta a antibioterapia e corticoterapia (Ocanã *et al.*, 2007).

Forma queratoseborreica

Ocorre alopecia difusa e descamação epidérmica abundante de cor esbranquiçada que confere à pele um aspecto seco e hiperqueratoso. Inicialmente surgem apenas na face - bordos das orelhas, ponta do nariz, região periorbitária – e extremidades, estendendo-se progressivamente ao resto do corpo. É frequente surgirem piodermites secundárias superficiais (Ocanã *et al.*, 2007).

Forma pustular

É muito menos frequente. Caracteriza-se por lesões em forma de placas eritematosas formadas por pápulo-pústulas e vesículas semelhantes às que aparecem na foliculite bacteriana, mas estas são estéreis (Ocanã *et al.*, 2007).

Forma nodular

Ocorrem múltiplos nódulos de pequeno tamanho, em regra sem ulceração, dor ou prurido. Ocorrem em mais frequentemente em raças de pêlo curto como o Boxer, Rottweiler, Doberman, etc. São nódulos de carácter granulomatoso, a partir dos quais se podem observar amastigotas nas citologias de amostras obtidas por punção (Ocanã *et al.*, 2007).

Forma ulcerativa

Caracteriza-se pela presença de úlceras crônicas no bordo das orelhas, pontos de pressão, nariz, espaços interdigitais, almofadas plantares, etc (Ocanã *et al.*, 2007).

8.1.1.3. Outras formas cutâneas

- Hiperqueratose nasal (Figura 9) e/ou das almofadinhas plantares
- Despigmentação nasal (Figura 10)
- Perionixis
- Onicogribose (Figura 11) - é um sinal bastante específico mas que segundo Greene (2006) se desenvolve numa pequena proporção dos pacientes. Já Ciaramella *et al.* (1997), Koutinas *et al.* (1999), citados por Pereira da Fonseca e Villa de Brito (2008) afirmam que surge em 24 a 30,5% dos casos de leishmaniose canina.
- Ulcerações das mucosas
- Eritema multiforme (Ocanã *et al.*, 2007)

Figura 9 - Hiperqueratose nasal (adaptado de Ocanã *et al.*, 2007)

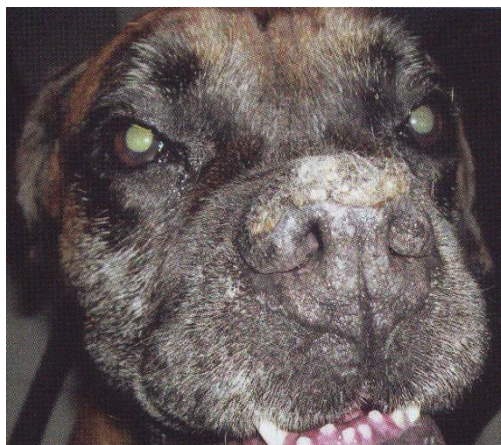


Figura 10 - Despigmentação da ponta nasal (adaptado de Ocanã *et al.*, 2007)

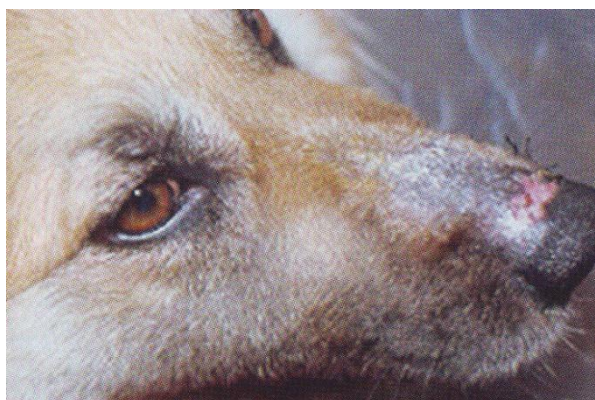


Figura 11 - Onicogrifose (adaptado de Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008)



Tem sido descrito com frequência a presença de nódulos intracutâneos, correspondendo a acumulações de células inflamatórias contendo inúmeros amastigotas e facilmente confundíveis com neoplasias. Estes nódulos podem ser múltiplos e pequenos, localizando-se nas pálpebras, membrana nictitante e no limbo esclero-corneal, ou por outro lado, grandes e isolados sem localização preferencial. Raramente surgem também nódulos na mucosa lingual, gengival ou peniana (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

8.1.2. Lesões sistêmicas e gerais

8.1.2.1. Sinais clínicos inespecíficos

- Depressão (Greene, 2006; Nelson & Couto, 2006)
- Emagrecimento (Figura 12), astenia e inaptência, que em casos extremos origina a caquexia do animal (Ocanã *et al.*, 2007). Alguns cães perdem peso apesar de possuidores de grande apetite (Greene, 2006).
- Atrofia dos músculos temporais e masséteres, aspecto conhecido por “cabeça de velha” (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008)
- Anemia não regenerativa, presente em até 40% dos doentes crônicos
- Linfadenomegália localizada ou generalizada, sendo esta última a forma mais comum, na qual os linfonodos estão hipertrofiados ou com aumento de consistência (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).
- Esplenomegalia
- Epistaxis, que parece estar mais relacionada com lesões inflamatórias da mucosa nasal do que com alterações dos mecanismos de coagulação (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

- Ataxia, paralisia, parésia, convulsões e neuralgia (Lima *et al.*, 2003, citados por Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008)
- Temperatura rectal pode flutuar mas em regra é normal ou sub-febril (Greene, 2006).

Figura 12 - Animal com leishmaniose canina evidenciando magreza (adaptado de Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008)



8.1.2.2. Sinais clínicos específicos

Alterações renais - a deposição de imunocomplexos a nível do glomérulo renal conduz à glomerulonefrite, que inicialmente tem um carácter agudo e reversível, mas à medida que a doença avança pode evoluir para glomerulonefrite intersticial, instalando-se a insuficiência renal. Esta constitui a causa mais frequente de morte nos cães com leishmaniose (Ferrer, 1992, Font *et al.*, 1993, citados por Ocanã *et al.*, 2007). Os sinais físicos frequentemente associados são a poliúria/polidipsia e mais raramente o vómito, a hematemese e a melena (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). A insuficiência renal pode ser o único sinal aparente em cães com leishmaniose canina. Assim, cães possuidores desta condição que vivam em zonas endémicas devem ser testados para pesquisa de leishmania (Greene, 2006).

Alterações hepáticas devido à deposição dos parasitas no fígado, (Ocanã *et al.*, 2007) podendo ocorrer hepatite crónica com subsequente insuficiência hepática (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

Alterações digestivas - são muito menos frequentes e devem-se também à deposição de parasitas desta feita na mucosa do intestino grosso, o que conduz a diarreias de intestino grosso com ou sem melena (Ocanã *et al.*, 2007).

Alterações oculares - lesões inflamatórias granulomatosas como blefarites, conjuntivites, uveítes, queratites ou suas associações. Menos frequentemente podem ocorrer hemorragias da retina, coriorretinites ou descolamento da retina. Em ocasiões raras a uveíte pode

desencadear um glaucoma de mau prognóstico. Em alguns casos as lesões oculares são os únicos sinais clínicos (Greene, 2006).

Alterações articulares/ósseas - poliartrite (Ocanã *et al.*, 2007; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008), sinovite, periostite e osteomielite osteolítica e menos frequentemente miosite (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008) – provocam claudicações ligeiras intermitentes devidas à deposição de imunocomplexos nas articulações. Por vezes este tipo de lesões tornam-se crónicas e principalmente em raças de grande porte podem complicar com problemas de ligamentos, como a rotura dos ligamentos cruzados do joelho. A citologia do líquido sinovial pode evidenciar a presença de leishmanias (Ocanã *et al.*, 2007).

Alterações cardio-vasculares, como o trombo-embolismo (Torrent *et al.*, 2005, Fonte *et al.*, 1996, citados por Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008) e alterações respiratórias como a rinite e a pneumonia (Slappendel, 1998, citado por Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008) têm surgido raramente.

Pode ocorrer imunossupressão e surgirem co-infecções que dificultam o diagnóstico da leishmaniose canina, tais como a erliquiose, riquetsiose, hepatozoonose, demodecose, babesiose e menos frequentemente, neosporose (Greene, 2006). Raramente a leishmaniose canina também surge associada a neoplasias como o hemangiossarcoma ou linfoma ou patologias endócrinas como o hipotireoidismo (Oliva, 2006).

8.2. Diagnóstico laboratorial

8.2.1. Diagnóstico parasitológico

8.2.1.1. Exame parasitológico directo

A visualização do parasita, quando possível, é sempre a melhor forma de diagnóstico (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

Este tipo de diagnóstico baseia-se na observação microscópica do parasita: das formas amastigotas intracelulares em preparações coradas- exame directo (Maia, 2005). As formas amastigotas aparecem no interior dos macrófagos ou livres no esfregaço, devido a ruptura celular.

A observação do parasita pode realizar-se a partir de diferentes amostras biológicas: aspirado de medula óssea, gânglio linfático, fígado, baço, sangue e biópsia cutânea (Riquelme *et al.*, 2007). Estas amostras são coradas com coloração de Wright ou Giemsa ou outros derivados de Romanovsky. Este método permite estabelecer o diagnóstico definitivo (Nelson & Couto, 2006).

A pesquisa de amastigotas *in vivo* a partir de esfregaços de matriz ungueal, de baço e de fígado caiu em desuso por se utilizarem técnicas demasiado traumáticas ou por não serem isentas de risco de hemorragia interna (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

O exame parasitológico directo tem uma excelente especificidade (100%) mas fraca sensibilidade (Roze, 2005, citado por Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008), sendo cerca

de 50% para a medula óssea (logo esta é a amostra biológica mais recomendada (Ferrer, 2008) e 30% para o linfonodo. Apesar da elevada especificidade, a citologia tem o inconveniente de por vezes não permitir detectar o parasita em animais em fases iniciais da doença (Roura, 2007, citado por Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

Tem como vantagens tratar-se de uma técnica rápida e pouco dispendiosa. A visualização de uma só célula parasitada é patognomónica de infecção por *Leishmania* (Maia, 2005).

8.2.1.2. Exame parasitológico cultural

Consiste na observação das formas promastigotas em meio de cultura *in vitro* (Maia, 2005). São realizadas culturas de amostras biológicas em diferentes meios, que podem ser monofásicos, como o meio de Schneider para insecto, M199, RPMI ou meio de Grace ou difásicos como o Meio Novy, Nicole e McNeal (NNN) (Maia & Campino, 2008). Esta técnica é mais sensível que a observação microscópica, mas é mais dispendiosa, mais trabalhosa, mais morosa e apresenta risco de contaminação. Não é uma técnica de diagnóstico rotineira nas clínicas veterinárias, estando a sua utilização reservada a laboratórios especializados (Riquelme *et al.*, 2007). É utilizada para identificar infecções patentes ou para posterior caracterização dos isolados, permitindo a identificação da estirpe de *Leishmania* (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

8.2.2. Inoculação experimental em animais

Este método de diagnóstico é de grande utilidade para isolar estirpes de *Leishmania* de difícil crescimento ou a partir amostras contaminadas (Riquelme *et al.*, 2007). O modelo *in vivo* mais utilizado é o hamster (*Meoscrinetus aureus*) (Riquelme *et al.*, 2007; Maia & Campino, 2008). A técnica consiste na inoculação de tecidos infectados no modelo vivo e monitorização dos sinais clínicos exibidos. Esta técnica é utilizada principalmente em investigação (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

8.2.3. Xenodiagnóstico

Esta técnica consiste em expor o cão suspeito de leishmaniose, previamente tranquilizado ou anestesiado à picada de fêmeas de *Phlebotomus* spp durante aproximadamente uma hora. Após 5 a 7 dias é realizada a dissecação dos insectos de modo a detectar a presença de formas amastigotas no tubo digestivo, mediante observação microscópica ou são efectuadas técnicas moleculares para detecção de ADN de *Leishmania* (Riquelme *et al.*, 2007).

8.2.4. Diagnóstico histopatológico

Pode ser realizado em biópsias de pele lesionada, ocorrendo uma grande variação no tipo de lesões. Frequentemente surge uma dermatite difusa do tipo granulomatosa, na qual a derme superficial e profunda estão densamente infiltradas por macrófagos pleiomórficos e

por agrupamentos de linfócitos e células plasmáticas (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

8.2.5. Reacção em Cadeia da Polimerase – PCR

A técnica da PCR é utilizada rotineiramente para fins de diagnóstico, estudos epidemiológicos, e selecção de dadores de sangue (Greene, 2006), sendo segura para determinar a presença e identificar o parasita não só nos casos activos, mas também para monitorizar a cura parasitológica após o tratamento (Maia & Campino, 2008).

Esta técnica é baseada na amplificação *in vitro* de uma sequência específica de nucleótidos do ADN parasitário (Maia & Campino, 2008), permitindo detectar o ADN de *Leishmania Infantum* em diferentes tecidos. A PCR mostrou ser uma técnica muito mais sensível quando comparada com as técnicas tradicionais de diagnóstico (Ikonomopoulos *et al.*, 2003, citados por Riquelme *et al.*, 2007).

Podem ser utilizadas vários tipos de amostra: medula óssea, gânglio linfático, pele, baço (Maia, 2005; Riquelme *et al.*, 2007), fígado (Maia, 2005) sangue e urina, (Riquelme *et al.*, 2007). A PCR apresenta sensibilidade e especificidade bastante elevadas (Maia, 2005). Esta técnica oferece maior sensibilidade quando se utilizam biópsias de medula óssea e gânglio linfático, já nas biópsias de pele a sensibilidade é ligeiramente menor. A pele é claramente uma fonte segura de ADN de *Leishmania* Manna *et al.* (2004 e permite uma detecção mais eficiente de ADN de *Leishmania* por PCR do que qualquer outro tecido. No caso do sangue, a duração, constância e intensidade da parasitemia no cão estão ainda por saber, o que conduz a falsos negativos, especialmente em cães assintomáticos. Assim, um único resultado PCR negativo em um cão clinicamente suspeito não é suficiente para descartar a hipótese de infecção, contudo durante a época de transmissão podem ocorrer falsos positivos devido a contaminação natural ou infecção transitória. (Maia & Campino, 2008).

A utilização de amostras biológicas periféricas torna-se mais simples e é de longe mais aceitável para os proprietários dos animais do que a recolha mais invasiva de material, como da medula óssea ou gânglio linfático (Maia & Campino, 2008).

A utilização de gânglio linfático e medula óssea para a PCR mostrou ser mais sensível do que a detecção microscópica de amastigotas em observação directa ou em cultura parasitológica. No caso do sangue foi revelada uma menor sensibilidade (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Para além disto, o gânglio linfático e medula óssea aumentam a quantidade de detecções de infecções sub-clínicas (Foster & Foil, 2003).

Segundo Maia e Campino (2008) a PCR utilizando aspirado de gânglio linfático é útil como primeira linha do diagnóstico inicial e para o seguimento do tratamento, enquanto que a utilização de medula óssea fica reservada para cães em que o linfonodo poplíteo não seja detectável. Nos casos em que ambos os aspirados não sejam exequíveis, por razões

económicas ou devido a tratar-se um rastreio epidemiológico de grande escala, é sugerida a utilização de soro para IFI ou cultura parasitológica, e sangue total em papel de filtro para PCR para complementar os resultados serológicos (Neves *et al.*, 2007).

A sensibilidade e especificidade da técnica de PCR depende das sequências iniciadoras utilizados, do número de cópias do ADN alvo, do método de extracção, do material de biópsia e do protocolo utilizado (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Em um estudo realizado por Quaresma *et al.* (2009), a análise do desempenho da PCR com amostras de cães sintomáticos e assintomáticos mostrou que este é um método confiável para a detecção de ADN de *Leishmania*, independentemente de o animal possuir ou não sinais clínicos e sintomas.

Actualmente, através da PCR quantitativa (qPCR) também chamada PCR em tempo real (RT-PCR) ou *kinetic polymerase chain reaction* (kPCR), é possível obter valores quantificados que permitem a avaliação das variações da carga parasitária e da resposta à terapêutica (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

A PCR em tempo real é uma técnica que consegue detectar cargas parasitárias extremamente pequenas quando comparado com a PCR convencional (Francino *et al.*, 2006, citados por Solano-Gallego *et al.*, 2009; Miró *et al.*, 2008). Este meio de diagnóstico possibilita a quantificação do parasita em tecidos de cães infectados, o que é importante para o diagnóstico bem como para o seguimento durante o tratamento de leishmaniose canina (Pennisi *et al.*, 2005a; Manna *et al.*, 2008a, citados por Solano-Gallego *et al.*, 2009).

A técnica PCR-RFLP é utilizada para identificar espécies e genótipos de *Leishmania* a partir de amostras biológicas ou isolados caninos.

Finalmente importa salientar que a informação fornecida pela PCR deve ser analisada em conjunto com os dados fornecidos pelo exame clínico e pelos exames serológicos, de modo a chegar a um resultado o mais correcto possível (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

8.2.6. Pesquisa de anticorpos - Sorologia

A avaliação da resposta humoral específica está amplamente difundida na leishmaniose canina (Miró, 2007). Podem ser detectados anticorpos contra *Leishmania* no soro. Desenvolvem-se títulos de IgG 14 a 28 dias após a infecção e declinam 45 a 80 dias após o tratamento (Nelson & Couto, 2006). São utilizadas a imunofluorescência indirecta (IFI), o teste de aglutinação directa (DAT), enzimaensaio (ELISA), dot-ELISA, Western Blot e imunocromatografia ou *dipstick* (Miró, 2007). Os resultados de IFI e DAT são expressos em diluições e os de ELISA em densidades ópticas (Maia, 2005).

A detecção de anticorpos anti-leishmania no soro indica exposição à infecção. Títulos de anti-corpos baixos, possivelmente transitórios são detectados em cães que foram expostos, mas que não desenvolveram doença clínica. Cães com infecções persistentes normalmente desenvolvem títulos de anticorpos que aumentam ao longo do tempo. Níveis altos de

titulação são usualmente associados a cães sintomáticos e com elevado parasitismo ou, segundo Baneth e Aroch (2008), a infecção assintomática persistente em cães portadores (Baneth & Aroch, 2008). Cães sintomáticos em norma produzem imunoglobulina IgG1 e IgG2, sendo que as IgG2 parecem predominar (Mettler, Grimm, Capelli, Camp & Deplazes, 2005).

Alguns cães permanecem seronegativos por períodos de tempo variáveis após terem sido infectados por *Leishmania* (Baneth & Aroch, 2008).

A presença de titulações baixas de anticorpos não indica necessariamente doença e deve ser feita mais pesquisa para confirmar ou excluir leishmaniose através de outros meios de diagnóstico como citologia, histopatologia e PCR (Miró *et al.*, 2008).

O teste de anticorpos verdadeiramente positivo indica a presença de infecção (Nelson & Couto, 2006), contudo após cura clínica os títulos de anticorpos anti-leishmania podem permanecer significativos por um longo período (Maia, 2005).

Têm sido detectadas reacções cruzadas com outros agentes patogénicos como o *Trypanosoma cruzi* (Nelson & Couto, 2006), *Babesia*, *Ehrlichia* e *Neospora* (Maia, 2005) principalmente nos testes onde é usado antígeno de *Leishmania* não modificado (Nelson & Couto, 2006).

8.2.6.1. Imunofluorescência indirecta – IFI

A IFI é considerada o *gold standart* do diagnóstico serológico da leishmaniose canina (Miró, 2007; Mettler *et al.*, 2005; Maia & Campino, 2008).

Neste método de diagnóstico procede-se à incubação de diluições seriadas do soro a testar com o antígeno, em seguida com um anticorpo conjugado com fluoresceína e por fim é feita a observação em microscópio de fluorescência (Maia, 2005).

Amostras nas quais os parasitas exibem fluorescência verde homogénea são consideradas positivas enquanto as que exibem coloração vermelha mate são consideradas negativas (Maia & Campino, 2008).

O título corresponde à maior diluição do soro onde se verifica a emissão de fluorescência (Maia, 2005). O limiar de positividade ou “cut-off” para distinguir resultados positivos e negativos varia entre 1:40 e 1:60, consoante os laboratórios (Ferroglia & Vitale, 2006, citados por Solano-Gallego *et al.*, 2009). Quando o resultado é duvidoso é recomendado realizar uma nova análise passados 45-60 dias para comprovar se foi produzida seroconversão (Riquelme *et al.*, 2007).

A IFI normalmente usa promastigotas completos como antígeno. É altamente específica e sensível para a detecção de infecção por *L. infantum*, mas parece carecer de sensibilidade para detectar cães clinicamente saudáveis mas infectados (Miró *et al.*, 2008).

Este teste é útil em estudos epidemiológicos, na prática clínica e no seguimento do tratamento. Tem como desvantagens o facto de exigir experiência e técnica e recursos laboratoriais dispendiosos (Maia & Campino, 2008).

8.2.6.2. Teste de aglutinação directa (DAT)

Este método utiliza como antigénio uma suspensão de promastigotas fixados com formalina e corados com azul de Coomasie que se unem especificamente aos anticorpos presentes no soro (Riquelme *et al.*, 2007).

No caso de a amostra ser positiva ocorre a presença de uma malha azul difusa enquanto que se for negativa surge um ponto azul compacto. O título equivale à maior diluição do soro onde é visível a aglutinação (Maia, 2005).

É uma forma barata e de execução simples. Tem como desvantagens o longo período de incubação (18h) e são necessárias várias diluições do soro ou sangue, o que torna o teste laborioso (Maia & Campino, 2008).

É uma técnica que permite a detecção precoce da infecção e é útil para realizar estudos epidemiológicos em áreas endémicas pois é simples e tem sensibilidade alta (Cardoso *et al.*, 2004, citados por Riquelme *et al.*, 2007).

8.2.6.3. Enzimaimunoensaio – ELISA

O teste ELISA é uma reacção imunoenzimática para detecção de imunoglobulinas específicas no soro (Maia, 2005).

Esta técnica baseia-se na ligação do antigénio solúvel adsorvido à placa e do anticorpo presente no soro do cão. A aplicação do conjugado associado a uma enzima (peroxidase ou fofatase) e a um substrato apropriado ao tipo de enzima permite a leitura dos resultados (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008) através de espectrofotometria (Maia, 2005). É apropriada para o diagnóstico serológico de leishmaniose canina em cães sintomáticos e assintomáticos (Mettler *et al.*, 2005).

Esta técnica é mais sensível do que a IFI. A sua principal vantagem é a automatização, que permite processar um grande número de amostras simultaneamente (Riquelme *et al.*, 2007).

ELISA tem como vantagens ser uma técnica simples, sensível e muito útil para estudos epidemiológicos em áreas endémicas (Cardoso *et al.*, 2004, Martinkovic & Marinculic, citados por Riquelme *et al.*, 2007).

Rodríguez-Cortés *et al.* (2009) realizou um estudo a partir do qual conclui que não existe um *gold standart* para diagnosticar infecção por leishmania. Acrescenta que o teste que mostrou o maior potencial para este fim é o ELISA IgG2.

8.2.7. Teste de Montenegro – Avaliação da resposta celular

O teste de Montenegro baseia-se na inoculação intradérmica de uma solução contendo promastigotas de *Leishmania* e leitura após 48-72 horas. Considera-se que o teste foi

positivo quando surgem nódulos ou endurecimento com diâmetro maior ou igual a 5 mm. Os cães positivos são considerados resistentes e manifestam uma resposta imunitária celular do tipo Th1 (Riquelme *et al.*, 2007).

8.3. Métodos complementares de diagnóstico

Pode ocorrer positividade no teste para anticorpos antinucleares em cães infectados com leishmaniose canina, especialmente se estiverem presentes infecções concomitantes (Greene, 2006).

8.3.1. Hemograma e proteínas plasmáticas

Na leishmaniose canina ocorre anemia do tipo normocítica, normocrômica e não regenerativa com leucocitose nas fases iniciais da infecção e leucopénia, linfopenia (Nelson & Couto, 2006; Riquelme *et al.*, 2007), monocitose e trombocitopénia nas fases crónicas (Riquelme *et al.*, 2007). Anemia hemolítica regenerativa causada por mecanismos imunomediados é raramente detectada (Greene, 2006).

Observa-se hiperproteinémia devido ao aumento das imunoglobulinas (hiperglobulinémia) (Ettinger & Feldman, 1997; Nelson & Couto, 2006). Nelson e Couto (2006) dizem ser em regra policlonal, contudo Riquelme *et al.* (2007) afirma ser principalmente das fracções β e γ -globulinas. Ocorre hipoalbuminémia (Greene, 2006; Nelson & Couto, 2006), o que resulta na inversão do ratio albumina/globulina. Tal é indicativo de um agravamento do estado geral do animal (Riquelme *et al.*, 2007). Uma hiperglobulinémia em cães de regiões endémicas de *Leishmania* sem causa aparente ou em cães que tenham viajado para tais áreas devem ser rastreados para leishmaniose canina (Greene, 2006).

Quanto ao perfil bioquímico hepático, nos cães com doença hepática ocorre elevação dos níveis séricos das enzimas AST, ALT e fosfatase alcalina.

Quanto ao perfil bioquímico renal, quando sobrevém compromisso renal pode observar-se um incremento dos níveis séricos de ureia e creatinina (Riquelme *et al.*, 2007).

Pequenos aumentos das enzimas hepáticas são frequentes (Nelson & Couto, 2006), contudo níveis de enzimas hepáticas muito elevados, azotémia severa ou ambos são encontrados apenas numa minoria dos cães com leishmaniose canina (Greene, 2006).

8.3.2. Análise da urina

Na urianálise é frequente o aparecimento de proteinúria (Nelson & Couto, 2006) com presença de cilindros no sedimento, sinal evidente de glomerulonefrite (Riquelme *et al.*, 2007), causada pela deposição de complexos imunes (Greene, 2006).

O aumento das concentrações de BUN e creatinina, além da proteinúria e hematúria, é comumente observado em cães com envolvimento renal (Ettinger & Feldman, 1997).

9. Tratamento

O tratamento da leishmaniose canina não reuniu ainda consenso na comunidade científica. Tal deve-se a várias razões, entre elas o facto de um cão infectado raramente não ter cura e como tal representar um importante reservatório da doença para o Homem e para outros cães, por outro lado o facto de os tratamentos serem prolongados, caros e muitas vezes parcialmente ineficazes (Meireles, 2008).

Até ao momento não existem princípios activos totalmente competentes no combate à leishmaniose canina (Barrientos, Góngora, Torres & Miró, 2007). Na maioria dos cães sujeitos a tratamento não se alcança a cura parasitológica mas sim a melhoria do quadro clínico (Meireles, 2008; Barrientos *et al.*, 2007) e das alterações clínico-patológicas de modo a que os cães tenham uma boa qualidade de vida (Ribeiro, 2009). Assim, na maioria dos casos o animal fica clinicamente curado durante um período variável - que depende de vários factores dos quais se destaca a resposta imunitária individual - (Ribeiro, 2009) mas permanece portador de leishmanias, ainda que com menor capacidade infectante para os flebótomos (Meireles, 2008). No final deste período surgem normalmente recidivas da doença (Ribeiro, 2009).

Até à data os únicos fármacos específicos para tratamento da leishmaniose canina permitidos na Europa são o antimoniato de glucamina, a aminosidina e a miltefosina (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Apesar dos protocolos de tratamento e o seguimento clínico se tenham modificado consideravelmente nos últimos anos e dos esforços para melhorar as fórmulas e propriedades farmacocinéticas, os fármacos utilizados na leishmaniose canina são basicamente os mesmos (Barrientos *et al.*, 2007; Miró, Cardoso, Pennisi, Oliva & Baneth, 2008). Vários novos fármacos têm sido testados, mas geralmente são sugeridos como um complemento para serem administrados em combinação com os fármacos classicamente utilizados ou como tratamentos de segunda linha para cães que não respondem bem ao primeiro tratamento (Miró *et al.*, 2008). De todos os fármacos disponíveis, os leishmanicidas mais utilizados e considerados de primeira linha são os antimoniais pentavalentes e a anfotericina B. O alopurinol, pela sua eficiência e inocuidade, é o leishmaniostático por excelência (Miró, 2007). A tendência actual no tratamento da leishmaniose canina é a combinação de fármacos com actividade leishmanicida e leishmaniostática (Ribeiro, 2009; Barrientos *et al.*, 2007), ainda que estejam a ser realizados estudos para comprovar a eficácia de novas moléculas (Barrientos *et al.*, 2007). A combinação de antimoniato de glucamina com alopurinol é considerada a terapêutica mais eficaz e constitui a primeira linha de tratamento contra a leishmaniose canina (Denerolle & Bourdoiseau, 1999, citado por Solano-Gallego *et al.*, 2009), prolongando os períodos de remissão clínica e assim espaçando as recidivas (Miró, 2007). Para além do tratamento etiológico deve se também proceder ao tratamento sintomático.

Antes do início do tratamento o proprietário do animal deve ser informado da duração do tratamento, do seu custo e de que poucas vezes se alcança a cura total do animal (López, 2007a).

Seguidamente serão abordados diversos compostos:

9.1. Análogos das Purinas – Pirazolopiridinas: Alopurinol

O alopurinol é um composto análogo estrutural da hipoxantina e funciona como leishmanostático (Meireles, 2008; Barrientos *et al.*, 2007), não destruindo as leishmanias (Meireles, 2008). Este composto atrasa o crescimento das leishmanias pois inibe as enzimas responsáveis pela interconversão das purinas, o que se traduz na diminuição da capacidade de produzir ATP e também porque incrementa metabolismos catabólicos de ARN com consequente restrição da síntese proteica (Barrientos *et al.*, 2007; Noli & Auxilia, 2005).

O alopurinol é utilizado sozinho ou combinado com antimoniais pentavalentes (Noli & Auxilia, 2005).

A dose utilizada varia entre 5mg a 40 mg/kg por dia, via oral, sendo que a dose mais utilizada é a de 20 mg/kg por dia (Meireles, 2008) repartida em duas ou três tomas (Barrientos *et al.*, 2007) durante um a quatro ou mais meses (Meireles, 2008). Segundo Barrientos *et al.* (2007) o tratamento deve prolongar-se entre seis a dezoito meses, ainda que alguns clínicos recomendem a sua utilização por toda a vida. Deve ser realizado o seguimento dos cães tratados com alopurinol de modo a avaliar qual o momento em que se deve terminar o tratamento (Barrientos *et al.*, 2007). Não existem dados suficientes que recomendem o uso do alopurinol como fármaco único, considerando que algumas semanas após o final do tratamento como fármaco único são esperadas recidivas na maioria dos animais tratados. O interesse deste princípio activo, quando combinado com uma primeira fase de tratamento com antimoniais, é exactamente diminuir significativamente a quantidade de recidivas (Noli & Auxilia, 2005). Se for administrado como único tratamento não irá eliminar o parasita, uma vez que não é um fármaco leishmanicida, e assim o parasita estará presente ao longo de todo o tratamento, o que representa maior elevado risco epidemiológico (Barrientos *et al.*, 2007). Contudo se for feito tratamento com antimonio de glucamina durante 20 dias seguido da administração de alopurinol durante vários meses este vai reduzir ou inibir a população parasitária na pele dos cães e como tal diminuir o risco de transmissão (João *et al.*, 2006, citado por Meireles, 2008). Nos cães, a eficácia do alopurinol em produzir remissão clínica é igual à dos antimoniais pentavalentes, apesar de ambas os fármacos, sozinhos ou combinados não erradicarem completamente o parasita. A combinação destes dois fármacos é comumente utilizada pois o sinergismo entre eles produz remissão dos sinais clínicos, diminui o tempo de administração dos antimoniais pentavalentes, tornando o tratamento melhor tolerado e mais económico. Num estudo esta

combinação produziu um maior rácio de cura clínica do que qualquer outro fármaco sozinho. Num outro estudo, a manutenção a longo prazo com o alopurinol reduziu as recidivas após o tratamento com antimoniais pentavalentes apesar de esta combinação não ter aumentado a taxa de curas parasitológicas (Manna *et al.*, 2009).

Este fármaco tem baixa toxicidade (Meireles, 2008; Barrientos *et al.*, 2007; Manna *et al.*, 2009; Noli & Auxilia, 2005), baixo custo, é eficiente na melhoria do estado clínico, é administrado oralmente (Manna *et al.*, 2009; Noli & Auxilia, 2005) e é bem tolerado (Barrientos *et al.*, 2007), o que se torna uma vantagem perante os antimoniais (Meireles, 2008; Barrientos *et al.*, 2007).

Os efeitos secundários não são comuns (Manna *et al.*, 2009), mas estão descritas náuseas, vómitos, diarreia, aumento das enzimas hepáticas AST, ALT e FAS bem como a produção de cristais e/ou urólitos de xantina (Barrientos *et al.*, 2007).

9.2. Antibióticos

9.2.1. Anfotericina B

O mecanismo de acção da anfotericina B consiste na sua capacidade de se unir ao ergosterol das membranas celulares das leishmanias alterando a sua permeabilidade (Miró *et al.*, 2008).

As doses utilizadas variam de autor para autor, indo de 0,1 mg a 1 mg/kg, diluídos em soro fisiológico, via intravenosa lenta – o que representa uma desvantagem deste fármaco - em dias alternados, durante dois meses.

Os efeitos secundários conhecidos relacionam-se com a sua nefrotoxicidade - logo pode pôr em risco cães que já sejam insuficientes renais (Miró *et al.*, 2008) - e com a sua união ao colesterol das células do hospedeiro mamífero, traduzindo-se em flebite, anorexia, vómitos, hipocaliémia, anemia, aumento da ureia e creatinina, icterícia, febre e em casos graves, paragem cardíaca (Meireles, 2008). Assim, a administração de anfotericina B requer monitorização atenta da função renal ao longo do tratamento com suspensão da terapêutica caso os níveis de creatinina aumentem acima dos níveis normais.

Apesar da anfotericina B ser um fármaco promissor para o tratamento e cura definitiva da leishmaniose canina, não existem estudos suficientes que confirmem esta possibilidade e a incidência de efeitos secundários (potencialmente severos) é alta. Assim, os dados existentes são insuficientes para recomendar o uso da anfotericina B na leishmaniose canina (Noli & Auxilia, 2005). Para além disto, Oliva (2006) defende que a classe veterinária não deve recorrer à anfotericina B de modo a evitar a selecção de parasitas resistentes à infecção como ocorreu com os antimoniais pentavalentes.

9.2.2. Paramomicina (Aminosidina)

A paramomicina é um antibiótico aminoglicosídeo. O seu mecanismo de acção não é conhecido (Barrientos *et al.*, 2007), ainda que se considere a hipótese de actuar nos

ribossomas do parasita e assim bloquear a síntese proteica (Meireles, 2008; Barrientos *et al.*, 2007).

A dose é de 10-20 mg/kg via intramuscular, observando-se uma melhoria clínica e diminuição da taxa de anticorpos. Se for utilizada uma dose mais elevada – 40 mg/kg/dia ocorre melhoria clínica e cura parasitológica durante um maior período de tempo, mas são produzidos efeitos adversos mais graves.

É nefro e ototóxica, pelo que a sua utilização requer alguns cuidados (principalmente em insuficientes renais), não sendo por isto recomendada como primeira linha de tratamento (Meireles, 2008; Noli & Auxilia, 2005; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

A combinação da paramomicina com compostos antimoniais permite diminuir a duração do tratamento uma vez que este antibiótico reduz o ritmo de eliminação do Sb⁵⁺, mantendo este composto em circulação durante mais tempo. Para além disto têm sido obtidos melhores resultados, tanto clínicos como parasitológicos, do que com a utilização individual dos fármacos (Barrientos *et al.*, 2007).

9.3. Compostos antimoniais

Os compostos antimoniais são utilizados desde há muitos anos e permanecem como os fármacos de eleição no tratamento da leishmaniose canina (Meireles, 2008; Barrientos *et al.*, 2007). Contudo, apenas permitem uma melhoria clínica e não a eliminação completa do parasita (López, 2007a).

Inicialmente eram utilizados na sua forma trivalente, porém devido à sua toxicidade elevada passaram a ser utilizados na sua forma pentavalente (Meireles, 2008; Barrientos *et al.*, 2007). As formas pentavalentes são consideradas o tratamento de escolha. As formas existentes são o Estibogluconato de sódio (Pentostan[®]) e o antimoniato de glucamina (Glucantime[®]) (Meireles, 2008; Barrientos *et al.*, 2007), sendo esta última a mais utilizada (López, 2007a). Existe ainda o antimoniato de metilglucamina encapsulado em lipossomas, que apresenta maiores concentrações plasmáticas de Sb, maior volume de distribuição e eliminação mais lenta. Contudo a sua relação custo-eficácia comparada com o tratamento com antimoniato de glucamina é discutível (Noli & Auxilia, 2005).

O modo de acção destes compostos consiste em inibir as enzimas fosfofrutoquinase e piruvato desidrogenase (Barrientos *et al.*, 2007), inibindo a glicólise e assim impedindo a formação de ATP e GTP e também inibe a oxidação dos ácidos gordos (Miró *et al.*, 2008). Estas acções irão levar à destruição das leishmanias (Meireles, 2008; Barrientos *et al.*, 2007). A quantidade de parasitas no animal diminui rapidamente, o que parece facilitar a sua resposta imunitária (López, 2007a).

A dose mínima recomendada é de 100mg/kg diariamente no mínimo durante 3 a 4 semanas. São alcançados melhores resultados com tratamentos mais longos (4 a 6 semanas) (Noli & Auxilia, 2005).

A farmacocinética dos compostos antimoniais pode variar significativamente em cães com leishmaniose canina. A insuficiência renal pode aumentar o tempo de semi-vida, logo o risco de toxicidade pode estar aumentado em cães com taxa de filtração glomerular diminuída (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Nestes casos alguns cães apresentam mialgias, artralhas, vômitos, diarreia, dor abdominal, anorexia, apatia, alterações hepáticas, renais e pancreáticas (Meireles, 2008; Barrientos *et al.*, 2007) e reacções no local da injeção (Noli & Auxilia, 2005). Assim, é prudente iniciar o tratamento farmacológico com doses inferiores às doses de tratamento de modo a testar as possíveis reacções de intolerância (Meireles, 2008).

Estes fármacos são os mais empregados no tratamento da leishmaniose canina, mas a sua utilização encontra-se ameaçada pela instalação de resistências (Manna *et al.*, 2009), o que obriga a pesquisar alternativas terapêuticas (López, 2007a).

9.4. Diamidinas

Actualmente as diamidinas são utilizadas no tratamento da leishmaniose canina como fármaco alternativo ou quando os antimoniais falham (Meireles, 2008).

Quando utilizadas, a diamidina escolhida é a pentamidina.

O mecanismo de acção destes fármacos está relacionado com a alteração do metabolismo das proteínas e dos ácidos nucleicos, ocorrendo interacção com o ARN e desorganização do ADN, com o qual forma complexos (Barrientos *et al.*, 2007). Para além disto exercem alterações sobre a mitocôndria, ribossoma, cinetoplasto e bolsa flagelar (Meireles, 2008).

A dose de pentamidina normalmente administrada é de 4mg/kg por via intramuscular profunda, duas a três vezes por semana durante quatro a sete semanas. As pentamidinas têm toxicidade e eficácia superiores quando comparadas com os antimoniais pentavalentes (Barrientos *et al.*, 2007).

Os efeitos adversos descritos são taquicardia (Barrientos *et al.*, 2007), vômitos, hipotensão, abscesso muscular no local da injeção (Meireles, 2008; Barrientos *et al.*, 2007), nefrite, hepatite, dor abdominal, síncope (Meireles, 2008).

A maioria dos cães tratados melhoram mas as recidivas são frequentes após o tratamento (Barrientos *et al.*, 2007).

9.5. Derivados do Imidazol

Os imidazóis são compostos antifúngicos que bloqueiam a síntese dos esteróis das membranas celulares das leishmanias, tornando-as pouco estáveis (Meireles, 2008; Barrientos *et al.*, 2007; Sundar & Chatterjee, 2006). Intensificam a glucogénese, o que conduz a uma diminuição das reservas energéticas e levando à morte das leishmanias. Para além disto formam complexos com o ADN inibindo a síntese dos ácidos nucleicos (Meireles, 2008; Barrientos *et al.*, 2007). Os princípios activos utilizados são o ketoconazol e o metronidazol.

9.5.1. Ketoconazol

Não existem muitos estudos acerca do tratamento da leishmaniose canina com este princípio activo. Alguns autores utilizam o protocolo de 7 mg/kg/dia via oral durante dois ou três meses, outros preferem utilizar doses mais elevadas – 25 mg/kg/dia via oral durante três meses. É altamente nefrotóxico, pelo que o seu uso está contra-indicado em cães com azotémia. Foi observado em trabalhos experimentais que o ketoconazol potencia a eficácia dos compostos antimoniais quando associados (Barrientos *et al.*, 2007).

9.5.2. Metronidazol

O metronidazol tem propriedades antiprotozoárias, antibacterianas e antiinflamatórias. A dose utilizada não deve exceder 65 mg/kg/dia e não deve ser administrado em fêmeas gestantes pois existe a suspeita de que seja teratogénico. Os seus efeitos secundários são anorexia, vómitos, diarreia, letargia, hepatotoxicidade, hematuria, neutropenia e alterações neurológicas como ataxia, síndromes vestibulares, *nistagmus*, entre outros. Estes efeitos adversos não são frequentes quando é utilizada a dose adequada. Com o objectivo de combater a leishmaniose canina foram realizados estudos em que se associou o metronidazol a outros princípios activos como a espiramicina, enrofloxacina, marbofloxacina e alopurinol. Resultou numa melhoria clínica mas não foi obtida cura parasitológica (Barrientos *et al.*, 2007).

9.6. Fármacos imunomoduladores

A leishmaniose canina leva a alterações imunológicas graves, o que justifica a utilização de fármacos imunoestimulantes – que potenciam a imunidade celular, considerada a imunidade protectora - ou imunossuppressores, que deprimem a imunidade humoral. A infecção por *Leishmania* spp leva a uma depressão dos linfócitos T helper 1 e a um aumento dos linfócitos T helper 2. Assim, a estratégia de desviar os linfócitos T helper para uma resposta do tipo Th1 é considerada uma boa estratégia. Os fármacos imunomoduladores são quase sempre associados a tratamentos específicos (Barrientos *et al.*, 2007).

9.6.1. Fármacos imunossuppressores

Os mais utilizados são os corticosteróides, nomeadamente a prednisolona e prednisona.

Os fármacos imunossuppressores deprimem a imunidade celular, diminuindo a capacidade dos linfócitos T de produzirem IL2 e assim interferindo no reconhecimento dos antigénios e bloqueando a produção de linfotoxinas e dos factores quimiotácticos dos monócitos. Para além de tudo isto são necessárias doses muito altas para diminuir a imunidade humoral. Por tudo isto deve-se evitar o uso destes fármacos em animais com leishmaniose canina, uma vez que podem provocar o aumento da replicação do parasita (Barrientos *et al.*, 2007).

Deste modo estes fármacos só se utilizam ocasionalmente em casos de insuficiência renal ou alterações oculares, como a uveíte devido à produção de imunocomplexos pois ao

diminuírem a imunidade humoral diminuem a produção de imunocomplexos (Meireles, 2008).

A dose recomendada é de 1 a 2 mg/kg/dia por via oral.

9.6.2. Fármacos imunoestimulantes

A utilização destes fármacos tem como principal objectivo a estimulação da imunidade celular e a activação dos macrófagos.

Os imunoestimulantes estudados são o levamizol, as citoquinas e a domperidona.

9.6.2.1. Levamizol

O levamizol é um antihelmíntico muito utilizado e em 1971 foi reconhecido o seu efeito na resposta imunitária (Meireles, 2008). No Homem potencia a velocidade de diferenciação dos linfócitos T e estimula a fagocitose em indivíduos saudáveis. Não está esclarecida a sua actividade nos cães (Meireles, 2008). Na leishmaniose canina não é habitualmente utilizado e quando o é, é sempre associado a um tratamento convencional (Barrientos *et al.*, 2007).

9.6.2.2. Citoquinas

A produção de citoquinas como a IL- 2 e IFN- γ pelos linfócitos T está diminuída durante a infecção por *Leishmania*.

Não existe informação suficiente acerca do tratamento com citoquinas em canídeos, mas foi observado que os cães que desenvolvem uma resposta celular do tipo Th1 permanecem assintomáticos, pelo que alguns autores consideram que a indução do INF- γ mediante o tratamento com citoquinas pode ser uma alternativa com boa possibilidade de sucesso, uma vez que o INF- γ induz resposta imunitária mediada por linfócitos Th1 (Barrientos *et al.*, 2007).

O uso de citoquinas e interferão γ é contudo ainda limitado e requer estudos mais aprofundados (Meireles, 2008).

9.7. Miltefosina

A miltefosina é um fármaco leishmanicida (Vischer, Grousson & Médaille, 2007), não sendo o seu mecanismo de acção completamente conhecido (Manna *et al.*, 2009)

Este fármaco é um alquifosfolípido com uma estrutura semelhante aos compostos metabolizados pelas leishmanias com actividade contra as formas promastigotas extracelulares e destruição das formas amastigotas (Meireles, 2008).

A miltefosina incorpora-se na bicamada lipídica da membrana plasmática do parasita, tornando-a permeável e alternando o metabolismo dos alquilípidos. Também foram descritas alterações da membrana flagelar dos promastigotas e defeitos na síntese dos fosfolípidos. Independentemente de qual o seu alvo primário a miltefosina induz a morte celular por apoptose. Para além disto tem efeitos imunoestimulantes.

Foram realizados poucos estudos em canídeos, tendo os mesmos mostrado que a miltefosina pode ser uma alternativa eficaz para o tratamento da leishmaniose canina. Manna *et al.* (2005) demonstraram uma boa eficácia da miltefosina, melhorando a sintomatologia, reduzindo a disproteinemia e reduzindo a carga parasitária quantificada por PCR em tempo real. Miro *et al.* (2005), citados por Barrientos *et al.* (2007) demonstraram boa eficácia clínica, bem como tolerância por parte dos animais tratados, não ocorrendo alteração das funções hepáticas e renais, ainda que tenham ocorrido efeitos adversos moderados a nível gastrointestinal de rápida recuperação.

A miltefosina é comercializada em Portugal como Milteforan[®], tem como dose recomendada 2mg/kg/dia via oral durante 28 dias (Meireles, 2008; Barrientos *et al.*, 2007), apresentando uma elevada percentagem de redução dos sinais clínicos dos cães tratados (Barrientos *et al.*, 2007). Apresenta a vantagem de ao não ser eliminado pela via renal poder ser indicado para cães com insuficiência renal (Meireles, 2008). Doses mais elevadas (4mg/kg) demonstraram uma maior eficácia leishmanicida mas podem provocar efeitos adversos mais prolongados que necessitem de tratamentos paliativos (Barrientos *et al.*, 2007).

O uso da miltefosina no tratamento da leishmaniose deve ser cuidadosamente pensado, pois como demonstrado pelo uso dos antimoniais em cães ou humanos pode conduzir a resistência. No caso de fármacos como a miltefosina, que têm uma semi-vida longa e a propensão de seleccionar formas resistentes, é essencial a monitorização da dose diária e o cumprimento do tratamento até ao fim (Manna *et al.*, 2009). Foi sugerida a combinação da miltefosina com o alopurinol como alternativa à combinação do antimoniato da meglumina com o alopurinol (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Legrand *et al.*, 2006, Vischer *et al.*, 2007 e Miró *et al.*, 2007, citados por Meireles (2008) concluem que a combinação do alopurinol com a miltefosina é eficaz, compatível e não provoca efeitos adversos e tóxicos. No ensaio clínico de Miró *et al.* (2007) em que se compara a eficácia do tratamento de referência - Glucantime[®] e Alopurinol com a combinação de miltefosina - Milteforan[®]- e alopurinol em 72 cães infectados naturalmente com leishmaniose canina concluiu-se que ambas as terapêuticas resultam em 30 a 50% de melhoria clínica. Observou-se ainda ausência de efeitos adversos e manutenção das funções renal e hepática normais. Ocorreu clara diminuição da carga parasitária ao fim de 3 meses de tratamento, o que leva a concluir que ambas as combinações têm um bom efeito leishmanicida (Barrientos *et al.*, 2007). Manna *et al.* (2009), num estudo realizado para determinar a eficácia da miltefosina e alopurinol em cães com leishmaniose, concluem que o tratamento combinado de miltefosina e alopurinol representa um bom protocolo e atrasa a progressão da doença em cães.

9.8. Péptidos antimicrobianos

Os péptidos antimicrobianos permeabilizam a membrana plasmática, alterando o transporte de enzimas. Os péptidos estudados para o combate à leishmaniose canina são dermaseptin,

cecropins, melittin, polipéptido da pele YY e gomesin. Um estudo realizado por Alberola *et al.* (2004) sobre a eficácia do péptido Oct-CA(17)M(2-9) concluiu que este tratamento é seguro e que, seis meses após o tratamento, os animais apresentavam melhoria clínica, valores normais de proteínas e diminuição do título de anticorpos e carga parasitária (Barrientos *et al.*, 2007).

9.9. Transportadores de moléculas de fármacos

Os transportadores de moléculas de fármacos são substâncias que ao serem incorporadas em determinados fármacos vão transportá-los até ao local da infecção (Meireles, 2008).

Permitem controlar a distribuição do fármaco, libertando-o nos órgãos alvo e assim reduzindo a possibilidade de toxicidade. Possibilitam também prolongar o tempo de libertação do princípio activo e assim aumentam a sua permanência no organismo, sendo necessárias doses mais baixas do que quando se utiliza o fármaco sozinho (Barrientos *et al.*, 2007).

Na leishmaniose os vectores devem poder transportar os fármacos anti-Leishmania até serem fagocitados, têm que se fundir com o fagolisossoma para que o medicamento exerça o seu efeito, têm de ser pequenos para poderem atravessar os vasos sanguíneos e atingir as zonas inflamadas e não devem ser tóxicos para o hospedeiro.

Estes vectores permitem reduzir as doses medicamentosas, diminuir os riscos de toxicidade e dirigir os fármacos de forma selectiva para o local onde se encontram as leishmanias.

Os mais utilizados são os lipossomas, anfotericina B, glóbulos vermelhos que veiculam medicamentos anti-leishmania cobertos com imunoglobulina G, niossomas e macromoléculas tipo polímeros glucosilados Poli-L-lisina. Apesar de todas as vantagens o seu custo torna proibitivo o uso destes fármacos (Meireles, 2008).

9.10. Tratamento sintomático

Além da terapêutica etiológica é de vital importância melhorar o estado de saúde do animal, utilizando um tratamento completo que vise a normalização das alterações clínicas provocadas pela doença. Assim, consoante o quadro clínico poderá recorrer-se à antibioterapia, fluidoterapia, anti-inflamatórios, dietas hipoproteicas, transfusões de sangue, anti-anémicos, ferro, tratamentos dermatológicos, entre outros (Meireles, 2008; Ribeiro, 2009). Nos tratamentos paliativos tem especial importância um bom manejo da insuficiência renal dada a elevada prevalência desta afecção em cães com leishmaniose canina.

9.10.1. Domperidona

A domperidona é um anti-hemético antagonista da dopamina. Actualmente é utilizado como antagonista dos efeitos gastro-intestinais produzidos por outros fármacos como por exemplo a miltefosina. Para além disto a domperidona eleva os níveis séricos de prolactina. A prolactina estimula a imunidade celular mediada por linfócitos Th1, que é a que se encontra

afectada nos canídeos que sofrem de leishmaniose. Assim, provocar hiperprolactinémia parece ser eficaz no tratamento destes animais. As doses utilizadas são de 1 mg/kg via oral, 30 dias consecutivos, associada à restante terapia (Barrientos *et al.*, 2007).

As vantagens da domperidona são o facto de ser um fármaco pouco dispendioso, poder ser administrado oralmente, e no estudo realizado por Gómez-Ochoa *et al.* (2009) não terem sido observados efeitos secundários, permitindo tratar animais insuficientes renais. No estudo supra-citado a domperidona foi eficaz no controlo e redução dos sinais clínicos e dos títulos de anticorpos.

9.11. Trifuralina

A trifuralina é um herbicida que inibe a proliferação dos promastigotas e reduz a infectividade das formas amastigotas. Tem sido alvo de alguns estudos experimentais (Maireles, 2008).

9.12. Outros Tratamentos

Os princípios activos de seguida abordados ainda estão a ser alvo de estudos, não tendo até à data, provado serem tão eficazes como o antimoniato de meglumina (Noli & Auxilia, 2005).

9.12.1. Buparvacuona

É utilizada no tratamento da teileriose em ruminantes e equinos, tendo demonstrado eficácia em estudos *in vitro* com amastigotas de *Leishmania*. Contudo não demonstrou eficácia no tratamento da leishmaniose canina na dose de 5mg/kg em quatro doses num período de 12 dias (Barrientos *et al.*, 2007).

9.12.2. Enrofloxacina

A enrofloxacina não é eficaz *in vitro*. Contudo, *in vivo*, associada sobretudo com o Gluacantime[®] demonstrou melhoria das manifestações cutâneas, diminuição do título de anticorpos e melhoria dos parâmetros analíticos. As primeiras recidivas surgiram 60 a 90 dias após o início do tratamento (Barrientos *et al.*, 2007).

9.12.3. Marbofloxacina

A marbofloxacina é uma quinolona de aplicação recente em Medicina Veterinária que demonstrou actividade *in vitro* perante os promastigotas e em macrófago dos animais infectados.

A morte dos promastigotas e amastigotas é dependente da dose, sendo a dose de 500µg/ml eficaz e não mostrando toxicidade. O tempo médio de eliminação é de 14 horas, o que facilita uma única administração diária.

Vouldoulkis *et al.* (2006), citado por Barrientos *et al.* (2007) mostrou num ensaio clínico que na dose de 2mg/kg/dia durante 28 dias, a marbofloxacina pode ter um claro efeito leishmanicida e representar uma alternativa terapêutica oral no combate à leishmaniose canina.

Stefani *et al.* (2005), citado por Barrientos *et al.* (2007) sugerem que exista um possível sinergismo na associação da marbofloxacina, metronidazol e alopurinol em cães com leishmaniose canina e insuficiência renal (Barrientos *et al.*, 2007).

9.13. Dieta

Existe uma dieta específica para o manejo da leishmaniose canina. É a Canine Leishmaniasis management[®], que administrada juntamente com Glucantime[®] e alopurinol resultou numa melhoria dos sinais clínicos, parâmetros analíticos e da resposta imunitária (Barrientos *et al.*, 2007). Contudo, em Portugal esta dieta ou outras específicas para a leishmaniose canina não estão disponíveis, competindo ao médico veterinário aconselhar o melhor alimento dietético para esta situação.

10. Profilaxia

O controlo da leishmaniose canina é um processo que implica várias medidas que idealmente deveriam ser realizadas em conjunto, de modo a atingir o objectivo de impedir que mais cães sejam infectados com esta doença.

As principais estratégias que devem ser empregadas são:

- Actuar directamente sobre o cão doente mediante tratamento.
Tal como já referido anteriormente, os fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose canina não eliminam completamente as leishmanias, ocorrendo raramente cura parasitológica. Assim, o tratamento dos cães doentes limita-se a melhorar a qualidade de vida do animal e a diminuir a carga parasitária, não prevenindo que os flebótomos, ao picarem este animal doente ingiram o parasita. O uso periódico de fármacos contra a leishmaniose para a prevenção da transmissão não provou ser bem sucedido (Miró *et al.*, 2008).
- Actuar directamente sobre o cão doente recorrendo a eutanásia.
Esta abordagem é utilizada no Brasil com o objectivo de reduzir a incidência de leishmaniose visceral humana (HVL) (Tafari, 2009). Contudo tal medida tem diversas contra-indicações:
 - O cão é um animal de estimação muitas vezes considerado como parte da família e o seu sacrifício é considerado inaceitável (Tafari, 2009).
 - A eutanásia de um cão implica muitas vezes a sua substituição por outro cão, o que já comprovou criar uma nova população alargada de cães mais jovens e mais susceptíveis à infecção por *Leishmania* (Tafari, 2009).

- Existem hospedeiros reservatórios selvagens (Miró *et al.*, 2008)
 - Os métodos serológicos muitas vezes facultam resultados falsos negativos (Miró *et al.*, 2008)
 - Não é possível alcançar toda a população canina (Miró *et al.*, 2008)
 - O período, por vezes longo, entre a detecção e a eutanásia dos animais (Miró *et al.*, 2008)
- Controlo do vector - a prevenção da picada do flebótomo interrompe o ciclo de transmissão da *Leishmania* e previne que ocorra infecção (Miró *et al.*, 2008). Para tal deve-se recorrer a diversas medidas:
 - Controlo intra-domiciliário - utilização de redes convencionais protectoras (com 0,3 a 0,4 mm² de área da quadrícula da malha) ou tratadas com piretróides sintéticos residuais (Esteban, Matute, Torres & Moreno, 2007; Miró *et al.*, 2008) janelas, portas e canis (Esteban *et al.*, 2007).
 - Resguardar o cão dentro de casa na época de actividade do flebotomo desde o crepúsculo até ao amanhecer (Solano-Gallego *et al.*, 2009).
 - Utilizar insecticidas nos canis e ao seu redor (Greene, 2006).
 - Reduzir os micro habitats favoráveis aos flebotomos nas imediações da casa ou nos locais onde o cão passa o seu tempo (Solano-Gallego *et al.*, 2009).
 - Aplicação tópica de insecticidas no cão de modo a reduzir as picadas dos flebotomos (Solano, 2008). Para este efeito pode-se recorrer a diversos métodos, como coleiras impregnadas de deltamertina, pulverizações e unções punctiformes à base de imidoclopride e permetrina (Greene, 2006).
Através deste recurso é conseguido um duplo efeito: por um lado, um repelente através do qual se interrompe a transmissão do parasita pois o flebótomo não chega a ingerir sangue; por outro, o insecticida mata o flebótomo que se tenha alimentado ou pousado no cão (Solano, 2008).
Os insecticidas mais utilizados actualmente são os piretróides pois são eficazes contra os flebotomos e pouco tóxicos para o cão (Miró *et al.*, 2008).
Cardoso (2006) afirma que o uso de insecticidas é a medida mais eficaz para prevenir a infecção em cães.
 - Actuar sobre o cão saudável através de imunoprofilaxia- a vacinação contra a leishmaniose canina previne a doença nos cães e constitui a principal estratégia para diminuir a ameaça de infecção para os humanos (Miró *et al.*, 2008).
Este assunto é alvo de pesquisa há já décadas (Miró *et al.*, 2008), contudo ainda não foi encontrada a vacina ideal para esta doença. No Brasil existe já uma vacina comercializada - Leishmune[®], com uma eficácia de 80% (Borja-Cabrera *et al.*, 2002, citados por Miró *et al.*, 2008), contudo a distinção entre os animais vacinados e os animais naturalmente infectados é difícil, pelo que alguns veterinários do Brasil

hesitam em vacinar os seus pacientes, uma vez que nesse país os cães seropositivos são sacrificados (Dantas-Torres & Brandao-Filho, 2006, citados por Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Uma outra vacina foi estudada em França, que mostrou boa protecção contra infecção experimental com *L. Infantum*. (Lemesre *et al.*, 2005, citados por Solano-Gallego *et al.*, 2009).

11. Prognóstico

O prognóstico da leishmaniose canina é variável (Nelson & Couto, 2006). Apesar de o tratamento combinado com antimoniato de meglumina e alopurinol ou somente com alopurinol proporcionar muitas vezes cura clínica (Noli & Auxilia, 2005, citados por Solano-Gallego *et al.*, 2009), alguns cães que inicialmente respondem bem ao tratamento podem recidivar durante ou após o final deste (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

O prognóstico depende da severidade das lesões orgânicas causadas pela doença, da resposta imunitária individual de cada animal, e do grau de evolução da doença.

Na ausência de insuficiência renal o tratamento em regra melhora os sinais dermatológicos e viscerais da doença (Greene, 2006). Contudo, os cães com insuficiência renal têm mau prognóstico (Nelson & Couto, 2006).

12. Importância zoonótica

Zoonose é uma doença dos animais transmissível ao Homem (Richard & Ashford, 1996).

A leishmaniose canina faz parte do grupo das principais zoonoses mundiais (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Os cães são muito utilizados como animal de companhia, pelo que são encontrados num grande número de agregados familiares, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (Solano-Gallego *et al.*, 2009). São considerados os principais reservatórios de leishmaniose visceral zoonótica para os Humanos na Bacia Mediterrânea, Médio Oriente e América do Sul (Greene, 2006).

Importa salientar que o facto de possuir um cão não representa um risco acrescido para infecção humana (Greene, 2006). A infecção ocorre através da acção do flebótomo, não sendo provável que o contacto directo com os amastigotas presentes nas lesões resulte em infecção humana (Nelson & Couto, 2006). Contudo, a hipótese de transmissão directa do cão infectado para o humano não pode ser excluída (Greene, 2006).

Tradicionalmente a leishmaniose visceral zoonótica afectava crianças, contudo actualmente é observado em adultos infectados pelo HIV ou sob tratamento com fármacos citostáticos ou imunossupressores.

Campino (2002) citado por Cortes *et al.* (2007) defende que a leishmaniose visceral canina é mais prevalente e está mais amplamente distribuída do que a leishmaniose visceral humana, não se correlacionando fortemente com a prevalência em humanos .

Um estudo realizado em Espanha em humanos toxicodependentes utilizadores de drogas endovenosas e que partilhavam agulhas mostrou que a infecção é transmitida através dessa via (Greene, 2006).

O facto de os cães que receberam tratamento leishmanicida e os cães assintomáticos poderem ser infectantes para os Humanos e os animais permanece como assunto de debate e preocupação em termos de Saúde Pública (Greene, 2006).

III – Rastreo de *Leishmania infantum* em cães assintomáticos na região de Mafra

1. Objectivo

O objectivo deste estudo foi a detecção de cães infectados por *L. infantum* assintomáticos pela técnica de imunofluorescência indirecta (IFI) na Clínica Veterinária de Mafra (CVM), no período compreendido entre 1 de Agosto de 2009 e 1 de Dezembro de 2009. Para além disso, nos cães cujo resultado de IFI fosse positivo seriam realizadas análises hematológicas e bioquímicas e PCR a partir de amostras de pele.

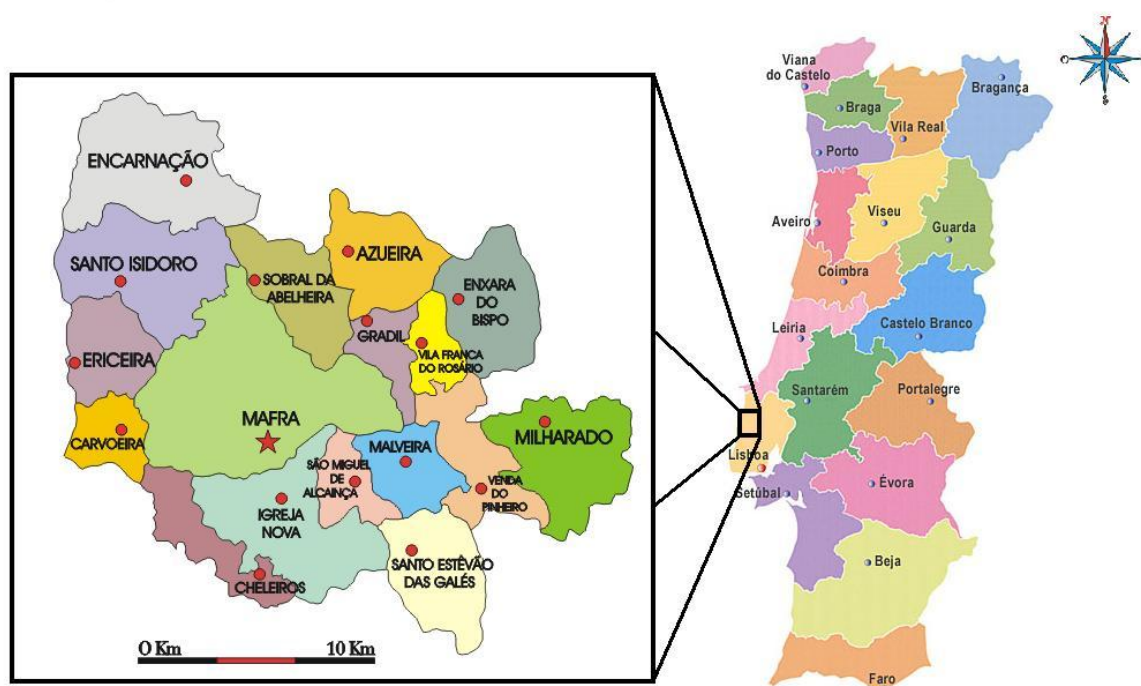
2. Material e Métodos

2.1. Caracterização da área geográfica do estudo

O concelho de Mafra localiza-se na Área Metropolitana de Lisboa. Confronta-se com os concelhos de Torres Vedras, Sobral de Monte Agraço, Arruda dos Vinhos, Loures e Sintra. Ocupa uma extensão de 291 km² e é constituído por um total de 17 freguesias: Azueira, Carvoeira, Cheleiros, Encarnação, Enxara do Bispo, Ericeira, Gradil, Igreja Nova, Mafra, Malveira, Milharado, Santo Estevão das Galés, Santo Isidoro, São Miguel de Alcaíça, Sobral da Abelheira, Vila Franca do Rosário e Venda do Pinheiro (Figura 13).

Segundo os censos de 2001 a população deste concelho é de 54 285 habitantes (Câmara Municipal de Mafra, 2010).

Figura 13 - Mapa do concelho de Mafra e dos distritos de Portugal (adaptado de <http://www.fisicohomepage.hpg.ig.com.br/mfr.htm> e de <http://oliveiradigital.no.sapo.pt/distritos.jpg>)



O concelho possui uma topografia ondulada, ocupada em mais de metade por áreas agrícolas. As zonas de floresta ocupam 21,9% da cobertura total do concelho, das quais se destaca pela sua beleza e notoriedade a Tapada Nacional de Mafra (Câmara Municipal de Mafra, 2007).

2.2. Caracterização climática da zona de Mafra

O clima nesta zona é influenciado pela proximidade do mar, que se encontra apenas a poucos quilómetros. A temperatura média anual ronda os 15°C, sendo a temperatura média do mês mais quente (Agosto) de 20°C. A velocidade do vento é moderada, contudo na transição entre estações os ventos chegam a soprar com rajadas fortes. A precipitação total anual média é de 860,9 mm, sendo Novembro o mês com maior precipitação (132,1 mm) e Julho o mês com menor precipitação (2,8 mm), ocorrendo cerca de 75 a 100 dias de chuva por ano. Verifica-se que existem dois semestres distintos em termos de precipitação: o semestre húmido (entre Outubro e Março) e o semestre seco (entre Abril e Setembro). O período húmido predomina em relação ao período seco, que se limita aos meses de Verão, entre princípios de Junho e meados de Setembro (Câmara Municipal de Mafra, 2007).

2.3. Caracterização da amostra

O presente estudo foi realizado com base numa amostra por conveniência, tendo sido efectuado em 80 cães provenientes da região de Mafra, com mais de um ano e meio de idade (para aumentar a probabilidade de já terem tido tempo de contactar com o insecto vector de *L. infantum* no período de maior prevalência deste e também para que houvesse tempo para a formação de resposta imunitária humoral) e sem sintomas aparentes de leishmaniose canina.

Aos proprietários de cães que se apresentaram na CVM foi-lhes questionado se estariam interessados em participar num estudo onde os seus cães com mais de um ano e meio de idade e sem sintomas de leishmaniose seriam testados para a infecção por *L. infantum*. Para além destes estão presentes neste estudo cães cujos proprietários souberam que estaria a decorrer o rastreio de infecção por *Leishmania infantum* e assim se deslocaram voluntária e propositadamente à CVM com os seus cães para que estes fossem testados. Por fim, dois proprietários na impossibilidade de se deslocarem até à CVM solicitaram que a recolha de material fosse realizada nos seus locais de habitação, e tal foi efectuado. A todos os proprietários de cães participantes neste estudo foi realizado um inquérito com o intuito de obter dados para caracterização da amostra.

2.3.1. História progressa e exame físico

A todos os cães participantes neste estudo foi feito um exame físico onde se verificou a ausência de sinais aparentes de leishmaniose, tais como, depressão, magreza, lesões

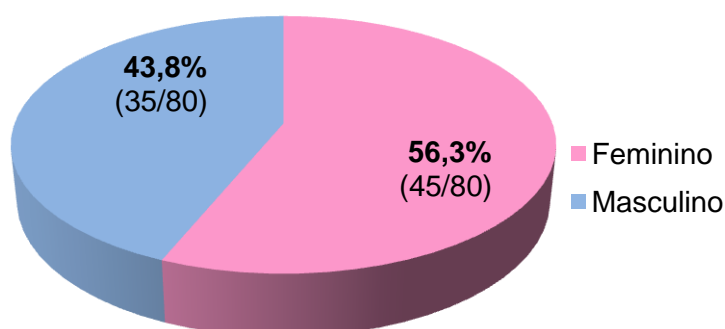
cutâneas, lesões oculares, onicogribose, ulcerações das mucosas, atrofia muscular, queixas articulares, hepatomegália, esplenomegália, adenomegália e/ou epistáxis.

Os animais que revelaram qualquer sinal que pudesse indicar a presença de leishmaniose canina foram eliminados do estudo.

2.3.2. Sexo

Dos 80 cães rastreados, 45 (56,25%) eram fêmeas e 35 (43,75%) eram machos.

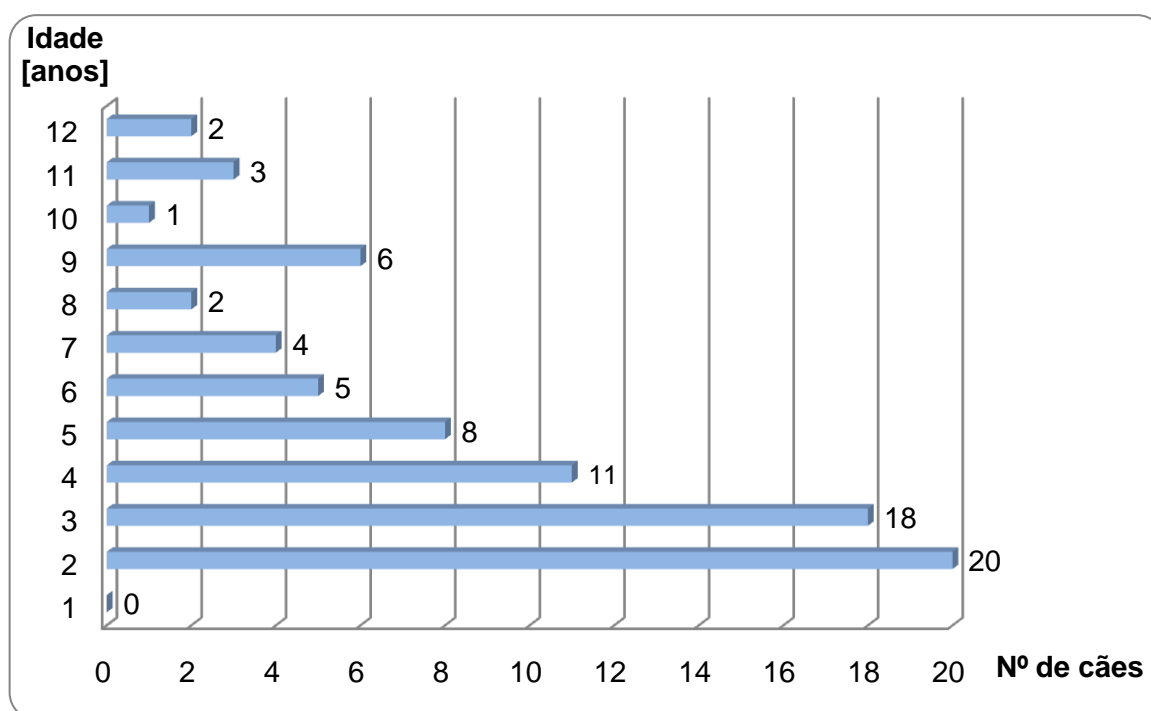
Gráfico 14 - Frequência relativa do sexo dos cães da amostra (N=80).



2.3.3. Idade

A idade dos animais estudados variou entre os 2 e os 12 anos, sendo a média de 4,7 anos, a mediana de 4 e o desvio padrão de 2, 8.

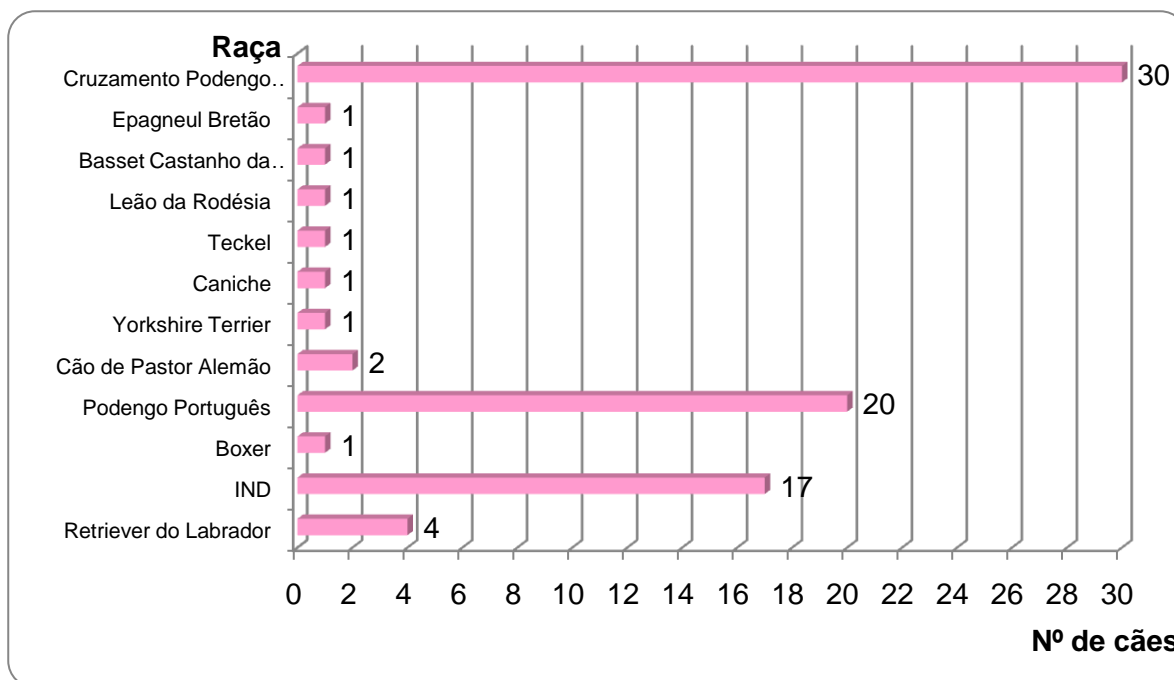
Gráfico 15 - Frequência absoluta da idade em anos dos cães da amostra (N=80).



2.3.4. Raça

A maioria dos animais estudados, 37,5% (30/80) resultou de um cruzamento da raça Podengo, 25% (20/80) dos cães rastreados pertenciam à raça Podengo, 21,3% (17/80) da amostra não tinha raça definida (IND) e os restantes 16,3% (13/80) pertenciam às raças Epagneul Breton, Basset da Bretanha, Leão da Rodésia, Teckel, Caniche, Yorkshire Terrier, Pastor Alemão, Boxer e Labrador Retriever.

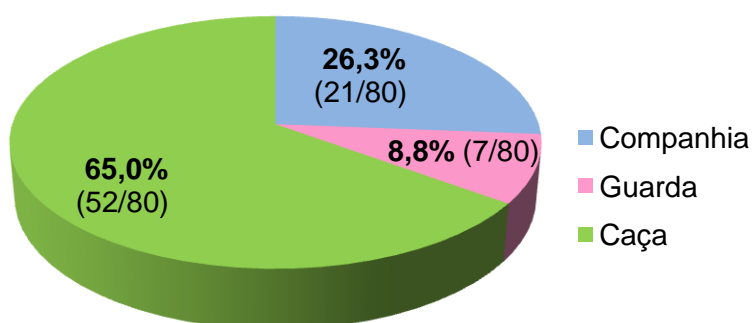
Gráfico 16 - Frequência absoluta da raça dos cães da amostra (N=80).



2.3.5. Aptidão

Relativamente à aptidão, a caça foi a mais frequentemente indicada (65% - 52/80), seguida pela aptidão de companhia (26,3% - 21/80) e de guarda (8,8% - 7/80).

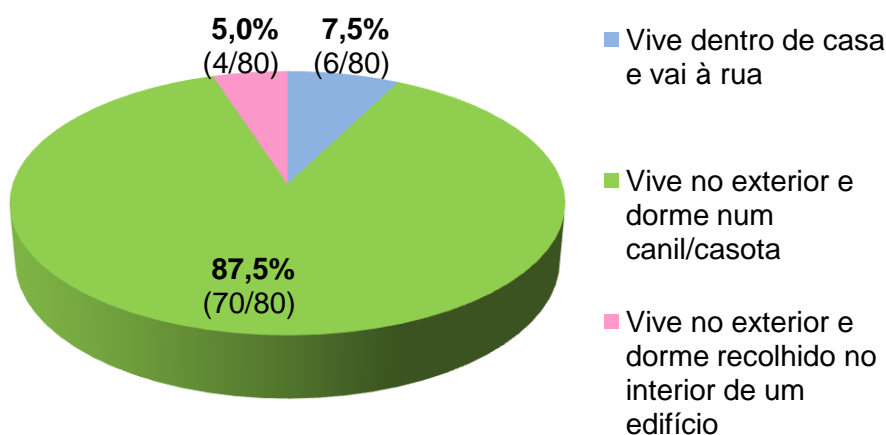
Gráfico 17 - Frequência relativa da aptidão dos cães da amostra (N=80).



2.3.6. Local de habitação

A grande maioria (87,5% - 70/80) dos cães rastreados vivia no exterior e dormiam numa casota ou canil, 7,5% (6/80) viviam no exterior e dormiam recolhidos no interior de um edifício como uma garagem ou um anexo da casa de habitação dos proprietários e 5,0% (4/80) viviam dentro de casa e faziam passeios na rua.

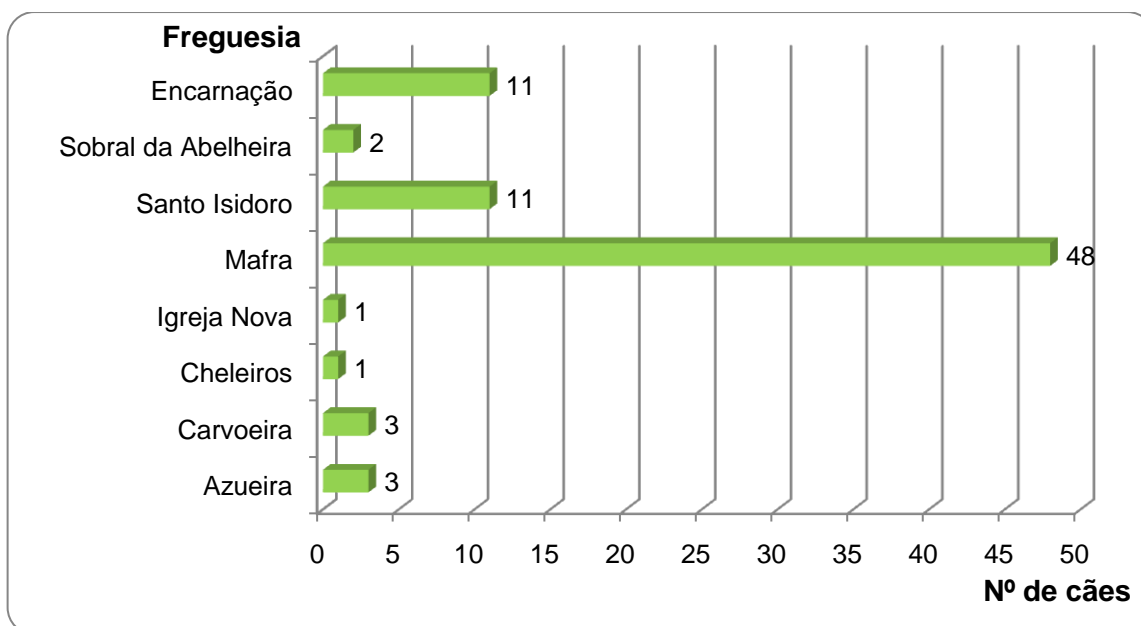
Gráfico 18 - Frequência relativa do local de habitação dos cães da amostra (N=80).



2.3.7. Proveniência

Quanto ao local de origem dos cães rastreados, 60% (48/80) pertenciam à freguesia de Mafra, 13,8% (11/80) à freguesia de Santo Isidoro, 13,8% (11/80) à freguesia de Encarnação, 3,8% (3/80) à freguesia da Carvoeira, 3,8% (3/80) à freguesia da Azueira, 2,5% (2/80) à freguesia de Sobral da Abelheira, 1,3% (1/80) à freguesia de Cheleiros e 1,3% (1/80) à freguesia da Igreja Nova.

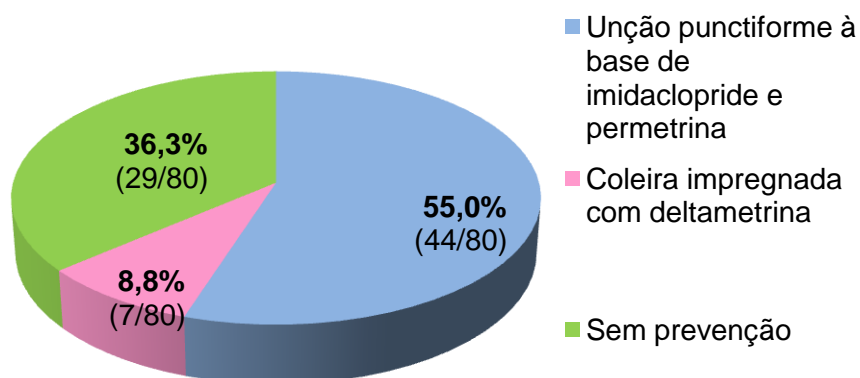
Gráfico 19 - Frequência absoluta da proveniência dos cães da amostra (N=80) por freguesia.



2.3.8. Prevenção da picada do insecto vector

No que respeita a medidas de prevenção contra a infecção por *L. infantum*, 36,3% (29/80) dos cães da amostra não recebiam qualquer tipo de medida de prevenção, enquanto que 63,7% (51/80) eram alvo de aplicação de unção punctiforme (*spot-on*) à base de imidaclopride e permetrina (55,0% - 44/80) ou coleira impregnada com deltametrina (8,8% - 7/80).

Gráfico 20 - Frequência relativa do tipo de prevenção contra a picada do insecto vector realizada nos cães da amostra (N=80).



2.4. Colheita e processamento das amostras

A recolha de sangue dos cães rastreados foi efectuada na CVM e nos locais de habitação dos cães pertencentes a dois dos proprietários. Estes não tinham possibilidade de se deslocarem até à CVM e apresentaram manifesto interesse em rastrear os seus cães. Ambos os locais se localizam na freguesia e concelho de Mafra.

2.4.1. Obtenção de soro para realização da técnica de IFI

Após a contenção do animal desinfectou-se a pele com álcool a 70%. Com um catéter de 22 G puncionou-se a veia cefálica e recolheu-se 1,5 ml de sangue, para um tubo seco para obtenção de soro destinado à realização da técnica de imunofluorescência indirecta de modo a detectar anticorpos anti-leishmania.

Os proprietários dos cães cujos resultados fossem duvidosos seriam contactados no sentido de repetir este exame, contudo apenas um dos proprietários se mostrou disponível para tal.

2.4.2. Execução de hemograma e análises bioquímicas

Posteriormente, em todos os cães cujo resultado da técnica de IFI foi positivo realizou-se nova colheita de sangue para tubo com EDTA para realização de hemograma no aparelho "Hospitex Diagnostic", modelo "Hema Screen 18" e determinação dos parâmetros

bioquímicos -creatinina, fosfatase alcalina, aspartato transaminase e alanina transaminase - no aparelho “Biochemical Systems International SRL”, modelo “Clin Check Plus Vet”. Cerca de 1,3 ml de sangue foram colhidos para tubo seco para obtenção de soro para realização de proteinograma em laboratório externo.

2.4.3. Execução de esfregaço sanguíneo

Foi efectuado um esfregaço de sangue para pesquisa de hemoparasitas.

2.4.4. Raspagem cutânea

No caso dos cães positivos na técnica de IFI efectuou-se raspagem cutânea com bisturi no pescoço, tórax e membro anterior direito para obtenção de material para PCR. Não foi possível realizar biópsia cutânea porque os proprietários não o permitiram.

2.5. Técnica de imunofluorescência indirecta (IFI)

Considerando o objectivo de detectar cães assintomáticos, realizaram-se os testes de IFI utilizando um valor de limiar de positividade inferior ao referido pelo fabricante com o objectivo de encontrar um maior número de cães assintomáticos infectados com *L. infantum*. Assim, convencionou-se iniciar o estudo com a diluição de 1/40 e no caso de os resultados serem maioritariamente negativos, proceder-se-ia a um segundo rastreio na diluição de 1/20. Para além disso, os soros que fossem positivos ou duvidosos na diluição de 1/40 seriam também analisados na diluição de 1/80. Usou-se como controlo positivo um pool de soros de cães positivos da seroteca do Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária (Universidade Técnica de Lisboa), com título $\geq 1/320$. Como controlo negativo foi utilizado um pool de soros de cães negativos da seroteca do Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária (Universidade Técnica de Lisboa). A técnica de IFI foi realizada no Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária (Universidade Técnica de Lisboa) e utilizou-se o *Kit* Leishmania-Spot IF (Laboratório bioMérieux, França, Ref. 75 931), de acordo com o protocolo do fabricante, com as seguintes alterações:

1. Retirar as lâminas com o antigénio fixado do frigorífico e colocá-las à temperatura ambiente durante 15 minutos;
2. Preparar o tampão fosfato salino (PBS) (BioMérieux, França, Ref. 75 511), diluindo-o em 1 l de água destilada;
3. Preparar o PBS-Tween 80, através da junção de 1 ml de Tween 80 (Merck, Alemanha, Ref. 822 187) a 1 l do preparado anterior;
4. Descongelar as amostras de soro à temperatura ambiente
5. Homogeneizar as amostras recorrendo ao agitador
- 6.

- a) No caso da diluição 1/20 depositar 95 µl de PBS em cada um dos poços da placa de titulação, correspondendo o número de poços ao número de soros que se pretende titular.
 - b) No caso da diluição de 1/40, depositar 195 µl de PBS, em cada um dos poços da placa de titulação, correspondendo o número de poços ao número de soros que se pretende titular.
7. Depositar 5 µl de soro em cada um dos poços da placa de titulação, homogeneizando com o auxílio da pipeta
 8. Depositar 10 µl da diluição de cada soro problema obtida em 6 num poço da lâmina.
 9. Depositar 10 µl de controlo positivo no poço 10 da lâmina
 10. Incubar durante 30 minutos a 37°C em câmara húmida.
 11. Fazer uma primeira lavagem rápida das lâminas utilizando um banho de PBS/Tween 80.
 12. Fazer uma segunda lavagem das lâminas mergulhando as lâminas num recipiente com PBS/Tween 80 durante 5 minutos.
 13. Fazer uma terceira lavagem das lâminas mergulhando as lâminas em outro recipiente com PBS/Tween 80 durante 5 minutos.
 14. Fazer uma última lavagem rápida das lâminas utilizando um banho água destilada.
 15. Secar bem as lâminas com o auxílio de um secador de cabelo.
 16. Depositar 10µl de conjugado fornecido no *kit* em cada um dos poços da lâmina.
 17. Incubar durante 30 minutos a 37°C em câmara húmida.
 18. Repetir os passos 10 a 14.
 19. Colocar uma gota de glicerina tamponada (1:10) Fluoprep em cada poço de cada lâmina
 20. Colocar uma lamela 50x24/mm sobre cada lâmina
 21. Observar em microscópio de fluorescência (neste caso, Olympus DP10, Modelo BX50F), no comprimento de onda de 425 nm. Considerar como positivo os poços onde se observam promastigotas de cor verde fluorescente e como negativo aqueles onde existir uma coloração vermelha.

2.6. PCR

A técnica da PCR foi realizada no da seroteca do Laboratório de Virulogia e Biologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária (Universidade Técnica de Lisboa).

- a) Extracção do ADN total a partir da amostra de pele

A extracção de ADN de alto peso molecular foi efectuada com o *Kit* de extracção Dneasy Blood and tissue *kit* (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

1. Homogeneizaram-se 200µl de sangue total com igual volume de Tampão AL, durante 15mn a 56°C, de forma a efectuar a lise celular (glóbulos vermelhos e glóbulos brancos).
 2. No final da incubação adicionou-se 200µl de Etanol a 96%, para promover a precipitação dos ácidos nucleicos e a totalidade da amostra foi aplicada numa coluna de silica gel, com elevada afinidade para ADN/ARN, quando em solução alcoólica.
 3. Após um passo de centrifugação a 16000xg/1mn, lavou-se a coluna de silica gel duas vezes com dois tampões de lavagens, sempre com alta concentração de álcool. As lavagens incluíram, adição do tampão seguido de um passo de centrifugação (16000xg/1mn) e eliminação do sobrenadante do tubo colector.
 4. Após a última lavagem adicionou-se 100 µl de tampão de eluição aquoso, directamente na coluna, de forma a hidratar os ácidos nucleicos fixos e centrifugou-se nas mesmas condições, para um tubo previamente identificado.
 5. A quantificação das amostras foi realizada no Nanodrop 2000c spectrophotometer e a concentração do ADN total expressa em ng/ µl. As amostras foram armazenadas a -20°C até à sua utilização.
- b) PCR convencional para detecção de *Leishmania* spp.

1. Submeteram-se as amostras de ADN total a uma reacção de PCR para amplificação de um fragmento de 120bp, incluído no ADN do cinetoplasto de *Leishmania* spp., de acordo com Lachaud et al. (2002). A reacção foi efectuada no volume final de 25µl utilizando Fidelity Taq 2x (GE Healthsciences) que inclui a Taq polimerase com actividade de *proofreading*, o tampão de reacção da enzima e os dNTPs necessários para a reacção de amplificação, para além do primer forward K13A (5' GTGGGGGAGGGGCGTTCT 3') e do primer reverse K13B (5' ATTTTACACCAACCCAGTTC 3') na concentração de 25 pmol/ µL. O ADN molde foi o último elemento a ser adicionado à reacção.
2. Todos os ensaios incluíram um controle positivo da reacção, no qual foi utilizado ADN genómico de *L. infantum* e um controle negativo, sem ADN.
3. O ciclo de amplificação incluiu um passo inicial de desnaturação a 94°C/4mn, seguido de um conjunto de 40 ciclos de 94°C/30seg; 58 °C/30seg; 68°C/30 seg e um passo adicional de extensão final de 68°C durante 10min.

c) Electroforese horizontal em gel de agarose e visualização dos produtos da reacção.

Os produtos resultantes da reacção de amplificação foram separados por electroforese horizontal, num gel de agarose a 2,5% em Tampão acetato-EDTA (TAE) com *gelred* (diluição 1/20) e visualizados num Imagemaster VPS.

2.7. Análise estatística dos resultados

Na análise dos dados foram utilizados métodos de estatística descritiva tais como gráficos descritivos e descrição tabular.

Foi também utilizado o teste do χ^2 para determinar a relação entre a aptidão de caça e a infecção assintomática por *L. infantum* e entre a raça dos cães testados e a infecção assintomática por *L. infantum*.

3. Resultados

3.1. Detecção de animais infectados com *L. infantum* pela técnica de imunofluorescência indirecta (IFI)

Dos 80 animais testados por IFI na diluição de 1/40 apenas um soro foi positivo (1,25%) e sete revelaram resultados duvidosos, enquanto que na diluição de 1/20 seis soros mostraram positividade (7,5%). O animal que revelou positividade na técnica de 1/40 revelou-se duvidoso na IFI na diluição de 1/80 (Tabela 22).

As frequências relativas dos cães positivos na técnica de IFI segundo a freguesia de habitação estão representadas nos mapas da Figura 23 e Figura 24.

Figura 21 - Aspecto da técnica da IFI do resultado positivo (ampliação de 370x aprox.) (original)

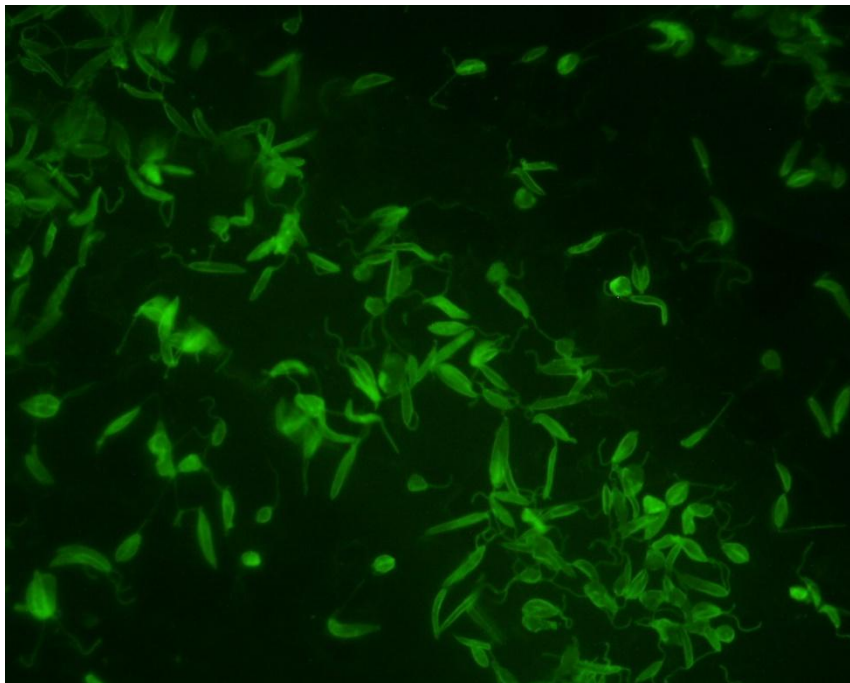


Tabela 22 - Caracterização da amostra em estudo e resultados da IFI (N=80).

Nº Amostra	Sexo	Idade [anos]	Raça	Aptidão	Local de habitação	Prevenção	Freguesia	Pelagem			Vive com cães com Leishmaniose ?	IFI		
								Comprimento	Cor	Tipo		1/20	1/40	1/80
1	Feminino	6	Retriever do Labrador	Companhia	Vive dentro de casa e vai à rua	Coleira impregnada com deltametrina	Mafra	Média	Bege	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
2	Masculino	3	IND	Companhia	Vive dentro de casa e vai à rua	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Azueira	Curta	Amarelo	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
3	Feminino	9	IND	Companhia	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Sem prevenção	Mafra	Curta	Creme e branca	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
4	Feminino	9	Boxer	Companhia	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Mafra	Curta	Castanha	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
5	Masculino	5	IND	Companhia	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Sem prevenção	Azueira	Média	Castanha e branca	Lisa	não	Positivo	Negativo	Não realizado
6	Masculino	9	IND	Guarda	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Coleira impregnada com deltametrina	Mafra	Comprida	Branco e Preto	Encaracolada	não	Negativo	Negativo	Não realizado
7	Masculino	6	IND	Guarda	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Coleira impregnada com deltametrina	Mafra	Média	Castanha	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
8	Masculino	4	IND	Guarda	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Coleira impregnada com deltametrina	Mafra	Comprida	Castanha	Encaracolada	não	Negativo	Negativo	Não realizado
9	Feminino	6	IND	Guarda	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Coleira impregnada com deltametrina	Mafra	Comprida	Castanha	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
10	Masculino	3	Retriever do Labrador	Companhia	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Mafra	Média	Amarelo	Lisa	não	Positivo	Negativo	Não realizado
11	Masculino	5	Retriever do Labrador	Companhia	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Mafra	Média	Preta	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
12	Masculino	9	Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Santo Isidoro	Média	Amarelo	Cerdosa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
13	Masculino	12	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Santo Isidoro	Média	Castanha	Cerdosa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
14	Masculino	7	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Santo Isidoro	Média	Castanha	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
15	Feminino	2	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Santo Isidoro	Média	Castanha e branca	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
16	Masculino	8	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Santo Isidoro	Média	Castanha	Lisa	não	Positivo	Negativo	Não realizado
17	Feminino	2	Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Santo Isidoro	Comprida	Castanha	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
18	Feminino	2	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Santo Isidoro	Média	Castanha	Lisa	não	Positivo	Negativo	Não realizado
19	Masculino	4	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Santo Isidoro	Média	Castanha e branca	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
20	Masculino	7	Cão de Pastor Alemão	Guarda	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Sem prevenção	Mafra	Média	Preta	Cerdosa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
21	Feminino	9	Cão de Pastor Alemão	Guarda	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Sem prevenção	Mafra	Média	Preta	Cerdosa	não	Negativo	Negativo	Não realizado

Soros positivos inicialmente testados por IFI apenas na diluição de 1/40

Soros secundariamente testados por IFI na diluição de 1/20

Tabela 22 - Caracterização da amostra em estudo e resultados da IFI (N=80) (continuação).

Nº Amostra	Sexo	Idade [anos]	Raça	Aptidão	Local de habitação	Prevenção	Freguesia	Pelagem			Vive com cães com Leishmaniose?	IFI		
								Comprimento	Cor	Tipo		1/20	1/40	1/80
22	Feminino	8	IND	Companhia	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Sem prevenção	Mafra	Média	Branco	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
23	Feminino	7	IND	Companhia	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Mafra	Comprida	Castanha	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
24	Feminino	2	IND	Companhia	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Carvoeira	Comprida	Branco e Preto	Cerdosa	não	Positivo	Positivo	Duvidoso
25	Masculino	2	IND	Companhia	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Carvoeira	Curta	Preta e castanha	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
26	Feminino	5	IND	Companhia	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Carvoeira	Comprida	Preta e castanha	Cerdosa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
27	Feminino	3	IND	Companhia	Vive no exterior e dorme recolhido no interior de um edifício	Sem prevenção	Azueira	Comprida	Preta	Encaracolada	não	Negativo	Negativo	Não realizado
28	Feminino	9	Yorkshire Terrier	Companhia	Vive dentro de casa e vai à rua	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Mafra	Comprida	Preta e castanha	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
29	Masculino	5	IND	Guarda	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Igreja Nova	Média	Bege	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
30	Feminino	2	Caniche	Companhia	Vive no exterior e dorme recolhido no interior de um edifício	Sem prevenção	Sobral da Abelheira	Comprida	Branca	Encaracolada	não	Negativo	Negativo	Não realizado
31	Feminino	11	IND	Companhia	Vive no exterior e dorme recolhido no interior de um edifício	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Mafra	Comprida	Preta	Encaracolada	não	Negativo	Negativo	Não realizado
32	Feminino	2	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Santo Isidoro	Comprida	Castanha	Encaracolada	não	Negativo	Negativo	Não realizado
33	Masculino	2	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Cheleiros	Curta	Preta	Cerdosa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
34	Masculino	12	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Santo Isidoro	Curta	Castanha	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
35	Masculino	2	Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Santo Isidoro	Curta	Amarela	Cerdosa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
36	Masculino	2	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Sem prevenção	Mafra	Média	Castanha	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
37	Feminino	2	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Sem prevenção	Mafra	Média	Castanha e branca	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
38	Masculino	2	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Sem prevenção	Mafra	Média	Preta	Cerdosa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
39	Feminino	4	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Sem prevenção	Mafra	Média	Branco e Preto	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
40	Feminino	3	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Sem prevenção	Mafra	Média	Castanha	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
41	Masculino	6	Teckel	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Sem prevenção	Mafra	Comprida	Castanha	Cerdosa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
42	Feminino	3	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Sem prevenção	Mafra	Média	Castanha	Cerdosa	não	Negativo	Negativo	Não realizado

Soros positivos inicialmente testados por IFI apenas na diluição de 1/40

Soros secundariamente testados por IFI na diluição de 1/20

Tabela 22 - Caracterização da amostra em estudo e resultados da IFI (N=80) (continuação).

Nº Amostra	Sexo	Idade [anos]	Raça	Aptidão	Local de habitação	Prevenção	Freguesia	Pelagem			Vive com cães com Leishmaniose?	IFI		
								Comprimento	Cor	Tipo		1/20	1/40	1/80
43	Masculino	3	Leão da Rodésia	Companhia	Vive dentro de casa e vai à rua	Coleira impregnada com deltametrina	Mafra	Curta	Castanha	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
44	Masculino	3	Retriever do Labrador	Companhia	Vive dentro de casa e vai à rua	Coleira impregnada com deltametrina	Mafra	Curta	Preta	Cerdosa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
45	Feminino	2	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Encarnação	Média	Castanha	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
46	Feminino	2	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Encarnação	Média	Bege	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
47	Masculino	2	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Encarnação	Média	Preta	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
48	Feminino	2	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Encarnação	Média	Preta	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
49	Masculino	2	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Encarnação	Média	Castanha	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
50	Feminino	3	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Encarnação	Média	Castanha e branca	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
51	Masculino	4	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Encarnação	Comprida	Branco e Preto	Cerdosa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
52	Feminino	2	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Encarnação	Média	Cinzentos e branca	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
53	Masculino	4	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Encarnação	Média	Castanha	Lisa	não	Negativo	Duvidoso	Negativo
54	Feminino	5	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Encarnação	Média	Branca	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
55	Feminino	2	Basset castanho da Bretanha	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Encarnação	Comprida	Castanha	Cerdosa	não	Negativo	Duvidoso	Negativo
56	Masculino	3	IND	Companhia	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Sobral da Abelheira	Média	Castanha	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
57	Masculino	4	IND	Companhia	Vive dentro de casa e vai à rua	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Mafra	Comprida	Cinzentos	Cerdosa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
58	Feminino	3	Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Sem prevenção	Mafra	Comprida	Castanha	Cerdosa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
59	Feminino	3	Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Sem prevenção	Mafra	Média	Branca e amarela	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
60	Feminino	6	Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Sem prevenção	Mafra	Média	Castanha	Lisa	não	Positivo	Negativo	Não realizado
61	Feminino	3	Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Sem prevenção	Mafra	Curta	Branca e amarela	Lisa	não	Positivo	Duvidoso	Negativo
62	Feminino	4	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Sem prevenção	Mafra	Média	Castanha	Lisa	não	Negativo	Duvidoso	Negativo
63	Feminino	3	Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Sem prevenção	Mafra	Comprida	Castanha	Encaracolada	não	Negativo	Negativo	Não realizado

Soros positivos inicialmente testados por IFI apenas na diluição de 1/40

Soros secundariamente testados por IFI na diluição de 1/20

Tabela 22 - Caracterização da amostra em estudo e resultados da IFI (N=80) (continuação).

Nº Amostra	Sexo	Idade [anos]	Raça	Aptidão	Local de habitação	Prevenção	Freguesia	Pelagem			Vive com cães com Leishmaniose?	IFI		
								Comprimento	Cor	Tipo		1/20	1/40	1/80
64	Masculino	2	Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Sem prevenção	Mafra	Média	Preta e castanha	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
65	Masculino	11	Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Sem prevenção	Mafra	Comprida	Castanha	Cerdosa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
66	Feminino	3	Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Sem prevenção	Mafra	Média	Castanha e branca	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
67	Feminino	5	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Sem prevenção	Mafra	Média	Castanha	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
68	Feminino	3	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Sem prevenção	Mafra	Média	Castanha	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
69	Feminino	5	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Sem prevenção	Mafra	Média	Branca	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
70	Masculino	11	Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Sem prevenção	Mafra	Comprida	Castanha	Cerdosa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
71	Feminino	3	Cruzamento Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Sem prevenção	Mafra	Curta	Cinzento	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
72	Feminino	7	Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Sem prevenção	Mafra	Comprida	Castanha	Cerdosa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
73	Feminino	3	Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Mafra	Média	Preta e castanha	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
74	Masculino	3	Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Mafra	Média	Branca e amarela	Cerdosa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
75	Feminino	4	Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Mafra	Média	Branca	Cerdosa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
76	Feminino	4	Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Mafra	Comprida	Castanha	Cerdosa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
77	Masculino	5	Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Mafra	Média	Preta	Cerdosa	não	Negativo	Duvidoso	Negativo
78	Masculino	4	Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Mafra	Média	Castanha	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
79	Feminino	4	Podengo Português	Caça	Vive no exterior e dorme num canil/casota	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Mafra	Média	Branca e preta	Lisa	não	Negativo	Negativo	Não realizado
80	Feminino	10	Epagneul Bretão	Companhia	Vive no exterior e dorme recolhido no interior de um edifício	Unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina	Mafra	Média	Branca e castanha	Lisa	não	Negativo	Duvidoso	Negativo

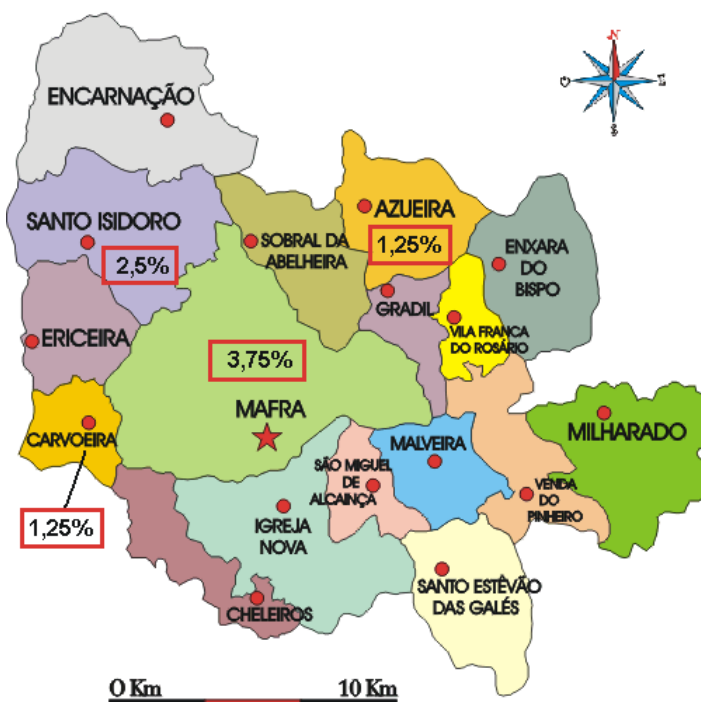
Soros positivos inicialmente testados por IFI apenas na diluição de 1/40

Soros secundariamente testados por IFI na diluição de 1/20

Figura 23 - Frequências relativas de cães positivos na técnica de IFI na diluição de 1/40 distribuídas pelas freguesias de origem (mapa adaptado de <http://www.fisicohomepage.hpg.ig.com.br/mfr.htm>)



Figura 24 - Frequências relativas de cães positivos na técnica de IFI na diluição de 1/20 distribuídas pelas freguesias de origem (mapa adaptado de <http://www.fisicohomepage.hpg.ig.com.br/mfr.htm>)



3.2. Resultados das análises hematológicas, bioquímicas e proteinograma

As análises hematológicas, bioquímicas e proteinograma apenas foram realizadas ao cão nº 24. Os resultados apresentam-se na seguinte tabela.

Tabela 25 - Resultados das análises hematológicas, bioquímicas e proteinograma do cão nº24.

Cão nº 24	Resultados	Valores referência	Unidades
IFI	1/20 e 1/40	Positivo \geq 1/20	
Leucograma			
Leucócitos	4,4 ↓	8,0-17,0	$10^3/\mu\text{L}$
Linfócitos	2,43	0,40-7,60	$10^3/\mu\text{L}$
MID	1,01	0,05-2,80	$10^3/\mu\text{L}$
Granulócitos	0,96 ↓	2,70-12,8	$10^3/\mu\text{L}$
Eritrograma			
Eritrócitos	7,09	5,50-8,50	$10^6/\mu\text{L}$
Hematócrito	44,6	37,0-55,0	%
VCM	63	60,0-70,0	fl
HCM	17,9 ↓	20,0-26,0	pg
CHCM	28,4 ↓	32,0-36,0	g/dl
Hemoglobina	12,7	11,0-18,0	g/dl
Plaquetas	53 ↓	200-500	$10^3/\mu\text{L}$
Parâmetros Renais			
Creatinina	0,6	<1,6	mg/dl
Parâmetros Hepáticos			
FAS	3	<330	U/L
AST	19	<83	U/L
ALT	39	<100	U/L
Proteinograma			
Albumina	3,8	2,26-4,31	g/dl
Alfa-1	0,3	0,32-0,75	g/dl
Alfa-2	0,8	0,50-1,17	g/dl
Beta	1	0,93-2,0	g/dl
Gama	0,8	0,39-1,02	g/dl
Ratio (A/G)	1,4 ↑	0,6-1,1	g/dl
Prot. Totais	6,6	5,5-7,5	g/dl

No hemograma verificou-se uma trombocitopenia marcada e leucopenia com diminuição dos granulócitos.

Os parâmetros bioquímicos não apresentaram qualquer alteração.

O proteinograma revelou aumento do rácio albumina/globulina.

3.3. Esfregaço de sangue

A observação do esfregaço de sangue foi negativa para a pesquisa de hemoparasitas.

3.4. Pesquisa da ADN de *L. infantum* por PCR

Apesar de inicialmente ter sido considerado o estudo de amostras cutâneas dos cães assintomáticos positivos, somente foi realizado num único animal e a PCR não revelou ADN de *L. infantum* nas amostras de pele do cão testado.

3.5. Teste do χ^2 para determinação da relação entre a aptidão de caça e a infecção assintomática por *L. infantum*

O valor do χ^2 para este factor foi de $1,45 < 3,84$ e o valor de P encontrado com base no *Fischer exact test* foi $0,23 > 0,05$ pelo que a relação entre a aptidão de caça e a infecção assintomática por *L. infantum* é devida ao acaso na amostra estudada. Não foi encontrada relação estatística entre a raça dos cães testados e a infecção assintomática por *L. infantum*.

4. Discussão

O número de cães infectados com *L. infantum* e assintomáticos é muito maior do que o número de cães portadores de infecções sintomáticas (Maia, 2005; Solano, 2008; Tafuri, 2009; López, 2007b; Ferrer, 2004; Matute *et al.*, 2007), sendo que os cães assintomáticos são infectantes para os flebótomos numa proporção similar aos sintomáticos (Molina *et al.*, 1994, Travi *et al.*, 2001, Courtenay *et al.*, 2002, citados por Manna *et al.*, 2006).

O presente trabalho teve como objectivo diagnosticar a infecção por *L. infantum* em cães assintomáticos da região de Mafra e chamar a atenção para a importância destes cães na transmissão de *L. infantum*. Até à data foram realizados poucos estudos acerca deste assunto (Moshfe *et al.*, 2009; Sideris *et al.*, 1999; Papadopoulou *et al.*, 2005), sendo este o primeiro a ser realizado na região de Mafra, Portugal.

Em Portugal a leishmaniose canina constitui uma razão muito frequente para a consulta veterinária. A prevalência necessária para uma zona ser considerada endémica é de 2.5% (Rioux *et al.*, 1971, citados por Cardoso, 2006). Assim, uma vez que Portugal tem uma seroprevalência de 6%, é considerado um país endémico de leishmaniose canina (Neves *et al.*, 2009). Segundo os resultados preliminares do estudo de Neves *et al.* (2009) – em que testou 4004 amostras através do teste de aglutinação directa (DAT) - dos dezoito distritos de Portugal, três - Castelo Branco, Portalegre e Beja- apresentaram seroprevalência entre 10 e 16%, sete - Vila Real, Bragança, Viseu, Guarda, Coimbra, Santarém e Lisboa- apresentaram seroprevalência entre 5 e 10% e os restantes distritos exibiram seroprevalência inferior a 5%. Castelo Branco possuiu a maior seroprevalência -16%- e Viana do castelo a menor, com 0,9%.

Mafra faz parte da área metropolitana de Lisboa (AML), que é considerada zona endémica de leishmaniose, logo a região de Mafra é igualmente considerada endémica. Não existem dados disponíveis acerca da seroprevalência desta doença em Mafra. Segundo Dr. Nuno

Palma, médico veterinário da CVM, existem muitos casos de leishmaniose canina na região de Mafra e o seu número tem vindo a aumentar.

A leishmaniose canina é uma doença de difícil tratamento. Os fármacos existentes raramente eliminam as leishmanias na totalidade, ocorrendo em regra recidivas. Ainda que o cão fique clinicamente curado permanece portador do parasita e deste modo infectante para o agente vector.

Muitos cães das áreas endémicas são portadores de infecções assintomáticas (Greene, 2006). Os cães infectados com *L. infantum* e assintomáticos têm a mesma capacidade infectante que os cães sintomáticos. É de suma importância proceder-se ao diagnóstico precoce pois quanto mais cedo os cães assintomáticos forem identificados menor disseminação da doença ocorrerá. Estes animais quando detectados deverão ser protegidos da picada do flebótomo de modo a interromper o ciclo de transmissão do parasita, não deverão ser utilizados como dadores de sangue (Freitas *et al.*, 2006) e com base em estudos recentes também não deverão ser utilizados como reprodutores. (Silva *et al.*, 2009) A identificação dos cães infectados assintomáticos é importante também em termos epidemiológicos, de modo a aferir a verdadeira prevalência da infecção do parasita nas várias áreas estudadas. A monitorização dos cães assintomáticos pode ser de relevância não só para avaliação epidemiológica da leishmaniose canina em áreas endémicas, como também para o controlo da infecção nas populações canina e humana através da monitorização dos cães dadores de sangue, e/ou de cães para importação para países não endémicos (Miró *et al.*, 2008). Caso ocorra a depressão do sistema imunitário do cão assintomático a doença poder-se-á manifestar.

O papel dos cães infectados com *L. infantum* e assintomáticos como reservatórios da infecção deve ser tido em conta como relevante e a percentagem destes animais em cada região deve ser conhecida de modo a serem implementadas medidas adequadas que visem a diminuição da transmissão deste parasita. Tanto os cães sintomáticos como os assintomáticos podem albergar *L. infantum* no seu sangue e pele (Moshfe *et al.*, 2009). A opinião no que respeita ao papel dos cães assintomáticos como fonte de infecção de *L. infantum* para humanos e outros animais mudou ao longo do tempo. Enquanto Lanotte *et al.* em 1979, citado por Moshfe *et al.* (2009) afirmam que os cães assintomáticos não representam um papel importante na transmissão da leishmaniose pois não possuem ou possuem capacidade diminuta de infectar os vectores, Molina *et al.* em 1994 citados por Manna *et al.* (2006) afirmam que os cães portadores assintomáticos têm a mesma capacidade de infectar os vectores que os cães sintomáticos e que a infecção latente contribui para a manutenção da presença do parasita nas regiões endémicas (Manna *et al.*, 2006). Moshfe *et al.* (2009) realizaram um estudo no qual tentaram aferir este papel recorrendo a inoculação de Syrian Golden Hamsters (*Mesocricetus auratus*) com exsudados de pele abdominal de cães infectados com *L. infantum* seronegativos e seropositivos. Este

estudo confirmou a alta prevalência de infecção com *Leishmania* nos cães assintomáticos nas áreas endémicas e mostrou que tanto os assintomáticos como os sintomáticos conseguem produzir infecção no Golden Hamster e que provavelmente têm um papel na transmissão de *L. infantum* nas áreas endémicas. Estas conclusões vêm mostrar que os cães infectados com *L. infantum* e assintomáticos são importantes na epidemiologia do parasita e que deverão ser feitos estudos no sentido de determinar a sua quantidade de modo a perceber em que escala influenciam a transmissão de *L. infantum*. Assim, o presente trabalho pretendeu iniciar este tipo de investigação em Portugal e o local escolhido para realizar este rastreio foi a região de Mafra, uma vez que a autora realizou o estágio curricular na CVM.

Na região de Mafra verifica-se que existem dois semestres distintos em termos de precipitação: o semestre húmido (entre Outubro e Março) e o semestre seco (entre Abril e Setembro). O período húmido predomina em relação ao período seco, que se limita aos meses de Verão, entre princípios de Junho e meados de Setembro.

Em Portugal, *P. ariasi* e *P. perniciosus* são os vectores de *L. infantum* (Alves-Pires *et al.*, 2001, citados por Cortes, Afonso, Alves-Pires & Campino, 2007). Cortes *et al.* (2007) estudaram 488 flebotomos recolhidos de áreas onde previamente tinham sido diagnosticados casos de leishmaniose canina e humana. A identificação dos vectores permitiu concluir que 80,33% da amostra pertencia à espécie *Phlebotomus perniciosus*, 19,06% à espécie *P. ariasi* e 0,61% a *P. sergenti* (Cortes *et al.*, 2007).

As espécies vectoras de leishmania são antropozofílicas, pois ainda que pareçam tender a alimentar-se com mais facilidade em gado e canídeos do que no Homem, na maioria das ocasiões parece tratar-se simplesmente de uma questão de acessibilidade e disponibilidade. Quando em presença de um humano e de um cão, o flebotomo parece preferir alimentar-se no cão (Matute *et al.*, 2007).

A actividade da maioria das fêmeas de flebotomos é crepuscular ou nocturna, conforme a espécie e época do ano (Afonso & Alves-Pires, 2008), apresentando uma actividade cicardiana clara (Mencke, Volf, Volfova & Stanneck, 2003). Porém, se houver intromissão do Homem, este tipo de actividade pode ser alterada (Afonso & Alves-Pires, 2008).

P. perniciosus tem preferência por paisagens acidentadas (Matute *et al.*, 2007), o que é o caso da região de Mafra. Os vectores de *L. infantum* são activos quando ocorrem temperaturas entre os 15 e 20 °C e na ausência de condições climáticas extremas como chuva e ventos fortes (Cardoso, 2006). Sabemos que a temperatura média anual da região de Mafra ronda os 15°C, sendo a temperatura média do mês mais quente (Agosto) de 20°C. A velocidade do vento é moderada, contudo na transição entre estações os ventos chegam a soprar com rajadas fortes. Assim, verificamos que a temperatura da região de Mafra é propícia à actividade flebotomínea na média dos meses do ano. Quanto ao vento, sabendo que as estações do ano mudam nos meses Março, Junho, Setembro e Dezembro, logo é

nestes meses que ocorrem rajadas fortes de vento, o que representa um impedimento à actividade dos flebótomos. Assim, tendo em conta que na região Mediterrânea os flebótomos são activos nos meses quentes, da Primavera até ao Outono (Greene, 2006) (Abril a Outubro) e que Outubro deverá ser descartado pois já é um mês em que ocorre precipitação relevante, poderia afirmar-se que os meses mais propícios à actividade dos flebótomos na região de Mafra seriam Abril, Maio, Julho e Agosto. Contudo, esta visão tornar-se-ia um pouco redutora e fechada, uma vez que cada vez mais as mudanças climáticas se manifestam num clima instável e a transição entre estações se faz de maneira abrupta e em desacordo com o calendário. Segundo um estudo realizado por Casimiro, Calheiros, Santos e Kovats (2006) em Portugal actualmente o risco de transmissão de *L. infantum* é médio. São previstas mudanças climáticas para todo o território nacional, com o aumento do número de dias com temperaturas favoráveis à actividade de *Phlebotomus perniciosus* – o flebótomo responsável pela maioria das infecções por *Leishmania infantum* em Portugal. Assim, é preconizado que o risco de transmissão de leishmaniose em Portugal irá tornar-se alto (Casimiro *et al.*, 2006). Deste modo, para se concluir acerca do período de actividade dos flebótomos deve-se ter em conta as suas preferências e analisar ano a ano, mês a mês de modo a concluir correctamente se se encontra num período de actividade flebotomínea ou não.

Como é do conhecimento geral existe em Mafra a Tapada Nacional de Mafra, onde abundam raposas e existe um núcleo do lobo Ibérico. Os canídeos selvagens (raposas, lobos e chacais) fazem parte do ciclo silvático da leishmaniose canina (Alvar, Cañavate, Molina, Moreno & Nieto, 2004, citados por Matute *et al.*, 2007). A raposa é considerada o elo de ligação entre o ciclo selvático e o doméstico pelos seus hábitos de aproximação às populações e assim actua como reservatório para os cães (Andrade *et al.*, 2002, citados por Matute *et al.*, 2007). Assim, seria interessante estudar a população de raposas (encontradas mortas ou capturadas) da região de Mafra de modo a aferir em que medida estas influenciam a leishmaniose canina na região de Mafra.

Das 17 freguesias que constituem o concelho de Mafra apenas oito estiveram representadas (Gráfico 19) e só foram encontrados cães positivos em quatro - Azueira, Mafra, Santo Isidoro e Carvoeira (Tabela 22, Figura 23 e Figura 24). As freguesias de Mafra não apresentam diferenças -climáticas, topográficas ou urbanísticas- relevantes entre elas, com a única excepção de Mafra que é de todas a mais urbanizada. Assim, não é possível encontrar uma explicação para a distribuição dos resultados.

A determinação dos factores de risco para um cão ser portador assintomático não estão descritos e o presente trabalho tentou chegar a conclusões quanto a este assunto. Face aos resultados obtidos não é possível concluir qual dos sexos representa um factor de risco para a infecção por *L. infantum* em cães assintomáticos, pois pela técnica de IFI na diluição de

1:40 só ocorreu um caso (Tabela 22) e na diluição de 1:20 a distribuição por sexo é equitativa (3/3) (Tabela 22).

A prevenção da picada do flebótomo interrompe o ciclo de transmissão de *Leishmania* e previne que ocorra infecção (Miró *et al.*, 2008). Quanto ao item da prevenção também não é possível chegar a uma conclusão pois da totalidade dos cães que revelaram positividade na técnica IFI na diluição de 1/20, três eram alvos de medidas de prevenção por parte dos seus proprietários, enquanto três não se encontravam protegidos contra a infecção por *L. infantum*. O cão positivo nº24 na técnica IFI na diluição de 1/40 era alvo de medidas de prevenção contra a infecção por *L. infantum* (Tabela 22). O facto de os proprietários tomarem medidas de prevenção contra a infecção por *L. infantum* e ainda assim os seus cães serem portadores de infecção assintomática pode ter várias explicações: dado o elevado número de cães que os caçadores possuem torna-se difícil suportar todas as despesas inerentes. Assim e tendo em conta que os caçadores querem os seus animais nas melhores condições de modo a desempenharem uma óptima performance na caça e também para tirarem dividendos das ninhadas provenientes dos seus cães, tentam realizar uma prevenção que considerem eficaz e económica. Da observação e troca de informações com os proprietários caçadores concluiu-se que é uma prática comum a compra de uma unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina numa fórmula para pesos mais elevados (cães com mais de 25 kg) e aplicação de apenas uma pequena quantidade de cada pipeta em cada um dos cães. Este método é falível e como tal os cães provavelmente não ficarão devidamente protegidos. Para além disto, da observação realizada neste estudo os proprietários de cães caçadores tendem a minimizar a quantidade de aplicações, não abrangendo a totalidade do período favorável à actividade dos flebótomos. A caça é praticada principalmente no início e final do dia, o que coincide com o período diário de actividade do flebótomo, assim os cães de caça estão mais expostos ao insecto vector.

Quanto aos cães positivos cuja aptidão é de companhia, as explicações relativas à ineficácia passam também por razões económicas, pois os proprietários podem não fazer as aplicações necessárias ao longo da época de actividade do flebótomo. Para além disto, em regra a aplicação da unção punctiforme faz-se de quatro em quatro semanas, contudo a actividade repelente contra *P. perniciosus*, é de apenas três semanas. Isto leva a um intervalo de uma semana em que o cão não se encontra protegido da picada de *P. perniciosus*. Existe ainda um outro aspecto a mencionar que ainda que não muito habitual pode ocorrer, pois caso o cão seja exposto frequentemente à água a duração da eficácia protectora pode diminuir (Bayer, 2010, acedido em <http://www.bayervet.com.pt/pt/popups/advantix.html>).

Existem estudos que relatam outras vias de transmissão do parasita que não são evitadas através das medidas de prevenção. Foi descrita transmissão vertical a partir de cadelas grávidas infectadas para os seus fetos através da placenta (Silva *et al.*, 2009). A

possibilidade de transmissão transplacentária de *Leishmania* foi confirmada por Rosypal e Lindsay (2005), citados por Magno da Silva *et al.* (2009) usando um modelo murino. Um estudo realizado por Magno da Silva *et al.* (2009) numa cadela infectada de modo natural comprovou a transmissão vertical de *L. infantum*, tendo sido confirmada a transmissão transplacentária. São necessários mais estudos para determinar a frequência com que ocorre este tipo de transmissão e qual o seu papel na epidemiologia da doença (Magno da Silva *et al.*, 2009).

A espécie *L. infantum* tem tropismo para o aparelho sexual masculino, particularmente para o epidídimo, prepúcio e glândula do pénis, resultando na inflamação destas estruturas e localização do parasita no sémen dos cães infectados de modo natural. Não foram observadas lesões no aparelho genital de cadelas com leishmaniose visceral. Assim, com base nestes factos e em resultados prévios, Silva *et al.* (2009) defendem que provavelmente a transmissão venérea de *L. infantum* é unidireccional, ocorrendo preferencialmente de machos infectados para fêmeas susceptíveis. É presumível que os promastigotas metacíclicos inoculados no hospedeiro mamífero através do flebótomo sejam mais infectantes do que os transmitidos sexualmente, uma vez que a saliva dos flebótomos contém diversos factores que favorecem a infecção (Silva *et al.*, 2009).

Teria sido interessante averiguar junto aos proprietários se os pais dos cães positivos na técnica de IFI eram doentes de leishmaniose e se os seus cães já tinham tido relações sexuais.

Freitas *et al.* (2006) demonstraram que *L. Infantum* pode ser transmitida por transfusão sanguínea, pois os amastigotas presentes nas células mononucleares são transmitidos para o animal receptor e conservam o seu potencial infectante. A transmissão de *L. infantum* através de transfusão sanguínea foi documentada em cães da América do Norte, incluindo um relato de transmissão através de sangue proveniente de um banco de sangue da Pennsylvania. A manifestação da doença adquirida por transfusão sanguínea depende, tal como na infecção natural, do estabelecimento de um equilíbrio entre o parasita e as defesas imunológicas e genética do hospedeiro (Freitas, Melo, Costa-Val & Michalick, 2006).

As medidas de prevenção adoptadas pelos proprietários dos cães positivos pela técnica de IFI neste estudo não previnem estes tipos de transmissão, o que também poderá explicar a positividade. Nenhum dos cães positivos na técnica de IFI tinham recebido transfusões sanguíneas, logo esta hipótese não deve ser considerada.

Ainda que os insecticidas aplicados pelos proprietários nos cães positivos na técnica de IFI também previnam contra pulgas e carraças, importa referir que estes parasitas também podem estar implicados na transmissão de *Leishmania* spp e assim, tendo em conta as limitações da aplicação do insecticida já referidas anteriormente, a hipótese de transmissão por pulgas ou carraças, embora remota deve ser tida em conta. Dantas-Torres *et al.* (2010) comprovaram a existência de ADN de *L. infantum* nas glândulas salivares de *Rhipicephalus*

sanguineus recolhidos de cães infectados com *L. infantum*. Contudo, tal não prova a sua capacidade vectorial e esta hipótese permanece em aberto, requerendo mais investigação (Paz et al., 2009). Ferreira et al. (2008) afirma que as pulgas podem actuar como vectores de *Leishmania* spp e que são capazes de infectar cães e hamsters com este parasita. Contudo, mais estudos são necessários para avaliar a importância das pulgas no ciclo de vida de *Leishmania* spp (Ferreira et al., 2008).

Um outro parâmetro avaliado como factor de risco foi o local de habitação. Todos os cães positivos na técnica de IFI tanto na diluição de 1:40 como na de 1:20 viviam no exterior e dormiam num canil/casota. Tal pode representar um factor de risco pois os animais só se recolhem ao interior da casota/canil quando querem e assim podem estar no exterior durante o período de actividade dos flebótomos, estando mais expostos à picada do flebótomo do que aqueles que vivem dentro de casa. Contudo, 87,5% (70/80) da amostra vivia no exterior e dormia num canil/casota e apenas 10% (7/70) destes revelou positividade (Tabela 22), o que nos deixa dúvidas quanto a considerar este tipo de local de habitação como factor de risco.

Tendo em conta que 65% (52/80) da amostra tem por aptidão a caça (Gráfico 17) pode-se considerar que a amostra está um pouco desviada para esta aptidão e ainda assim apenas 4 dos cães de caça (7,7% - 4/52) apresentaram positividade na diluição de 1:20, não apresentando positividade na diluição de 1:40 (Tabela 22). Tal pode ser explicado por os cães de caça aqui estudados serem de uma raça autóctone – Podengo Português – e de cruzamentos desta raça. Vários autores afirmam que as raças autóctones das zonas endémicas são mais resistentes a desenvolver os sintomas de leishmaniose canina pois convivem com o parasita há milhares de anos e como tal desenvolveram resistência ao desenvolvimento de sintomas (Papadopoulou et al., 2005; Ferrer, 2008). Foi demonstrado que a raça Podengo de Ibiza, uma raça local das ilhas Baleares, é mais resistente à doença e desenvolve uma imunidade do tipo celular (Ferrer, 2008). Por outro lado, tendo em conta que vivem no exterior e dormem em canis ou casotas, estes animais estão muito mais expostos à picada dos flebótomos do que os animais que vivem em interior de edifícios. O número alargado de cães infectados em áreas endémicas de leishmaniose canina sem apresentarem sinais clínicos pode estar relacionado com a sua grande exposição aos parasitas e ao desenvolvimento de imunidade protectora, especialmente em cães mais idosos (Moshfe et al., 2009).

Assim, pode ser exactamente a sua elevada exposição ao parasita e consequente desenvolvimento de imunidade protectora que explique o facto de os cães de caça não apresentarem valores altos de positividade à exposição por *L. infantum*. Devido ao número reduzido de animais positivos encontrados no presente estudo, o teste do χ^2 concluiu que a relação entre a aptidão de caça e a infecção assintomática por *L. infantum* se deve ao acaso, pois o valor de P não permite validar este teste. Ainda no âmbito dos resultados da

técnica de IFI é importante referir que nas áreas endémicas são encontrados baixos títulos de anticorpos devido à exposição contínua ao parasita.

As formas clínicas da leishmaniose canina podem ser classificadas como: infecção sintomática, em que existem sinais clínicos e laboratoriais de leishmaniose canina; infecção assintomática patente em que há sempre detecção do ADN do parasita nas amostras de gânglio linfático/medula óssea, títulos de IFI estáveis ou crescentes, cultura e análise microscópica de amostras de gânglio linfático/medula óssea positivas e ausência de sinais de leishmaniose canina; infecção sub-patente (Oliva, 2006), em que o animal é resistente à infecção ou resolve-a sem desenvolver sinais clínicos (Baneth & Aroch, 2008) em que a detecção do ADN do parasita nas amostras de gânglio linfático/medula óssea é inconstante e/ou os títulos de IFI são fracamente positivos, cultura e análise microscópica de amostras de gânglio linfático/medula óssea são negativas e há ausência de sinais clínicos de leishmaniose (Oliva, 2006).

O período de incubação da leishmaniose canina, em que os cães permanecem infectados com *L. infantum* sem apresentarem sinais de leishmaniose varia desde alguns meses até vários anos ou até toda a vida do animal (Moreno & Alvar, 2002, citados por Dantas-Torres, 2007; Maignac *et al.*, 2004; Greene, 2006), dependendo da virulência do parasita (Greene, 2006), da susceptibilidade genética do hospedeiro (Greene, 2006; Cardoso, 2006) e de vários factores exógenos, entre os quais infecção concomitante por outros agentes patogénicos (Cardoso, 2006). Após a inoculação do parasita podem ocorrer duas situações, ou o cão é susceptível à doença, torna-se sintomático e morre se não tratado ou é resistente ao parasita, sendo denominado de assintomático (Sideris, Papadopoulou, Dotsika & Karagouni, 1999). Os cães assintomáticos possuem uma infecção crónica por *L. infantum* e não exibem sinais aparentes de leishmaniose (Sideris *et al.*, 1999). Contudo são infecciosos para os flebótomos (Greene, 2006) e podem possuir parasitas cutâneos (Matute *et al.*, 2007). A infecção assintomática pode permanecer despercebida por um longo período de tempo (Greene, 2006), logo estes cães constituem um reservatório perigoso no que diz respeito à disseminação desta doença (Sideris *et al.*, 1999), representando um maior risco epidemiológico por serem difíceis de detectar (Matute *et al.*, 2007). Nem todos os cães natural ou experimentalmente infectados com *Leishmania* desenvolvem doença (Greene, 2006; Ferrer, 2008). Após a infecção alguns cães conseguem controlar o parasita e não desenvolvem doença durante anos ou até por toda a vida, enquanto que outros cães infectados apresentam doença progressiva (Moreno & Alvar, 2002, citados por Manna *et al.* (2006). Após a picada pelo flebótomo segue-se uma fase em que o cão está assintomático mas os seus níveis de anticorpos anti-leishmania sobem, contudo alguns cães permanecem seronegativos por períodos de tempo variáveis após terem sido infectados com *Leishmania* (Baneth & Aroch, 2008). Cães sintomáticos podem ser seronegativos no início de infecção (período pré-patente) devido a ainda não ter ocorrido produção de anticorpos específicos e

também no período final da doença por falência do sistema imunitário. A produção de anticorpos específicos pode também não conduzir a quantidade suficiente para ser detectada pelos métodos sorológicos (Maia, 2005). Considerando esta informação provavelmente o número de cães infectados por *L. infantum* na região de Mafra, ainda que não detectáveis por agora, pode ser muito mais elevado pois o parasita pode encontrar-se no organismo do animal e não haver resposta humoral ou esta não ser detectável.

A resposta imunitária elaborada pelos cães aquando da infecção parece ser o factor mais importante na determinação de qual o caminho que essa infecção vai seguir, isto é se se irá desenvolver doença ou se a infecção irá permanecer assintomática (Greene, 2006). A imunidade é um factor decisivo no desenvolvimento da leishmaniose canina. Cães infectados de modo natural são capazes de realizar uma resposta imunitária protectora (Sideris *et al.*, 1999). Os cães infectados aparentemente são caracterizados pela presença de uma resposta imunitária celular específica contra o parasita e resposta humoral leve (Solano, 2008) na qual apresentam seronegatividade ou fraca positividade (com títulos no limiar da positividade) (Ferrer, 2004). Cães infectados gravemente doentes possuem uma resposta humoral exagerada e resposta celular específica reduzida ou ausente (Solano, 2008).

O desenvolvimento da infecção depende da capacidade de os macrófagos destruírem o parasita. Esta actividade é determinada pelo equilíbrio entre um conjunto heterogéneo de citocinas. Os linfócitos T e as citocinas desempenham um papel crucial pois determinam se a infecção irá evoluir para um estado imunitário protector ou para uma doença declarada e progressiva (Pinelli *et al.*, 1994, Pinelli *et al.*, 1995, citados por Manna *et al.*, 2006).

A resolução da infecção por leishmania é dependente das células T e mediada por macrófagos activados pelas citocinas derivadas das células T (Liew & O'Donnell, 1993, citados por Chamizo, Moreno & Alvar, 2005).

Chamizo *et al.* (2005) afirmam que os cães infectados com *L. Infantum* assintomáticos produzem resposta Th1 e Th2, contudo existe uma predominância da resposta Th1 que confere imunidade contra o parasita. Atestam também que a resposta Th1 induz actividade leishmanicida macrofágica, o que protege os cães contra a progressão da infecção e desenvolvimento da doença (Chamizo *et al.*, 2005).

Estudos feitos acerca da resposta imunitária em cães experimentalmente infectados com *L. Infantum* mostraram que a imunidade protectora relaciona-se com a produção de IL-2, TNF- α (Chamizo *et al.*, 2005; Moreno & Alvar, 2002, citados por Manna *et al.*, 2006) e IFN- γ por parte das células mononucleares do sangue periférico (PMBC) conjuntamente com a activação de células T citotóxicas específicas para o parasita (Moreno & Alvar, 2002, citados por Manna *et al.*, 2006).

Para além disto a activação dos macrófagos pelo IFN- γ resulta na produção de óxido nítrico, o que medeia a morte dos parasitas intracelulares (Pinelli *et al.*, 1999; Gradoni & Ascenzi,

2004, citados por Manna *et al.*, 2006). O óxido nítrico parece estar envolvido na protecção a longo prazo contra a infecção por *L. Infantum* (Panaro *et al.*, 2008).

Deplazes *et al.* (1995), citados por Barbiéri (2006) afirmam que as subclasses de imunoglobulinas IgG1 e IgG2 têm sido consideradas como um indicador da progressão da leishmaniose canina mais fiável do que as IgG totais. Contudo, foi demonstrada uma relação directa entre os níveis de IgG1 e a presença de sinais clínicos, enquanto que a subclasse IgG2 é associada a infecção assintomática (Nieto *et al.*, 1999, citado por Barbiéri, 2006). Estes resultados não foram corroborados por outros estudos (Solano-Gallego *et al.*, 2000, Bourdoiseau *et al.*, 1997, citados por Barbiéri, 2006). Carcelén *et al.* (2007) afirmam que os anticorpos específicos presentes no sangue dos cães infectados são sobretudo da subclasse IgG2. Teria sido interessante quantificar as IgG1 e IgG2 nos cães positivos, contudo por condicionantes económicas tal não foi possível.

A escolha da técnica para realizar o rastreio de *L. infantum* na região de Mafra recaiu sobre a IFI, sendo a identificação dos cães assintomáticos uma tarefa complexa. Otranto *et al.* (2009) realizaram um estudo cujo objectivo foi o de obter um plano de diagnóstico de infecção por *L. infantum* em cães assintomáticos, tendo concluído que não existe um teste *gold standart* para este diagnóstico, devendo ser executados outros em simultâneo. Os cães infectados por *L. infantum*, especialmente os assintomáticos podem não seroconverter imediatamente após a infecção ou desenvolver uma resposta imunitária celular, o que pode conduzir a resultados falso-negativos nos testes serológicos. Assim, estes testes não são os mais indicados para o diagnóstico de cães expostos ou recentemente infectados. Otranto *et al.* (2009) afirmam que a PCR é o método mais sensível para a detecção do cão à exposição do cão à picada do flebótomo e/ou infecção pois uma amostra tecidual positiva no PCR determina que esse cão foi exposto ao parasita. Esta técnica oferece maior sensibilidade quando se utilizam biópsias de medula óssea e gânglio linfático, com resultados entre 86 e 100%, já nas biópsias de pele a sensibilidade pode variar entre 80 e 95%. A pele é claramente uma fonte segura de ADN de *Leishmania* e a biópsia de um pequeno fragmento de pele é um procedimento simples e seguro (Quaresma *et al.*, 2009). Manna *et al.* (2004), citados por Quaresma *et al.* (2009) afirmam que a pele canina, independentemente da presença de lesões cutâneas, permite uma detecção mais eficiente de ADN de *Leishmania* por PCR do que qualquer outro tecido. No sangue periférico alguns autores obtiveram uma sensibilidade de 93-100%, contudo em outros estudos a sensibilidade da técnica mostrou ser menor (Riquelme *et al.*, 2007). A duração, constância e intensidade da parasitemia no cão estão ainda por saber, o que conduz a falsos negativos, especialmente em cães assintomáticos. Assim, um único resultado PCR negativo em um cão clinicamente suspeito não é suficiente para descartar a hipótese de infecção. Por outro lado, durante a época de transmissão podem ocorrer falsos positivos devido a contaminação natural ou infecção transitória. (Maia & Campino, 2008). Neste trabalho optou-se por fazer

PCR em amostras de pele, obtidas apenas por raspagem cutânea, pois o proprietário não consentiu a recolha de material de medula óssea e gânglio linfático. Seria interessante avaliar os resultados de PCR se tivesse sido possível utilizar outros tipos de amostra.

Manna *et al.* (2006) realizaram um estudo onde procuraram relacionar a quantidade de ADN de *Leishmania* e os níveis de expressão de citoquinas em amostras de tecidos de cães assintomáticos com o estado clínico e a evolução da doença. Os cães assintomáticos em progressão para doença possuíam uma carga elevada de ADN de leishmania nas biópsias de pele na ocasião do diagnóstico. Contudo, com o surgimento dos sinais clínicos a carga de ADN do parasita na pele diminuiu, enquanto que a nível do gânglio linfático aumentou dramaticamente. No grupo de cães que permaneceu sem sintomas durante o período do estudo, na primeira observação foi detectado um número elevado de parasitas nas biópsias de pele e nos gânglios linfáticos. Mais tarde, a carga de ADN parasitário diminuiu em todas as amostras. Contudo, 6 meses após a primeira observação a carga parasitária ainda era significativa na pele e aumentava nos gânglios linfáticos, ainda que em menor ritmo. Os autores afirmam que os seus resultados apontam para que no cão a pele representa um reservatório de amastigotas quando o hospedeiro é imunocompetente e existe um equilíbrio entre o parasita e o hospedeiro.

A carga parasitária elevada detectada na pele do grupo de cães assintomáticos que permaneceram sem sintomas durante um longo período de tempo realça a sua importância como hospedeiros reservatórios (Manna *et al.*, 2006). Os resultados obtidos neste estudo indicam que a quantificação dos parasitas na pele é um recurso fiável para o diagnóstico de leishmaniose canina em cães infectados e assintomáticos enquanto que a quantificação de ADN de leishmania nos gânglios linfáticos é necessária para a previsão da evolução da doença. A quantificação do ADN do sangue de cães infectados assintomáticos não parece ser útil para a gestão clínica da infecção. Assim, o estudo de Manna *et al.* (2006) suporta a escolha da autora de amostra de pele para a realização de PCR.

Os cães infectados com *L. infantum* possuem um elevado parasitismo cutâneo por formas amastigotas de *Leishmania*, aumentando a possibilidade de transmissão (Ashford, 1996; Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006, citados por Dantas-Torres, 2007). Guarga *et al.* (2000) citados por Moshfe *et al.* (2009) afirmam que a pele saudável dos cães infectados é mais atractiva para os flebótomos. Assim, à medida que a doença progride e a pele se deteriora o flebótomo fêmea vai-se sentindo menos atraído por essa mesma pele. Este comportamento do flebótomo fêmea justifica o facto de os animais assintomáticos representarem um risco de infecção nas áreas endémicas (Moshfe *et al.*, 2009).

Em um estudo realizado por Quaresma *et al.* (2009), a análise do desempenho da PCR com amostras de cães sintomáticos e assintomáticos mostrou que este é um método confiável para a detecção de ADN de *Leishmania*, independentemente de o animal possuir ou não sinais clínicos e sintomas. Por outro lado os métodos serológicos e parasitológicos fornecem

maior número de resultados positivos para amostras de cães sintomáticos do que para cães assintomáticos. Assim, a PCR é um método mais eficaz para o diagnóstico de infecção por *L. infantum* canina pois não possui as limitações associadas aos métodos diagnósticos convencionais, especialmente em casos em que a infecção não é aparente. O estudo de Quaresma *et al.* (2009) mostrou que a PCR é capaz de detectar infecção mesmo quando os testes convencionais falharam. No caso do presente estudo isto não se verificou pois a infecção detectada pela técnica de IFI não foi detectada pela PCR. A maior preocupação no controlo da leishmaniose canina é a presença de animais assintomáticos que aparentam ser negativos com base nos exames serológicos. O uso da PCR juntamente com outros métodos de diagnóstico auxilia a determinar a extensão de infecção sub-clínica em áreas endémicas e fornece um número mais preciso da quantidade de cães assintomáticos (Quaresma *et al.*, 2009).

Assim, o ideal teria sido testar todos os cães do nosso estudo através de PCR, contudo devido a contingências económicas tal não foi possível, tendo-se optado pela técnica de IFI em títulos baixos, de modo a diagnosticar o maior número de animais possível.

Quanto aos resultados obtidos pela técnica de IFI, Faria (2007), no seu estudo realizado em 78 cães no Município de Vila Franca de Xira onde utilizou também a técnica de IFI considerando como limiar de positividade a diluição de 1/80, concluiu que 19,23% (15/78) da sua amostra era clinicamente assintomática mas positiva nesta técnica. Os cães que não apresentam sintomas e albergam parasitas cutâneos são os que implicam um maior risco epidemiológico. Estes são assim os autênticos portadores (Matute *et al.*, 2007). Estudos serológicos realizados em regiões endémicas da Europa revelam que 50 a 60% de todos os cães são positivos mas assintomáticos, dos quais 20% possuem leishmanias na pele (Matute *et al.*, 2007). Os resultados obtidos no presente estudo (8,75% - 7/80 - dos cães testados pela técnica de IFI possuíam anticorpos anti-leishmania) são muito inferiores aos supra-citados. Tal pode ter como várias explicações: o facto de a amostra ser constituída em 25% (20/80) por cães de uma raça autóctone e 37,5% (30/80) por cães resultantes de cruzamento de uma raça autóctone e como tal mais resistente à infecção por *L. infantum*; 87,5% (70/80) dos cães estudados vive no exterior e dorme num canil/casota e como tal está mais exposto à picada do flebótomo e assim desenvolve imunidade protectora, por fim a prevenção era realizada em 63,8% (51/80) dos cães da amostra (55% - 44/80 - dos cães utilizavam unção punctiforme à base de imidaclopride e permetrina e 8,8% - 7/80- utilizavam coleira impregnada com deltametrina) (Gráfico 20) diminuindo assim a possibilidade de infecção por *L. infantum*.

Após determinação dos animais positivos, foi efectuada PCR em amostra de pele do cão positivo na IFI na diluição de 1/40. Teria sido interessante também testar através de PCR cães positivos na técnica de IFI na diluição de 1/20, contudo os proprietários não se mostraram disponíveis.

Apesar do desenho experimental deste trabalho incluir a realização de análises hematológicas e bioquímicas aos animais positivos, apenas foi possível realiza-las em um único animal (cão nº24). Mais uma vez não foi possível fazê-lo para os cães positivos na técnica de IFI na diluição de 1/20 devido à falta de colaboração por parte dos proprietários. O hemograma revelou trombocitopénia e leucopénia. A trombocitopénia é um achado constante nas parasitoses transmitidas por ixodídeos, contudo no esfregaço de sangue efectuado não foram observados estes parasitas. Uma vez que o animal em causa apresentava títulos de 1/20 e 1/40 e era duvidoso no título de 1/80 e apresentava achados hematológicos compatíveis com leishmaniose canina, talvez este cão estivesse a progredir para infecção por *L. infantum* sintomática. Ainda assim, as suas análises renais e hepáticas revelaram-se normais, o que seria esperado para um cão assintomático ou para um cão no início de infecção sintomática. Também importa referir que as técnicas laboratoriais mais sensíveis para detectar parasitas como *Ehrlichia*, *Babesia* ou *Anaplasma* são a IFI e a PCR. Neste trabalho, por condicionantes económicas, apenas foi possível utilizar a observação de esfregaços, que é uma técnica pouco sensível em situações crónicas ou iniciais. Quanto ao proteinograma do cão nº24, revelou aumento do rácio albumina/globulina, que pode ser explicado por ingestão insuficiente de colostro ou produção insuficiente de imunoglobulinas. Seria útil fazer o seguimento deste animal de modo a avaliar a sua evolução. O facto de não existir ADN de *L. infantum* na amostra de pele do cão positivo nº24 na técnica de IFI na diluição de 1:40 e duvidoso na diluição de 1:80 pode dever-se ao facto de os locais onde se efectuou a raspagem cutânea- pescoço, tórax e membro anterior direito não serem os locais preferenciais de picada dos flebótomos. Para além disto, apesar de a amostra ter sido negativa podem existir leishmanias num outro local da pele onde não foi pesquisada a sua presença, assim como nos órgãos internos. O facto de de ter sido realizada PCR em amostra de apenas um animal é insuficiente para poder chegar a conclusões quanto a este item, pelo que teria sido útil fazê-lo também para os outros cães que revelaram positividade na técnica de IFI, mais uma vez tal não foi efectuado por recusa por parte dos proprietários. Nem os testes serológicos nem os moleculares podem prever se o cão irá permanecer assintomático a longo prazo, se o cão irá eliminar a infecção ou se a infecção irá progredir para doença (Otranto *et al.*, 2009). Assim, seria importante fazer o seguimento dos cães que revelaram positividade na técnica de IFI, repetindo a PCR e a técnica de IFI nas diluições de 1/40 e 1/80 dentro de 1,5 a 2 meses, de modo a averiguar simultaneamente a presença de leishmanias e a variação dos títulos de anticorpos. Contudo, uma vez que o presente estudo foi realizado com animais de estimação e não experimentais, está sujeito às condicionantes inerentes. Os proprietários desinteressam-se, vendem os animais, receiam que os procedimentos prejudiquem os seus cães e como tal evitam a repetição de recolha de amostras.

As medidas que deveriam ser tomadas por parte dos proprietários dos cães infectados com *L. infantum* e assintomáticos são todas aquelas que visem o impedimento do contacto com o flebótomo. A prevenção da picada do flebótomo interrompe o ciclo de transmissão de *Leishmania* spp e previne que ocorra infecção (Miró *et al.*, 2008). Para tal deve-se recorrer a diversas medidas: controlo intra-domiciliário através de utilização de redes convencionais protectoras (com 0,3 a 0,4 mm² de área da quadrícula da malha) ou tratadas com piretróides sintéticos residuais (Esteban, Matute, Torres & Moreno, 2007; Miró *et al.*, 2008) nas janelas, portas e canis (Esteban *et al.*, 2007); resguardar o cão dentro de casa na época de actividade do flebótomo desde o crepúsculo até ao amanhecer (Solano-Gallego *et al.*, 2009); utilizar insecticidas nos canis e ao seu redor (Greene, 2006); reduzir os micro-habitats favoráveis aos flebótomos nas imediações da casa ou nos locais onde o cão passa o seu tempo (Solano-Gallego *et al.*, 2009); aplicação tópica de insecticidas no cão de modo a reduzir as picadas dos flebótomos (Solano, 2008). Para este efeito pode-se recorrer a diversos métodos, como coleiras impregnadas de deltametrina, pulverizações e unções punctiformes à base de imidoclopride e permetrina (Greene, 2006). Através deste recurso é conseguido um duplo efeito, por um lado, um repelente através do qual se interrompe a transmissão do parasita pois o flebótomo não chega a ingerir sangue; por outro, o insecticida mata o flebótomo que se tenha alimentado ou pousado no cão (Solano, 2008). Os insecticidas mais utilizados actualmente são os piretróides pois são eficazes contra os flebótomos e pouco tóxicos para o cão (Miró *et al.*, 2008). Cardoso (2006) afirma que o uso de insecticidas é a medida mais eficaz para prevenir a infecção em cães.

Em zonas endémicas para além das medidas de prevenção acima citadas deveria proceder-se à imunoprofilaxia. A vacinação contra a leishmaniose canina previne a doença nos cães e constitui a principal estratégia para diminuir a ameaça de infecção para os humanos (Miró *et al.*, 2008). Este assunto é alvo de pesquisa há já décadas (Miró *et al.*, 2008), contudo ainda não foi encontrada a vacina ideal para esta doença. No Brasil existe já uma vacina comercializada - Leishmune[®], com uma eficácia de 80% (Borja-Cabrera *et al.*, 2002, citados por Miró *et al.*, 2008), contudo a distinção entre os animais vacinados e os animais naturalmente infectados é difícil, pelo que alguns veterinários do Brasil hesitam em vacinar os seus pacientes, uma vez que nesse país os cães seropositivos são sacrificados (Dantas-Torres & Brandao-Filho, 2006, citados por Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Uma outra vacina foi estudada em França, que mostrou boa protecção contra infecção experimental com *L. infantum* (Lemesre *et al.*, 2005, citados por Solano-Gallego *et al.*, 2009). Neste momento uma empresa farmacêutica espera a autorização para a comercialização em Portugal de uma vacina contra a *L. infantum* (Madureira, P., comunicação pessoal, Maio 20, 2010).

5. Conclusão

Mafra é considerada uma zona endémica em leishmaniose canina. Contudo segundo este estudo a frequência relativa de cães infectados com *L. infantum* e assintomáticos é baixa (8,75% - 7/80).

Trabalhos como o presente são importantes pois o conhecimento do número de cães assintomáticos chama a atenção para a existência destes animais, para o seu papel na transmissão de *L. infantum* e para a importância do controlo desta infecção tanto pela prevenção da picada do flebótomo como pela imunoprofilaxia.

Determinar a seroprevalência da leishmaniose canina na região de Mafra seria um trabalho útil de modo a melhor enquadrar os resultados obtidos no presente trabalho, bem como averiguar a importância das raposas existentes na Tapada Nacional de Mafra na transmissão de *L. infantum* na região de Mafra. Seria ainda importante realizar mais trabalhos para determinar a quantidade de cães infectados com *L. infantum* e assintomáticos em outras regiões de Portugal.

Todo o trabalho realizado no âmbito da leishmaniose canina só faz sentido se as conclusões se fizerem chegar aos proprietários, serviços oficiais, órgãos de comunicação social e médicos veterinários. Os proprietários deverão ser informados de forma simples e aplicável no dia-a-dia. São eles a chave para o controlo desta doença pois se se envolverem na prevenção com certeza o número de infecções por *L. infantum* irá diminuir significativamente.

Bibliografia

- Afonso, M. & Alves-Pires, C. (2008). Capítulo II: Bioecologia dos vectores. In Santos-Gomes, G.M., Fonseca, I.M.P. (Eds.). *Leishmaniose Canina*. (pp. 27-40). Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A.
- Altamirano-Enciso, A.J., Marzochi, M.C.A.; Moreira, J.S.; Schubach, A.O. & Marzochi, K.B.F. (2003). Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. *História, Ciências, Saúde - Manguinhos*, 10, 853-82.
- Baneth, G. & Aroch, I. (2008). Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *The Veterinary Journal*, 175, 14-15.
- Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P. & Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, vol. 24, no. 7, 324-330.
- Barbiéri, C.L. (2006). Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 28, 329-337.
- Barrientos, M.M., Góngora, C.E., Torres, C.M. & Miró, G. (2007). Tratamiento. *Canis et Felis*, 89, 72-87. (gentilmente cedida por Prof. Dra. Guadalupe Miró Corrales)
- Bayer (2010). Advantix®. Acedido em Maio 21, 2010, disponível em: <http://www.bayervet.com.pt/pt/popups/advantix.html>.
- Botelho, L.S. (1986). *Moderna enciclopédia universal – volume 11*. (1ª edição). (pp.256). Lisboa: Círculo de Leitores, Lda.
- Câmara Municipal de Mafra (2007). Plano Municipal de Defesa da Floresta Contra Incêndios. Acedido em Maio 22, 2010, disponível em: http://www.cm-mafra.pt/proteccao/pdf/caderno_2-PMDFCI.pdf
- Câmara Municipal de Mafra (2010). Carta Educativa do Concelho de Mafra: Capítulo 4, Projecções Demográficas. Acedido em Maio 22, 2010, disponível em: http://www.cm-mafra.pt/educacao/pdf/carta/projeccoes_crescimento.pdf
- Campillo, M.C., Vazquez, F.A.R., Fernandez, A.R.M., Acedo, M.C.S., Rodriguez, S.H., Lopez-Cozar, I.N., Baños, P.D., Romero H.Q. & Varela, M.C. (1999). *Parasitología veterinaria*. (1ª edição). (pp.651-665). Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- Carcelén, J., Iniesta, V., Fernández-Cotrina, J., Corraliza, I., Monroy, I., Baz, V., Gómez-Blázquez, M., Viñuelas, J., & Nieto, L.C.G. (2007). Patogenia e imunopatología. *Canis et Felis*, 89, 20-36. (gentilmente cedida pela Prof. Dra. Guadalupe Miró Corrales)
- Cardoso, L. (2006). Current knowledge on the parasitology and prevention of canine leishmaniosis. In proceedings of the Bayer Pre-Congress Symposium ESVD/ECVD 2006, Lisbon, Portugal. pp. 6-14.
- Cardoso, L. & Mendão, C. (2009). Inquérito sobre a leishmaniose canina em Portugal – resultados preliminares. *Veterinary Medicine – Edição Portuguesa*, vol.11, no. 62, 57–62.

- Casimiro, E., Calheiros, J., Santos, F.D. & Kovats, S. (2006). National assessment of human health effects of climate change in Portugal: approach and key findings. *Environmental Health Perspectives*, vol. 114, no. 12, 1950-1956.
- Chamizo, C., Moreno, J. & Alvar, J. (2005). Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 103, 67-75.
- Cortes, S., Afonso, M.O., Alves-Pires, C. & Campino, L. (2007). Stray dogs and leishmaniasis in urban areas, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 13, no. 9, 1431-1432.
- Dantas-Torres, F. (2007). The role of dogs as reservoirs of leishmania parasites, with emphasis on leishmania (leishmania) infantum and leishmania (viannia) braziliensis. *Veterinary Parasitology*, 149, 139-146.
- Dantas-Torres, F., Lorusso, V., Testini, G., Paiva-Cavalcanti, M., Figueiredo, L.A., Stanneck, D., Mencke, N., Brandão-Filho, S.P., Alves, L.C. & Otranto, D. (2010). Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. *Parasitology Research*, 106, 857-860.
- Esteban, R.G., Matute, A.M., Torres, C.M. & Moreno, R.M. (2007). *Control. Canis et Felis*, 89, 100-111. (gentilmente cedida pela Prof. Dra. Guadalupe Miró Corrales)
- Ettinger, S.J. & Feldman, E.C. (1997). *Tratado de medicina interna veterinária: moléstias do cão e do gato. (1ª edição)*. (pp.565-567). São Paulo: Editora Manole Ltda.
- Faria, T.C.P. (2007). Estudo zero-epidemiológico da infecção por leishmania spp. em cães e gatos do município de Vila Franca de Xira (Ribatejo, Portugal) utilizando o teste de imunofluorescência indirecta. *Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária*. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Ferreira, M.G.P.A., Fattori, K.R., Souza, F. & Lima, V.M.F. (2008). Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. *Veterinary Parasitology*, doi: 10.1016/j.vetpar.2009.06.026.
- Ferrer, L. (2004). Canine leishmaniosis: immunodeficiency and co-infections. In *Proceedings of the 14th ECVIM-CA Congress*, Barcelona, Espanha. Acedido em Fev. 2, 2010, disponível em: www.vin.com.
- Ferrer, L. (2008). Leishmaniosis canina (CANL): entender la epidemiología para comprender los nuevos métodos de diagnóstico. In *17º Congresso Nacional da Associação Portuguesa de Médicos Veterinários Especialistas em Animais de Companhia*, Estoril, Portugal.
- Foster, A. & Foil, C. (2003). *BSAVA manual of small animal dermatology. (2nd edition)*. (pp.187-188). England: BSAVA - British Small Animal Veterinary Association.
- Freitas, E., Melo, M.N., Costa-Val, A.P. & Michalick, M.S.M. (2006). Transmission of leishmania infantum via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology*, 137, 159–167.
- Gómez-Ochoa, P., Castillo, J.A., Gascón, M., Zarate, J.J., Alvarez, F. & Couto, C.G. (2009). Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: A clinical trial. *The Veterinary Journal*, 179, 259–263.

- Greene, C.E. (2006). Infectious diseases of the dog and cat. (3th edition). (pp.685-698). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Hervás, J., Chacón-M De Lara, F., Sánchez-Isarria, M.A., Pellicer, S., Carrasco, L., Castillo, J.A. & Gómez-Villamandos, J.C. (1999). Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniosis in Spain. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 1, 101-105.
- Lachaud, L., Marchergui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J.P., Bastien, P. (2002). Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 40:210-5.
- Lobsiger, L., Müller, N., Schweizer, T., Frey, C.F., Wiederkehr, D., Zumkehr, B. & Gottstein, B. (2010). An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. *Veterinary Parasitology*, 169, 408-414.
- López, X.R. (2007a). Como trato: leishmaniosis. In Proceedings of the SEVC-AVEPA Conference, Barcelona, Espanha. Acedido em Fev. 1, 2010, disponível em: www.vin.com.
- López, X.R. (2007b). Diagnóstico de leishmaniosis. In Proceedings of the SEVC-AVEPA Conference, Barcelona, Espanha. Acedido em Fev. 1, 2010, disponível em: www.vin.com.
- Magno da Silva, S., Ribeiro, V.M., Ribeiro, R.R., Tafuri, W.L., Melo, M.N. & Michalick, M.S.M. (2009). First report of vertical transmission of leishmania (*leishmania*) *infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 166, 159–162.
- Maia, C.A.S. (2005). Diagnóstico laboratorial da leishmaniose canina. *Veterinária Técnica*, 2, 34-37.
- Maia, C. & Campino, C. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 158, 274–287.
- Manna, L., Reale, S., Viola, E., Vitale, F., Manzillo, V.F., Michele, P.L., Caracappa, S. & Gravino, A.E. (2006). Leishmania DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology*, 142, 271-280.
- Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Picillo, E., Neglia, G., Vescio, F. & Gravino, A.E. (2009). Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. *The Veterinary Journal*, 182, 441–445.
- Marignac, G., Fall, G., Prina, E., Lebastard, M., Milon, G. & Nicolas, L. (2004). Cutaneous asymptomatic carriage of leishmania. *Veterinary Dermatology*, 15, 1-19.
- Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O. & Morillas-Márquez, F. (2007). Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. *Veterinary Parasitology*, 145, 267-273.
- Matute, A.M., Esteban, R.G., Barrientos, M.M. & Moreno, R.M. (2007). Etiología, biología y epidemiología. *Canis et Felis*, 89, 6-18. (gentilmente cedida pela Prof. Dra. Guadalupe Miró Corrales)
- Meireles, J. (2008). Capítulo VII: Terapêutica e profilaxia da leishmaniose canina. In Santos-Gomes, G.M., Fonseca, I. M.P. (Eds.). *Leishmaniose canina*. (pp. 93-99) Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A.

- Mencke, N., Volf, P., Volfova, V. & Stanneck, D. (2003). Repellent efficacy of a combination containing imidacloprid and permethrin against sand flies (*phlebotomus papatasi*) on dogs. *Parasitol Research*, 90, S108–S111.
- Mettler, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, H. & Deplazes, P. (2005). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *leishmania* infections in dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 5515–5519.
- Miranda, S., Roura, X., Picado, A., Ferrer, L. & Ramis A. (2008). Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. *Veterinary Science*, 85, 35–38.
- Miró, G. (2007). Leishmaniosis canina : situation actual en Europa, diagnóstico y contro. *Acta Scientiae Veterinariae*, 35, 227-229.
- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Oliva, G. & Baneth, G. (2008). Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology*, vol.24, no.8, 371-377.
- Moshfe, A., Mohebbali, M., Edrissian, G., Zarei, Z., Akhoundi, B., Kazemi, B., Jamshidi, S. & Mahmoodi, M. (2009). Canine visceral leishmaniasis: asymptomatic infected dogs as a source of *L. infantum* infection. *Acta Tropica*, 112, 101-105.
- Nelson, R.W & Couto, C.G. (2006). Manual de medicina interna de pequenos animais. (2ª edição). (pp.1032-1033). Rio de Janeiro: Elsevier.
- Neves, R., Cardoso, L., Afonso, M.O. & Campino, L. (2007). Leishmaniose canina em Portugal Continental – o que sabem os proprietários de cães acerca desta zoonose parasitária. Acedido em Abr. 1, 2010, disponível em: http://www.fmv.utl.pt/spcv/pdf/pdf12_2007/377-396.pdf
- Neves, R., Cardoso, L., Campino, L., Maia, C., Marques, M, Cristóvão, J., Ramada, J. & Cortes, S. (2009). “A semana da leishmaniose” – resultados preliminares, ONLeish – Observatório Nacional das Leishmanioses. (gentilmente cedida por Dr. Rodolfo Dias Neves)
- Noli, C. & Auxilia, S.T. (2005). Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Veterinary Dermatology*, 16, 213–232.
- Ocanã, C.F., Nogueira, C.R., Rodríguez, P.S. & Miró, G. (2007). Cuadro clínico. *Canis et Felis*, 89, 40-50. (gentilmente cedida pela Prof. Dra. Guadalupe Miró Corrales)
- Oliva, G. (2006). Canine leishmaniosis: Up to date. In proceedings of the Bayer Pre-Congress Symposium ESVD/ECVD 2006, Lisbon, Portugal. pp. 2-5.
- Otranto, D., Paradies, P., Caprari, D., Stanneck, D., Testini, G., Grimm, F., Deplazes, P. & Capelli, G. (2009). Toward diagnosing leishmania infantum infection in asymptomatic dogs in an area where leishmaniasis is endemic. *Clinical and Vaccine Immunology*, vol.16, no.3, 337-343.
- Panaro, M.A., Brandonisio, O., Caprari, D., Cavallo, P., Cianciulli, A., Mitolo, V. & Otranto, D. (2008). Canine leishmaniasis in Southern Italy: a role for nitric oxide released from activated macrophages in asymptomatic infection? *Parasites & Vectors* 2008, 1-10.

- Papadopoulou, C., Kostoula, A., Dimitriou, D., Panagiou, A., Bobojianni, C. & Antoniadis, G. (2005). Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece. *Journal of Infection*, 50, 53-60.
- Paz, G.F., Ribeiro, M.F.B., Michalsky, E.M., Lima, A.C.V.M.R., França-Silva, J.C., Barata, R.A., Fortes-Dias, C.L. & Dias, E.S. (2009). Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus Sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. *Parasitology Research*, 106, 523-528.
- Pennisi, M.G. (2002). A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. In *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum*, Sevilla, Spain.
- Pereira, M.A. (2008). Capítulo III: Epidemiologia da leishmaniose canina. In Santos-Gomes, G.M., Fonseca, I.M.P. (Eds). *Leishmaniose canina*. (pp. 41-51). Lisboa: Chaves Ferreira –Publicações, S.A.
- Pereira da Fonseca, I.M., Santos, C., Diaz, S., Bordeaux, P., & Oliveira, A (2008a). Resultados de um inquérito sobre leishmaniose canina efectuado a médicos veterinários em Portugal em 2007: I – dados epidemiológicos. In 17º Congresso Nacional da Associação Portuguesa de Médicos Veterinários Especialistas em Animais de Companhia, Estoril, Portugal.
- Pereira da Fonseca, I.M., Santos, C., Diaz, S., Bordeaux, P., & Oliveira, A (2008b). Resultados de um inquérito sobre leishmaniose canina efectuado a médicos veterinários em Portugal em 2007: II – diagnóstico, tratamento e prevenção. In 17º Congresso Nacional da Associação Portuguesa de Médicos Veterinários Especialistas em Animais de Companhia, Estoril, Portugal.
- Pereira da Fonseca, I.M. & Villa de Brito, M.T. (2008). Capítulo VI: Diagnóstico. In Santos-Gomes, G. M., Fonseca, I.M.P. (Eds.). *Leishmaniose Canina*. (pp. 83-92) Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A.
- Quaresma, P.F., Murta, S.M.F., Ferreira, E.C., Rocha-Lima, A.C.V.M., Xavier, A.A.P. & Gontijo, C.M.F. (2009). Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of leishmania species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Tropica*, 111, 289-294.
- Ribeiro, V.M. (2009). Treatment of canine visceral leishmaniasis: impact of control programs. In *World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings*, Minas Gerais, Brasil. Acedido em Fev. 1, 2010, disponível em: www.vin.com.
- Richard, W. & Ashford, D. (1996). Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology*, 14, 523–532.
- Riquelme, J.M., Martínez, J.N., Chávez, M.F. & Cañavate, C.C. (2007). Diagnóstico. *Canis et Felis*, 89, 52-70. (gentilmente cedida pela Prof. Dra. Guadalupe Miró Corrales)
- Rochette, F. (2003). *Los parasitos del perro y su control*. (1ª edição). (pp.206-209). Barcelona: Vet Esteve.
- Rodrigues, J.S. (1921). Sobre o diagnóstico etiológico das esplenomegalias – trabalho de clínica pediátrica. Tese de Doutoramento. Porto: Faculdade de Medicina do Porto.
- Rodríguez-Cortés, A., Ojeda, A., Francino, O., López-Fuertes, L., Timón, M. & Alberola, J. (2010). Leishmania infection: laboratory diagnosing in the absence of a “gold standard” [abstract]. *Am J Trop Med Hyg*, 82(2), 251-6.

- Rosa, N.J.G.C. (2009). Rastreio de dirofilariose e de leishmaniose em gatos da área metropolitana de Lisboa. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Santos-Gomes, G.M., Rodrigues, O.R. & Marques, C. (2008). Capítulo V: Resposta imunológica. In Santos-Gomes, G.M., Fonseca, I.M.P. (Eds.). Leishmaniose canina. (pp. 69-82) Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A.
- Sideris, V., Papadopoulou, G., Dotsika, E. & Karagouni, E. (1999). Asymptomatic canine leishmaniasis in greater Athens area, Greece. *European Journal of Epidemiology*, 15, 271-276.
- Silva, A.A.A.G.M. (2009). Leishmaniose canina na zona do Pinhal. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Silva, F.L., Oliveira, R.G., Silva, T.M.A., Xavier, M.N., Nascimento, E.F. & Santos, R.L. (2009). Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 160, 55–59.
- Silva, A.V.M., Paula, A. A., Cabrera, M.A.A. & Carreira, J.C.A. (2005). Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. *Cad. Saúde Pública*, 21, 324-328.
- Solano, L., (2008). Update no diagnóstico da leishmaniose canina: infecção versus doença. [videoconferência interactiva ibérica: doenças dos cães transmitidas por vectores]. Lisboa: Bayer HealthCare: Saúde Animal.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. & Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165, 1-18.
- Stanford University (2010). Leishmaniasis history. Acedido em Fev. 7, 2010, disponível em: <http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2006/Leishmaniasis/history.htm>
- Sundar, S. & Chatterjee, M. (2006). Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. *Indian J Med Res*, 123, 345-352.
- Tafari, W.L., (2009). Strategies for control of canine visceral leishmaniasis around the world . In World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings, São Paulo, Brasil. Acedido em Fev. 1, 2010, disponível em: www.vin.com.
- Tomás, A. & Romão, S.F. (2008). Capítulo I: Biologia do parasita. In Santos-Gomes, G.M., Fonseca, I.M.P. (Eds.) Leishmaniose canina. (pp.7-26). Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A.
- Vischer, C., Grousson, D. & Médaille, C. (2007). Preliminary safety study of the combination therapy of miltefosine and allopurinol in dogs. In World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings,, Arcueil,, França. Acedido em Fev. 1, 2010, disponível em: www.vin.com.
- Wéry, M. (1995). Protozoologie médicale. (1ª edição). (pp.123). Bruxelas: De Boeck Université.

Anexos

Anexo I – Questionário efectuado aos proprietários dos cães rastreados

Questionário

Animal nº _____

Data ___/___/___

1. Nome do dono: _____

2. Morada: _____

3. Freguesia: _____

4. Contacto: _____

5. Nome do animal: _____

6. Idade: _____

7. Raça: _____

8. Sexo:

a. Masculino

b. Feminino

9. Pelagem

a. Comprimento Curta Média Comprida

b. Cor _____

c. Tipo Lisa Encaracolada Cerdosa

10. Presença de ectoparasitas

a. Sim Quais: _____

b. Não

11. Proveniência do animal

a. Loja

b. Criador

c. Canil

d. Associações de animais

e. Oferecido

f. Animal de rua

g. Nasceu em casa do dono

12. Onde esteve o animal nos últimos 6 meses? _____

Nesse local tomavam medidas de prevenção contra ectoparasitas?

a. Sim Quais? _____

b. Não

13. Aptidão

- a. Companhia
- b. Guarda
- c. Caça
- d. Outra: _____

14. Habitat

- a. Vive dentro de casa e não vai à rua
- b. Vive dentro de casa e vai à rua
 - i. À trela
 - ii. Solto
 - iii. Ambos

A que horas vai à rua? _____

- c. Vive no exterior e dorme num canil/casota
- d. Vive no exterior e dorme recolhido no interior de um edifício (garagem, anexo da casa)
- e. Outro: _____

15. Existem cursos de água ou águas acumuladas perto do local onde o animal vive?

- a. Sim
- b. Não

16. Existem suiniculturas ou vacarias perto do local onde o animal vive?

- a. Sim
- b. Não

17. Utilização de desparasitantes

- a. Internos
 - i. Sim Quais: _____ Freq de aplicação: _____
 - ii. Não
- b. Externos
 - i. Sim Quais: _____ Freq de aplicação: _____
 - ii. Não

18. Tem conhecimento de uma doença denominada de Leishmaniose?

- a. Sim
- b. Não

19. Vive com outros cães diagnosticados com Leishmaniose?

- c. Sim
- d. Não

20. Toma medidas de prevenção contra a Leishmaniose

- a. Sim Quais: _____
- b. Não

21.No caso do resultado da IFI ser positiva o dono aceita que sejam efectuados mais exames ao seu cão?

- a. Sim
- b. Não

20.Notas:

Anexo II – Caracterização da amostra em estudo (N=80) (restantes dados obtidos no questionário)

Nº Amostra	Existência águas	Presença de ectoparasitas	Proveniência	Onde esteve o cão nos últimos 6 meses	Suíniculturas/Vacarias perto da habitação do animal	Conhecimento de leishmaniose
1	não	não	criador	com o proprietário	não	sim
2	sim	não	associação	com o proprietário	sim	não
3	sim	não	cão errante	com o proprietário	não	não
4	não	não	canil	com o proprietário	não	sim
5	não	não	cão errante	rua	não	sim
6	não	não	oferecido	com o proprietário	sim	sim
7	não	não	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	sim	sim
8	não	não	oferecido	com o proprietário	sim	sim
9	não	não	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	sim	sim
10	não	não	cão errante	rua	não	não
11	não	não	criador	com o proprietário	não	não
12	sim	não	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	sim	sim
13	sim	não	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	sim	sim
14	sim	não	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	sim	sim
15	sim	não	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	sim	sim
16	sim	não	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	sim	sim
17	sim	não	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	sim	sim
18	sim	não	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	sim	sim
19	sim	não	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	sim	sim
20	não	não	loja	com o proprietário	não	sim
21	não	não	criador	com o proprietário	não	sim
22	sim	não	oferecido	com o proprietário	não	sim
23	sim	não	oferecido	com o proprietário	não	sim
24	não	não	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	não	sim
25	não	não	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	não	sim
26	não	não	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	não	sim
27	não	não	cão errante	rua	não	sim
28	não	não	canil	com o proprietário	não	não
29	não	não	criador	com o proprietário	não	sim
30	sim	não	associação	rua	não	sim
31	sim	não	oferecido	com o proprietário	não	não
32	não	não	oferecido	com o proprietário	sim	sim
33	sim	não	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	sim	sim
34	não	pulgas	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	não	sim
35	não	pulgas	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	sim	sim

Soros positivos inicialmente testados por IFI apenas na diluição de 1/40


Soros secundariamente testados por IFI na diluição de 1/20


Nº Amostra	Existência águas	Presença de ectoparasitas	Proveniência	Onde esteve o cão nos últimos 6 meses	Suiculturas/Vacarias perto da habitação do animal	Conhecimento de leishmaniose
36	não	pulgas e carraças	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	não	sim
37	não	pulgas e carraças	oferecido	com o proprietário	não	sim
38	sim	pulgas e carraças	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	não	não
39	sim	pulgas e carraças	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	não	não
40	sim	pulgas e carraças	oferecido	com o proprietário	não	não
41	sim	pulgas e carraças	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	não	não
42	sim	pulgas e carraças	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	não	não
43	não	não	criador	com o proprietário	não	sim
44	não	não	criador	com o proprietário	não	sim
45	não	pulgas e carraças	criador	com o proprietário	não	sim
46	não	pulgas e carraças	oferecido	com o proprietário	não	sim
47	não	pulgas e carraças	criador	com o proprietário	não	sim
48	não	pulgas e carraças	criador	com o proprietário	não	sim
49	não	pulgas e carraças	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	não	sim
50	não	pulgas e carraças	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	não	sim
51	não	pulgas e carraças	criador	com o proprietário	não	sim
52	não	pulgas e carraças	criador	com o proprietário	não	sim
53	não	pulgas e carraças	oferecido	com o proprietário	não	sim
54	não	pulgas e carraças	oferecido	com o proprietário	não	sim
55	não	pulgas e carraças	oferecido	com o proprietário	não	sim
56	sim	não	cão errante	com o proprietário	sim	sim
57	não	não	oferecido	com o proprietário	sim	sim
58	não	pulgas	criador	com o proprietário	não	sim
59	não	pulgas	criador	com o proprietário	não	sim
60	não	pulgas	criador	com o proprietário	não	sim
61	não	pulgas	criador	com o proprietário	não	sim
62	não	pulgas	criador	com o proprietário	não	sim
63	não	pulgas	criador	com o proprietário	não	sim
64	não	pulgas	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	não	sim
65	não	pulgas	criador	com o proprietário	não	sim
66	não	pulgas	criador	com o proprietário	não	sim
67	não	pulgas	criador	com o proprietário	não	sim
68	não	pulgas	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	não	sim
69	não	pulgas	criador	com o proprietário	não	sim
70	não	pulgas	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	não	sim
71	não	pulgas	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	não	sim
72	não	pulgas	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	não	sim
73	sim	pulgas	criador	com o proprietário	não	sim

 Soros positivos inicialmente testados por IFI apenas na diluição de 1/40

 Soros secundariamente testados por IFI na diluição de 1/20

Nº Amostra	Existência águas	Presença de ectoparasitas	Proveniência	Onde esteve o cão nos últimos 6 meses	Suíniculturas/Vacarias perto da habitação do animal	Conhecimento de leishmaniose
74	sim	pulgas	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	não	sim
75	sim	pulgas	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	não	sim
76	sim	pulgas	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	não	sim
77	sim	pulgas	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	não	sim
78	sim	pulgas	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	não	sim
79	sim	pulgas	nasceu em casa do proprietário	com o proprietário	não	sim
80	sim	não	criador	com o proprietário	não	sim

 Soros positivos inicialmente testados por IFI apenas na diluição de 1/40

 Soros secundariamente testados por IFI na diluição de 1/20