



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**ESTUDO DE BABESIOSE E LEISHMANIOSE NOS CÃES DOS CONCELHOS DE  
LAMEGO, TAROUCA E PESO DA RÉGUA, PORTUGAL**

SARA ALEXANDRA MEIRELES DA COSTA ARAÚJO

CONSTITUIÇÃO DE JÚRI:

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da  
Fonseca de Sampaio

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

ORIENTADOR

Dr. Francisco Geraldês Neto

COORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de  
Carvalho

2017

LISBOA

---



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**ESTUDO DE BABESIOSE E LEISHMANIOSE NOS CÃES DOS CONCELHOS DE  
LAMEGO, TAROUCA E PESO DA RÉGUA, PORTUGAL**

SARA ALEXANDRA MEIRELES DA COSTA ARAÚJO

CONSTITUIÇÃO DE JÚRI:

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da  
Fonseca de Sampaio

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

ORIENTADOR

Dr. Francisco Geraldês Neto

COORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de  
Carvalho

2017

LISBOA

“If you can dream it, you can do it”

Walt Disney

## **Agradecimentos**

Ao Francisco Neto, médico veterinário e diretor clínico da Clínica Veterinária Douro Sul, por me ter aceite como sua orientanda e por me ter feito sentir parte da sua equipa de clínicos veterinários.

Ao Professor Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho por toda a ajuda, disponibilidade e amizade demonstradas ao longo desta jornada.

À equipa da Clínica Veterinária Douro Sul, com um agradecimento especial à Ana, Lara, Denise e Marta por me terem acolhido, pelo companheirismo, pela amizade, por me terem ensinado tanto e por todo o incentivo que me fez sentir que eu nasci para ser médica veterinária. Sem vocês eu não me sentiria tão confiante que escolhi o caminho certo. Obrigada por tudo.

Aos tutores dos animais amostrados para o estudo, pela colaboração na realização dos inquéritos.

Aos meus pais, mas principalmente à minha mãe que nunca me permitiu pensar que eu não ia ser capaz de chegar aonde estou. Foram tantas as chamadas em que me disse que eu ia cumprir o meu sonho, e que se os outros conseguem, eu também consigo. Tantos anos separadas por centenas de quilómetros e nunca me permitiu sentir-me longe dela.

Aos meus amigos da faculdade que viveram comigo esta jornada, às “Queridas”, mas principalmente à Salomé, que viveu esta experiência da forma mais companheira possível. Lisboa não teria sido a mesma sem ela nem o meu percurso académico teria sido o mesmo sem a sua ajuda. Obrigada pelas inúmeras horas de estudo, pelas compras pós época de exames e pelos gelados da “Olá” com extra chantili depois de um exame.

Aos meus companheiros de casa: ao Agostinho por todos os conselhos, amizade e pelas inúmeras gargalhadas que me fez soltar quando mais precisei, à Raquel por todas as horas de estudo, canto, brincadeira e por me ter feito sentir parte da sua família. Por fim à minha querida Inês, que me acompanhou desde o primeiro até ao último dia em Lisboa. Por nunca duvidar das minhas capacidades, por me mostrar que era possível ser feliz em Lisboa, por todo o incentivo que sempre recebi, mas principalmente pela amizade e cumplicidade que partilhamos.

Às minhas amigas de infância Joana, Leninha e Lavínia, por desde cedo me mostrarem que este era o meu caminho, por todo o carinho, amizade e incentivo que me fizeram sentir ao longo do meu percurso académico.

À Joana e ao Manuel Santiago por estarem do meu lado incondicionalmente, por não terem permitido que a distância física nos afastasse, por toda amizade e carinho que partilhamos.

À Catarina, Renata, Pedro e Eduardo, por apesar de termos estado distanciados tanto tempo nunca permitirem que isso abalasse a nossa amizade, por toda a preocupação demonstrada quando eu estava em épocas de exame e por serem uns amigos fantásticos.

Ao meu coelho “Bingo”, por me ter mostrado a importância que um animal pode assumir na vida de uma pessoa, mas principalmente por me ter feito compreender que eu queria ser médica veterinária.

À minha furoa “Kiara”, por estar comigo há tantos anos e por me fazer ver que um animal pode ser companheiro e compreensivo.

À minha gata “Nala” por me mostrar que é possível amar sem dominar.

Porque os últimos são os primeiros, ao meu querido Nuno, por tudo! Por todas as vezes que estudou as minhas matérias para poder explica-las, por me mostrar o Norte em todas as vezes que o perdi, por nunca me deixar desistir, por me apoiar em todas as decisões que tomo, por ter lido e revisto esta dissertação, por ser o meu porto de abrigo e a minha bóia de salvação, mas sobretudo por ser a minha pessoa.



## RESUMO

### **Estudo de Babesiose e Leishmaniose nos cães nos concelhos de Lamego, Peso da Régua e Tarouca, Portugal**

Este estudo foi realizado com os seguintes objetivos: a) compreender a ocorrência de Babesiose Canina (BC) e Leishmaniose Canina (LCan) nos cães nos concelhos de Lamego, Tarouca e Peso da Régua; b) avaliar o risco de contacto dos cães com os vetores; c) analisar as medidas profiláticas instituídas nos animais amostrados. Para obtermos informação sobre as características da vida dos animais foi realizado um inquérito aos proprietários dos animais. Ao todo foram preenchidos 60 inquéritos (1 por animal). A amostra de 60 animais foi constituída por 32 cães diagnosticados com BC e 28 cães que foram submetidos a diagnóstico, rastreio ou avaliação do controlo de LCan. Relativamente aos animais amostrados para BC, verificámos que 100% dos animais foram positivos a *Babesia* spp, enquanto 60,7% dos cães amostrados para LCan foram positivos para *Leishmania* sp.

O diagnóstico de BC foi realizado através da visualização de formas intraeritrocitárias de *Babesia* spp. no esfregaço sanguíneo dos 32 animais. Os testes utilizados para diagnóstico, rastreio e controlo de LCan variaram entre o método de ELISA e um teste imunocromatográfico. O teste de ELISA foi utilizado em 71,4% da população amostrada ao passo que o teste imunocromatográfico foi empregue em 28,6% dos cães. Relativamente às duas doenças estudadas verificámos que 56,3% dos animais amostrados para BC eram provenientes do concelho de Lamego, ao passo que 42,9% dos animais estudados para LCan pertenciam ao concelho do Peso da Régua. O estudo decorreu entre o dia 5 de setembro de 2016 e 28 de fevereiro de 2017, e verificámos que novembro de 2016 foi o mês em que se realizaram mais diagnósticos de BC, enquanto fevereiro de 2017 foi o mês em que se realizaram mais testes para diagnóstico, rastreio ou controlo de LCan.

Alguns dos factores estudados para avaliar o risco de contacto com os vetores das respetivas doenças foram: a aptidão do animal, local onde dormem, convivência com cães diagnosticados com BC e LCan, acesso ao exterior das habitações, entre outros. Para análise da profilaxia dos animais comparámos a frequência utilizada com a recomendada pelo fabricante dos respetivos produtos. Assim dos 32 animais amostrados para Babesiose Canina verificámos que nenhum dos animais estava corretamente desparasitado, ao passo que apenas 39,3% dos animais testados para LCan apresentavam proteção correta para ectoparasitas.

**Palavras-chave:** Babesiose, Leishmaniose, Cães, Peso da Régua, Lamego e Tarouca, Portugal.



## ABSTRACT

### **Babesiosis and Leishmaniasis study in domestic canids from the counties of Lamego, Tarouca and Peso da Régua, Portugal.**

This study was accomplished based on the following goals: a) understand the occurrence of Canine Babesiosis (CB) and Canine Leishmaniasis (CanL) in domestic canids from the counties of Lamego, Tarouca and Peso da Régua; b) assess the risk of contact with the vectors; c) to analyse the prophylactic measures established in the sampled animals. In order to obtain information about the characteristics of the animals' life, a survey was performed with the dog owners, resulting in 60 fulfilled inquiries, one per animal. This sample was constituted by 32 canids diagnosed with CB and 28 canids submitted to a CanL diagnosis, survey and control assessment. Concerning the animals sampled for CB, we verified that 100% of the animals were positive to *Babesia* spp, while 60.7% of the dogs sampled to CanL were positive for *Leishmania* sp..

The CB diagnosis was performed using visualisation of intra-erythrocyte forms of *Babesia* spp. in the blood smear of the 32 animals. The tests used for the CanL diagnosis, survey and control assessment varied between the ELISA's method and an immunochromatographic test. The first was used in 71,4% of the samples population and the second in 28,6% of the canids. Regarding the two studied diseases, we found that 56,3% of the CB samples animals originated from the county of Lamego whilst 42,9% of the CanL sampled animals belonged to the Peso da Régua county. The study was conducted between 5<sup>th</sup> September 2016 and 28<sup>th</sup> February 2017, and we verified that November 2016 was the month with more CB diagnosis, while February 2017 was the month in which more CanL diagnosis tests, survey and control assessment were performed. Some of the factors studied to assess the risk of contact with the vectors concerning these diseases were: the aptitude of the animal, the place where they slept, the coexistence with canids diagnosed with CB and CanL, the access to the outside of dwellings, among others. After analysing the animals prophylaxis, we compared the frequency used with the one recommended by the manufacturers of the respective products. Thus, among the 32 canine Babesiosis sampled animals we verified that none of those animals were properly dewormed, whilst only 39,3% of the CanL tested animals showed a correct protection regarding ectoparasites.

**Keywords:** Babesiosis, Leishmaniasis, Dogs, Peso da Régua, Lamego and Tarouca, Portugal.

## ÍNDICE

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xiii
LISTA DE TABELAS .....	xiii
LISTA DE GRÁFICOS .....	xiv
Lista de abreviaturas, Siglas e Símbolos .....	xv
I - INTRODUÇÃO .....	1
II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
1. Babesiose Canina .....	3
2. Leishmaniose Canina .....	17
III - ESTUDO DE BABESIOSE E LEISHMANIOSE NOS CÃES DOS CONCELHOS DE LAMEGO, TAROUCA E PESO DA RÉGUA, PORTUGAL.....	30
1. Objetivos do Estudo .....	30
IV - MATERIAL E MÉTODOS .....	31
1. Caracterização dos cães utilizados, da área geográfica e do respetivo clima no período de amostragem.....	31
2. Composição e identificação da amostra .....	32
3. Recolha e processamento da amostra.....	32
4. Métodos laboratoriais .....	33
4.1. Esfregação sanguíneo.....	33
4.2. Leiscan® Leishmania ELISA Test, Esteve.....	34
4.3. <i>Speed Leish K</i> ®, Virbac .....	38
4.4. Análises laboratoriais .....	41
5. Inquérito (inserido no anexo) .....	41
6. Análise dos dados e processamento dos resultados .....	42
V - RESULTADOS .....	43
1. Inquérito .....	43
1.1. Identificação do concelho .....	43
1.2. Identificação dos meses de diagnóstico, controlo ou rastreio.....	44
1.3. Caracterização do animal.....	44
1.3.1. Idade.....	44
1.3.2. Sexo .....	45
1.3.3. Raça .....	46
1.3.4. Tipo de pelagem.....	47
1.4. Características da vida do animal .....	47
1.4.1. Aptidão.....	47
1.4.2. Dormitório do animal.....	48

1.4.3. Convívio com outros cães.....	49
1.4.4. Diagnóstico positivo de BC nos cães conviventes.....	50
1.4.5. Diagnóstico positivo para LCan nos cães conviventes.....	50
1.4.6. Acesso ao exterior (em que período do dia e em que locais).....	51
1.4.6.1. Babesiose Canina.....	51
1.4.6.2. Leishmaniose Canina.....	51
1.4.7. Hábitos de vacinação.....	51
1.4.8. Hábitos de desparasitação.....	53
1.4.8.1. Babesiose Canina.....	53
1.4.8.2. Leishmaniose Canina.....	55
1.4.9. Reinfeção de BC.....	57
1.5. Sinais apresentados na consulta.....	57
1.6. Internamento.....	58
1.6.1. Babesiose Canina.....	58
1.6.2. Leishmaniose Canina.....	58
1.7. Morte.....	58
1.7.1. Babesiose Canina.....	59
1.7.2. Leishmaniose Canina.....	59
1.8. Concomitância de LCan e BC.....	59
2. Resultados laboratoriais.....	59
2.1. Esfregaços sanguíneos.....	59
2.2. Leiscan® Leishmania ELISA Test, Esteve Veterinária.....	60
2.3. Speed Leish K®, Virbac.....	60
2.4. Análises laboratoriais hematológicas e bioquímicas.....	61
2.4.1. Análises laboratoriais relativas aos animais amostrados para Babesiose Canina.....	61
2.4.2. Análises laboratoriais relativas aos animais amostrados para Leishmaniose Canina.....	63
VI – DISCUSSÃO.....	66
1. Babesiose Canina.....	66
2. Leishmaniose Canina.....	70
VII – CONCLUSÃO.....	76
VIII - RECOMENDAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	77
IX - BIBLIOGRAFIA.....	79
LETI (s.d.). LETIFEND, vacina contra la leishmaniosis canina. Acedido em 17 de Julho de 2017 em <a href="http://saludanimal.leti.com/vacuna-contr-leishmaniosis-letifend/">http://saludanimal.leti.com/vacuna-contr-leishmaniosis-letifend/</a> .....	81
X - ANEXO.....	85

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição das espécies de <i>Babesia</i> sp. responsáveis pela etiologia de Babesiose Canina na Europa, determinadas por análise molecular (Solano-Galego & Baneth, 2011).....	5
Figura 2- Ciclo biológico de <i>Babesia</i> spp. (Kevin & Petersen, 2013) .....	8
Figura 3- Palidez das mucosas num cão diagnosticado com Babesiose Canina (Original). ....	10
Figura 4 - Hematúria observada num Boxer diagnosticado com Babesiose Canina (Original). .....	11
Figura 5- Mapa das áreas geográficas endémicas de <i>L.infantum</i> , <i>L.donovani</i> e <i>L.chagasi</i> (Intitute of Tropical Medicine, s.d.) .....	17
Figura 6 - Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp. (Frézard, 2015). .....	21
Figura 7- Onicogribose no membro anterior direito num cão com Leishmaniose Canina (Original). .....	24
Figura 8- Dermatite ulcerativa presente na porção distal do membro anterior direito de um cão com LCan (Original). .....	24
Figura 9- Dermatite descamativa na zona abdominal de um cão com LCan (Original). .....	25
Figura 10- Blefarite alopecica e ulcerativa num Labrador Retriever com LCan (Original). ....	25
Figura 11- Lâminas com esfregaços sanguíneos no período de secagem e solução corante (Diff-quick) atrás dos mesmos (Original). .....	34
Figura 12- Soluções e Controlos numerados pertencentes ao teste Leiscan® <i>Leishmania</i> ELISA Test, Esteve Veterinária (Original). .....	37
Figura 13- Imagem correspondente ao 3º passo do protocolo (colocação de amostra e controlo nos poços) (Original). .....	37
Figura 14- Leitor de ELISA com filtro de 450 nanómetros a informar qual o Rz da amostra lida (Original) .....	38
Figura 15- Instruções para realização do teste Speed Leish K®, Virbac (Virbac, 2011).....	40
Figura 16-Resultado positivo ao teste Speed Leish K® (Original).....	40
Figura 17- Merozoitos intraeritrocitários de <i>Babesia</i> spp. num cão diagnosticado com Babesiose canina. obj. x400, oc. x10 (Original).....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Interpretação de resultados do teste Leiscan® <i>Leishmania</i> ELISA Test, Esteve Veterinária, de acordo com o fabricante (INNO, 2012). .....	35
Tabela 2 - Distribuição dos animais amostrados pela raça.....	46
Tabela 3 - Distribuição dos animais amostrados de acordo com o local de dormitório.....	49
Tabela 4 – Frequência de vacinação dos animais amostrados.....	52
Tabela 5 - Frequência da forma do ectoparasiticida utilizado nos animais diagnosticados com BC.....	53
Tabela 6 - Frequência dos produtos utilizados sob a forma de unção punctiforme nos animais diagnosticados com BC. ....	54
Tabela 7 - Frequência dos produtos utilizados sob a forma de coleira nos animais diagnosticados com BC. ....	55
Tabela 8 - Frequência das formas de ectoparasiticidas nos animais amostrados para LCan. ..	55
Tabela 9 - Frequência do produto utilizado sob a forma de unção punctiforme nos animais amostrados para LCan. ....	56
Tabela 10 - Frequência do produto utilizado sob a forma de coleira nos animais amostrados para LCan. ....	57
Tabela 11 - Frequência do produto utilizado sob a forma de coleira nos animais amostrados.	58
Tabela 12 - Frequência dos resultados obtidos pelo método de ELISA.....	60
Tabela 13 - Frequência dos resultados obtidos através do teste imunocromatográfico. ....	60

Tabela 14 - Valores dos parâmetros hematológicos e bioquímicos nos cães amostrados para BC.....	62
Tabela 15 - Valores dos parâmetros hematológicos e bioquímicos nos cães amostrados para LCan. ....	64

## **LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 1 - Distribuição dos animais amostrados pelos concelhos. ....	43
Gráfico 2 - Distribuição dos animais amostrados pelos meses. ....	44
Gráfico 3 - Distribuição dos animais amostrados pelas idades. ....	45
Gráfico 4 - Distribuição dos animais amostrados pelo sexo. ....	46
Gráfico 5- Distribuição dos animais amostrados de acordo com o comprimento do pelo. ....	47
Gráfico 6 - Distribuição dos animais amostrados de acordo com a aptidão.....	48
Gráfico 7 - Distribuição dos animais amostrados de acordo com o convívio com outros cães. ....	49
Gráfico 8 - Frequência do convívio de animais amostrados com animais diagnosticados com a mesma doença.....	50
Gráfico 9 - Frequência do convívio de animais amostrados para LCan com animais diagnosticados com LCan.....	50
Gráfico 10 - Frequência dos ectoparasiticidas externos utilizados nos animais diagnosticados com BC.....	53
Gráfico 11 - Frequência dos ectoparasiticidas externos utilizados nos animais amostrados para LCan. ....	56

## Lista de abreviaturas, Siglas e Símbolos

%- Por cento

< - Menor que

> - Maior que

® - Marca registrada

µg- Micrograma

µl- Microlitro

µm- Micrometro

18S- rRNA – Subunidade do ácido ribonucleico ribossomal nuclear

Ac- Anticorpo

Acs- Anticorpos

AHIM- Anemia Hemolítica Imunomediada

*B.- Babesia*

BC- Babesiose Canina

BH- Babesiose Humana

BID- Duas vezes por dia

CAMV- Centro de Atendimento Médico-Veterinário

CID- Coagulação Intravascular Disseminada (do inglês *Disseminated intravascular coagulopathy*)

CV Douro Sul- Clínica Veterinária Douro Sul

*D.reticulatus- Dermacentor reticulatus*

dl – Decilitro

DNA- Ácido desoxirribonucleico

EDTA- Ácido etilendiamino tetra-acético (do inglês Ethylenediamine tetraacetic acid)

ELISA- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

ex:- Exemplo

fL- Fentolitro

g- Grama

g/dL- grama por decilitro

HIV – Vírus da imunodeficiência humana (do inglês *Human immunodeficiency virus*)

Htc- Hematócrito

*I. – Ixodes*

IFAT- Teste de Imunofluorescência Indireta

IFI- Imunofluorescência indireta

IM- Via intramuscular

IRC- Insuficiência renal crônica  
L/L- Litro por Litro  
LCan- Leishmaniose Canina  
LH- Leishmaniose Humana  
L- Litro  
mg/kg- Miligrama por kilograma  
ml- Mililitro  
mm- Milímetro  
MO- Microscópio Ótico  
nm- Nanômetro  
Nº- Número  
°C- Graus Celcius  
ONLeish- Observatório Nacional das Leishmanioses  
*P.* - *Phlebotomus*  
PCR- Reação em Cadeia da Polimerase  
PO- Via oral ou *Per Os*  
PSE- Proteínas secretadas-excretadas  
Rz- Razão da amostra  
SC- Via subcutânea  
SID- Uma vez por dia  
SNC- Sistema Nervoso Central  
sp. - Espécie  
spp.- Espécies  
SRD- Sem raça definida  
SRIS- Síndrome sistêmico de resposta inflamatória (do inglês *Systemic response inflammatory syndrome*)  
TAD- Técnica de Aglutinação Direta (do inglês *Direct agglutination technique*)  
Th1- T helper 1  
Th2- T helper 2  
TID- Três vezes por dia  
UI- Unidades internacionais  
UI/L- Unidade internacional por litro  
WB- Ensaio imunoenzimático (do inglês *Immunoblotting*, também conhecido como *Western Blotting*)

## **Atividades realizadas durante o estágio curricular**

O estágio curricular foi realizado na Clínica Veterinária Douro Sul (CV Douro Sul), constituída pela clínica em Lamego (onde se realizam cirurgias, consultas e recobro) e consultórios onde apenas se realizam consultas, localizadas em Tarouca, Peso da Régua, Armamar e Santa Marinha do Zêzere. Tivemos o privilégio de estagiar na clínica de Lamego e nos consultórios de Tarouca, Santa Marinha do Zêzere e Peso da Régua. O presente estágio decorreu durante o período de tempo compreendido entre 5 de setembro de 2016 e 28 de fevereiro de 2017.

Como foi anteriormente referido, a clínica inserida na cidade de Lamego proporciona diversas áreas como recobro, imagiologia, cirurgia e consultas, tendo sido este o local onde foram dedicadas mais horas ao estágio. A CV Douro Sul dedica-se maioritariamente à clínica de pequenos animais, tendo sido os canídeos e os felídeos domésticos os principais animais observados.

As consultas foram a atividade de preferência, uma vez que permitiram não só desenvolver uma capacidade de comunicação com os tutores, mas também a aptidão de os conseguir interpretar. Desta forma participámos na realização da anamnese, no exame físico dos animais, na recolha de materiais biológicos (ex: recolha de sangue), em consultas de urgência e na administração de formas farmacêuticas (ex: administração de vacinas e desparasitantes internos e externos).

Nos procedimentos cirúrgicos foi possível interpretar o papel de ajudante de cirurgião em cirurgias como extração do dente carniceiro em cães, ovariohisterectomias em cadelas e gatas e ainda orquiectomia em cães e gatos. Para além disso foi prestado auxílio na realização dos procedimentos anestésicos, analgésicos, preparação dos animais para as cirurgias, e ainda na monitorização anestésica antes, durante e após o ato cirúrgico.

A área de imagiologia é constituída por radiologia e ecografia, permitindo o auxílio na contenção dos animais e na interpretação dos resultados.

No internamento pudemos aprimorar a prática, uma vez que este local se encontrava resguardado dos proprietários dos animais e estavam sempre presentes uma enfermeira e uma médica veterinária que permitiram e auxiliaram na colocação de cateteres, algaliações, recolha de materiais biológicos e administração de fármacos. Também aqui foram desenvolvidas competências na alimentação e higiene dos animais internados.

De ressaltar que os testes laboratoriais necessários para a elaboração da presente dissertação de mestrado foram realizados na CV Douro Sul junto de profissionais qualificados. Neste local foram executados, observados e interpretados esfregaços sanguíneos para diagnóstico de Babesiose Canina (através da pesquisa de formas de *Babesia* spp. intraeritrocitárias) e para o rastreio, diagnóstico e controlo de Leishmaniose Canina foram utilizados dois meios, o teste

imunocromatográfico (*Speed Leish K*®, Virbac) e ainda o método de ELISA (*Leiscan*® *Leishmania ELISA Test*, Esteve).

Após cinco anos de estudo intensivo, consideramos o estágio uma parte fulcral para o nosso desenvolvimento como futura médica veterinária, pois só praticando e com a tutoria de proximidade de vários profissionais, é que realmente aprendemos novos aspetos da medicina veterinária de animais de companhia e consolidamos os nossos conhecimentos teórico-práticos. A possibilidade de podermos estar envolvidos na maioria dos procedimentos da CV Douro Sul tornou possível a consolidação dos conhecimentos técnicos e científicos que adquirimos ao longo da nossa formação académica. Graças a esta experiência temos a certeza que desenvolvemos competências fulcrais para o nosso futuro enquanto médica veterinária de animais de companhia.



## I - INTRODUÇÃO

Portugal assume-se cada vez mais como um país amigo dos animais e atualmente 54% dos lares portugueses têm presente pelo menos um animal de estimação. Dos animais de companhia escolhidos pelas famílias portuguesas, 38% são cães (Pinto, 2015). Desta forma, o vínculo que une o ser humano e o canídeo tem aumentado seriamente, tendo o cão uma nova posição na sociedade. Olhados como família por uns ou como o Rei Frederico II dizia, o “melhor amigo do homem” por outros, os canídeos domésticos têm conseguido um espaço na vida quotidiana do Homem, trazendo inúmeros benefícios conhecidos, desde a área da saúde, agindo na deteção de convulsões, auxílio na terapia da fala, acompanhamento de invisuais, ou em áreas de lazer, como é o caso da caça (Casciotti, 2016).

Se não houver cuidados com a saúde dos respetivos intervenientes nesta simbiose emocional, para além dos inúmeros benefícios supracitados, podem ser partilhadas doenças, denominadas por zoonóticas. Segundo a Organização Mundial da Saúde, doenças zoonóticas têm por definição serem “doenças ou infeções que podem ser transmitidas entre animais vertebrados e humanos” (World Health Organization, 2016). Desta forma, compreende-se a importância do controlo de saúde não só do ser humano como dos animais. Aqui entra o médico veterinário na prestação de cuidados aos animais e na sensibilização dos seus proprietários para a importância do controlo deste tipo de doenças.

Segundo o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, os principais vetores causadores da transmissão de doenças infecciosas ao ser humano são “os mosquitos, os flebótomos, as carraças, as pulgas e os piolhos” (Matos, Gargaté, Machado, Silveira, Santos, Costa, Sousa, 2014). Igualmente transmitidas por estes vetores existem algumas doenças que afetam o cão e que podem ser transmitidas ao Homem, no entanto, na presente dissertação de mestrado iremos apenas abordar a “Babesiose Canina” e a “Leishmaniose Canina”. Estas doenças parasitárias possuem como vetores a carraça e o flebótomo, respetivamente, assumindo o cão o papel de hospedeiro definitivo na Babesiose Canina e hospedeiro reservatório na Leishmaniose Canina, no entanto os respetivos vetores podem parasitar o ser humano.

A transmissão destas doenças depende de muitos fatores nomeadamente da capacidade de adaptação dos vetores às variações da temperatura ambiente favorecendo a sua sobrevivência e transmissão (Stemberg & Thomas, 2014). Também o não controlo de desparasitação externa dos animais de companhia, a prática de atividades ao ar livre na proximidade de locais com águas paradas, rios ou ribeiros e em alturas crepusculares, podem influenciar o contacto dos animais e do ser humano com os diversos vetores de doenças parasitárias (Solano-Gallego, Ángel Sainz, Xavier Roura, Augustín Estrada-Peña & Guadalupe Miró, 2016).

O Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA) considera que Portugal é um país de clima temperado e que o mesmo se divide numa zona com inverno chuvoso, verão seco e quente e outra zona com inverno chuvoso, verão seco e pouco quente. Uma vez que os centros de atendimento médico veterinários (CAMV) da CV Douro Sul que serviram como local de recolha das amostras se situam geograficamente em Lamego, Peso da Régua e Tarouca, estes locais, de acordo com a classificação de Koppen mencionada pelo IPMA, são abrangidos por um clima temperado com inverno chuvoso, verão seco e quente, com uma temperatura média anual de 12.1-13°C e uma precipitação acumulada anual de 1.401-1.600 mm. (IPMA, 2017). Assim, para elaboração desta dissertação de mestrado foi realizado um estudo sobre Leishmaniose e Babesiose em cães pertencentes aos concelhos de Lamego, Peso da Régua e Tarouca.

## II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. Babesiose Canina

A Babesiose Canina (ou piroplasmose) é uma doença parasitária de cariz zoonótico causada por um protozoário intraeritrocitário (piroplasma) pertencente à ordem Piroplasmida, filo Apicomplexa, família Babesiidae e género *Babesia* (Rios & Ríos, 2011). Para haver transmissão do protozoário são necessários dois intervenientes: um hospedeiro invertebrado (carraça) e um hospedeiro vertebrado (ser humano, animais selvagens, silvestres e animais domésticos) (Chauvin, Moreau, Bonnet, Plantard & Malandrin, 2009).

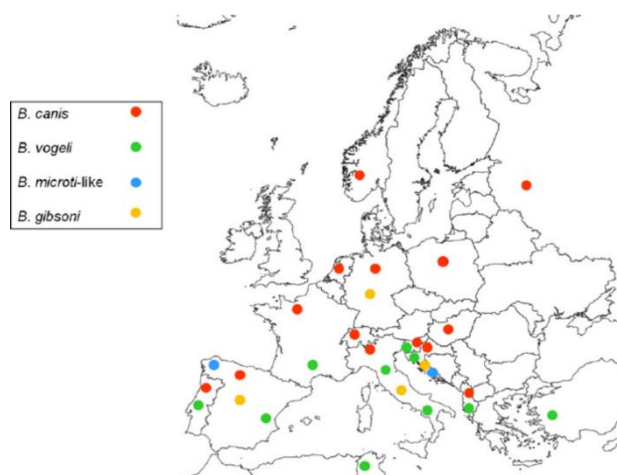
Antigamente as espécies de *Babesia* eram classificadas de acordo com a morfologia apresentada por visualização microscópica das formas presentes no esfregaço sanguíneo, e foram divididas em duas formas distintas: grandes dimensões (2,5x5 µm) onde pertencem as espécies *Babesia canis* (*B.canis*), *Babesia vogeli* (*B. vogeli*) e *Babesia rossi* (*B.rossi*) e as de pequenas dimensões (1x2,5 µm), das quais fazem parte: *Babesia conradae* (*B.conradae*) e *Babesia microti-like* (*B. microti-like*) (Solano-Gallego *et al.*, 2016). No passado era defendido que todas as formas de *Babesia* spp. de grandes dimensões deveriam ser classificados como *B. canis*, não sendo a *B. rossi* e a *B. vogeli* consideradas espécies independentes. Atualmente são consideradas espécies distintas uma vez que apesar de apresentarem morfologia muito similar, possuem distribuição geográfica, genótipo, vetor e apresentação clínica diferentes. Tendo em conta um estudo realizado em sete cães diagnosticados com babesiose (seis cães esplenectomizados e um animal não esplenectomizado que se encontrava a realizar quimioterapia para tratar um linfoma) foi possível descobrir uma nova espécie de *Babesia* spp. pertencente ao grupo de grandes dimensões, ainda sem nome atribuído mas geneticamente semelhante a *Babesia bigemina* que parasita habitualmente bovinos. Esta descoberta foi fruto da ampliação e sequenciação da subunidade do ácido ribonucleico ribossomal nuclear 18S (ácido ribonucleico ribossomal-rRNA) de *Babesia* spp. detetada (Sikorski *et al.*, 2010). Como foi anteriormente referido o vetor difere entre espécies, sendo que *B. canis* tem como vetor o ixodídeo *Dermacentor reticulatus*, *B. rossi*, *Haemaphysalis leachi* e *B. vogeli*, *Rhipicephalus sanguineus* (Chauvin *et al.*, 2009). Acreditava-se que apenas *Babesia gibsoni* pertencia ao grupo de pequenas dimensões (1x2,5 µm) (Solano-Gallego & Baneth, 2011), mas devido a estudos moleculares concluiu-se que fazem parte mais duas espécies: *Babesia conradae* e *Babesia microti-like*, também conhecida por *Theileria annae*. Os vetores destas espécies são respetivamente: *Rhipicephalus sanguineus* para *B. gibsoni* e *B. conradae*, e *Ixodes hexagonus* ou *Ixodes canisuga* para *B. microti-like* (Solano-Gallego *et al.*, 2016).

Igualmente pertencente ao filo Apicomplexa, e desta forma também transmitido por carraças, *Theileria* é um género de parasitas que pode ser confundido com *Babesia* spp., no entanto,

podem ser distinguidos tendo em conta os locais de multiplicação quando presentes no hospedeiro vertebrado e o modo de transmissão por parte do hospedeiro invertebrado. Desta forma, é de salientar que *Babesia* spp. apenas se multiplicam dentro dos eritrócitos do hospedeiro vertebrado e são transmitidos pelo ixodídeo por modo transovário e transtadial. Já *Theileria* spp. só se transmitem pelo ixodídeo por modo transtadial, e no hospedeiro vertebrado, ao contrário do que acontece com a outra forma parasitária, primeiro ocorre multiplicação a nível dos linfócitos e, só depois, nos eritrócitos (Chauvin *et al.*, 2009).

Os casos de Babesiose Canina (BC) são encontrados em diversas áreas geográficas e apresentam elevada significância na Europa. As espécies *B. gibsoni* e *B. vogeli* têm uma elevada distribuição geográfica mundial. No que respeita a *B. canis* é a espécie mais detetada na Europa (Solano-Gallego & Baneth, 2011), encontrando-se distribuída desde Portugal até norte e leste da Europa. A justificação pode passar pela abundância do seu hospedeiro invertebrado, *Dermacentor reticulatus*, nesta área. As formas adultas de *D. reticulatus* são mais ativas nos meses de inverno (outubro a março), desde que não seja um inverno muito rigoroso, e a hibernação ocorra quando a temperatura ambiente se mantém inferior a 6°C. Estes têm preferência por locais com vegetação e solarengos, podendo ser frequentemente encontrados na berma de caminhos de campo aberto e pastagens perto de florestas. As formas adultas deste hospedeiro parasitam maioritariamente o cão, enquanto as formas imaturas parasitam habitualmente roedores selvagens, que por serem endófilos têm mais acesso a este tipo de animais. Para além da espécie acima mencionada, muitas outras espécies de *Babesia* são possíveis de se encontrar na Europa tais como: *B. vogeli* que pode ser encontrada em Portugal, Espanha, Grécia, Sérvia, França, Eslovénia, Itália e Turquia; *B. gibsoni* distribuída pela Sérvia, Reino Unido, Eslováquia, Alemanha, Espanha e Croácia; e ainda *B. microti-like* já relatada em Portugal, Suíça, Espanha, Croácia, Itália e Sérvia (Solano-Gallego, Sainz, Roura, Estrada-Pena & Miro, 2016). Foi realizado um estudo na Hungria, onde foram analisadas 650 amostras de sangue pertencentes a animais de áreas urbanas e rurais, e através da medição do nível de Ac's anti *B. canis* (por IFI) foi possível detetar que animais com idades entre 3 e 5 anos foram os que apresentaram maiores níveis de Ac's e que cães das raças Pastor alemão (apresenta predisposição genética para Babesiose crónica) e Komondor (são fenotipicamente apropriados para exposição às carraças) foram as raças mais afetadas com BC (Hormok, Edelhofer, & Farkas, 2006). A distribuição das espécies de *Babesia* spp. responsáveis pela etiologia de Babesiose Canina na Europa encontra-se representada na figura 7.

Figura 1 - Distribuição das espécies de *Babesia* sp. responsáveis pela etiologia de Babesiose Canina na Europa, determinadas por análise molecular (Solano-Galego & Baneth, 2011).



Os principais vetores de *Babesia* spp. detetados na Europa (para além de *Dermacentor reticulatus* anteriormente mencionado) são: *Rhipicephalus sanguineus* (também conhecido por carraça castanha) e *Ixodes hexagonus*. O ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus* é altamente abundante em climas temperados (áreas do Mediterrâneo) e pode igualmente ser descoberto em regiões mais frias da Europa Central e das Ilhas Britânicas. Podem habitar em zonas urbanas pois nestes locais é providenciada a humidade relativa necessária para o seu desenvolvimento através de irrigações artificiais existentes (ex.: fontes de água). É igualmente possível a sua deteção nas margens dos rios onde habitem carnívoros selvagens entre maio e agosto. Uma vez que o último estágio de desenvolvimento deste parasita ocorre entre agosto e setembro, uma grande quantidade de larvas pode passar despercebida durante os meses de verão. Outro vetor encontrado é *Ixodes hexagonus*, um possível transmissor de *B. microti-like* que parasita maioritariamente ouriços e carnívoros selvagens, nomeadamente a raposa (Solano-Gallego *et al.*, 2016).

Foram realizados dois estudos com o objetivo de determinar quais as espécies de *Babesia* spp. e quais os principais vetores das mesmas nos canídeos domésticos em Portugal. O estudo “Babesiose Canina e caracterização molecular de co-infeções transmitidas por vetores” foi elaborado com o intuito de estudar as principais espécies de *Babesia* spp. no cão em Portugal. Para isto utilizaram-se 45 cães com suspeita de BC no norte de Portugal (mais propriamente em Trás-os-Montes e Alto Douro) com idades compreendidas entre os dois meses e os dois anos de vida, de várias raças e de ambos os sexos durante um período compreendido entre outubro

de 2007 e março de 2009. As espécies de *Babesia* spp. foram identificadas através da visualização microscópica no esfregaço sanguíneo obtido pelos cães em estudo e por reação em cadeia de polimerase (“*polymerase chain reaction*” – PCR). Com a elaboração do estudo concluiu-se que 44 cães (98%) tinham *B. canis*, sendo desta forma considerada a principal espécie do género *Babesia*, e apenas num cão (2%) foi encontrado *B.vogeli*; *Dermacentor reticulatus* foi considerado o vetor de *B.canis* enquanto *R.sanguineus* foi considerado o vetor de *B.vogeli*. O Podengo foi a principal raça onde foi encontrada BC e novembro foi o mês com mais diagnósticos (Cardoso *et al.*, 2010). O estudo “Detecção molecular de bactérias e parasitas em carraças em Portugal” foi elaborado através da remoção de 925 carraças (no período compreendido entre maio de 2012 e maio de 2013) em cães (620 carraças foram removidas de 116 cães), gatos (42 carraças foram removidas de 14 gatos) e vegetação (263 carraças removidas em Faro durante três dias consecutivos) de quatro distritos de Portugal: Lisboa, Setúbal, Faro e Guarda. A espécie das carraças foi determinada através da utilização de chaves morfológicas e verificaram que a espécie *Rhipicephalus sanguineus* foi a mais prevalente (Maia, Ferreira, Nunes, Vieira, Campino & Cardoso, 2014).

A Babesiose Humana (BH) é uma doença zoonótica emergente e limitada a algumas áreas geográficas. Nos últimos 30 anos tem-se verificado um aumento do número de casos nos Estados Unidos, que pode ser justificado pelo aumento de atividades realizadas no exterior das habitações e pelo aumento das populações de veados de cauda branca (por aumento de reprodução e por diminuição da caça nas mesmas), que serve de alimento para os ixodídeos. A prevalência desta doença é muito difícil de apurar uma vez que a maior parte dos indivíduos infetados são assintomáticos, no entanto, existem casos relatados de BH a Nordeste e Noroeste dos Estados Unidos e descrições esporádicas noutros estados. Na Europa e na Ásia é pouco frequente. Em 1957, em terreno europeu, nomeadamente na Jugoslávia, foi detetada *B. bovis* num agricultor anteriormente esplenectomizado. Desde então, apenas 40 casos foram reportados e encontravam-se distribuídos pela Irlanda, Reino Unido e França, todos eles afetando pessoas esplenectomizadas. A principal espécie de *Babesia* detetada nos Estados Unidos é *B. microti* e o principal vetor é *Ixodes scapularis*, no entanto, foram detetadas outras espécies de *Babesia* como *B. divergens*, *Babesia* sp.CA1 e *B.divergens-like*. Já na Europa foram detetadas *B. divergens* e *B. bovis*, ambas com *I. ricinus* como vetor (Burke, 2016), e também *B. microti* e *Babesia venatorum*. Neste âmbito destaca-se a ocorrência de um caso fatal de babesiose humana provocado por *B. divergens* ocorrido em Portugal em 1998. Este indivíduo de 66 anos era esplenectomizado e aquando da consulta apresentava febre, anorexia, náusea e dor abdominal (Centeno-Lima *et al.*, 2003). Na Coreia do Sul foi encontrada *Babesia* sp. (de

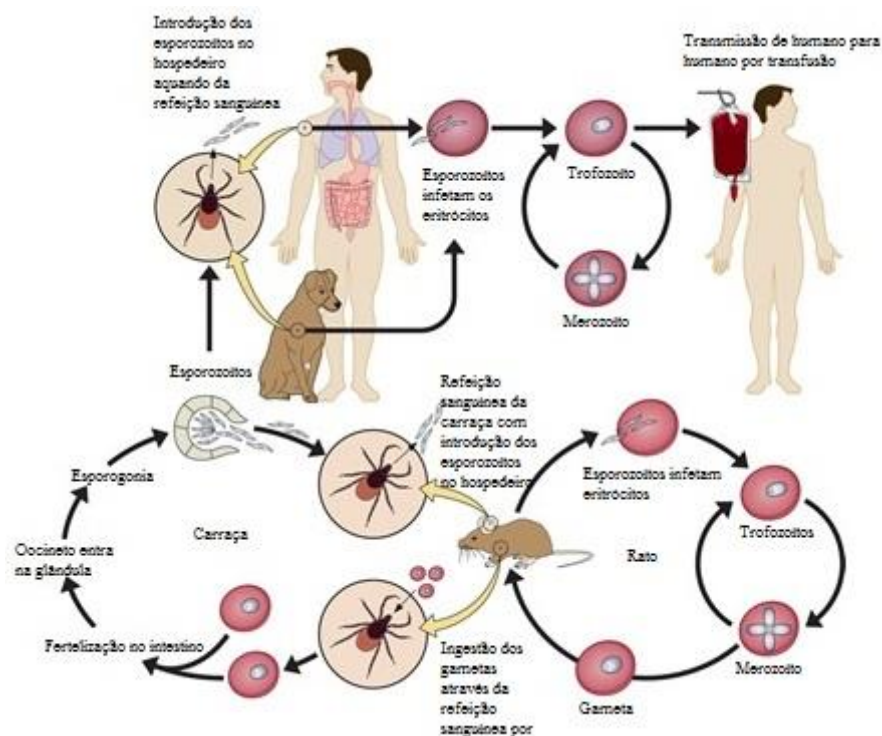
ovinos) em pessoas com babesiose (Schnittger, Rodriguez, Florin-Christensen, & Morrison, 2012).

O homem funciona como hospedeiro acidental após a mordedura do ixodídeo (larva, ninfa ou adulto, com o maior número de casos a ocorrer por alimentação da ninfa) (Burke, 2016) e os roedores e animais de grande porte, quer domésticos quer silvestres, funcionam como hospedeiros reservatórios. Para além da picada da carraça são cada vez mais frequentes relatos de pessoas que contraem BH após transfusão sanguínea (Schnittger *et al*, 2012). Relativamente ao ciclo de vida de *B. microti*, o rato de patas brancas é considerado o hospedeiro reservatório. Este serve de alimento para as formas larvares do ixodídeo, que ao realizarem a sua alimentação hematófaga de um rato infetado tornam-se portadoras. Quando fizerem a transformação para ninfas, realizam transmissão transtadial da *B. microti* perpetuando o parasitismo. As ninfas alimentam-se de ratos ou do ser humano (se disponível) e maturam durante o outono. As formas adultas de *I. scapularis* alimentam-se a partir de veados de cauda branca durante a primavera, colocando os ovos e morrendo após a refeição. Desta forma, conclui-se que os ratos de patas brancas perpetuam *B. microti* enquanto a gazela de cauda branca apenas perpetua a população de ixodídeos adultos, uma vez que não serve como hospedeiro para a espécie de *Babesia*, e apenas serve de alimento para a forma adulta de *I. scapularis* (Burke, 2016).

Indivíduos relatados com BH apresentam normalmente história de viagem nos meses compreendidos entre maio e setembro para zonas endémicas (altura em que as ninfas se alimentam) e a doença apresenta um período de incubação de 1 a 3 semanas (embora existam casos até 9 semanas) após a picada da carraça. O quadro clínico da doença é variado, havendo casos completamente assintomáticos e outros com sinais pouco específicos como febre, anorexia, fadiga, mialgias, arrepios, vômitos, dor abdominal, entre outros, que pode confundir com doença viral ou malária (Burke, 2016).

Também os animais selvagens e silvestres são afetados por Babesiose, tendo sido diagnosticada numa série de espécies como leão, pantera, lince, elefante, girafa, antílope, búfalo, várias espécies de veado, guaxinim, hiena, lobo, rinocerontes, e algumas espécies de pássaros tais como gaivotas e Kiwi. As espécies de *Babesia* diagnosticadas nos animais selvagens podem ser específicas para a espécie, como é o caso da *Babesia leo* em leões e *Babesia bicornis* em rinocerontes, ou então podem ser espécies de *Babesia* tipicamente encontradas em espécies domésticas, como acontece com *B. bigemina* presente em veados ou *B. canis* presente em lobos. Tal como acontece nas outras espécies acredita-se que a prevalência da doença é elevada, mas com uma manifestação maioritariamente subclínica passando desta forma despercebida (Schnittger *et al.*, 2012).

Figura 2- Ciclo biológico de *Babesia* spp. (Kevin & Petersen, 2013)



Como foi anteriormente referido o ciclo biológico do protozoário responsável pela Babesiose Canina (Figura 8) necessita de dois hospedeiros intervenientes. O hospedeiro vertebrado infeta-se através da introdução de esporozoítos (forma infetante de *Babesia* spp.) aquando da refeição hematófaga por parte da carrça (larva, ninfa e adulto). Através da maturação dos esporozoítos (nas glândulas salivares) são originados trofozoítos (em forma de anel) que parasitam os eritrócitos do hospedeiro vertebrado e originam por divisão binária (reprodução assexuada) dois merozoítos (estes em forma de pêra). Esta fase designa-se por merogonia. Os dois merozoítos previamente originados podem sofrer divisão até oito ou mais formas parasitárias no eritrócito do hospedeiro vertebrado e, desta forma, conduzir à lise do mesmo. Quando ocorre lise do eritrócito, os merozoítos migram em direção a outro eritrócito e assim sucessivamente. No momento em que os merozoítos param a sua divisão originam pré-gametócitos (Chauvin *et al.*, 2009).

Quando a carrça realiza a sua refeição sanguínea num animal infetado pode ingerir eritrócitos com pré-gametócitos que, posteriormente, se diferenciam em gametócitos no intestino da mesma. Os gâmetas sofrem fusão e conduzem ao aparecimento de um zigoto (8-10  $\mu$ m) finalizando assim a fase da gametogonia. O zigoto previamente formado invade as células intestinais da carrça e origina um oocineto (com forma móvel) tendo desta forma início a meiose (esporogonia). O oocineto pode migrar para os ovários do hospedeiro invertebrado

conduzindo assim à infecção dos mesmos. Assim as formas de *Babesia* (*Babesia sensu strictu*) podem ser transmitidas à descendência do hospedeiro invertebrado infetado. Para além dos ovários, os oocinetos podem dirigir-se para as glândulas salivares da carraça (Solano-Gallego *et al.*, 2016).

Para além da forma acima referida, este parasita pode ser transmitido ao cão por transfusão sanguínea (verificado na espécie *B. gibsoni*), por transmissão vertical nas fêmeas gestantes (sendo por este motivo aconselhável não cruzar fêmeas com BC) e por ingestão de sangue ou saliva de animais infetados em animais de luta (principalmente em Pit Bull Terriers) (Solano-Gallego *et al.*, 2016).

A manifestação de sinais clínicos depende em larga escala de alguns fatores como: espécie de *Babesia*, idade do animal, estado imunitário do mesmo e existência de doenças concomitantes (Solano-Gallego *et al.*, 2016).

Como foi referido anteriormente, os sinais clínicos diferem consoante a resposta imunitária por parte do hospedeiro e a espécie de *Babesia* presente (Köster, Lobetti, & Kelly, 2015), podendo manifestar-se desde infecção subclínica a falência multiorgânica (Solano-Gallego *et al.*, 2016). Esta doença tem 10 a 28 dias de período de incubação podendo os primeiros sinais clínicos serem manifestados após este período (Köster *et al.*, 2015). Os achados clínicos dependem da espécie parasitária que causa a doença, uma vez que a virulência varia entre espécies. Deste modo considera-se que *B. vogeli* é pouco virulenta, *B. rossi* é muito virulenta, *B. canis* é moderadamente virulenta, ao passo que *B. gibsoni* e *B. microti-like* têm um espectro de virulência que varia de grave a moderado (Solano-Gallego *et al.*, 2016). Existem achados clínicos que são associados a todas as espécies deste parasita: anemia hemolítica intra e extravascular (sinal mais característico de Babesiose) hipertermia, anorexia, letargia, esplenomegalia, palidez das mucosas (Figura 9), hematúria (Figura 10) (Irwin, 2010), linfadenomegalia, icterícia e fraqueza (Solano-Gallego *et al.*, 2016) e sinais que variam consoante a espécie de *Babesia*. Por exemplo, *B. vogeli* apresenta habitualmente anemia que varia de grave a moderada em cachorros, enquanto em adultos se pode manifestar de forma subclínica; *B. rossi* é comumente associada a: nefropatia aguda ou crónica, glomerulonefrite, coagulação intravascular disseminada (CID), vômitos, diarreia, pancreatite, ascite, uveíte ou cegueira, mialgia e rabdomiólise (Solano-Gallego *et al.*, 2016). Tal como supramencionado a anemia hemolítica é um sinal associado a todas as espécies de *Babesia* e ocorre por destruição eritrocitária que vai de moderada ( $0,15 \leq \text{hematócrito (Htc)} \leq 0,30 \text{ L/L}$ ) ou grave ( $\text{Htc} < 0,15 \text{ L/L}$ ). Em animais com *B. canis* mesmo quando se verifica uma parasitémia baixa, a anemia pode ser grave, o que sugere que possam existir nos organismos outros fatores não parasitários a influenciar a anemia, como é o caso de problemas imunomediados (Köster *et al.*, 2015). Nos

casos graves de Babesiose Canina pode estar presente a síndrome de reposta inflamatória sistêmica (SRIS) e podem também ser encontrados: hepatopatia, insuficiência renal aguda, síndrome de *stress* respiratório agudo, rabdomiólise, disfunção miocárdica, pancreatite e babesiose cerebral (Köster *et al.*, 2015).

Os animais infetados com *B. gibsoni* manifestam sinais moderados na fase aguda da doença, mas também podem apresentar anemia grave. A maioria dos cães com *B. gibsoni* encontram-se letárgicos, com história de anorexia, analiticamente positivos ao teste de Coomb's, com anemia regenerativa, trombocitopénia mas com perfil de coagulação normal e sem existência de sinais clínicos de hemorragia. Num Labrador Retriever com esta espécie parasitária foi diagnosticado nefropatia com perda de proteína e foi também descrito um caso de vasculite cutânea secundária a *B. gibsoni* num Samóiedo que apresentava alopecia generalizada, necrose cutânea dos membros anteriores e presença de pápulas e erosões nas orelhas. Acredita-se que estas lesões tenham sido provocadas pela ligação de imunocomplexos à parede dos vasos sanguíneos (Köster *et al.*, 2015)

Figura 3- Palidez das mucosas num cão diagnosticado com Babesiose Canina (Original).



Figura 4 - Hematúria observada num Boxer diagnosticado com Babesiose Canina (Original).



O diagnóstico deve ter em conta os sinais encontrados aquando a realização do exame físico e da anamnese, sendo que se deve suspeitar de BC sempre que no exame físico são detetados sinais como: letargia, hematúria, hipertermia e quando se deteta anemia e trombocitopenia no hemograma (Irwin, 2010). É de salientar a importância de uma correta anamnese pois através de dados como a época do ano, a presença de carraças no animal (Cardoso *et al.*, 2010), a existência de lesões compatíveis com mordeduras por outros cães ou a realização de viagens para áreas endémicas de Babesiose Canina podem fazer suspeitar desta doença (Reine *et al.*, 2005). Como auxílio ao mesmo podem ser realizadas análises, como o hemograma, que em caso de infeção pode apresentar anemia hemolítica grave a moderada, policromasia, anisocitose, leucocitose com neutrofilia, linfopenia, monocitose, e se a espécie parasitária for *B.gibsoni* será ainda expectável que ocorra hemoconcentração (Dantas-Torres & Figueredo, 2006); estudo bioquímico a partir do qual se pode constatar hipoalbuminemia, hiperbilirrubinemia, e se *B.gibsoni* está presente, acidose metabólica (Irwin, 2010). Para além destes pode-se recorrer à realização de um esfregaço de sangue com visualização do mesmo ao microscópio ótico (MO), onde podem ser observadas formas intraeritrocitárias de *Babesia* spp. quando aquele é corado com *Wright* ou *Giemsa*. Este método é considerado de eleição para o diagnóstico uma vez que é muito específico, fácil, barato de realizar e com elevada sensibilidade quando presente a fase aguda da infeção. No entanto, quando existem baixos níveis de parasitemia a sensibilidade é mais diminuta (Irwin, 2009). As formas de *Babesia* spp. de grandes dimensões são facilmente detetadas em amostras de sangue periférico (removido do pavilhão auricular ou da unha) ou por exame de células da camada flogística presentes no hematócrito (Bohm, Leisewitz, Thompson, & Schoeman, 2006). Quando os animais estão assintomáticos ou padecem de infeções crónicas, o diagnóstico é mais difícil uma vez que apresentam baixo nível de parasitemia e as formas parasitárias são muitas vezes invisíveis no esfregaço sanguíneo (por serem intermitentes). Nestes casos o teste molecular mais sensível é a reação em cadeia de polimerase (“*polymerase chain reaction*” – PCR), uma vez que permite

deteção de casos agudos e a determinação da espécie de *Babesia*. O teste serológico mais utilizado é o teste de imunofluorescência indireta (“*indirect fluorescent antibody test*” – IFAT), uma vez que é o teste mais específico para *Babesia* spp., no entanto, tem como desvantagem não ser capaz de diferenciar infecção aguda de crónica. Quando são realizados testes epidemiológicos o teste serológico mais utilizado é o Ensaio de Imunoabsorção Enzimático (“*enzyme-linked immunosorbent assay*” – ELISA) (Solano-Gallego & Baneth, 2011). A IFAT e a PCR são testes altamente sensíveis e moderadamente específicos para anticorpos anti-*Babesia* spp. A PCR apesar de ter uma sensibilidade e especificidade de 100% tem como desvantagem a necessidade de ser realizada num laboratório com equipamento especializado (Dantas-Torres & Figueredo, 2006).

Na terapêutica devemos ter em conta quatro fatores: a realização de transfusão sanguínea se anemia grave, o tratamento e eliminação do parasita, restauração das alterações metabólicas e ainda controlo sob os ixodídeos. Quando presente: *B. canis*, *B. rossi* ou *B. vogeli* o tratamento farmacológico mais utilizado é Dipropionato de Imidocarb (7,5mg/kg, por via intramuscular (IM), SID ou 7 mg/kg, IM, BID, durante 14 dias (Köster *et al.*, 2015), sendo que quando presente *B. canis* ou *B. vogeli* a administração instituída deve ser repetida 15 dias depois (Solano-Gallego *et al.*, 2016). Este fármaco interfere com a produção e/ou utilização de poliaminas e na prevenção da absorção de inositol para dentro do eritrócito parasitado (Dantas-Torres & Figueredo, 2006). Pode ter como efeitos adversos: dor no local da administração, sialorreia, vômitos e diarreia. Quando utilizado numa dose acima da padronizada pode ocorrer necrose hepática (Köster *et al.*, 2015). De forma a combater os efeitos colinérgicos pode-se administrar Atropina (0,04 mg/kg) dez minutos antes da administração do Dipropionato de Imidocarb (Dantas-Torres & Figueredo, 2006). Para além deste, segundo Dantas-Torres e Figueiredo, a aplicação única de Diaminazina (2,5-3,5mg/kg, IM ou subcutâneo (SC)) parece ter efeito quando *B. canis* é a espécie presente. Este fármaco interfere com a glicólise e síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA) do parasita (Dantas-Torres & Figueredo, 2006). Quando ultrapassa as doses aconselhadas pode provocar alguma toxicidade a nível do sistema nervoso (Köster *et al.*, 2015).

Quando presente *B. gibsoni* podem ser instituídos alguns protocolos terapêuticos como: utilização de Diaminazina, na mesma dosagem e via anteriormente mencionadas com duas tomas separadas por 24 h (Köster *et al.*, 2015), que embora não seja tão eficaz como para o tratamento de *B. canis*, diminui a parasitémia, morbidade e mortalidade da doença. Para além deste pode ser utilizado: Dipropionato de Imidocarb (mesma dosagem e via anteriormente referidas) e Azitromicina (10 mg/kg, PO, SID, 10 dias) juntamente com Atovaquona (13,5 mg/kg, PO, TID, 10 dias). Uma administração única desta combinação demonstrou redução da

parasitemia abaixo do limite inferior de detecção por PCR. Esta combinação pode igualmente ser utilizada quando presente *B. conradae* e *B. microti-like* (Solano-Gallego *et al.*, 2016). A utilização de Buparvaquona (5 mg/kg, IM, com repetição da dose 48 horas depois) tem apresentado melhores resultados clínicos em animais parasitados com *B. microti-like*. comparativamente com o uso de Atovaquona (Solano-Gallego *et al.*, 2016).

Ainda que não seja de primeira escolha, de forma a evitar resistência a antibióticos (AB) podem ser utilizadas duas combinações no tratamento de *Babesia* spp.: Doxiciclina (5mg/kg, PO, duas vezes por dia) + Clindamicina (25mg/kg, PO, duas vezes por dia) + Metronidazol (15mg/kg, PO, duas vezes por dia) ou Doxiciclina (7-10 mg/kg, PO, duas vezes por dia) + Enrofloxacin (2-2,5 mg/kg, PO, duas vezes por dia) + Metronidazol (5-15 mg/kg, PO, duas vezes por dia). Ambos os protocolos devem ser instituídos durante seis semanas, após os quais se deve parar doze semanas (Solano-Gallego *et al.*, 2016).

Em animais internados, para além do tratamento farmacológico anteriormente referido, deve ser realizada uma terapêutica de suporte consoante as necessidades do paciente. Se o animal estiver desidratado ou hipovolêmico deve ser realizada fluidoterapia de forma a normalizar o volume sanguíneo, controlar a diurese com fluídos cristaloides, e também realizar a correção de desequilíbrios hidro-eletrolíticos e dos parâmetros ácido-base se existentes. Quando a anemia está presente, deve proceder-se à transfusão de eritrócitos ou de hemoglobina sintética, mas, se por sua vez o animal tiver Coagulação Intravascular Disseminada (CID) deve ser realizada uma transfusão de plasma. Um animal com BC que se encontre estável não deve ficar internado e deve apenas fazer um tratamento com anti-protozoário. Animais com Htc ou volume plaquetário inferior a 15% ou 40.000 / $\mu$ l respetivamente, apresentam geralmente bom prognóstico quando instituído apenas tratamento anti-protozoário. Quando o animal apresenta hemorragias espontâneas ou desmaios após o tratamento anti-protozoário deve ser testado para Anemia Hemolítica Imunomediada (AHIM) (quando presente é positivo ao teste de Coombs', existe presença de auto-aglutinação e detecção de Ac's anti-eritrócitos) e para trombocitopenia imunomediada (valor de plaquetas no intervalo 20.000 a 40.000/  $\mu$ l). Se alguma das patologias se encontrar presente deve ser administrada Prednisona (2mg/kg/ dia, durante 10 dias). A principal causa de morte de um animal com AHIM é o tromboembolismo pulmonar e por este motivo é aconselhável instituir como medida profilática Clopidogrel, Heparina ou Ácido Acetilsalicílico (Solano-Gallego *et al.*, 2016).

Um cão com Babesiose pode apresentar coinfeção com várias espécies de *Babesia* ou com outros agentes distintos, dependendo da sua localização geográfica e da disponibilidade dos respetivos vetores. Na África do Sul foram relatados casos de cães com BC provocada por *B. rossi* e *B. vogeli* e outros casos com *B. rossi*, *B. vogeli* e ainda *Ehrlichia canis*. Em áreas

endêmicas podem ser encontradas coinfeções com *Leishmania* spp., *Ehrlichia/Anaplasma* spp., *Hepatozoon* spp. ou *Rickettsia conori*. A presença de coinfeções pode justificar uma maior dificuldade na realização de um correto diagnóstico, reduzir a eficácia da terapêutica aplicada e ainda complicar o prognóstico (Solano-Gallego *et al.*, 2016).

O prognóstico desta doença não é linear uma vez que difere consoante a espécie de *Babesia* diagnosticada. Em animais cuja doença é provocada por *Babesia* spp. de grandes dimensões (*B. canis*, *B. vogeli* e *B. rossi*) a resposta clínica costuma ser mais eficaz e mais rápida (com início em 24-48 horas) comparativamente com *Babesia* spp. de pequenas dimensões (*B. microti-like* e *B. gibsoni*). Desta forma demonstram francas melhorias no período entre 1 a 7 dias após tratamento adequado, havendo alguns casos que apenas evidenciam melhorias 15 dias após o mesmo. Animais com *B. canis* costumam recuperar na totalidade após tratamento apropriado apresentando um baixo índice de mortalidade. A morte do animal acontece por determinadas alterações provocadas pelo agente: anemia moderada, trombocitopenia grave, leucopenia grave a moderada, hiperlactatemia, aumento moderado das concentrações de fosfato e triglicéridos e ainda por descida moderada das concentrações plasmáticas totais. Animais tratados com combinação de Azitromicina e Atovaquona para combater *B. gibsoni* não apresentam reincidências habituais e podem manter-se negativos ao PCR durante um longo período de tempo. Estes animais podem resolver completamente a anemia decorrente da doença sem posterior recidiva, ou ocasionalmente podem permanecer com anemia moderada, trombocitopenia ou hipergamaglobulinemia persistentes. Alguns animais, que aparentemente tinham recuperado da doença quando sujeitos a situações de *stress*, podem apresentar recidivas (muito comum em cães esplenectomizados). Uma vez que não existe nenhum tratamento considerado 100% eficaz para *B. microti-like* acredita-se que o desenvolvimento clínico seja similar ao que ocorre em cães parasitados com *B. gibsoni*. De uma forma geral animais parasitados com esta espécie desenvolvem uma fraca resposta a protocolos terapêuticos que utilizem Dipropionato de Imidocarb. Desta forma, e com objetivo de melhorar a resposta terapêutica, têm-se instituído combinações de Atovaquona ou Buparvaquona com Azitromicina (Solano-Gallego *et al.*, 2016).

A principal medida profilática passa por um controlo apertado aos ixodídeos, principalmente nas áreas onde seja mais provável o aparecimento deste ectoparasita. Este controlo deve ser realizado durante todo o ano, mas principalmente durante os meses decorrentes entre a primavera e o outono. Para tal podem ser utilizados ectoparasiticidas externos sob a forma de coleiras: Scalibor®, MSD ou Seresto®, Bayer (que têm como duração média 6-8 meses – abordado no capítulo de “Leishmaniose Canina”) (Solano-Gallego *et al.*, 2016).

Existem também ectoparasiticidas sob a forma de *spot-on* ou unção punctiforme, como por exemplo Advantix®, Bayer (abordado no capítulo de “Leishmaniose Canina”) ou Frontline®, Merial constituído por Fipronil como substância ativa que atua em todas as fases do ciclo biológico e que possui uma ação adulticida provocando uma hiperexcitação a nível do sistema nervoso central (SNC) da carraça eliminando-a até 48 horas após a aplicação. Para além desta existe ainda a associação de Fipronil com S-metropeno (Frontline Combo®) funcionando este último como inibidor de crescimento, uma vez que interrompe o ciclo biológico da carraça, não permitindo o desenvolvimento dos ovos e da larva (Merial, s.d.).

Fármacos em *spray* também podem ser utilizados e exemplo disso é o spray Frontline®, Merial também com Fipronil como substância ativa (frasco de 100ml- 6-12 pulverizações/kg de cão ou frasco de 250ml e 500ml- 2 a 4 pulverizações/kg). Promove uma eficácia de 44 dias após aplicação e resistência à água (Merial, s.d.). Um fator importante na escolha do ectoparasiticida é a sua resistência à água (Solano-Gallego *et al.*, 2016).

Para além das formas anteriormente mencionadas, podem ainda ser utilizados champôs, como por exemplo Taberdog®, DFV. A junção do champô com a água permite a remoção de ovos e fezes dos parasitas. De ressaltar que devem apenas ser aplicados uma vez por semana, pois em excesso conduzem à desidratação da pele (Solano-Gallego *et al.*, 2016).

Ainda no controlo da presença de carraças no animal, deve ser aconselhado ao proprietário verificar a existência de carraças vivas presas ao animal e se tal ocorrer, deve ser recomendada a remoção das mesmas o mais cedo possível (Solano-Gallego *et al.*, 2016), uma vez que demora no mínimo 48 horas a transmissão de *Babesia* spp. (Köster *et al.*, 2015). No mercado europeu está a ser comercializada uma vacina denominada por Pirodog®, Merial, que pode ser administrada a partir dos 5 meses de vida com revacinação anual. Apesar de apenas garantir proteção para *B. canis* e não prevenir o aparecimento da doença, mas sim o controlo da gravidade dos sinais clínicos (Solano-Gallego *et al.*, 2016) apresenta uma eficácia de 70 a 100% (Köster *et al.*, 2015). Para além da vacina anteriormente mencionada também a Novibac Piro®, Schering-Plough, está a ser comercializada em Portugal. Esta vacina pode ser administrada a partir dos 6 meses de vida com uma segunda toma 3-6 semanas depois e com revacinação de 6 em 6 meses (Schering-Plough, s.d.). Uma vez que esta doença pode ser transmitida através da transfusão sanguínea, todos os cães dadores devem ser testados por PCR ou por esfregaço de sangue, e excluídos todos os positivos aos testes (Solano-Gallego *et al.*, 2016). Estudos experimentais sugerem que uma única toma de Dirpropionato de Imidocarb (6mg/kg) pode conferir proteção contra *B. canis* durante 8 semanas (Irwin, 2009). De referir que o título de Acs anti-*Babesia* spp. começam a diminuir 5 meses após a infeção por BC (Köster *et al.*, 2015).

Também se estima que o uso de Doxiciclina (5 mg/kg, PO, SID) diminua a gravidade dos sinais clínicos causados por *B. canis* (Vercammen, De Deken, & Maes, 1996).

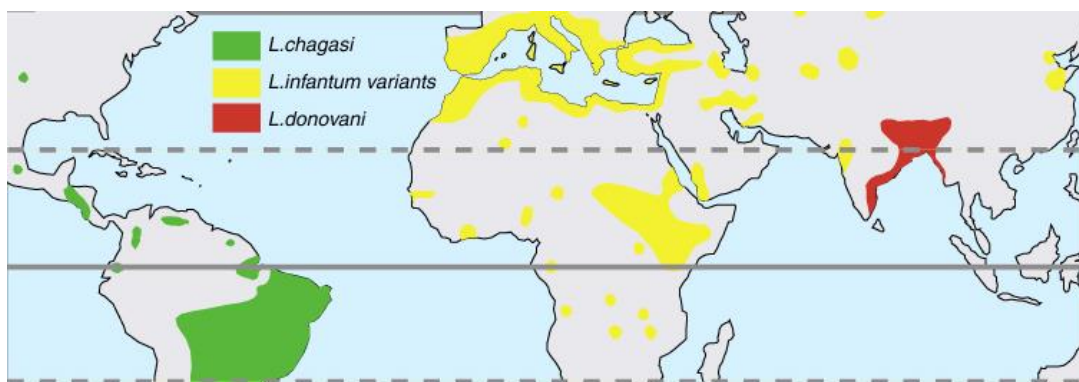
## 2. Leishmaniose Canina

A Leishmaniose é uma doença parasitária que afeta humanos, animais domésticos, silvestres e selvagens. O cão é considerado o principal hospedeiro reservatório da mesma (Campino & Maia, 2010). Esta doença tem como agente causal um protozoário intracelular do reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, sub-filo Mastigophora, ordem Kinetoplastidae, sub-ordem Trypanosomatina e género *Leishmania* (Siqueira, 2009).

Existem diversas espécies de *Leishmania* nas várias partes do Mundo, que se encontram divididas em países do Novo Mundo e Países do Velho Mundo (Green, 2006). O Novo Mundo engloba a totalidade da América, enquanto o Velho Mundo compreende a Europa, África e Ásia. Nos países pertencentes à bacia mediterrânica, Médio Oriente e Portugal, o principal agente responsável pela Leishmaniose Canina (LCan) é *Leishmania infantum*. Já na América Central e na América do Sul o mais prevalente é *Leishmania chagasi* (Mencke, Volf, Volfova, & Stanneck, 2003). Para *Leishmania* spp. serem transmitidas aos seus hospedeiros vertebrados necessitam de vetores que apresentem capacidade de desenvolvimento completo do parasita e que sejam capazes de transmitir o mesmo após a alimentação num hospedeiro suscetível (Solano-Gallego *et al.*, 2013).

Os vetores são insetos fêmeas pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, sub-família Phlebotominae e géneros *Phlebotomus* e *Sergentomyia* no Velho Mundo, enquanto no Novo Mundo são flebotomos do género *Lutzomyia* (Solano-Gallego *et al.*, 2013). O mapa das áreas geográficas endémicas de *L. infantum*, *L. donovani* e *L. chagasi*, encontra-se representado na figura 1.

Figura 5- Mapa das áreas geográficas endémicas de *L.infantum*, *L.donovani* e *L.chagasi* (Intitute of Tropical Medicine, s.d.)



Existem cerca de 1000 espécies de flebótomos, mas desses, crê-se que menos de 50 espécies sejam capazes de funcionar como vetores em todo o mundo. Desta forma, é possível encontrar diferentes espécies de vetores nos diversos nichos ecológicos e áreas geográficas (Solano-Gallego *et al.*, 2013). Os vetores mais relevantes na Europa são *Phlebotomus perniciosus* e *P. ariasi* (*P. ariasi*) (Campino & Maia, 2010), *P. kyelakii*, *P. langeroni*, *P. longicuspis*, *P. neglectus*, *P. perfiliewi*, *P. syriacus* e *P. tobbi* (Solano-Gallego *et al.*, 2013). Estes apresentam uma coloração que varia do castanho claro a negro, corpo alongado revestido por sedas, asas em forma de V quando se encontram em repouso (Solano-Gallego *et al.*, 2013) e um comprimento compreendido entre 2 a 5 milímetros (Killick-Kendrick, 1999). Apresentam uma metamorfose completa constituída por quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva (com quatro estádios), pupa e adulto (Solano-Gallego *et al.*, 2013). A atividade dos mesmos varia de acordo com a área geográfica, uma vez que os que habitam nos Trópicos e Sub-Trópicos têm um ciclo de vida contínuo, enquanto os que vivem na região Mediterrânea têm um ciclo de vida estacional, nomeadamente durante o período evolvente entre a primavera e o outono (fevereiro a outubro) (Solano-Gallego *et al.*, 2013). As formas adultas apresentam maior atividade nas horas crepusculares e noturnas, uma vez que a temperatura ambiental é menor (Killick-Kendrick, 1999). Estima-se que numa região endémica, um cão possa ser picado 700 vezes numa só noite (Solano-Gallego *et al.*, 2013). São habitualmente encontrados em locais frios, mas com ausência de chuva e vento forte, pouca luminosidade, humidade relativa alta e constante, e uma vez que as fêmeas são hematófagas e os machos se alimentam de néctar das plantas, os locais onde habitam devem ter presente matéria orgânica de origem vegetal, que lhes serve de alimentação. Exemplos desses locais são tocas de animais, minas, jardins, águas estagnadas, entre outros (Rosypal, Zajac & Lindsay, 2003).

A transmissão desta doença ocorre mais nas áreas rurais e na vizinhança próxima das cidades, onde existem casas com jardins ou pátios, que englobam as condições ideais para o desenvolvimento deste vetor, no entanto, é de salientar que cada vez mais aparecem casos de LCan em áreas citadinas (Solano-Gallego *et al.*, 2013). Aquando da alimentação no cão, as fêmeas preferem áreas com pouco pelo, alimentando-se predominantemente na cabeça, ponta do nariz, pavilhão auricular, áreas inguinais e perianais do hospedeiro em causa (Solano-Gallego *et al.*, 2013).

Esta doença parasitária é considerada endémica em cerca de 70 países distribuídos pela Ásia, América Central, América do Sul, África e Europa (Alvar, Canavate, Molina, Moreno, & Nieto, 2004) onde os cães são considerados os principais reservatórios do parasita em causa (Solano-Gallego *et al.*, 2013). Embora LCan possa ocorrer em cães de todas as idades, a seroprevalência apresenta um padrão bimodal, indicando mais animais doentes com menos

de 3 anos e mais de 8 anos, uma vez que estes podem apresentar uma diminuição das suas defesas imunitárias. Para além disto, em áreas endémicas todas as raças de cães são suscetíveis ao parasita, no entanto, estudos apontam que cães como o Pastor Alemão, Rottweiler e Boxer, possam ser raças mais suscetíveis ao mesmo, uma vez que são animais que apresentam mais atividade em locais compatíveis com o desenvolvimento do vetor, a passo que raças como Yorkshire Terrier e Caniche apresentam menos casos de LCan, uma vez que são por norma mais resguardados do ambiente exterior da habitação. Para além disto parece não haver um sexo mais predisposto à doença (Solano-Gallego *et al.*, 2013). Foi verificado que cães com pelagem comprida apresentam uma prevalência menor da LCan comparativamente a cães com pelagem curta (Cardoso, 2016).

Segundo estudos serológicos estima-se que em Espanha, Itália e França existam no mínimo 2,5 milhões de cães infetados (Solano-Gallego *et al.*, 2013). Quanto à situação em Portugal existem casos de LCan distribuídos por todo o país (Campino, 2013), no entanto, tendo como base estudos de seroprevalência realizados nos últimos 25 anos, considera-se que existem algumas regiões endémicas à doença em Portugal, tais como Trás-os-Montes e Alto Douro, Concelho de Évora, Sub-região da Cova da Beira, Algarve, Concelhos do distrito de Coimbra, Sub-região do Pinhal Interior Sul, Distrito de Santarém e ainda Região de Lisboa (envolvendo a Grande Lisboa e a Península de Setúbal). Segundo o Observatório Nacional das Leishmanioses (ONLeish), Portalegre, Beja, Guarda e Viseu podem igualmente ser consideradas regiões endémicas. As regiões consideradas endémicas não têm permanecido as mesmas com o passar dos anos, uma vez que atualmente existem regiões onde a prevalência de LCan aumentou de forma significativa comparativamente com os dados de anos anteriores. No entanto, não significa que as regiões que no passado foram mais afetadas demonstrem um menor risco, tal pode ser verificado em Trás-os-Montes e Lisboa, que continuam a apresentar uma prevalência de LCan considerável (Campino, 2013).

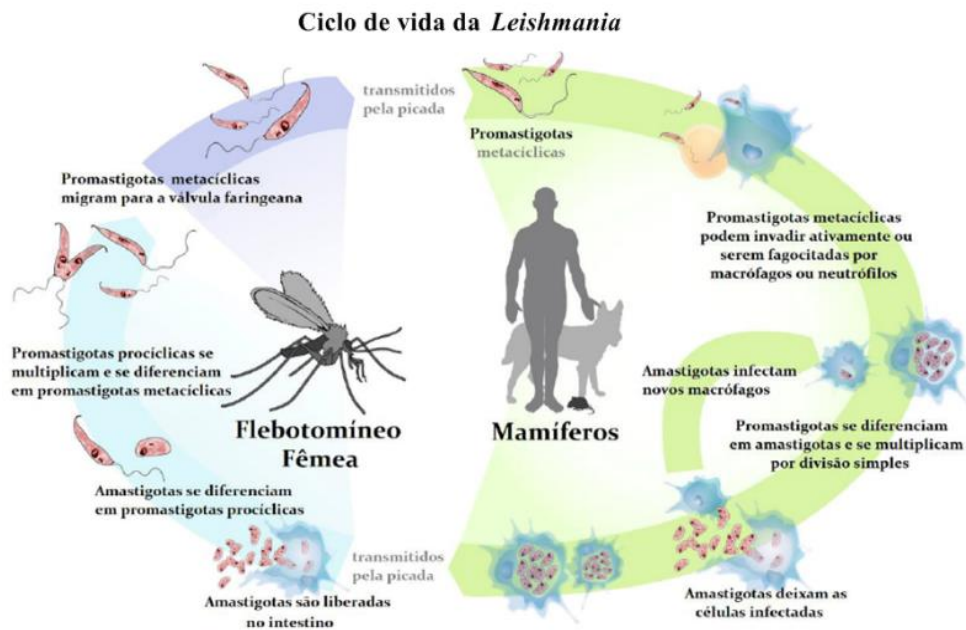
Tendo como objetivo a recolha de dados e acompanhamento de LCan e de Leishmaniose humana (LH), foi fundado em 2008 o ONLeish, que durante uma semana em janeiro de 2009, realizou o estudo “Fatores de Risco para a Leishmaniose Canina numa Região Endémica do Mediterrâneo” e determinou que a prevalência de LCan se situa maioritariamente no interior do país – Beja, Portalegre e Castelo Branco (Campino, 2013). Com a realização deste estudo detetou-se uma seroprevalência de 6% para *Leishmania* spp. nos 4000 cães que serviram de amostra previamente seguidos em 140 CAMV de todos os distritos de Portugal. Concluiu-se que a seroprevalência a nível distrital situou-se entre 1% até valores superiores a 15%, indicando os níveis mais elevados em distritos pertencentes ao interior do país – Bragança, Vila Real, Beja, Portalegre, Castelo Branco e Santarém. Os cães que serviram de amostra

englobavam as seguintes características: idade superior a dois anos, cães que habitam maioritariamente ou exclusivamente no exterior e com pelo curto ou médio (Campino, 2013). Tendo em conta o sucesso do estudo anteriormente citado, o ONLeish lançou uma rede de vigilância epidemiológica para a LCan em 2009 – LEISHnet. O principal objetivo da mesma foi criar uma base *online* que recebesse casos de Leishmaniose Canina oriundos de todo o país. Para este feito fizeram-se acordos entre o “LEISHnet”, laboratórios de análises clínicas e centros de atendimento médico-veterinário distribuídos a nível nacional. Desta forma, os CAMV ao pedirem análises para diagnóstico de LCan aos laboratórios aderentes, se preenchessem uma ficha cedida pelo LEISHnet autorizavam a cedência dos resultados por parte dos laboratórios em questão à rede de vigilância, fornecendo assim dados do diagnóstico desta doença por todo o país e em tempo real (Cardoso, 2011).

A crescente incidência de Leishmaniose no Alto Douro pode ser explicada pelo facto da “orografia da zona ser muito acidentada e também pelos socalcos suportados por muros xistogruvâquicos, que podem servir como local para o desenvolvimento das formas imaturas, funcionando como refúgio para os flebótomos e como obstáculo à ação dos inseticidas” (Pires, 2000).

Tendo *Leishmania* spp. um ciclo de vida heteroxeno (parte do seu desenvolvimento ocorre no hospedeiro vertebrado e outra no hospedeiro invertebrado) este parasita intracelular apresenta duas formas distintas: no vetor (flebótomo) apresenta a forma promastigota e no hospedeiro vertebrado a forma amastigota (Oliveira, Alves, & Junior, 2015). Assim sendo, e uma vez que a forma amastigota se encontra no interior dos macrófagos e células do sistema mononuclear fagocítico, esta divide-se por fissão binária e leva à rutura dos macrófagos e das células onde se encontra, podendo conduzir à infeção de novas células. Sendo o flebótomo fêmea hematófago poderá ingerir a forma amastigota aquando da ingestão de sangue num hospedeiro infetado (Green, 2006). No flebótomo a forma amastigota é libertada das células onde se encontra e sofre uma diferenciação morfológica no intestino do vetor durante 6 a 10 dias (Gossage, Rogers, & Bates, 2003) até originar a forma promastigota metacíclica (extracelular flagelada) (Green, 2006). Quando o vetor pica um ser vertebrado para se alimentar, liberta as formas promastigotas através da saliva, que introduz na pele do animal picado. Já no ser vertebrado, a forma promastigota introduzida pode ser fagocitada pelos macrófagos e células dendríticas da pele, formando a forma amastigota (a forma anterior perde o flagelo característico), podendo assim disseminarem-se para outros locais através da circulação sanguínea e linfática, como é o caso do fígado, baço e medula óssea, com nova replicação e infeção de novos macrófagos (Oliveira *et al.*, 2015). O ciclo de vida de *Leishmania* spp. encontra-se demonstrado na figura 2.

Figura 6 - Ciclo de vida de *Leishmania* spp. (Frézard, 2015).



A forma amastigota tem as seguintes características: forma ovoide, um tamanho que varia entre 2.5-5.0  $\mu\text{m}$  de comprimento e 1.5- 2.0 $\mu\text{m}$  de largura, um citoplasma com núcleo arredondado, excêntrico e visível, um cinetoplasto (estrutura mitocondrial) bacilar e pouco visível, e ainda um envelope flagelar com rudimentos do flagelo. Uma vez que esta forma não possui flagelo livre não apresenta motilidade (Green, 2006). As características da forma promastigota são consideravelmente distintas, uma vez que são formas extra-celulares, situam-se na parte média do intestino do flebótomo, apresentam um cinetoplasto entre o núcleo e o flagelo. Este flagelo é bem desenvolvido e situa-se na região anterior, permitindo assim a existência de mobilidade por parte desta forma parasitária (Rosypal *et al.*, 2003).

A transmissão de *Leishmania* spp., pode também ocorrer por: via vertical (de mãe para feto se ainda no útero, ou de mãe para recém-nascido aquando do parto), venérea, transfusão sanguínea (Naucke & Lorentz, 2012), contato direto de cães saudáveis com outros cães com feridas e/ou mordeduras (Solano-Gallego *et al.*, 2013).

Os cães são considerados os principais hospedeiros reservatórios da doença no ser humano na zona da América do Sul, Médio Oriente e Mediterrâneo, no entanto tendo em conta um estudo realizado em Sintra e Sesimbra (Portugal), também os roedores (*Mus musculus* e *Rattus norvegicus*) podem ser considerados hospedeiros reservatório da doença (Helhazar, Leitão, Duarte, Tavares & Fonseca, 2013). Para além destes, as raposas e javalis foram reportados como portadores do parasita no Médio Oriente e na Europa. Também a lebre assume o papel de

hospedeiro reservatório de *L. infantum* de acordo com um estudo realizado em Madrid (Ruiz-Fons, Ferroglia *et al.*, 2013). Os principais hospedeiros acidentais são os lobos e os gatos, sendo que nos últimos foram identificadas diversas espécies de *Leishmania* spp: *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis* e *L. brasilienses* (Green, 2006).

A LH é considerada endêmica em 88 países distribuídos pela Bacia do Mediterrâneo, África, Médio Oriente, Ásia e América do Sul (Solano-Gallego *et al.*, 2013). É igualmente transmitida pelo flebótomo fêmea e são conhecidas mais de 17 espécies *Leishmania* spp. Com capacidade de infectar o ser humano. Tal como acontece com o cão são conhecidas quatro formas da doença: assintomáticos (por curtos períodos ou durante toda a sua vida); visceral, também conhecida por “Kala-azar” (fatal em 95% dos casos não sujeitos a terapêutica adequada), endêmica no Sub-Continente Indiano e do Leste de África com cerca de 200.000 a 400.000 novos casos registados por todo o mundo; cutânea, à semelhança do que acontece com o cão é a manifestação clínica mais comum da doença, com uma incidência de 0,7 a 1,3 milhões de novos casos por todo o mundo, sendo que 95% destes localizam-se na Ásia Central, Bacia do Mediterrâneo, América e Médio Oriente; por fim a forma mucocutânea: 90% dos casos com esta manifestação clínica estão distribuídos pelo Brasil, Peru e Bolívia (Cardoso, 2011).

As formas cutânea e visceral da LCan são consideradas zoonóticas. Têm como hospedeiro reservatório o cão, e como espécie causal a *L. infantum*., e ocorre predominantemente na Região Mediterrânea. Na Grécia a Leishmaniose cutânea é antroponótica e tem como agente causal a *Leishmania tropica* e como hospedeiro reservatório o Homem (Solano-Gallego *et al.*, 2013). A pobreza está intimamente relacionada com o aparecimento da doença nas pessoas, uma vez que poderá existir má gestão de resíduos e esgotos nas habitações, casas com muitos ocupantes, hábito de dormir no chão fora de habitações, dietas pobres em proteína, ferro, vitamina A e zinco. As alterações climáticas também têm a sua quota-parte no aparecimento de LH, visto que a alteração de temperatura exterior, humidade relativa e aparecimento de chuva afetam os vetores e hospedeiros reservatórios, alterando as suas distribuições e influenciando a taxa de sobrevivência. Para além disto, a seca, a fome e as inundações podem conduzir à migração humana, conduzindo-as para regiões endêmicas. Na Etiópia, Índia e Brasil foram relatados casos de co-infecção com vírus da imunodeficiência humana (HIV), e nestes está relatada uma maior probabilidade de desenvolvimento de sinais clínicos e alta mortalidade. No entanto, as pessoas que têm medicamentos antiretrovirais instituídos na terapêutica apresentam melhor prognóstico, dado que estes fármacos diminuem o desenvolvimento da Leishmaniose, atrasam recaídas, aumentando desta forma a sobrevivência destes pacientes (World Health Organization, 2016).

Como foi anteriormente dito, nem todos os vertebrados parasitados com Leishmaniose apresentam sinais clínicos, podendo desta forma assumirem-se como assintomáticos. A manifestação clínica depende em grande parte da genética, do sistema imunitário e da presença de doenças concomitantes (Solano-Gallego, Morell, Arboix, Alberola & Ferrer, 2001).

A LCan pode assumir três formas: visceral, cutânea e viscerocutânea (Campillo *et al.*, 1999), manifestando-se clinicamente conforme o sistema afetado. A nível sistémico os animais podem apresentar caquexia, linfadenomegália generalizada ou localizada (principalmente a nível dos poplíteos) (Companion Animal Parasite Council, s.d.) atrofia muscular (maioritariamente marcada a nível dos músculos temporais e músculos masseterianos), hipertermia (ainda que raro), epistáxis (normalmente associado a inflamação da mucosa nasal, trombocitopenia ou úlceras tissulares) e ainda palidez das mucosas (provocada pela anemia). As alterações no trato gastro-intestinal ainda que raras podem ocorrer sobre a forma de diarreias do intestino grosso com ou sem melena associada, justificadas por colite ulcerativa granulomatosa provocada pela multiplicação parasitária na mucosa intestinal. As alterações renais são consideradas as principais causas de morte de um animal com Leishmaniose e ocorrem por depósito de imunocomplexos no glomérulo renal, originando um quadro de glomerulonefrite. Esta quando não tratada atempadamente evolui para insuficiência renal crónica (IRC) com azotémia, perda de proteínas na urina e anemia associadas (os animais nesta fase podem demonstrar poliúria-polidipsia, anorexia e vômitos). Ainda que pouco estudado podem aparecer alterações neurológicas representadas por processos inflamatórios, como é o caso das encefalites. No sistema nervoso central, devido ao aumento do nível de Acs anti-*L. infantum* no líquido cefalorraquidiano poderão estar presentes alterações da barreira hemato-encefálica traduzindo-se sob a forma de enfartes cerebrais. As alterações cardiovasculares são igualmente raras, no entanto, já foram descritos casos de *L. infantum* presente no miocárdio de animais que apresentavam sinais de prostração, anorexia e dificuldade respiratória. A nível respiratório são descritos quadros clínicos compatíveis com rinite crónica e pneumonia intersticial crónica. O conjunto de alterações oculares é diverso sendo mais frequentes quadros de: blefarite, que pode manifestar-se de forma alopecica (a mais usual, ocorrendo em 26,7% dos casos), húmida, ulcerativa ou nodular, conjuntivite (presente em 31,4 a 75,6% dos casos); granulomas únicos ou múltiplos, uni ou bilateral; queratite estromal; queratoconjuntivite seca; uveíte (presente em 42,8% dos animais com LCan) que se pode manifestar de forma exsudativa, não exsudativa ou granulomatosa; glaucoma após cronicidade de uveíte pré-existente; e celulite orbitária. A poliartrite de cariz imunomediado é a principal causa de claudicação intermitente e ocasional não responsiva a anti-inflamatórios (Solano-Gallego *et al.*, 2013). Para além desta pode ocorrer edema dos membros e articulações (Companion Animal Parasite Council, s.d.).

As alterações cutâneas são as manifestações clínicas mais frequentes de LCan representando 81-89% dos casos (Solano-Gallego *et al.*, 2013). Podem manifestar-se como problemas dermatológicos típicos (exemplo (ex): onicogribose (Figura 3), dermatite ulcerativa (Figura 4) nas proeminências ósseas, dermatite papular ou descamativa) e atípicos nomeadamente: alopecia multifocal não prurítica (principalmente nas orelhas, nariz e olhos) (Naucke & Lorentz, 2012), dermatite nasal, dermatite ulcerativa mucocutânea; dermatite nodular cutânea e mucocutânea, dermatite pustulosa e dermatite descamativa (Figura 5) nasodigital (Solano-Gallego *et al.*, 2013). As dermatites podem ou não ser acompanhadas por piodermite bacteriana (Companion Animal Parasite Council, s.d.).

Figura 7- Onicogribose no membro anterior direito num cão com Leishmaniose Canina (Original).



Figura 8- Dermatite ulcerativa presente na porção distal do membro anterior direito de um cão com LCan (Original).



Figura 9- Dermatite descamativa na zona abdominal de um cão com LCan (Original).



Figura 10- Blefarite alopécica e ulcerativa num Labrador Retriver com LCan (Original).



O diagnóstico deve ser elaborado tendo em conta a anamnese, os dados epidemiológicos, o exame objetivo e a realização de exames complementares de diagnóstico. O diagnóstico definitivo pode ser realizado através do estudo parasitológico, métodos moleculares e métodos serológicos. O estudo parasitológico pode ser realizado por cultivo *in vitro* de *Leishmania* spp. e mais frequentemente por citologia corada por *Wright* ou *Giemsa*, realizada através de biópsia por aspiração de medula óssea ou gânglios linfáticos. Nesta pode ser observada a forma

amastigota do parasita, livre ou no interior de monócitos, macrófagos ou neutrófilos (Solano-Gallego *et al.*, 2014).

O diagnóstico serológico deve ser realizado mediante técnicas quantitativas como imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), testes rápidos imunocromatográficos, Western Blotting (WB) e ainda técnica de aglutinação direta (TAD) (Solano-Gallego *et al.*, 2014).

A imunofluorescência indireta (IFI) é o teste serológico de eleição com uma especificidade de 100% e sensibilidade de 98.4%<sup>9</sup> (Rosypal *et al.*, 2003), e consiste na deteção de anticorpos através da utilização de soros diluídos com antígeno da forma promastigota *Leishmania* spp. É de salientar que esta técnica apresenta uma sensibilidade diminuída na presença de animais assintomáticos (Solano-Gallego *et al.*, 2014).

O teste de ELISA utiliza antígenos distintos que podem ser porções inteiras ou solúveis da forma promastigota, proteínas recombinantes ou purificadas. Destes antígenos as porções da forma promastigota apresentam elevada sensibilidade na deteção de infeções clínicas e subclínicas, no entanto apresentam pouca especificidade. Já as proteínas recombinantes são altamente específicas, mas menos sensíveis na deteção de animais doentes ou assintomáticos (Solano-Gallego *et al.*, 2014).

Os testes rápidos imunocromatográficos (ex: *Speed Leish K*®, Virbac) permitem a deteção de Acs anti-cinesina da *Leishmania infantum* (Virbac, 2011). Estes testes podem ser realizados pelo clínico durante a consulta (Companion Animal Parasite Council, s.d.) e através dos quais se obtém uma resposta em 15 minutos (Virbac, 2011), no entanto tem como desvantagem apresentar muitos falsos negativos (Solano-Gallego *et al.*, 2014).

O teste de Western Blotting (WB) é um método utilizado com fins de investigação e não de diagnóstico, pela necessidade de equipamento e recursos humanos especializados. Este permite a deteção de Acs específicos, assim como a sua especificidade tendo em conta frações antigénicas distintas do parasita (Campillo *et al.*, 1999).

A técnica de aglutinação direta (TAD) apresenta uma sensibilidade de 79,9% e especificidade de 84.9%. É uma técnica serológica quantitativa pouco dispendiosa e de fácil interpretação. Tal como o nome indica, esta técnica baseia-se na aglutinação dos anticorpos presentes no soro do animal com antígenos (Solano-Gallego *et al.*, 2014).

A deteção de baixos níveis de anticorpos por métodos serológicos não indica a presença de doença. Neste sentido, para confirmação de diagnóstico está indicada a realização de um método molecular como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Solano-Gallego *et al.*, 2014). Como forma de estadiamento da doença, deve-se fazer o estudo hematológico e bioquímico. A alteração hematológica mais comum é a anemia do tipo normocítica normocrómica não

regenerativa, de base inflamatória crónica ou em menor percentagem por insuficiência renal crónica (IRC). No leucograma é frequente observar padrão de *stress* (neutrofilia, com linfopenia e monocitose). Relativamente às alterações do perfil bioquímico, destaca-se um ligeiro aumento das enzimas hepáticas (ALT e FA) e ainda que com menos frequência, pode ser detetada bilirrubinemia. Outro marcador laboratorial de doença é a alteração dos níveis de algumas proteínas séricas: hiperproteinemia com hiperglobulinemia e hipoalbuminemia. Também pode ser observada a elevação da proteína C reativa e seroplasmina. Na urianálise destaca-se a presença de proteinúria. Quando tal ocorre, deve-se determinar a razão proteinúria/creatinina urinária, de forma a otimizar a deteção precoce de alteração da função renal. Por fim, nos cães com LCan a trombocitopenia é a alteração analítica mais frequentemente identificada (Solano-Gallego *et al.*, 2014).

O protocolo terapêutico e o prognóstico variam de acordo com o estágio da doença. Desta forma, a LCan pode apresentar os seguintes estádios e respetivas ações terapêuticas:

Estádio I – Ligeiro: serologicamente não existe nenhum ou tem um baixo nível de Acs anti-*Leishmania* spp., os sinais clínicos mais prevalentes são linfadenomegalia e/ou dermatite papular, tem bom prognóstico e a linha de tratamento utilizada pode ser a associação de Alopurinol (10 mg/kg, BID, durante seis a doze meses, PO) e Antimoniato de Glucamina (Glucantime®) (75 a 100 mg/kg, uma vez por dia ou 40-75 mg/kg, BID, durante quatro semanas, SC) ou em alternativa Miltefosina (Milteforan®) (2 mg/kg, SID, durante vinte e seis dias, PO) (Solano-Gallego *et al.*, 2011);

Estádio II – Moderado: detetado pouco ou tem um elevado nível de Acs; os sinais mais prevalentes para além dos apresentados no estágio I são lesões cutâneas difusas ou simétricas, como é o caso da dermatite exfoliativa, onicogribose, úlceras na pele, anorexia, perda de peso, epistáxis e febre; tem um prognóstico que varia do bom a reservado e como linha de tratamento existe a associação de Alopurinol (na dose, forma de administração e tempo anteriormente mencionados) e Antimoniato de Glucamina (Glucantime®) (na dose, forma de administração e tempo anteriormente mencionados) ou Alopurinol e Miltefosina (Milteforan®) (Solano-Gallego *et al.*, 2011);

Estádio III – Grave: médio a alto nível de Acs detetados; neste estágio podem estar presentes os sinais clínicos do estágio I e II e ainda lesões imunomediadas, como é o caso de vasculite, artrite, uveíte e glomerulonefrite; o prognóstico tem um cariz reservado; a terapêutica reside na associação de Alopurinol com Antimoniato de Glucamina (Glucantime®) (na dose, forma de administração e tempo anteriormente mencionados) ou Alopurinol com Miltefosina (Milteforan®) (na dose, forma de administração e tempo anteriormente mencionados); de referir que neste estágio pode ocorrer grande comprometimento renal, e por este motivo deve

ser instituída terapêutica adequada para contrariar a degradação deste órgão (Solano-Gallego *et al.*, 2011);

Estádio IV – Muito grave: tal como no estágio anterior são detetados altos níveis de Acs; para além dos sinais clínicos referidos em todos os outros estádios, poderão existir ainda tromboembolismo pulmonar ou síndrome nefrótica; o prognóstico por sua vez é mau e o tratamento instituído consiste na utilização exclusiva de Alopurinol (na dose, forma de administração e tempo anteriormente mencionados) associado a um anticoagulante. (Solano-Gallego *et al.*, 2011);

As medidas profiláticas para o controlo da Leishmaniose são diversas e passam por evitar o contacto entre o vetor e o hospedeiro. Estas devem ser realizadas durante todo o ano, mas em caso de impossibilidade recomenda-se uma profilaxia no período de fevereiro a outubro. Neste sentido, podem ser utilizados métodos farmacológicos e não farmacológicos. As medidas não farmacológicas passam por: destruição dos locais que possam servir de microhabitats para os flebótomos, como é o caso de solos húmidos, fendas e rachaduras nas paredes (Otranto & Dantas-Torres, 2013), colocação de redes (com malha inferior a 0,4mm<sup>2</sup>) impregnadas com piretróides nas janelas e portas (ESCCAP, 2012), impedir o contato dos cães com roedores, uma vez que estes podem agir como hospedeiros reservatórios de *L.infantum* (Helhazar *et al.*, 2013) e ainda evitar o passeio do cão nas horas crepusculares e em locais húmidos (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Os métodos farmacológicos visam igualmente diminuir o risco de transmissão da doença através do controlo do flebótomo. Desta forma, a utilização de fármacos como os piretróides sintéticos é a mais indicada e considerada como a medida mais eficaz no controlo do vetor. Os fármacos que pertencem a este grupo são tóxicos para o flebótomo, causando desorientação do mesmo com consequente abandono do hospedeiro. Os piretróides mais utilizados estão disponíveis sob a forma de coleiras ou unção puntiforme (pipeta ou *spot-on*). Na forma de unção puntiforme um dos produtos que pode ser administrado é Advantix®, Bayer constituído por Imidacloprid 10% e Permetrina a 50% (Otranto & Dantas-Torres, 2013) com eficácia de 4 semanas (Bayer, 2016). Aquando da colocação desta forma farmacológica, apenas 24 horas depois se verifica a distribuição do fármaco na camada córnea do cão. Numa primeira vez, é aconselhado ser colocada um mês antes da estação de atividade do flebótomo, de forma a proporcionar um maior nível de proteção (Otranto & Dantas-Torres, 2013). Para além deste, o Frontline® TRI-ACT, Merial, também pode ser utilizado sob a forma de unção punctiforme no combate ao flebótomo. Este fármaco possui como substâncias ativas o Fipronil e Permetrina, atuando assim em carraças, pulgas e flebótomos. O fabricante garante uma proteção durante 4 semanas (Merial, s.d.). Também o Vectra 3D® pode ser utilizado no cão como repelente para o flebótomo. Este produto é constituído por Dinotefurano, Piriproxifeno e

Permetrina e está garantida proteção durante 4 semanas após a aplicação do mesmo (CEVA, s.d.).

Na apresentação de coleiras pode ser utilizada a Scalibor®, MSD, composta por Deltametrina 4% que apresenta uma duração de proteção até 6 meses (MSD Animal Health, s.d.)

Em Portugal é permitida a utilização de duas vacinas como medida profilática no cão. Os fabricantes das vacinas aconselham a utilização prévia (uma semana antes) de repelentes de flébtomos. A CaniLeish®, Virbac Animal Health possui como substância ativa proteínas secretadas – excretadas (ESP) de *Leishmania infantum* (100 µg). Esta vacina com 92% de eficácia (Otranto & Dantas-Torres, 2013) visa imunizar animais com idade superior a 6 meses de vida e negativos aos testes de Leishmaniose, uma vez que pretende diminuir a infeção ativa da doença após o contato com *Leishmania infantum*. São necessárias três doses vacinais com intervalos de 3-4 semanas entre cada administração e revacinação anual. A imunidade estabelece-se semanas após a primeira administração e tem duração de um ano (Virbac, 2017). Para além desta, também a Letifend®, Leti está a ser comercializada recentemente na União Europeia. Esta vacina é constituída pela proteína Q, produzida através da união de cinco proteínas removidas de *L. infantum* e pretende reduzir o risco de desenvolver infeção ativa, doença clínica ou ambos após o contato com o referido parasita. Pode ser igualmente administrada a partir dos 6 meses de vida, numa única dose com duração de imunidade anual e início de imunidade 28 dias após a administração vacinal. Esta vacina para além de permitir a diferenciação entre animais vacinados e infetados, apresenta eficácia de 72% na prevenção de aparecimento de LCan em regiões endémicas para a doença (LETI, s.d.).

Para além dos métodos anteriormente citados, existe atualmente um novo produto, Leisguard®, Esteve Veterinária, que atua não só na prevenção do aparecimento da doença, mas também na diminuição dos sinais clínicos em animais doentes, podendo desta forma ser utilizado como método preventivo e terapêutico. Este fármaco apresenta-se sob a forma de suspensão oral de Domperidona 5 mg/ml. Pode ser utilizado em animais de qualquer idade, portadores ou não de doença, na dose de 1ml/kg, de 24-24 horas durante 30 dias seguidos com um intervalo de administração de 4 meses. A 1ª toma deve ser realizada no período de maio/junho. Desta forma, o produto pretende controlar a Leishmaniose na fase inicial, uma vez que estimula o rácio de citocinas T helper 1 (Th1): T helper 2 (Th2), ativando as células fagocíticas e assim aumentando a capacidade leishmanicida.

### **III - ESTUDO DE BABESIOSE E LEISHMANIOSE NOS CÃES DOS CONCELHOS DE LAMEGO, TAROUCA E PESO DA RÉGUA, PORTUGAL**

Apesar do estudo de concomitância de doenças não fazer parte dos objetivos para a presente dissertação de mestrado, foi detetado um animal que apresentou diagnóstico positivo a LCan em setembro de 2016 e diagnóstico positivo para BC em outubro do mesmo ano. Desta forma e uma vez que foram contabilizados todos os diagnósticos como doenças independentes, o animal referido foi incluído no estudo de animais diagnosticados com BC e no estudo de animais que realizaram diagnóstico, controlo ou rastreio para LCan.

#### **1. Objetivos do Estudo**

Com a elaboração deste estudo pretendemos:

1. Detecção de *Babesia* spp. por esfregaço sanguíneo, corado por *Diff-quick* e visualização do mesmo ao microscópio ótico em animais com sinais correspondentes a Babesiose Canina na consulta;
2. Realização de teste rápido imunocromatográfico (*Speed Leish K®*, Virbac) ou método de ELISA (*Leiscan®*, Esteve) para diagnóstico de LCan em animais com sinais do mesmo, para controlo de doença previamente diagnosticada ou ainda elaboração do teste rápido imunocromatográfico para rastreio de infeção para posterior administração vacinal;
3. Avaliação de fatores de risco (raça, aptidão, aplicação de antiparasitários externos, características da vida dos animais, entre outros);
4. Determinar quais os principais sinais de LCan e BC presentes na consulta, quantos animais estudados foram internados e quantos morreram.

Desta forma, com o presente estudo tentou-se compreender se existe alguma relação entre o diagnóstico das referidas doenças com o dormitório, profilaxia e características dos animais (nomeadamente a aptidão para caça, o comprimento do pelo, a raça, entre outros).

#### **IV - MATERIAL E MÉTODOS**

##### **1. Caracterização dos cães utilizados, da área geográfica e do respetivo clima no período de amostragem**

Como foi anteriormente mencionado, o presente estudo foi realizado durante o período decorrido entre 5 de setembro de 2016 e 28 de fevereiro de 2017 em cães seguidos nos consultórios de Lamego, Tarouca e Peso da Régua, pertencentes à CV Douro Sul. Ao todo foram analisados 60 cães, 28 com suspeita, controlo ou rastreio de LCan e 32 diagnosticados com Babesiose Canina, de ambos os sexos, de raças distintas e com idades compreendidas entre três meses e dez anos nos animais diagnosticados com BC e um intervalo de idades entre os quatro meses e os quinze anos nos animais testados para LCan.

Para o estudo de Babesiose Canina, foram utilizados animais com clínica compatível com a doença. Já para o estudo de Leishmaniose Canina foram utilizados animais assintomáticos com mais de 6 meses de vida, sujeitos a rastreio para posterior administração vacinal (CaniLeish®, Virbac), animais com sinais compatíveis com a doença e, uma vez que se trata de uma doença crónica, foram igualmente incluídos animais testados para avaliação do controlo da mesma.

As cidades referidas pertencem respetivamente ao concelho de Lamego, Tarouca e Peso da Régua, sendo os dois primeiros concelhos pertencentes ao distrito de Viseu, enquanto a última cidade enunciada pertence ao distrito de Vila Real.

O concelho de Lamego tem um número estimado de 26 691 habitantes e é constituído por dezoito freguesias: Penajóia, Samodães, Cambres, Sande, União de Freguesias Parada de Bispo e Valdigem, Avões, Ferreiros, Figueira, Lamego, Penude, Vila Nova de Souto D'el Rei, Britiande, Ferreirim, Várzea de Abrunhais, União de Freguesias de Cepões, Meijinhos e Melcões, União de Freguesias de Bigorne, Magueija e Pretarouca e ainda Lazarim (Lamego, 2017).

Ao concelho de Tarouca pertencem sete freguesias: Gouviães e Ucanha, Granja Nova e Vila Chã da Beira, Mondim da Beira, S. João de Tarouca, Salzedas, Tarouca e Dalvares, Várzea da Serra e apresenta uma população estimada de 8325 habitantes (Tarouca, 2016).

São oito o número de freguesias que pertencem ao concelho do Peso da Régua com um total de 17 131 habitantes: União de Freguesias de Moura Morta e Vinhós, Sediolos, Loureiro, Fontelas, União de Freguesias de Peso da Régua e Godim, Vilarinho dos Freires, União das Freguesias de Poiares e Canelas e ainda União de Freguesias de Galafura e Covelinhas (CMPR, 2017).

Estas localizações geográficas são conhecidas por possuírem tanto áreas urbanas como áreas rurais, onde é frequente a prática de caça. Com exceção da caça ao javali, veado, gamo, corço

e muflão que tem início em junho e término obrigatório em maio, as restantes espécies cinegéticas podem ser caçadas em meses variados.

Desta forma, a época da caça pode ser iniciada em agosto (nos terrenos ordenados) para quem caçar Rola-Comum (com término de período de caça em setembro), pato-real e galeirão (com término do referido período em janeiro). Em setembro inicia a época de caça à codorniz (com término em novembro), ao coelho-bravo e à lebre (com fim em dezembro). Já em outubro podem ser caçadas espécies como a frisada, pato-trombeteiro, zarro-comum, zarro-negrita, marrequinha, arrabio, piadeira, faisão, perdiz-vermelha, raposa e saca-rabos (todos com término da época em janeiro). Tem início em novembro a caça à narceja-comum, narceja-galega (ambos com fim de época de caça em fevereiro), tarambola-dourada, galinhola, tordo e estorninho-malhado (todos com término em fevereiro) (ICNF, 2016).

Segundo a classificação de *Koppen* mencionada pelo Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), os concelhos referidos são abrangidos por um clima temperado com inverno chuvoso, verão seco e quente, com uma temperatura média anual de 12,1-13°C e uma precipitação acumulada anual de 1,401-1,600 mm. (IPMA, 2017).

## **2. Composição e identificação da amostra**

As amostras necessárias para o estudo de Babesiose Canina e Leishmaniose Canina basearam-se na colheita de sangue dos animais selecionados e seguidos na CV Douro Sul.

A cada animal foi recolhida uma amostra de sangue e para a seleção dos animais serviu a conveniência do próprio estudo.

## **3. Recolha e processamento da amostra**

Recolheram-se 4 a 5ml de sangue nos animais submetidos a análises laboratoriais e apenas 2ml nos animais sujeitos a esfregaço sanguíneo, teste rápido imunocromatográfico e método de ELISA. Esta recolha foi realizada pela médica veterinária assistente em alguns animais durante a consulta e pela autora (com auxílio e supervisão de uma enfermeira e de uma médica veterinária) nos animais internados. A mesma foi realizada por punção venosa periférica, tendo sido a veia safena, veia cefálica ou a veia jugular externa os locais de venopunção preferenciais. Para o estudo de BC, a amostra de sangue recolhida serviu imediatamente para a realização de esfregaço sanguíneo (realizado pela autora ou pela médica veterinária assistente), com posterior visualização, após coloração, no microscópio ótico presente na CV Douro Sul. Nos animais em que houve disponibilidade monetária para realização de análises laboratoriais, o sangue foi recolhido pela introdução de uma agulha (com *gauge* adequado ao calibre venoso) acoplada a

uma seringa de 5ml. Deste total, 2,5 ml do sangue recolhido foi imediatamente colocado num tubo com EDTA e os restantes 2,5ml foram colocados num tubo seco. De seguida, foram colocados no frigorífico (a uma temperatura de 5°C), enquanto esperavam para serem conduzidos ao laboratório.

De referir que as amostras foram entregues no Laboratório de Análises Clínicas Santos Monteiro no mesmo dia em que foram obtidas. Uma vez que a distância física entre a clínica e o laboratório era sensivelmente 10 minutos de carro, o transporte da amostra foi realizado dentro de um saco devidamente isolado com uma placa térmica (termoacumulador) de forma a impedir grandes oscilações da temperatura.

Como já foi referido, quando não foi possível realizar análises laboratoriais, apenas foram recolhidos 2ml (tanto para diagnóstico de BC como de LCan), através da introdução de uma agulha (com diâmetro adequado ao vaso) acoplado a uma seringa de 2ml. No diagnóstico de BC, a amostra recolhida foi imediatamente utilizada para elaboração do esfregaço sanguíneo, não tendo desta forma sido colocada num tubo com EDTA e armazenada no frigorífico.

Também as amostras de sangue recolhidas (com método de venopunção igual ao descrito anteriormente) com objetivo de testar LCan pelo teste rápido (*Speed Leish K®*, Virbac) foram utilizadas no momento, durante a consulta e em frente ao proprietário, enquanto as amostras destinadas a serem testadas pelo método Leiscan® Leishmania ELISA Test, Esteve Veterinária, foram acondicionadas em tubos com EDTA no frigorífico (a uma temperatura de 5°C) presente na clínica até serem utilizados. Este último método foi realizado na CV Douro Sul por uma pessoa competente, num período máximo de sete dias após a recolha.

#### **4. Métodos laboratoriais**

##### **4.1. Esfregaço sanguíneo**

Foi realizado um esfregaço sanguíneo por cada animal com suspeita de Babesiose Canina, e após a realização do mesmo, numa lâmina de vidro propriamente identificada a caneta de acetato com o nome do respetivo animal, este ficou a secar ao ar durante dez minutos.

Após o período de secagem da lâmina (Figura 11), procedeu-se à coloração da mesma com a solução corante *Diff-quick*. Este corante é constituído por um corante de *Wright-Giemsa* modificado e é composto por um fixador, uma solução corante do citoplasma celular e uma solução que cora o núcleo das células. Para se proceder à coloração, foi distribuído uniformemente por toda a superfície da lâmina: primeiro o fixador, de seguida a solução que cora o citoplasma e por fim o corante nuclear. Todas as aplicações foram separadas por 30 segundos e a solução ou fixador anteriormente colocados, foram removidos por escorrimento através do levantamento da lâmina. Após este procedimento, a lâmina foi lavada com água da

torneira corrente, de forma a serem removidos quaisquer excedentes das soluções anteriormente colocadas. De seguida, com a lâmina previamente corada e lavada procedeu-se à secagem, realizada ao ar à temperatura ambiente.

Posto isto, a visualização do esfregaço sanguíneo teve início na periferia até ao extremo oposto da lâmina, de forma a toda a superfície da mesma ser analisada. Esta visualização foi realizada no MO presente na clínica, pela autora e por uma médica veterinária, com as objectivas de 40 x e 100 x e ocular 10 x, ou seja, os esfregaços sanguíneos foram sujeitos a uma ampliação de 400x e 1000x para a deteção de *Babesia* spp.

Figura 11- Lâminas com esfregaços sanguíneos no período de secagem e solução corante (*Diff-quick*) atrás dos mesmos (Original).



#### 4.2. Leiscan® Leishmania ELISA Test, Esteve

Este produto foi desenvolvido pelos Laboratórios HIPRA, S.A., e cedido pela Esteve Veterinária. Sendo assim todas as informações que irão ser de seguida relatadas foram referidas pelo fabricante.

É um produto de fácil utilização (segue-se acompanhado por um protocolo para a realização da respetiva técnica) e com interpretação objetiva através da leitura automática do resultado por um espectrofotómetro. Apresenta uma sensibilidade de 98%, diminuindo assim a possibilidade do aparecimento de falsos negativos, e uma especificidade de 100%. Desta forma, estamos presentes um valor preditivo positivo de 100%, uma vez que quando existe positividade ao teste, existe 100% de certeza que foram detetados Acs anti *Leishmania* spp. no animal testado. Para além disto, este teste permite analisar mais do que uma amostra em simultâneo (INNO, 2012).

O controlo do ensaio pode ser realizado em três pontos distintos: controlo negativo, positivo baixo e positivo. Os resultados serológicos são cedidos em valores de razão da amostra (Rz) (Tabela 1), tendo em conta as absorvâncias da amostra e do controlo positivo baixo (INNO, 2012).

O presente teste foi utilizado em animais com mais de seis meses de idade, para rastreio de positividade a *Leishmania* spp. e posterior vacinação com *CaniLeish*®, Virbac. Serviu também como método de diagnóstico em animais que manifestavam sinais compatíveis com LCan na consulta, e ainda como controlo da doença em cães previamente diagnosticados com LCan.

Tabela 1- Interpretação de resultados do teste Leiscan® Leishmania ELISA Test, Esteve Veterinária, de acordo com o fabricante (INNO, 2012).

Razão da amostra (Rz)	Resultado
$0,5 < Rz < 0,7$	Negativo
$0,7 < Rz < 0,9$	Negativo
$0,9 < Rz < 1,1$	Duvidoso
$1,1 < Rz < 1,5$	Positivo baixo
$1,5 < Rz < 2$	Positivo alto
$2 < Rz < 3$	Positivo alto
$3 < Rz < 4$	Positivo muito alto
$Rz > 4$	Positivo muito alto

É importante referir que em animais vacinados com *CaniLeish*®, Virbac, existe reação cruzada com o teste acima mencionado, uma vez que animais vacinados têm sempre presentes títulos de Acs residuais (tendo um valor de razão da amostra de  $0,9 < Rz < 1,1$ ). No entanto, esta reação cruzada apenas ocorre durante seis meses após a vacinação (INNO, 2012).

O protocolo cedido pelo fabricante para a realização do teste é o seguinte:

Nos momentos antes da elaboração do teste, todos os reagentes devem estar à temperatura ambiente durante dez minutos.

1º. Preparação da “Solução de Lavagem diluída”: diluir um volume da solução de lavagem (frasco nº0) em 19 volumes de água destilada. Cada poço pode ser lavado manualmente com 4

ml de Solução de Lavagem diluída. Esta solução diluída previamente realizada pode ficar armazenada a 2°C-8°C durante 4 semanas;

2°. Preparação das amostras: diluir as amostras na concentração de 1:20 com Diluente de Amostras (frasco número (nº) 1) da seguinte forma: misturar 10 µl de amostra com 190 µl do Diluente de Amostras;

Nota 1: os controlos positivo alto, positivo baixo e negativo são facultados pelo fabricante e encontram-se prontos a utilizar.

3°. A película protetora que se encontra a cobrir os poços, deve apenas ser removida momentos antes da sua utilização. Após a remoção da mesma devem ser colocados 100 µl da amostra previamente diluída e o controlo nº6 (positivo baixo) nos respetivos poços (Figura 13). Agitar brandamente durante 15 segundos;

Nota 2: o fabricante recomenda a utilização de pelo menos um controlo por coluna de placa para validação dos resultados.

4°. Incubar a temperatura ambiente (20-25°C) durante 10 minutos;

5°. Remover o conteúdo dos poços e lavar o poço cinco vezes com 300 µl de Solução de Lavagem Diluída;

6°. Adicionar 100 µl de conjugado (frasco nº2) em cada poço utilizado e agitar suavemente durante 15 segundos;

7°. Incubar a temperatura ambiente (20-25°C) durante 5 minutos;

8°. Repetir o 5º passo;

9°. Acrescentar 100 µl de Substrato (frasco nº3) em cada poço utilizado e agitar brandamente durante 10 segundos;

10°. Incubar no escuro e à temperatura ambiente durante 10 minutos;

11°. Adicionar 100 µl de Solução de Paragem (frasco nº4) em cada poço utilizado;

12°. Ler as densidades óticas num leitor de ELISA com filtro de 450 nanómetros (nm);

13°. Calcular a Rz da amostra:  $\frac{\text{Densidade ótica da amostra}}{\text{Densidade ótica do controlo positivo baixo}}$  (no caso do leitor de ELISA não fornecer de imediato o Rz);

14°. Interpretação do resultado.

As Soluções e os Controlos utilizados no teste acima mencionado encontram-se demonstrados na figura 12.

Figura 12- Soluções e Controlos numerados pertencentes ao teste Leiscan® Leishmania ELISA Test, Esteve Veterinária (Original).



Figura 13- Imagem correspondente ao 3º passo do portocolo (colocação de amostra e controlo nos poços) (Original).





Desta forma, o teste não deteta as PSE em animais vacinados, conduzindo desta forma a menos casos falsos positivos (Virbac, 2011).

Desvantagens do teste (Virbac, 2011):

- Tem menor sensibilidade que os testes serológicos IFI e ELISA;
- Pode ocorrer o aparecimento de alguns falsos negativos;
- Uma vez que é um método qualitativo, não é possível titular os Ac's quando existem casos positivos.

Para a realização do teste é necessária uma gota da amostra (plasma, soro ou sangue com anti-coagulante) e um *kit* com um dispositivo, uma pipeta de utilização única e um frasco de reagente. O mesmo pode ser armazenado à temperatura ambiente (2°C-30°C) (Virbac, 2011). Aquando da colocação de uma gota da amostra no poço do dispositivo de teste, forma-se uma união entre as partículas do conjugado (presente no referido poço). Estas partículas ligam-se a qualquer anticorpo anti-*L. infantum* existente na amostra colocada, originando assim um complexo conjugado/Ac, que migra pela membrana por capilaridade, formando a banda de controlo (banda rosa) (Virbac, 2011). Na membrana do dispositivo de teste existem antigénios específicos para *L. infantum*, que em caso de positividade se unem ao complexo conjugado/Ac e migram até ao fim da membrana, formando outra banda cor-de-rosa (Virbac, 2011).

O protocolo cedido pelo fabricante para a realização do teste é o seguinte (Virbac, 2011) (Figura 15):

1º. Adicionar uma gota de amostra (plasma, soro ou sangue com anti-coagulante) com a pipeta de utilização única em posição vertical no poço do dispositivo de teste;

2º. Imediatamente, juntar cinco gotas do reagente no mesmo poço onde foi anteriormente colocada a amostra.

Nota: se após dois minutos da colocação do reagente não houver migração, devem ser adicionadas mais duas gotas de reagente.

3º. Esperar 15 minutos;

4º. Interpretação do resultado:

- Negativo: presença de uma única banda cor-de-rosa (banda de controlo);

- Positivo: presença de duas bandas cor-de-rosa (Figura 16);
- Inválido: ausência de banda cor-de-rosa.

Figura 15- Instruções para realização do teste Speed Leish K®, Virbac (Virbac, 2011).

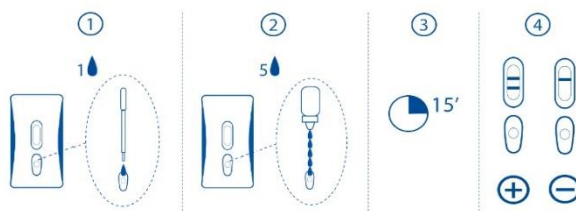


Figura 16-Resultado positivo ao teste Speed Leish K ® (Original).



Quando se realiza o teste para rastreio de positividade e posterior administração de vacina:

- Se der negativo no teste deve-se proceder à administração de vacina *CaniLeish®*, Virbac.
- Se positivo ao teste sugere-se confirmação por IFI ou ELISA.

Quando confirmação por IFI ou ELISA:

- Se for negativo após a realização de um dos testes pode ser administrada a vacina;
- Se por sua vez for positivo, pode ser realizado novamente o teste rápido *Speed Leish K®*, Virbac, ou repetir o teste de IFI ou ELISA passados 3 meses. Se passado este tempo o animal voltar a manifestar-se como positivo, não deve ser vacinado (Virbac, 2011).

#### **4.4. Análises laboratoriais**

As análises laboratoriais podem ser utilizadas como meio complementar para o diagnóstico, prognóstico e tratamento das doenças. De forma a otimizar o prognóstico e tratamento dos cães com LCan e Babesiose Canina pertencentes ao estudo foi sugerido aos seus proprietários a realização de um painel de análises (obtido na consulta de diagnóstico/controlo ou rastreio e assim antes de qualquer instituição terapêutica). No entanto, e por diversas causas, marcadas maioritariamente por contenção monetária por parte dos proprietários dos animais, foram apenas realizadas análises a 9 dos 60 animais que fizeram parte do estudo.

Do total de 32 cães diagnosticados com Babesiose Canina, apenas seis animais realizaram análises clínicas e destes, quatro estavam internados.

Dos 28 animais que realizaram diagnóstico, controlo ou rastreio de LCan, apenas três realizaram análises laboratoriais. Nenhum dos referidos animais estava internado.

Como foi anteriormente referido, as análises foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas Santos Monteiro e basearam-se na elaboração de hemograma e do estudo bioquímico. O hemograma foi realizado no sentido de averiguar quaisquer alterações hematológicas presentes e avaliaram-se diferentes parâmetros, conforme discriminado nas Tabelas 15 e 16. O painel de análises bioquímicas foi pedido com o intuito de detetar alterações renais, hepáticas, metabólicas e marcadores inflamatórios. Desta forma os diferentes parâmetros que foram analisados encontram-se discriminados nas Tabelas 15 e 16.

#### **5. Inquérito (inserido no anexo)**

De forma a otimizar o estudo foi realizado um inquérito, que para ser preenchido foi lido em voz alta e clara pela autora ao proprietário que se fez acompanhar do animal, durante a consulta. Desta forma, o inquérito estava impresso em papel e as perguntas foram lidas e esclarecidas quando necessário, de forma a obter uma resposta clara por parte do cliente. Este inquérito foi realizado aos proprietários responsáveis pelos animais constituintes da amostra. Ao todo foram respondidos 60 inquéritos, dos quais 32 foram respondidos por tutores de animais diagnosticados com Babesiose Canina e 28 proprietários de cães que realizaram rastreio, controlo ou diagnóstico de LCan, no período compreendido entre dia 5 de setembro de 2016 e dia 28 de fevereiro de 2017 na Clínica Veterinária Douro Sul.

O presente inquérito foi constituído por 17 perguntas de resposta curta e escolha múltipla. Optamos por ler as questões em voz alta e clara, de forma a garantir que fossem obtidas as respostas necessárias, e assim, à medida que foram colocadas as questões, foram esclarecidas quaisquer dúvidas existentes por parte dos tutores. As perguntas que constaram do inquérito tiveram como objetivo obter informações relativamente às características do animal (ex: raça,

género, idade), da sua localização geográfica e hábitos de profilaxia (desparasitação para ectoparasitas e vacinação).

Sendo assim, o inquérito estava dividido em três secções: Informação sobre o animal, hábitos de profilaxia e ocorrências na clínica.

## **6. Análise dos dados e processamento dos resultados**

Foi possível processar todos os resultados obtidos através do inquérito realizado. No entanto, no que toca aos resultados do estudo bioquímico foi necessário analisá-los individualmente, uma vez que os parâmetros bioquímicos analisados não foram os mesmos em todos os animais. Os resultados dos inquéritos foram registados num ficheiro do programa Microsoft Excel 2013® e no programa IBM SPSS® para análise descritiva.

## V - RESULTADOS

### 1. Inquérito

Uma vez que os inquéritos foram realizados aos proprietários dos animais diagnosticados com Babesiose Canina, e dos animais que realizaram rastreio, diagnóstico ou controlo de Leishmaniose Canina, foi possível preencher um total de 60 inquéritos.

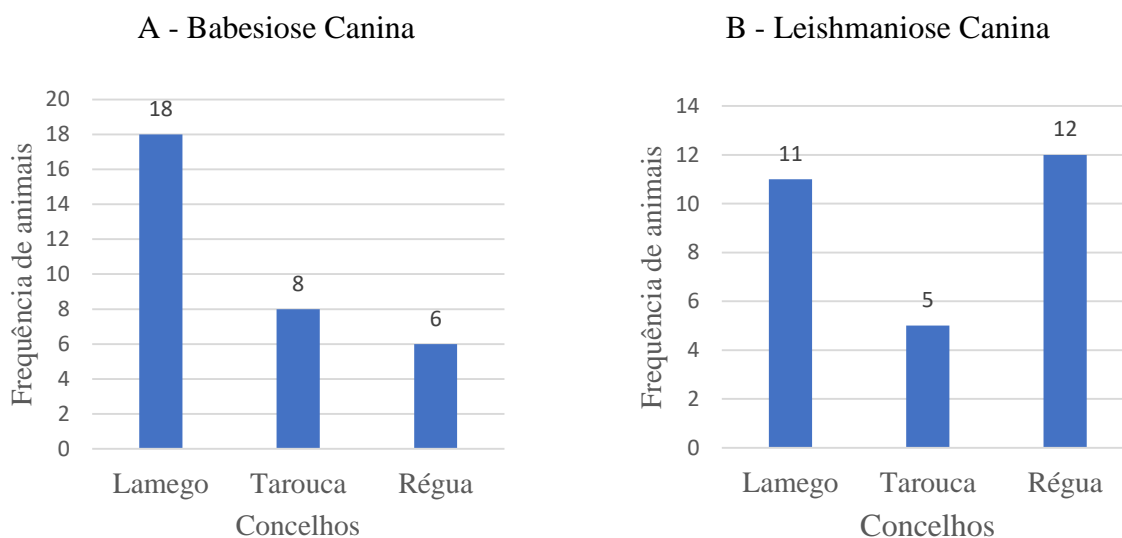
#### 1.1. Identificação do concelho

O estudo foi realizado nos concelhos de Lamego, Tarouca e Peso da Régua, e com a realização do mesmo pretendemos determinar qual dos concelhos foi o mais representado, tendo em conta a localização geográfica dos animais.

Relativamente aos 32 animais diagnosticados com BC: 56,3% (18/32) habitavam no concelho de Lamego, 25% pertenciam ao concelho de Tarouca (8/32) e 18,8% dos cães pertenciam ao concelho do Peso da Régua (6/32). A distribuição dos animais pelos concelhos encontra-se no Gráfico 1.

Os animais que foram submetidos a diagnóstico, rastreio ou controlo de LCan, perfizeram um total de 28, e apresentaram-se distribuídos pelos concelhos da seguinte forma: 39,3% (9/28) dos animais foram provenientes do concelho de Lamego, 17,9% (5/28) pertenciam ao concelho de Tarouca ao passo que 42,9% (12/28) dos cães eram habitantes do concelho de Peso da Régua (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Distribuição dos animais amostrados pelos concelhos.

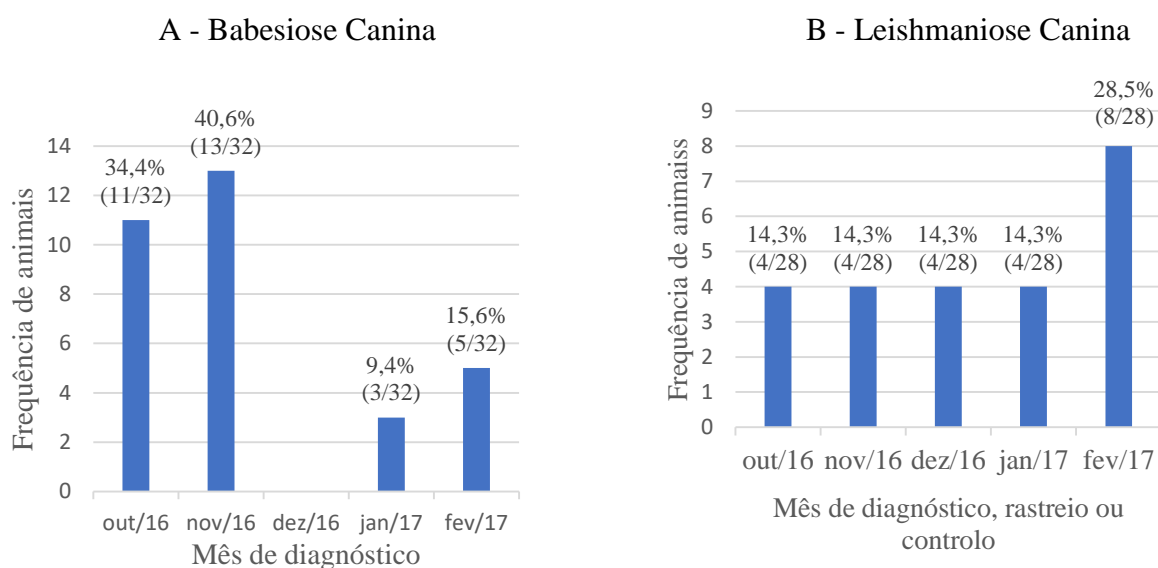


## 1.2. Identificação dos meses de diagnóstico, controlo ou rastreio

Como foi anteriormente referido, o estudo foi realizado durante o período decorrente entre 5 de setembro de 2016 e 28 de fevereiro de 2017. Relativamente aos animais diagnosticados com BC, verificámos que novembro foi o mês em que se diagnosticaram mais casos (40,6%), seguido de outubro (34,4%). Para além destes, foram diagnosticados 9,4% dos casos em janeiro e 15,6% em fevereiro. Foi possível observar que nenhum animal foi diagnosticado nos meses de setembro e dezembro de 2016 (Gráfico 2).

Antes de mais, é importante referir que dos 28 animais amostrados para LCan, 57,1% (16/28) realizaram diagnóstico, 32,1% (9/28) rastreio e 10,8% (3/28) avaliação do controlo da doença. Foi no mês de fevereiro de 2017 que se realizaram mais testes com intuito de diagnóstico, rastreio ou controlo de LCan, tendo sido testados 28,5% (8/28) dos animais amostrados neste mês. Observámos que o total de 14,3% (4/28) dos cães foram testados em cada um dos restantes meses (setembro, outubro, novembro, dezembro e janeiro) (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Distribuição dos animais amostrados pelos meses.



## 1.3. Caracterização do animal

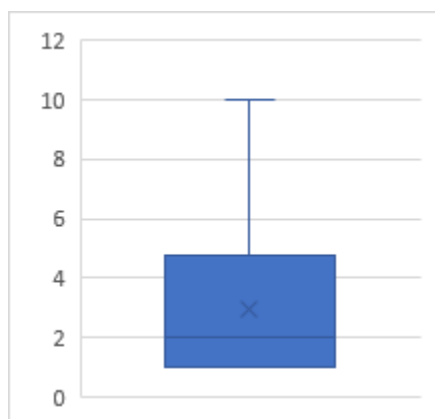
### 1.3.1. Idade

Com a análise dos dados verificámos que a presente variável não apresentou uma distribuição normal. Tendo em conta os 32 animais diagnosticados com BC, observámos uma distribuição de idades entre 1 a 10 anos. A mediana observada foi de 2 anos, como se verifica no Gráfico 3.

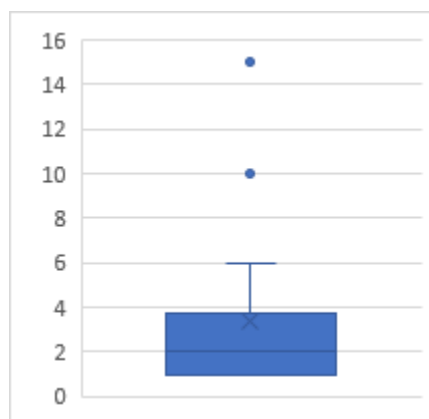
Tal como ocorreu com os animais amostrados para BC, também nos animais amostrados para LCan verificámos que a distribuição desta variável não foi normal. Neste grupo de animais foi-nos possível constatar uma distribuição de idades entre 1 ano a 15 anos com uma mediana de 2 anos, tal como mostra o Gráfico 3.

Gráfico 3 - Distribuição dos animais amostrados pelas idades.

A - Babesiose Canina



B - Leishmaniose Canina



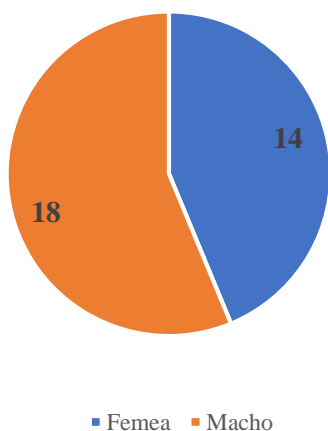
### 1.3.2. Sexo

No total dos animais referentes a BC, verificámos que 43,8% (14/32) da população pertencia ao sexo feminino, ao passo que 56,3% (18/32) da população representou o sexo masculino (Gráfico 4).

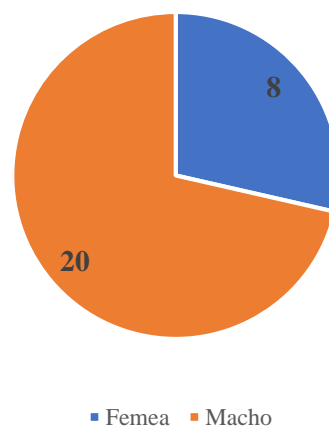
Já na amostra referente ao estudo de LCan, a população feminina assumiu uma percentagem de 28,6% (8/28) enquanto a população masculina foi representada por 71,4% (20/28) dos animais (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Distribuição dos animais amostrados pelo sexo.

A – Babesiose Canina



B – Leishmaniose Canina



### 1.3.3. Raça

Embora tenham feito parte do estudo diversas raças, verificamos que 53,1% (17/32) dos animais diagnosticados com BC eram Podengo Português (Tabela 2).

As raças que constituíram de amostra para o estudo encontram-se distribuídas no Gráfico 5. Verificamos que 46,4% (13/28) dos animais que realizaram diagnóstico, rastreamento ou controle de LCan, foram “animais sem raça definida” (SRD). As raças que serviram de amostra para o estudo encontram-se distribuídas na Tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição dos animais amostrados pela raça.

Raça dos animais diagnosticados com BC	Frequência	Raça dos animais que realizaram diagnóstico, rastreamento ou controle de LCan	Frequência
Castro Labreiro	3,1% (1/32)	Golden Retriever	3,6% (1/28)
Pequinês	3,1% (1/32)	Leão da Rodésia	3,6% (1/28)
Setter Inglês	3,1% (1/32)	Pastor Alemão	3,6% (1/28)
Podengo Português	53,1% (17/32)	Labrador Retriever	17,9% (5/28)
Boxer	3,1% (1/32)	Yorkshire Terrier	3,6% (1/28)
Pastor Alemão	3,1% (1/32)	Pastor Belga	3,6% (1/28)
Sem raça definida (SRD)	31,3% (10/32)	SRD	46,4% (13/28)

### 1.3.4. Tipo de pelagem

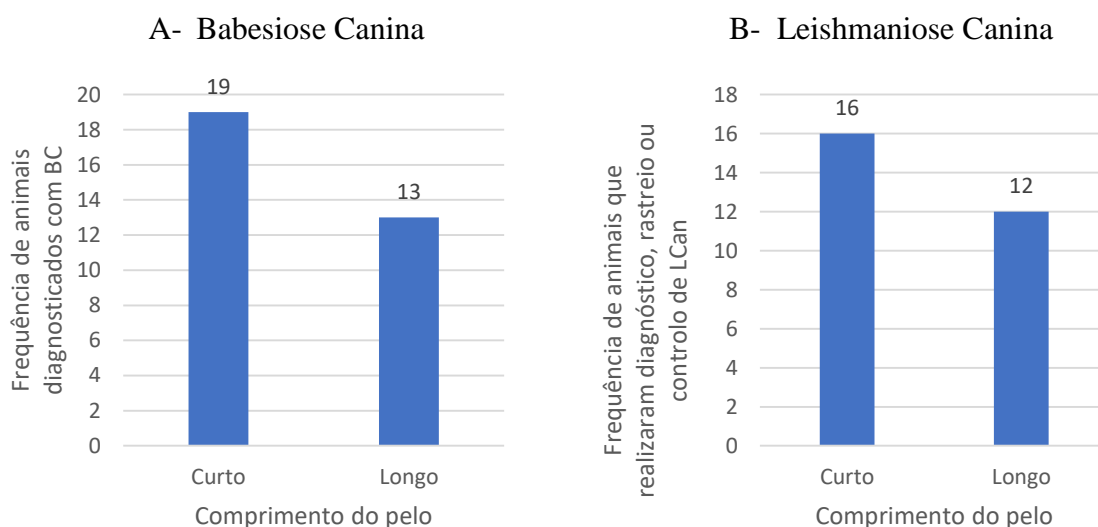
De forma a simplificar o estudo, o tipo de pelagem dos animais foi dividido em “curto” ou “longo”.

O pelo curto foi o mais frequente nos animais diagnosticados com BC, encontrando-se presente em 59,4% (19/32) dos animais. Por sua vez, o pelo longo apresentou uma frequência de 40,6% (13/32) nesta população. A frequência do tipo de pelagem dos animais diagnosticados com BC apresenta-se distribuída no Gráfico 5.

Com a elaboração deste estudo, verificámos que um maior número de animais amostrados para LCan tinham pelo curto, representados por 57,1% (16/28) da população estudada, ao passo que 42,9% (12/28) dos animais tinham pelo longo.

A frequência do tipo de pelagem dos animais amostrados para LCan apresenta-se distribuída no Gráfico 5.

Gráfico 5- Distribuição dos animais amostrados de acordo com o comprimento do pelo.



## 1.4. Características da vida do animal

### 1.4.1. Aptidão

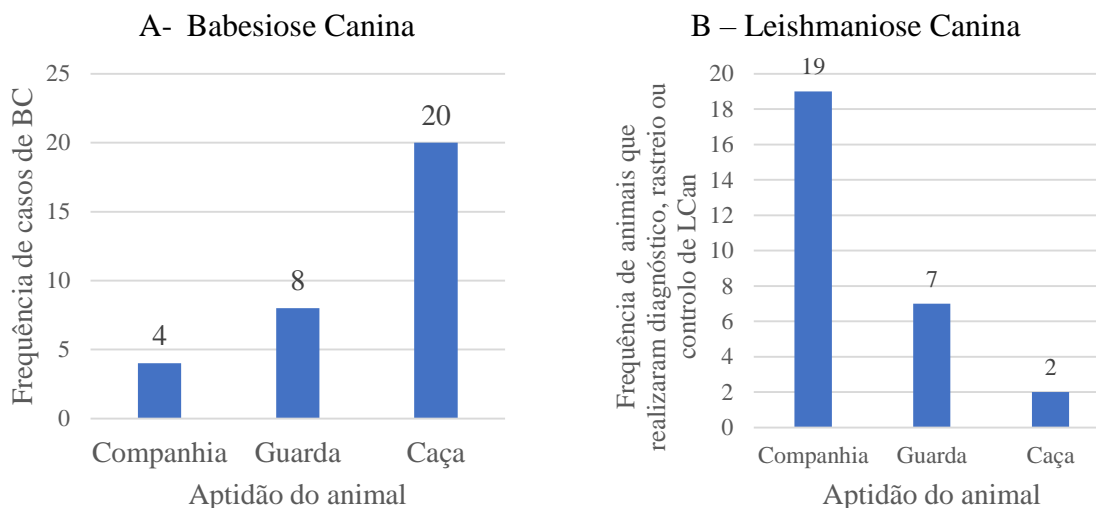
De forma a caracterizar a aptidão dos animais pertencentes ao estudo, estes foram classificados como animais de “caça”, “guarda” ou “companhia”.

Verificámos que 62,5% (20/32) dos animais diagnosticados com BC tinham como aptidão serem cães de caça, 12,5% (4/32) animais de companhia e 25% (8/32) animais de guarda.

A frequência das aptidões dos animais estudados encontra-se descrita no Gráfico 6.

Da amostra de cães com LCan, 67,9% (19/28) tinham como aptidão serem animais de companhia, 25% (7/28) animais de guarda e apenas 7,1% (2/28) tinham aptidões de caça. A frequência das aptidões dos animais estudados encontra-se descrita no Gráfico 6.

Gráfico 6 - Distribuição dos animais amostrados de acordo com a aptidão.



#### 1.4.2. Dormitório do animal

No sentido de entender quais os locais aonde dormem os animais do estudo, os possíveis dormitórios foram divididos em: “dentro de casa”, “fora de casa ao ar livre” e “fora de casa, mas num canil”.

Apurámos que 59,4% (19/32) dos animais diagnosticados com BC dormem “fora de casa, mas num canil”, 31,3% (10/32) dormem “fora de casa ao ar livre” e apenas 9,4% (3/32) da população dorme “dentro de casa”.

A frequência detalhada dos locais de dormitório dos animais estudados encontra-se discriminada na Tabela 3.

Relativamente à população estudada para LCan, verificámos que 60,7% (17/28) dos animais dormem “fora de casa ao ar livre”, 32,1% (9/28) “dentro de casa” e apenas 7,1% (2/28) dos animais dormem “fora de casa, mas num canil”.

A frequência detalhada dos locais de dormitório dos animais estudados encontra-se discriminadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Distribuição dos animais amostrados de acordo com o local de dormitório.

Local que serve como dormitório	Frequência dos animais que realizaram diagnóstico para BC	Local que serve como dormitório	Frequência dos animais que realizaram diagnóstico, rastreamento ou controle de LCan
Dentro de casa	9,4% (3/32)	Dentro de casa	32,1% (9/28)
Fora de casa ao ar livre	31,3% (10/32)	Fora de casa ao ar livre	60,7% (17/28)
Fora de casa, mas num canil	59,4% (19/32)	Fora de casa, mas num canil	7,1% (2/28)

### 1.4.3. Convívio com outros cães

Relativamente à convivência com outros cães, verificámos que dos 32 animais diagnosticados com BC, 65,6% (21/32) da amostra apresentava convívio com outros cães, enquanto 34,4% (11/32) não apresentava hábitos de convívio.

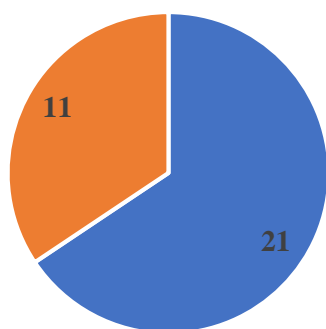
O convívio dos animais com outros cães encontra-se descrito no Gráfico 7.

Quanto aos animais amostrados para LCan, averiguámos que 39,3% (11/28) convivem com outros cães enquanto 60,7% (17/28) dos animais não o faz.

O convívio dos animais com outros cães encontra-se descrito no Gráfico 7.

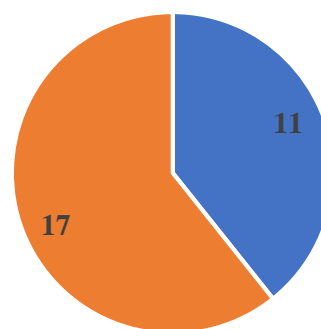
Gráfico 7 - Distribuição dos animais amostrados de acordo com o convívio com outros cães.

A – Babesiose Canina



■ Sim ■ Não

B – Leishmaniose Canina

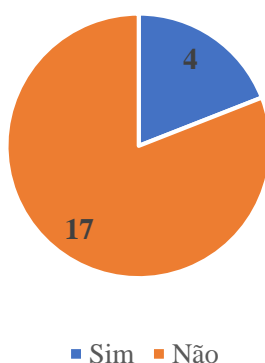


■ Sim ■ Não

#### 1.4.4. Diagnóstico positivo de BC nos cães conviventes

Determinámos que dos 32 animais diagnosticados com BC: 65,6% (21/32) apresentavam convivência com outros cães. Desses animais, observámos que 19% (4/21) dos cães conviviam com animais diagnosticados com Babesiose canina, ao passo que 81% (17/21) dos cães não convivia com outros cães com esta doença (Gráfico 8).

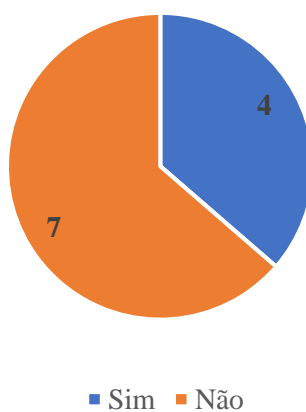
Gráfico 8 - Frequência do convívio de animais amostrados com animais diagnosticados com a mesma doença.



#### 1.4.5. Diagnóstico positivo para LCan nos cães conviventes

Do total dos 28 animais amostrados para LCan, apenas 11 conviviam com outros cães. Dos 11 animais que mantinham contacto com outros cães 36,4% (4/11) conviviam com cães diagnosticados com Leishmaniose Canina. A frequência do convívios destes animais encontra-se discriminada no Gráfico 9.

Gráfico 9 - Frequência do convívio de animais amostrados para LCan com animais diagnosticados com LCan.



#### **1.4.6. Acesso ao exterior (em que período do dia e em que locais)**

##### **1.4.6.1. Babesiose Canina**

Dos 32 animais diagnosticados com BC: 81,3% (26/32) têm acesso ao exterior, enquanto apenas 18,8% (6/32) não o fazem. Destes 26 animais que têm acesso ao exterior, 46,2% (12/26) fazem-no da parte da manhã, 23,1% (6/26) da parte da tarde e 30,8% (8/26) acedem ao exterior no período da noite.

Dos 26 animais amostrados para BC com acesso ao exterior: 23,1% (6/26) fazem-no em locais públicos, ao passo que 76,9% (20/26) apenas acedem a locais próprios para caça. Deste total de animais, 57,7% (15/26) têm acesso a ribeiros, riachos, rio, charcos ou lagos, enquanto 42,3% (11/26) são privados do contacto com zonas ricas em água.

##### **1.4.6.2. Leishmaniose Canina**

Relativamente aos 28 animais amostrados para LCan, observámos que 78,6% (22/28) acediam ao exterior, enquanto 21,4% (6/28) não. Dos 22 cães que contactavam com o exterior, registámos que 27,3% (6/22) o faziam da parte da manhã, 36,4% (8/22) da parte da tarde e 36,4% (8/22) acediam ao exterior da habitação durante a noite. Da totalidade de animais com contato ao exterior, confirmámos que 90,9% (20/22) tinham acesso a locais públicos, enquanto 9,1% (2/22) acediam a locais designados para a caça. Quanto ao contacto com ribeiros, riachos, rio, charcos ou lagos, constatámos que 81,8% (18/22) tinham acesso aos mesmos, ao passo que 18,2% (4/22) não o fazia.

#### **1.4.7. Hábitos de vacinação**

De 32 animais diagnosticados com BC, verificámos que quanto ao hábito de vacinação: 87,5% (28/32) dos mesmos se encontravam vacinados para a raiva e/ou doenças infecciosas, ao passo que 12,5% (4/32) não apresentavam este hábito. Dos 28 animais vacinados, verificámos que 75% (21/28), se encontravam apenas vacinados para a Raiva, 21,4% (6/28) estavam vacinados para Raiva e Esgana, Hepatite Infecciosa, Parvovirose, Parainfluenza e Leptospirose Canina. Verificámos também que apenas um cão (3,6%) estava vacinado para Esgana, Hepatite Infecciosa, Parvovirose, Parainfluenza e Leptospirose Canina, e que nenhum dos animais amostrados se encontrava vacinado para Babesiose Canina ou para Leishmaniose Canina.

A frequência da vacinação dos animais diagnosticados com BC encontra-se descrita na Tabela 4.

Verificámos que dos 28 animais amostrados para LCan: 96,4% (27/28) apresentavam hábitos de vacinação, ao passo que apenas um cão (3,6%) não se encontrava vacinado contra nenhuma doença. Os 27 animais encontravam-se vacinados da seguinte forma: apenas um animal (3,7%) vacinado para Esgana, Hepatite Infecciosa, Parvovirose, Parainfluenza e Leptospirose Canina, 11,1% (3/27) da população estava vacinada para a Raiva, 55,6% (15/27) encontravam-se vacinados para a Raiva, Esgana, Hepatite Infecciosa, Parvovirose, Parainfluenza e Leptospirose Canina e 29,6% (8/27) da população estava vacinada para Raiva, Esgana, Hepatite Infecciosa, Parvovirose, Parainfluenza, Leptospirose Canina e Leishmaniose Canina. Em toda a amostra não foi verificada nenhuma vacinação para Babesiose Canina (Tabela 4).

Tabela 4 – Frequência de vacinação dos animais amostrados.

<b>Doenças</b>	<b>Frequência de animais amostrados para BC</b>	<b>Doenças</b>	<b>Frequência de animais amostrados para LCan</b>
<b>Raiva</b>	75% (21/28)	<b>Raiva</b>	11,1% (3/27)
<b>Raiva + Esgana + Hepatite Infecciosa + Parvovirose + Parainfluenza + Leptospirose Canina</b>	21,4% (6/28)	<b>Raiva + Esgana + Hepatite Infecciosa + Parvovirose + Parainfluenza + Leptospirose Canina</b>	55,6% (15/27)
<b>Esgana + Hepatite Infecciosa + Parvovirose + Parainfluenza + Leptospirose Canina</b>	3,6% (1/28)	<b>Esgana + Hepatite Infecciosa + Parvovirose + Parainfluenza + Leptospirose Canina</b>	3,7% (1/27)
<b>Babesiose Canina</b>	0	<b>Raiva + Esgana + Hepatite Infecciosa + Parvovirose + Parainfluenza + Leptospirose Canina + Leishmaniose Canina</b>	29,6% (8/27)
<b>Leishmaniose Canina</b>	0	<b>Babesiose Canina</b>	0
		<b>Leishmaniose Canina</b>	0

## 1.4.8. Hábitos de desparasitação

### 1.4.8.1. Babesiose Canina

Quanto aos hábitos de desparasitação para ectoparasitas, verificámos que, nos 32 animais diagnosticados com BC, 53,1% (17/32) apresentavam este hábito profilático, ao passo que 46,9% (15/32) dos animais não tinham acesso a métodos de desparasitação externa. Nos 17 animais com acesso a desparasitação externa, as formas do ectoparasiticida variaram entre unção punctiforme (*spot-on*), coleira e injetável.

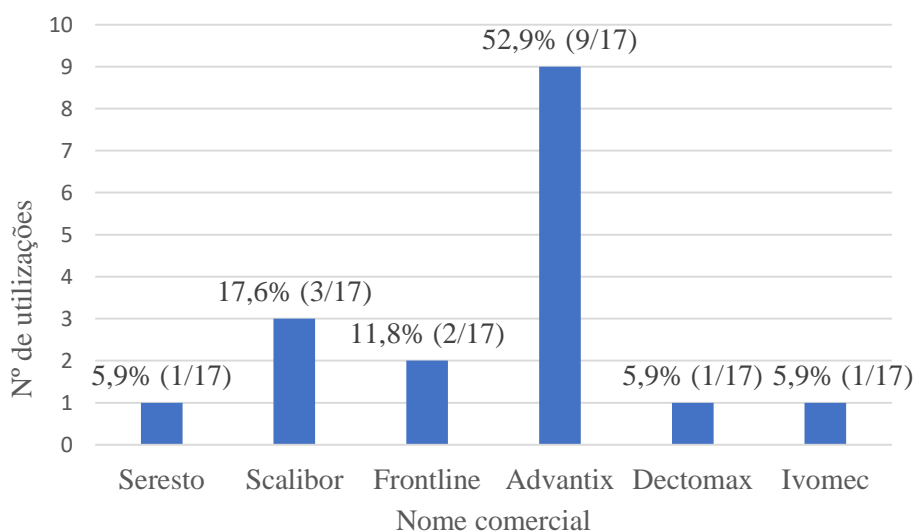
A frequência da forma do ectoparasiticida encontra-se na Tabela 5.

Tabela 5 - Frequência da forma do ectoparasiticida utilizado nos animais diagnosticados com BC.

Forma do ectoparasiticida externo	Frequência dos animais amostrados para BC
Unção punctiforme ( <i>spot on</i> )	64,7% (11/17)
Coleira	23,5% (4/17)
Injetável	11,8% (2/17)

Tendo em conta as diversas formas de ectoparasiticidas externos, nos animais diagnosticados com BC, foram aplicados os seguintes produtos: Seresto®, Bayer, Scalibor®, MSD, Frontline®, Merial, Advantix® Bayer, Dectomax®, Zoetis e Ivomec®,Merial. A frequência da aplicação encontra-se discriminada no Gráfico 10.

Gráfico 10 - Frequência dos ectoparasiticidas externos utilizados nos animais diagnosticados com BC.



De forma a verificarmos se a desparasitação externa foi realizada de forma correta, comparamos a frequência de utilização recomendada pelo fabricante dos produtos com a frequência de aplicação apresentada nos animais amostrados.

Como foi anteriormente mencionado, dos 17 animais que tiveram acesso a ectoparasiticidas externos, 64,7% (11/17) foi sob a forma de unção punctiforme. Os produtos utilizados variaram entre Frontline®, Merial (18,2%) e Advantix® Bayer (81,8%).

Os produtos e as respetivas frequências de utilização encontram-se descritas na Tabela 6.

Tabela 6 - Frequência dos produtos utilizados sob a forma de unção punctiforme nos animais diagnosticados com BC.

<b>Produto utilizado sob a forma de unção punctiforme (spot-on)</b>	<b>Frequência de utilização recomendável pelo fabricante</b>	<b>Frequência utilizada no animal</b>
<b>Frontline®, Merial</b>	4 em 4 semanas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3 em 3 meses: 18,2% (2/11) da população apresentava a aplicação do produto neste intervalo de tempo;</li> <li>• 7 em 7 semanas: 18,2% (2/11) dos animais apresentava a aplicação do produto neste intervalo de tempo;</li> </ul>
<b>Advantix® Bayer</b>	4 em 4 semanas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 8 em 8 semanas: 54,5% (6/11) da população apresentava a aplicação do produto neste intervalo de tempo;</li> <li>• 3 em 3 meses: 9,1% (1/11) dos animais apresentava a aplicação do produto neste intervalo de tempo.</li> </ul>

Do total de animais com acesso a ectoparasiticidas, 23,5% (4/17) apresentava aplicação do mesmo sob a forma de coleira. Destes, 75% (3/4) utilizaram Scalibor®, MSD e 25% (1/4) Seresto®, Bayer.

Os presentes produtos e a respetiva frequência de utilização encontram-se descritos na Tabela 7.

Tabela 7 - Frequência dos produtos utilizados sob a forma de coleira nos animais diagnosticados com BC.

Produto utilizado sobre a forma de coleira	Frequência de utilização recomendável pelo fabricante	Frequência utilizada no animal
Scalibor®, MSD	6 em 6 meses	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 7 em 7 meses: 50% (4/4) dos animais apresentava a aplicação do produto neste intervalo de tempo;</li> <li>• Anual: 25% (1/4) da população apresentava a aplicação do produto neste intervalo de tempo.</li> </ul>
Seresto®, Bayer	8 em 8 meses	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anual: 25% (1/4) da população apresentava a aplicação do produto neste intervalo de tempo.</li> </ul>

Os fármacos Dectomax®, Zoetis e Ivomec®, Merial têm como espécie alvo animais de pecuária, logo foram administrações *off label*, no entanto, foram colocados em 11,8% (2/17) dos cães desparasitados. Verificamos que ambos os produtos foram colocados sob a forma de solução injetável pelo próprio proprietário, com uma frequência de aplicação anual.

#### 1.4.8.2. Leishmaniose Canina

Ao contrário do que foi observado no grupo anteriormente mencionado, 100% (28/28) da população amostrada para LCan, apresentava hábitos de desparasitação externa. Nestes animais, os produtos utilizados assumiram a forma de coleiras e pipetas (*spot-on*).

A distribuição da forma dos ectoparasiticidas utilizados encontra-se discriminada na Tabela 8.

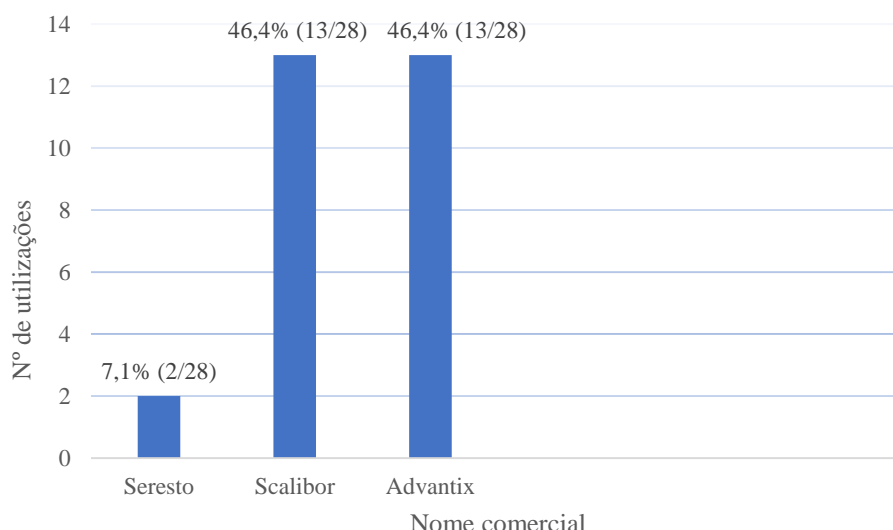
Tabela 8 - Frequência das formas de ectoparasiticidas nos animais amostrados para LCan.

Forma do ectoparasiticida	Frequência dos animais amostrados para LCan
Pipeta ( <i>spot-on</i> )	42,9% (12/28)
Coleira	57,1% (16/28)

Neste grupo de animais foram apenas utilizados três produtos: Seresto®, Bayer, Scalibor®, MSD e Advantix® Bayer.

A respetiva frequência de aplicação encontra-se descrita no Gráfico 11.

Gráfico 11 - Frequência dos ectoparasiticidas externos utilizados nos animais amostrados para LCan.



Tal como ocorreu no estudo de Babesiose Canina, de forma a verificarmos se a profilaxia por meios farmacológicos estava a ser realizada corretamente, recorremos à comparação da frequência de utilização recomendada pelo fabricante dos produtos, com a frequência utilizada em cada animal amostrado. Como verificámos anteriormente, 100% (28/28) da população amostrada apresentou acesso a ectoparasiticidas. Os fármacos utilizados como medida profilática assumiram a forma de unção punctiforme em 42,9% (12/28) da população amostrada e coleira em 57,1% (16/28).

O ectoparasiticida Advantix® Bayer foi o único utilizado sob a forma de unção punctiforme nos animais amostrados para LCan. Verificámos que este ectoparasiticida foi aplicado de acordo com as recomendações do fabricante em 33,3% (4/12) da população.

O presente produto e a respetiva frequência de utilização estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9 - Frequência do produto utilizado sob a forma de unção punctiforme nos animais amostrados para LCan.

Produto utilizado sob a forma de unção punctiforme	Frequência de utilização recomendável pelo fabricante	Frequência utilizada no animal
<b>Advantix® Bayer</b>	4 em 4 semanas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4 em 4 semanas: 33,3% (4/12) da população apresentava a aplicação do produto neste intervalo de tempo;</li> <li>• 8 em 8 semanas: 41,7% (5/12) da população apresentava a aplicação do produto neste intervalo de tempo;</li> <li>• 12 em 12 semanas: 25% (3/12) dos animais apresentava a aplicação do produto neste intervalo de tempo.</li> </ul>

Sob a forma de coleira foram utilizados dois ectoparasiticidas: Scalibor®, MSD em 87,5% (14/16) da população e Seresto®, Bayer em 12,5% (2/16) dos cães amostrados.

Os produtos referidos e a respetiva frequência de utilização estão discriminados na Tabela 10.

Tabela 10 - Frequência do produto utilizado sob a forma de coleira nos animais amostrados para LCan.

<b>Produto utilizado sob a forma de coleira</b>	<b>Frequência de utilização recomendável pelo fabricante</b>	<b>Frequência utilizada no animal</b>
<b>Scalibor®, MSD</b>	6 em 6 meses	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 6 em 6 meses: 42,9% (6/14) dos animais amostrados apresentava a aplicação do produto neste intervalo de tempo;</li> <li>• 8 em 8 meses: 14,2% (2/14) da população apresentava a aplicação do produto neste intervalo de tempo;</li> <li>• Anual: 42,9% (6/14) dos cães amostrados apresentava a aplicação do produto neste intervalo de tempo;</li> </ul>
<b>Seresto®, Bayer</b>	8 em 8 meses	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anual: 100% (2/2) dos animais utilizaram este produto com uma frequência anual.</li> </ul>

#### **1.4.9. Reinfecção de BC**

Uma vez que após o tratamento, os animais diagnosticados com BC podem voltar a contrair a doença, questionámos os proprietários, com o objetivo de compreender se o mesmo já tinha sido diagnosticado com BC no passado.

Dos 32 animais que serviram de amostra, verificou-se que apenas 2 casos (6,3%) já tinham sido diagnosticados anteriormente com Babesiose Canina.

#### **1.5. Sinais apresentados na consulta**

A frequência dos principais sinais apresentados pelos 32 animais com diagnóstico positivo a BC na consulta encontram-se discriminados na Tabela 11. Verificámos que a letargia (15,3%) foi o sinal mais frequente nos animais diagnosticados com BC, seguida pela hipertermia e presença de carraças (ambas com 14,6%).

Já nos cães amostrados para LCan, verificámos que a dermatite alopecica (orelhas, nariz e olhos) foi o principal sinal apresentado (28,6%), seguido pelo défice cicatricial (25%) e pela

dermatite descamativa e onicogrifose (ambas com 14,3%). Os restantes sinais apresentados pelos animais na consulta estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11 - Frequência do produto utilizado sob a forma de coleira nos animais amostrados.

### 1.6. Internamento

Sinais apresentados pelos animais diagnosticados com BC	Frequência	Sinais apresentados pelos animais amostrados para LCan	Frequência
Hipertermia	14,6% (20/32)	Dermatite alopecica (orelhas, nariz e olhos)	25% (7/28)
Hematúria	9,5% (13/32)	Dermatite ulcerativa	10,7% (3/28)
Letargia	15,3% (21/32)	Dermatite descamativa	10,7% (3/28)
Perda de apetite	13,1% (18/32)	Onicogrifose	10,7% (3/28)
Perda de peso	6,6% (9/32)	Défice cicatricial	17,9% (5/28)
Caquexia	3,6% (5/32)	Hiperqueratose nasal	3,6% (1/28)
Icterícia	2,9% (4/32)	Linfadenomegália (popliteos)	7,1% (2/28)
Naúsea	3,6% (5/32)	Piodermite bacteriana	3,6% (1/28)
Vômitos	2,9% (4/32)	Perda de apetite	3,6% (1/28)
Desidratação	6,6% (9/32)	Caquexia	7,1% (2/28)
Palidez das mucosas	10,22% (14/32)		
Presença de pulgas	2,2% (3/32)		
Presença de carrças	14,6% (20/32)		
Nistagmus	0,73% (1/32)		

#### 1.6.1. Babesiose Canina

Do total de 32 animais diagnosticados com BC, observámos que 37,5% (12/32) dos animais tiveram que ser internados na CV Douro Sul, ao passo que 62,5% (20/32) pôde ir para casa após a consulta.

#### 1.6.2. Leishmaniose Canina

Verificámos que nenhum dos 28 animais amostrados para LCan, teve que ser internado após o rastreio, diagnóstico ou controlo da doença.

### 1.7. Morte

Este parâmetro teve em conta os casos de óbito na clínica, e os casos de morte que ocorreram em casa.

### 1.7.1. Babesiose Canina

Após o diagnóstico de BC, constatámos que 15,6 % (5/32) da população amostrada morreu, enquanto os restantes 84,4% (20/32) sobreviveram.

### 1.7.2. Leishmaniose Canina

Já nos animais que serviram de amostra para LCan, verificámos que nenhum dos mesmos morreu, sobrevivendo assim 100% (28/28) da população.

## 1.8. Concomitância de LCan e BC

Embora a pesquisa de concomitância de doenças não fizesse parte dos objetivos da presente dissertação, verificámos que o mesmo animal foi diagnosticado com Leishmaniose Canina em setembro de 2016 e Babesiose Canina em outubro do mesmo ano.

## 2. Resultados laboratoriais

### 2.1. Esfregaços sanguíneos

Os esfregaços sanguíneos serviram como método de diagnóstico de Babesiose Canina, e uma vez que apenas fizeram parte do estudo animais com diagnóstico positivo à mesma, foram visualizadas diversas formas intraeritrocitárias de *Babesia* spp. (Figura 17) nos 32 esfregaços realizados (32/32).

Figura 17- Merozoítos intraeritrocitários de *Babesia* spp. num cão diagnosticado com Babesiose canina. obj. x400, oc. x10 (Original).



## 2.2. Leiscan® Leishmania ELISA Test, Esteve Veterinária

O presente teste foi utilizado em 71,4% (20/28) dos animais que realizaram rastreio, controlo e diagnóstico de Leishmaniose Canina. Desta forma, foi aplicado como auxílio ao diagnóstico em 50% (10/20) da população amostrada, como método de rastreio em 35% (7/20) dos animais e foi realizado como método de avaliação do controlo em 15% (3/20) dos animais amostrados. Dos 20 testes de ELISA realizados, os resultados foram os seguintes: 15% (3/20) dos animais tiveram valores compatíveis com “positivo muito alto”, 35% (7/20) positivo baixo, 20% (4/20) positivo alto e 30% (6/20) não apresentavam infeção por LCan. Os resultados obtidos e os respetivos procedimentos estão discriminados na Tabela 12.

Tabela 12 - Frequência dos resultados obtidos pelo método de ELISA.

Resultado obtido	Frequência do método utilizado
Positivo	<ul style="list-style-type: none"><li>70% (14/20) dos animais amostrados.</li></ul>
Negativo	<ul style="list-style-type: none"><li>30% (6/20) dos animais amostrados.</li></ul>

## 2.3. Speed Leish K®, Virbac

Este teste foi utilizado em 28,6% (8/28) da população amostrada para LCan, e serviu como método de diagnóstico em 75% (6/8) dos animais e como forma de rastreio em 25% (2/8) dos animais estudados.

Os resultados obtidos através deste teste dividem-se em “positivo” ou “negativo” e verificámos que dos testes realizados 50% (4/8) foram negativos e 50% (4/8) positivos. Os resultados e respetivas utilizações estão descritas na Tabela 13.

Tabela 13 - Frequência dos resultados obtidos através do teste imunocromatográfico.

Resultado obtido	Frequência do método utilizado
Positivo	<ul style="list-style-type: none"><li>100% (4/4) utilizado como método de Diagnóstico;</li></ul>
Negativo	<ul style="list-style-type: none"><li>75% (3/4) utilizado como método de Rastreio;</li><li>25% (1/4) utilizado como método de Diagnóstico.</li></ul>

Através da análise dos dois métodos utilizados para diagnóstico, rastreio e controlo de Leishmaniose Canina, verificámos que 60,7% (17/28) dos animais amostrados foram positivos para a doença.

## **2.4. Análises laboratoriais hematológicas e bioquímicas**

Apesar do apelo à importância da elaboração de análises laboratoriais para o prognóstico e tratamento dos animais estudados, por questões financeiras dos proprietários, não foi possível realizá-las em todos os animais. Por este motivo, apenas 15% (9/60) dos cães foram sujeitos a análises laboratoriais desta índole. Destes, apenas 18,8% (6/32) foram animais diagnosticados com Babesiose Canina e 10,7% (3/28) foram animais diagnosticados com Leishmaniose Canina. Em relação aos animais submetidos a este tipo de análises, 66,7% tinham BC (6/9) e 33,3 tinham LCan (3/9).

De ressaltar, que as análises laboratoriais foram requeridas no decorrer da consulta em que os animais foram testados para as respectivas doenças, e desta forma antes de qualquer instituição terapêutica. Para além disto, é ainda importante mencionar que o preço final das análises variou consoante o número de parâmetros pedidos, e por este motivo não foi possível analisar os mesmos parâmetros na análise bioquímica em todos os animais. Desta forma, os parâmetros do estudo bioquímico serão descritos individualmente. Os mesmos parâmetros do hemograma foram analisados em todos os animais amostrados.

### **2.4.1. Análises laboratoriais relativas aos animais amostrados para Babesiose Canina**

De ressaltar, que 100% (6/6) dos animais sujeitos a análises laboratoriais, realizaram hemograma e que foram analisados os mesmos parâmetros em todos os animais. A descrição do hemograma dos animais diagnosticados com Babesiose Canina encontra-se na Tabela 14.

Tabela 14 - Valores dos parâmetros hematológicos e bioquímicos nos cães amostrados para BC.

Valores dos parâmetros hematológicos e bioquímicos nos cães amostrados para BC							
Hemograma							
Parametro	Valor Referência no cão (Meyer & Harvey, 2007)	A	B	C	D	E	F
Eritrócitos	5,4-7,8x10 <sup>12</sup> /L	4,8 x10 <sup>12</sup> /L	5,2 x10 <sup>12</sup> /L	4,3 x10 <sup>12</sup> /L	5,1 x10 <sup>12</sup> /L	4,5 x10 <sup>12</sup> /L	4,7 x10 <sup>12</sup> /L
Hemoglobina	13-19g/dL	11 g/dL	10 g/dL	8 g/dL	12 g/dL	11 g/dL	7 g/dL
Hematócrito	37-54%	35%	29%	30%	32%	35%	31%
V.G.M	62-74fL	58 fL	63 fL	56 fL	71 fL	64 fL	66 fL
H.C.M	22-27Pg	24 Pg	22 Pg	26 Pg	22 Pg	27 Pg	25 Pg
C.H.G.M	32-36g/dL	34 g/dL	39 g/dL	33 g/dL	38 g/dL	35 g/dL	34 g/dL
Leucócitos	6,0-17,0%	15%	7%	5,1%	10,3%	8%	13%
Plaquetas	250-500x10 <sup>9</sup> /l	184 x10 <sup>9</sup> /l	200 x10 <sup>9</sup> /l	168 x10 <sup>9</sup> /l	196 x10 <sup>9</sup> /l	178 x10 <sup>9</sup> /l	180 x10 <sup>9</sup> /l
Bioquímica							
Creatinina	0,5-1,4mg/dL	0,86 mg/dL	0,48 mg/dL	0,65 mg/dL	0,82 mg/dL	0,75 mg/dL	0,85 mg/dL
Ureia	7-25mg/dL	96 mg/dL	37 mg/dL	91 mg/dL	82 mg/dL	41 mg/dL	271 mg/dL
TRANS.GLUT.OXAL (TGO/AST)	16-43UI/L	103 UI/L	39 UI/L	360 UI/L	285 UI/L	61 UI/L	104 UI/L
TRANS.GLUT.PIR (TGP/ALT)	15-58UI/L	54 UI/L	28 UI/L	37 UI/L	44 UI/L	47 UI/L	38 UI/L
Fosfatase Alcalina	0-200UI/L	252 UI/L	169 UI/L	169 UI/L	131 UI/L	54 UI/L	128 UI/L
Albumina	2,5-3,6g/dL	1,4 g/dL	2,0 g/dL	2,0 g/dL	1,7 g/dL	2,3 g/dL	1,5 g/dL
Proteínas totais	5,4-7,1g/dL	3,7 g/dL	-	-	-	5,6 g/dL	3,3 g/dL
Bilirrubina total	0,1-0,3mg/dL	5,0 mg/dL	-	3,8 mg/dL	0,7 mg/dL	-	8,3 mg/dL
Glicose	77-120mg/dL	-	118 mg/dL	119 mg/dL	120 mg/dL	117 mg/dL	-

Com a descrição do estudo bioquímico realizado aos 6 animais diagnosticados com BC, verificamos que ao todo foram analisados 9 parâmetros. Estes parâmetros incidiram sobre a função renal, hepática e marcadores inflamatórios.

De forma a compreender a função renal, utilizaram-se dois parâmetros: ureia e creatinina. Nestes 6 animais, verificámos que 83,3% (5/6) manifestaram valores considerados normais para creatinina e 100% apresentou o valor correspondente à ureia acima do valor de referência.

Para a função hepática e hepatobiliar foram analisados: ALT, AST, fosfatase alcalina, albumina e bilirrubina total. O parâmetro ALT foi analisado em 83,3% (5/6) dos animais, e destes, verificámos que 100% (5/5) apresentavam este valor dentro dos limites de referência. Já o parâmetro AST foi investigado nos 6 animais, e nestes verificámos que 66,7% (4/6) manifestaram este parâmetro acima do valor considerado normal. A fosfatase alcalina foi igualmente analisada nos 6 animais e constatámos que apenas 33,3% (2/6) manifestaram aumento deste valor comparativamente com o valor de referência.

Verificámos também que 100% (6/6) dos animais apresentaram o valor de albumina abaixo do valor de referência. Por sua vez, a bilirrubina total foi analisada em 66,7% (4/6) dos cães e destes, 100% (4/4) apresentaram este valor acima do considerado normal.

Para além de todos os parâmetros acima referidos, também os marcadores inflamatórios foram investigados. Para isto, foram requeridas proteínas totais em 50% (3/6) dos cães destes, verificámos que 66,7% apresentavam um valor abaixo do tido como referência. Por fim, em 66,7% (4/6) dos animais foi analisado o valor da glicose e observámos que 100% (4/4) apresentavam este valor normalizado.

#### **2.4.2. Análises laboratoriais relativas aos animais amostrados para Leishmaniose Canina**

É importante referir que dos 3 animais amostrados para LCan, apenas 66,7% (2/3) realizaram hemograma. No entanto, os parâmetros estudados foram os mesmos, e por esse motivo poderão ser descritos em conjunto (Tabela 15).

Tabela 15 - Valores dos parâmetros hematológicos e bioquímicos nos cães amostrados para LCan.

<b>Valores dos parâmetros hematológicos e bioquímicos nos cães amostrados para LCan</b>				
<b>Hemograma</b>				
<b>Parametro</b>	<b>Valor Referência no cão (Meyer &amp; Harvey, 2007)</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>Eritrócitos</b>	<b>5,4-7,8x10<sup>12</sup>/L</b>	4,8 x10 <sup>12</sup> /L	7,4 x10 <sup>12</sup> /L	-
<b>Hemoglobina</b>	<b>13-19g/dL</b>	10 g/dL	16 g/dL	-
<b>Hematócrito</b>	<b>37-54%</b>	33%	52%	-
<b>V.G.M</b>	<b>62-74fL</b>	64 fL	72 fL	-
<b>H.C.M</b>	<b>22-27Pg</b>	24 Pg	22 Pg	-
<b>C.H.G.M</b>	<b>32-36g/dL</b>	32 g/dL	35 g/dL	-
<b>Leucócitos</b>	<b>6,0-17,0%</b>	12%	8%	-
<b>Plaquetas</b>	<b>250-500x10<sup>9</sup>/l</b>	180 x10 <sup>9</sup> /l	400 x10 <sup>9</sup> /l	-
<b>Bioquímica</b>				
<b>Creatinina</b>	<b>0,5-1,4mg/dL</b>	2,34 mg/dL	0,88 mg/dL	0,78 mg/dL
<b>Ureia</b>	<b>7-25mg/dL</b>	102 mg/dL	38 mg/dL	37 mg/dL
<b>TRANS.GLUT.OXAL (TGO/AST)</b>	<b>16-43UI/L</b>	42 UI/L	26 UI/L	42 UI/L
<b>TRANS.GLUT.PIR (TGP/ALT)</b>	<b>15-58UI/L</b>	26 UI/L	50 UI/L	57 UI/L
<b>Fosfatase Alcalina</b>	<b>0-200UI/L</b>	37 UI/L	164 UI/L	62 UI/L
<b>Albumina</b>	<b>2,5-3,6g/dL</b>	1,4 g/dL	2,5 g/dL	2,7 g/dL
<b>Proteínas totais</b>	<b>5,4-7,1g/dL</b>	-	-	-
<b>Bilirrubina total</b>	<b>0,1-0,3mg/dL</b>	-	-	-
<b>Glicose</b>	<b>77-120mg/dL</b>	-	111 mg/dL	-

Através do estudo bioquímico dos animais amostrados para LCan, observámos que ao todo, foram analisados 8 parâmetros, e que tal como ocorreu no grupo anterior, incidiram na função renal, hepática e marcadores inflamatórios.

Para o estudo da função renal, foram analisados dois parâmetros: ureia e creatinina. Dos 3 animais analisados, verificámos que apenas um animal (33,3%) apresentou o valor de creatinina aumentado, ao passo que 100% (3/3) dos cães mostraram ter o valor de ureia aumentado relativamente aos valores de referência.

Para avaliar a função hepática e hepatobiliar foram igualmente analisados: ALT, AST, fosfatase alcalina, albumina e bilirrubina total. Relativamente à ALT, AST e fosfatase alcalina, ficou claro que 100% (3/3) dos animais apresentavam estes parâmetros dentro dos limites de referência.

De salientar, que apenas um cão (33,3%) apresentou valor relativo a albumina inferior ao limite de referência. Para além dos parâmetros acima mencionados, também a glicose foi analisada num dos animais (33,3%), tendo-se demonstrado dentro do valor de referência.

## VI – DISCUSSÃO

### 1. Babesiose Canina

No estudo de Babesiose Canina foram incluídos 32 cães, todos com sinais compatíveis com a doença aquando da consulta e com diagnóstico positivo obtido por realização de esfregaço sanguíneo. Como ocorreu no estudo de LCan, para melhor acesso a informação sobre os animais, foi realizado um inquérito por animal aos tutores, tendo sido no total concluídos 32 inquéritos. O estudo foi elaborado durante o mesmo período de tempo referido na análise de LCan.

Relativamente aos 32 animais amostrados para BC, verificámos que a maioria pertencia ao concelho de Lamego. De ressaltar que a CAMV de Lamego apresenta um horário de expediente alargado, apresentado assim uma elevada casuística e que Lamego se apresenta como um dos locais aonde existem mais caçadores. Um estudo realizado em França observou que 19 em 23 animais diagnosticados com BC eram animais de caça (Furlanello, Fiorio, Caldin, Lubas, Solano-Gallego, 2005), e o mesmo foi verificado no nosso estudo, onde a maior percentagem dos animais diagnosticados tinham como aptidão serem cães de caça.

Um dos possíveis vetores da doença, *D. reticulatus*, apresenta maior atividade nos meses de inverno (outubro a março) e com a realização do nosso estudo verificámos que novembro de 2016 foi o mês em que ocorreram mais diagnósticos de Babesiose Canina. Embora o período de incubação de *B. canis* seja de 10 a 21 dias e o de *B. gibsoni* de 14 a 28 dias (Schoeman, 2009), foram ainda diagnosticados casos em janeiro e em fevereiro. Tal pode ser justificado pelo efeito das alterações climáticas no ciclo biológico da carraça, uma vez que as mesmas influenciam a taxa de sobrevivência dos vetores (World Health Organization, 2016).

Um “estudo de identificação epidemiológica e vetorial na Babesiose Canina” foi realizado no Paquistão e determinou que a incidência da doença foi maior em animais com idade inferior a dois anos (Bashir, Chaudhry, Ahmed & Saeed, 2009). No nosso estudo verificámos que as idades se distribuíram desde 1 aos 10 anos de idade, com uma mediana de 2 anos de vida.

Para a elaboração do estudo “Seroprevalência de Babesiose Canina na Hungria sugere predisposição de raça” foram recolhidas 651 amostras sanguíneas de vários cães (de diversas raças) presentes em zonas urbanas e rurais e as mesmas foram posteriormente submetidas ao método de IFI para pesquisa de Acs anti- *B. canis*. Com este estudo verificaram que o Pastor Alemão parece ter predisposição genética para Babesiose crónica ao passo que o Komondor apresenta uma predisposição para o contacto repetido com carraças (Hornok, 2006). Da nossa amostra fizeram parte várias raças e verificámos que o maior número de cães com diagnóstico positivo foram cães Podengo Português. É de salientar que todos os cães Podengo Português

tinham como aptidão serem animais de caça, logo mais expostos à infestação por carrças e conseqüentemente aos agentes de BC.

De forma a estudar o comprimento do pelo dos animais, este foi dividido em “pelo curto” e “pelo longo” e verificámos que a maior percentagem dos animais positivos para BC apresentavam pelo curto. Este achado pode ser justificável por haver maior facilidade de acesso à pele do cão por parte da carrça (onde irá efetuar a sua alimentação hematófaga) em animais de pelo curto.

Esta doença é provocada por um hemoparasita (*Babesia* spp.), e o vetor varia consoante a espécie da mesma. Desta forma, considera-se que *B. canis* é a espécie mais detetada na Europa e tal pode ser justificável pela alta ocorrência do seu vetor nesta área (*Dermacentor reticulatus*). Este vetor encontra-se mais ativo entre os meses de outubro a março, têm preferência por locais com vegetação e sol, sendo frequentemente encontrados nos campos e pastagens (Solano-Gallego & Baneth, 2011). Desta forma o contacto do cão com o vetor encontra-se intimamente relacionado com o local onde o cão habita e passeia. Sendo assim, questionámos os proprietários dos animais quanto ao local onde o cão dorme e quais os seus hábitos de passeio (locais, em que período do dia, e se contacta com locais com água).

Assim, observámos que elevada percentagem dos animais amostrados dormem “fora de casa, mas num canil. A elevada percentagem de animais a dormir “fora de casa, mas num canil” pode ser justificável tendo em conta que 20 dos 32 cães amostrados eram animais de caça. Por norma um proprietário caçador tem mais do que um cão de caça e por este motivo têm por hábito colocá-los num canil.

Relativamente aos hábitos de passeio verificámos que a maior parte dos animais amostrados tiveram acesso ao exterior, maioritariamente da parte da manhã. Deste grupo de animais constatámos que a maior percentagem apenas acedia a locais de caça. Estes locais podem apresentar elevado risco de contacto com o vetor, uma vez que normalmente apresentam muita vegetação. Para além de *D. reticulatus*, na Europa podem ser encontrados outros vetores de outras espécies de *Babesia*. Sendo assim podem ser detetadas *B. gibsoni* e *B. conradae* que apresentam *Rhipicephalus sanguineus* (também conhecido por carrça castanha) como vetor (Solano-Gallego *et al.*, 2016). Este ixodídeo é frequente em ambientes de clima temperado e em zonas com humidade relativa, adequada à sua sobrevivência, que pode ser assegurada por irrigações artificiais. Desta forma, pode ser detetado em locais com água entre os meses decorrentes entre maio e agosto (Solano-Gallego *et al.*, 2016). Por este motivo obtivemos informação que nos permitiu constatar que grande parte dos cães tinham acesso a ribeiros, riachos, lagos, charcos e rio.

Tal como mencionado no estudo de LCan, também foi estudado o plano vacinal dos animais amostrados para BC e ainda que seja apenas obrigatória a vacina da Raiva (como foi anteriormente referido), existem vacinas comercializadas em Portugal que podem ser utilizadas como medida profilática para BC, no entanto verificámos que nenhum dos cães estudados apresentava esta medida profilática.

Uma vez que a Babesiose Canina se trata de uma doença transmitida por vetores, é necessário salientar a importância de uma boa profilaxia. A principal medida profilática incide no controlo dos vetores de forma evitar o contacto com o futuro hospedeiro. Esta medida deve ser realizada durante o ano todo, mas principalmente durante a primavera e o outono (Solano-Gallego *et al.*, 2016). A profilaxia pode ser realizada por métodos farmacológicos, recorrendo ao uso de ectoparasiticidas sob a forma de coleiras (ex: Scalibor®, MSD e Seresto®, Bayer), unção punctiforme ou *spot-on* (Advantix® Bayer e Frontline®, Merial), *spray* (Frontline®, Merial) e ainda champôs (Taberdog®, DFV). Os métodos não farmacológicos passam por sensibilizar o proprietário a remover as carraças presentes no animal e evitar o passeio do cão em locais onde seja provável a existência de carraças (Solano-Gallego *et al.*, 2016). Tendo em conta que a doença pode ser transmitida por transfusão sanguínea, é aconselhado que todos os cães dadores de sangue sejam testados por PCR, com posterior exclusão dos animais positivos (Solano-Gallego *et al.*, 2016).

Os dados obtidos através da população amostrada, permitiram verificar que 17 dos 32 animais contactaram com ectoparasiticidas. As formas de administração dos mesmos variaram entre unção punctiforme, coleira e injetável, ainda que a utilização específica do último não esteja descrita em cães.

De forma a avaliar se esta medida profilática estava a ser utilizada corretamente, comparámos a frequência de utilização aconselhada pelo fabricante do produto, com a frequência de utilização confirmada no animal e verificámos que nenhum dos animais amostrados estava corretamente desparasitado. Com a elaboração do inquérito, quando foi perguntado a frequência e produto utilizados, os proprietários afirmavam que para alguém que acolhe mais do que um animal (muito habitual em caçadores) se torna complicado em termos monetários realizar a desparasitação dentro da frequência recomendada.

Ressalvamos a administração ectoparasiticidas utilizados em animais de pecuária, nomeadamente Dectomax®, Zoetis e Ivomec®, Merial em dois dos cães estudados. Os proprietários dos respetivos animais admitiram administrar-lhes esta forma farmacêutica, de forma a economizar na utilização de ectoparasiticidas. Ambos possuíam animais de pecuária e por este motivo já tinham a forma farmacêutica em casa.

Os possíveis sinais clínicos variam com a resposta imunitária do hospedeiro e com a espécie de *Babesia* presente (Köster *et al.*, 2015), podendo estes apresentarem-se desde a forma subclínica a falência multiorgânica (Solano-Gallego *et al.*, 2016). Apesar de haver divergência de apresentação clínica consoante a espécie parasitária, sinais como anemia hemolítica intra e extravascular (sinal mais característico de *Babesia* spp.), hipertermia, anorexia, letargia, esplenomegália, hematúria, palidez das mucosas (Irwin, 2010), linfadenomegália e icterícia (Solano-Gallego *et al.*, 2016) estão associados a todas as espécies do parasita. Ao todo foram detetados 14 sinais presentes nos 32 cães amostrados aquando da consulta, tendo sido a letargia o sinal mais frequente, seguido de hipertermia e presença de carraças.

A realização de esfregaço sanguíneo periférico para visualização de inclusões intraeritrocitárias de *Babesia* spp., é considerado o método de diagnóstico preferencial, uma vez que é fácil, rápido e barato de realizar (Irwin, 2009), e ainda apresenta alta especificidade e sensibilidade (quando em fase aguda da parasitemia). Através da técnica de PCR é possível determinar qual a espécie de *Babesia* presente no animal. O teste de IFAT é o método serológico mais utilizado, uma vez que apresenta maior especificidade para a espécie parasitária em causa.

São de igual importância aspetos como a época do ano, presença de ectoparasitas no animal (Cardoso *et al.*, 2010), existência de lesões conciliáveis com mordeduras provocadas por outros cães, realização de viagens para áreas endémicas por parte do animal (Reine *et al.*, 2005) e elaboração de análises laboratoriais (hemograma e estudo bioquímico). Por motivos monetários, a única forma de diagnóstico utilizado no presente estudo, foi a elaboração de um esfregaço sanguíneo corado com solução de *Diff-quick* e posterior observação ao MO. De ressaltar que obtivemos confirmação laboratorial nos animais que realizaram hemograma.

## 2. Leishmaniose Canina

Com a realização do estudo verificámos que a maior percentagem dos animais amostrados pertencia ao concelho do Peso da Régua. Este concelho pertence a Trás-os-Montes e Alto Douro, uma das regiões consideradas endémicas em Portugal (Campino, 2013). Para além disto, a cidade do Peso da Régua possui um percurso pedestre com cerca de 3 km's, acompanhado pelo Rio Douro em toda a sua extensão. Este local manifestou-se como um dos locais mais utilizados para passeios com cães neste concelho. Desta forma, está patente a maior probabilidade de contato dos cães com o vetor da doença, pois os flebótomos desenvolvem-se em zonas arborizadas e margens arenosas perto de rios e ribeiros.

A atividade do vetor varia de acordo com a região geográfica, e está descrito que os flebótomos que habitam na região Mediterrânea apresentam um ciclo de vida durante os meses decorrentes entre fevereiro e outubro (primavera e o outono) (Solano-Gallego *et al.*, 2013). Tendo em conta os 28 animais amostrados para o estudo, verificámos que fevereiro foi o mês em que se realizaram mais testes para diagnóstico, rastreio ou controlo de LCan.

Embora a LCan possa ocorrer em cães de todas as idades, a seroprevalência indica que existem mais animais doentes com menos de 3 anos e mais de 8 anos, uma vez que estes podem apresentar uma diminuição do sistema imunológico (Cardoso, Santos, Neto & Rodrigues, 2006). No nosso estudo verificámos que a distribuição de idades ocorreu entre 1 ano a 15 anos de idade, tendo sido a mediana de 2 anos.

Assume-se que nas áreas endémicas todas as raças são suscetíveis à picada do flebótomo, no entanto, acredita-se que raças como o Pastor Alemão, Rottweiler e Boxer possam ser mais suscetíveis. Tal pode ocorrer, uma vez que estas raças habitualmente têm mais acesso ao exterior e desta forma maior probabilidade de contato com o flebótomo. O mesmo não acontece a raças como Yorkshire Terrier e Caniche que parecem apresentar menor predisposição para a doença (Solano-Gallego *et al.*, 2013). Esta menor predisposição está intimamente relacionada com a menor exposição ao vetor, ou seja, considera-se que estas raças são menos predispostas, uma vez que estes animais se encontram maioritariamente no interior das habitações. Os animais do nosso estudo pertenciam a várias raças, tendo sido “Animais sem raça definida” a raça mais frequente.

As aptidões dos animais amostrados foram divididas em “animais de companhia”, “animais de guarda” e “animais de caça”. Nos animais amostrados para LCan, observámos que o maior número de animais dos animais tinham como aptidão serem “animais de companhia”. Poderá parecer contraditório a maioria dos animais estudados serem animais de companhia, uma vez que devido ao estreito contacto com o ser humano, se espera que estes animais apresentem

medidas profiláticas mais rigorosas. No entanto, é importante salientar que quando presentes sinais de doença são os animais de companhia que apresentam mais acesso a cuidados médico-veterinários (Pinto, 2016).

Uma vez que a Leishmaniose Canina é uma doença transmitida por vetores que se encontram maioritariamente em locais com pouca luminosidade, humidade relativa alta e constante (ex: minas, jardins, águas estagnadas, entre outros) (Rosypal *et al*, 2003) e com maior atividade nas horas crepusculares (Solano-Gallego *et al.*, 2011), considerámos proveitoso entender quais os hábitos de passeio dos animais amostrados (relativamente ao acesso ao exterior, período do dia e em que locais), de forma a compreender qual a possível proximidade dos cães amostrados com os flebótomos. Desta forma registámos que a maior percentagem dos animais amostrados tinha acesso ao exterior e que a maior parte dos mesmos o fazia da parte da tarde e da noite. Dos cães com acesso ao exterior, o maior número tinha acesso a locais públicos. Verificámos que uma grande percentagem tinha acesso a ribeiros, riachos, rios, charcos ou lagos (possíveis microhabitats para flebótomos). Com estes dados verificámos que um número considerável de cães apresentou hábitos de passeio com elevado risco de contato com o vetor. Através da elaboração do inquérito foi possível observar que os animais que realizavam os passeios de acordo com o aconselhável pelas medidas profiláticas, foram os animais que realizaram rastreio para posterior vacinação (CaniLeish®, Virbac). cremos que tal aconteceu, porque os seus proprietários estavam consciencializados sobre a doença e sobre as corretas medidas profiláticas.

Tendo em conta que apenas a vacina da Raiva é obrigatória em Portugal e que existem vacinas que podem ser utilizadas como medida profilática para LCan, pretendemos perceber quais as vacinas administradas aos animais estudados. De ressaltar, que nos casos assumidos como vacinados com CaniLeish®, Virbac, foram incluídos os animais que realizaram rastreio (com resultado negativo) e vacina na mesma consulta. Desta forma, concluiu-se que uma grande percentagem dos animais amostrados apresentava hábitos de vacinação, embora nenhum animal se encontrasse vacinado para LCan.

Sendo a LCan uma doença transmitida por vetores, cabe ao médico veterinário sensibilizar os tutores para a importância da profilaxia. As medidas profiláticas devem ser realizadas durante o ano todo, mas uma vez que a atividade do vetor é mais marcada no período de fevereiro a outubro, deve-se garantir que nestes meses os animais estejam devidamente protegidos. A profilaxia visa evitar o contacto entre o flebótomo e o possível hospedeiro vertebrado. Para isto podemos recorrer a métodos farmacológicos e a métodos não farmacológicos. Solos húmidos, rachaduras nas paredes e fendas (Otranto & Dantas-Torres, 2013) podem servir como microhabitats para os flebótomos, e por este motivo, uma das medidas não farmacológicas passa

pela destruição ou inutilização destes mesmos locais. Para além desta medida está recomendada a colocação de redes de proteção nas janelas e portas (com malhas inferiores a 0,4mm<sup>2</sup>) e redes mosquiteiras impregnadas com piretróides (ESCCAP, 2012) e ainda o impedimento do contacto dos cães com roedores, uma vez que os últimos podem assumir o papel de hospedeiro reservatório de *L. infatum* (Helhazar *et al.*, 2013). Como já foi anteriormente referido, os vetores apresentam maior atividade nas horas crepusculares e apresentam preferência por locais húmidos (Solano-Gallego *et al.*, 2011), sendo assim, é vantajoso explicar aos proprietários a importância de evitar passeios com os cães nestas locais e horários.

Os métodos farmacológicos pretendem controlar o vetor atuando de forma tóxica nos flebótomos. Os piretróides são os mais indicados no combate ao vetor, e os produtos mais utilizados estão disponíveis sob a forma de coleira (ex: Scalibor®, MSD) e unção punctiforme (ex: Advantix®, Bayer e Frontline® TRI-ACT, Merial) (Otranto & Dantas-Torres, 2013). Como foi anteriormente referido, existem vacinas, atualmente comercializadas em Portugal, (Otranto & Dantas-Torres, 2013) que pode ser aplicada a animais com mais de 6 meses de idade, negativos a LCan, com revacinação anual.

Com a elaboração do estudo, verificámos que todos os cães amostrados para LCan apresentavam hábitos de desparasitação para ectoparasitas. Isto pode ser justificável pela área geográfica do estudo ser endémica para a doença, e os proprietários dos animais estarem mais sensibilizados para a importância dos meios farmacológicos como medida profilática. Os ectoparasiticidas mais utilizados nos animais do presente estudo foram administrados sob a forma de coleira. Esta situação também foi verificada noutra inquérito recente sobre práticas de desparasitação em pequenos animais, uma vez que garantem proteção durante um maior período de tempo (Matos, Alho, Owen, Nunes & Carvalho, 2015).

Desta forma, foi-nos possível compreender que existem alguns proprietários consciencializados para a importância das medidas profiláticas de forma a evitar o aparecimento da doença nos seus animais, pois todos os que foram submetidos a rastreio, apresentavam frequência correta de aplicação de ectoparasiticidas, foram vacinados para LCan e ainda apresentavam hábitos de passeio conservadores, tendo em conta que evitavam passear os seus cães em horários e locais onde seria possível encontrar o vetor.

A apresentação clínica desta doença não se manifesta sempre da mesma forma, uma vez que depende da genética do hospedeiro, da presença de doenças concomitantes e do sistema imunitário do animal (Solano-Gallego *et al.*, 2001). Quando presente uma manifestação clínica, esta pode ocorrer de forma visceral, cutânea (mais prevalente) ou viscerocutânea, podendo desta forma manifestar diversos sinais clínicos tendo em conta o sistema afetado (Campillo, *et al.*, 1999). Desta forma, podem ser manifestados diversos sinais, tais como: caquexia,

linfadenomegália generalizada ou localizada (principalmente a nível dos poplíteos) (Companion Animal Parasite Council, s.d.), atrofia muscular, hipertermia, epistáxis, palidez das mucosas, glomerulonefrite, insuficiência renal crónica, blefarite, queratoconjuntivite seca, uveíte, dermatite ulcerativa nas proeminências ósseas (Laia Solano Gallego, 2013), alopecia multifocal não prurítica (principalmente nas orelhas, nariz e olhos) (Naucke & Lorentz, 2012), dermatite descamativa, piodermite bacteriana (Companion Animal Parasite Council, s.d.), entre outros.

Nos 28 animais amostrados para LCan verificaram-se 10 sinais clínicos distintos, tendo sido a dermatite alopecica (nariz, olhos e orelhas) a mais frequente, seguida de défice cicatricial.

Uma vez que dependendo do seu estágio de desenvolvimento esta doença pode ser muito debilitante, quisemos apurar quantos dos animais amostrados tiveram que ser internados após diagnóstico, rastreio ou controlo e quantos faleceram. Neste estudo nenhum dos animais teve que ser internado (0/28) e nenhum morreu (0/28).

A elaboração de análises laboratoriais demonstrou ser uma mais-valia no prognóstico e instituição terapêutica. Ainda que a importância da realização de análises laboratoriais tivesse sido explicada aos tutores dos animais amostrados, as mesmas possuíam um custo que teria que ser suportado pelo proprietário, e por motivos financeiros, apenas 10,7% (3/38) tiveram acesso às mesmas. Destes animais, apenas 66,7% (2/3) realizaram hemograma (os mesmos parâmetros foram analisados para ambos os animais), ao passo que os três animais realizaram estudo bioquímico (ainda que os parâmetros não tenham sido os mesmos). Segundo a literatura, um animal diagnosticado com LCan pode apresentar as seguintes alterações laboratoriais: anemia do tipo normocítica normocrómica não regenerativa, leucograma de *stress* (neutrofilia, linfopenia e monocitose), aumento das enzimas hepáticas (ALT e FA), hiperproteinemia com hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, entre outros (Solano-Gallego *et al.*, 2014).

Apesar da amostra dos animais sujeitos a hemograma ter sido muito reduzida (constituída apenas por 2 animais), foram detetadas alterações num cão. Ao mesmo animal foi detetado trombocitopenia e anemia. É importante salientar que a anemia foi identificada pela presença de valores relativos a eritrócitos, hemoglobina e hematócrito abaixo do valor de referência, e que não foi possível classificá-la relativamente à regeneração, uma vez que não foram analisados reticulócitos.

No estudo bioquímico, um animal positivo a Leishmaniose Canina pode apresentar ligeiro aumento das enzimas hepáticas (ALT e FA), hiperproteinemia com hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, azotemia, elevação da proteína C reativa e seroplasmina. Na urianálise a alteração mais prevalente é a existência de proteinúria (Solano-Gallego *et al.*, 2014).

Nos 3 animais amostrados sujeitos a estudo bioquímico, verificámos que um dos cães apresentou os valores de creatinina e ureia simultaneamente aumentados, ao passo que dois cães apresentaram apenas o valor da ureia aumentado relativamente aos valores de referência. Para além disto verificámos também que o mesmo animal que apresentava os dois valores da função renal aumentados apresentava igualmente hipoalbuminémia. É importante mencionar que a anemia, trombocitopenia, azotémia e hipoalbuminemia foram detetadas no mesmo animal.

O diagnóstico desta doença não é linear e deve ser realizado conjugando possíveis métodos de diagnóstico. Assim sendo, consideramos que a melhor forma de otimizar o diagnóstico é através da anamnese, dos dados epidemiológicos e da elaboração de análises laboratoriais (para estadiamento e prognóstico da doença) (Solano-Gallego *et al.*, 2014).

Para o diagnóstico definitivo podem ser realizados métodos parasitológicos, moleculares e serológicos. Os métodos parasitológicos podem ser realizados através de citologia corada por *Wright* ou *Giemsa*, obtida através de biópsia por aspiração de fígado, baço, medula óssea ou gânglios linfáticos. Os métodos serológicos podem ser realizados por técnicas quantitativas como imunofluorescência indirecta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), testes rápidos imunocromatográficos, Western Blotting (WB) e ainda técnica de aglutinação directa (TAD) (Solano-Gallego *et al.*, 2014). Destes testes considera-se que a imunofluorescência indirecta (IFI) seja o teste serológico de eleição. A IFI apresenta uma especificidade de 100%, sensibilidade de 98.4%-99.5% (Rosypal *et al.*, 2003) e deteta Ac's através da utilização de soros diluídos com antigénio da forma promastigota *Leishmania spp.* No entanto, apresenta pouca sensibilidade quando utilizada em animais assintomáticos (Solano-Gallego *et al.*, 2014). A reacção em cadeia da polimerase (PCR) é o método molecular mais utilizado para confirmação de diagnóstico quando estão presentes baixos níveis de Ac's, uma vez que esta técnica altamente sensível e específica permite a deteção de DNA de *Leishmania spp.* (Solano-Gallego *et al.*, 2014).

Embora deva ser o médico veterinário a determinar qual o teste a ser utilizado mediante a situação, o custo do mesmo teve que ser suportado pelo proprietário do animal. Uma vez que os testes têm características e custos distintos, os proprietários dos animais foram esclarecidos sobre os mesmos e assim determinaram qual poderia ser utilizado. Foi aconselhado pelo médico veterinário a utilização do método de ELISA em animais submetidos a controlo ou diagnóstico da doença e a realização do teste rápido imunocromatográfico nos animais submetidos a rastreio para posterior administração vacinal. No nosso estudo recorremos à utilização do teste de ELISA (Leiscan® *Leishmania* ELISA test, Esteve Veterinária) e o teste imunocromatográfico Speed Leish K®, Virbac. Após a utilização dos dois testes anteriormente mencionados, verificámos que 17 dos 28 animais testados para LCan foram positivos para a doença.

De forma a melhorar o prognóstico do animal, cabe ao médico veterinário sensibilizar o proprietário para a importância do controlo laboratorial da doença, que deve ocorrer de 6 em 6 meses. Este controlo tem como objetivo observar a resposta do animal à terapêutica instituída através da realização de análises laboratoriais que permitem o estadiamento da doença. Apesar da notória importância do controlo da doença, por motivos monetários, nem sempre é possível acompanhar os animais com o intervalo de tempo aconselhado, o que dificulta o prognóstico da doença no animal.

Embora a análise da terapêutica não faça parte dos objetivos da presente dissertação (pela curta duração do estudo e por falta de acompanhamento dos animais) obtivemos informação que estes animais estavam medicados com Alopurinol na dosagem de 10 mg/kg, BID, PO, durante seis meses seguidos e Leisguard®, Esteve, na dose de 1ml/kg, de 24-24 horas durante 30 dias seguidos com um intervalo de administração de 4 meses. Observámos que em todos os animais controlados, se verificou uma diminuição no valor de rz (razão da amostra).

É importante fazer entender ao proprietário, que a Leishmaniose Canina não tem cura podendo apenas ser controlada de forma terapêutica e profilática. A terapêutica a instituir depende em grande parte do estadio da doença, e esta deve ser dirigida ao parasita e aos sistemas envolvidos (ESCCAP, 2012).

Apesar do estudo de concomitância de doenças não fazer parte da presente dissertação, à medida que foram recolhidos os dados, verificámos que o mesmo animal foi diagnosticado em setembro com LCan pelo método de ELISA, apresentando um valor de razão de amostra de 3,67 (positivo muito alto), e simultaneamente diagnosticado com Babesiose Canina em outubro do mesmo ano por esfregaço sanguíneo. Este animal era do sexo feminino, com 6 anos de idade, pelo curto, pertencente ao concelho de Lamego, tinha como aptidão ser cão de guarda e tinha apenas acesso ao exterior da habitação (ainda que dentro das imediações), local aonde dormia. Em termos profiláticos encontrava-se apenas vacinada contra a Raiva e utilizava uma coleira Scalibor®, MSD renovada anualmente. Ou seja, face à renovação de 6 em 6 meses recomendada pelo fabricante, constatámos que este animal se encontrava mal protegido contra ectoparasitas. Aquando da consulta em setembro de 2016, este animal apresentava défice cicatricial e, uma vez que o ectoparasiticida não estava a ser utilizado tendo em conta o tempo sugerido pelo fabricante, foi testado para LCan demonstrando-se positivo. Apesar de ter sido explicada a importância de uma correta profilaxia ao tutor do animal, a mesma continuou a não ser realizada devidamente e em outubro do mesmo ano, este canídeo voltou à clínica manifestando letargia e presença de carraças. Devido aos sinais apresentados foi realizado um esfregaço sanguíneo, onde foram observadas formas de *Babesia* spp. intraeritrocitárias.

## VII – CONCLUSÃO

Em termos globais nos animais analisados para BC, verificámos que 100% foram positivos a *Babesia* spp, enquanto 60,7% dos cães examinados para LCan foram positivos para *Leishmania* sp.

A elaboração do presente estudo permitiu-nos concluir também que o contacto com os ectoparasitas vetores dos agentes de BC e LCan é influenciado pelas características do animal e da vida do mesmo. De forma a reduzir o contacto dos cães com os vetores, o médico veterinário deve consciencializar o proprietário sobre a importância de uma profilaxia adequada e da inspeção regular dos animais para observação de ectoparasitas vetores durante todo o ano. No entanto, ressaltamos a importância da realização da mesma durante os meses decorrentes entre fevereiro a outubro (período de maior atividade do flebótomo) e outubro e março (maior atividade dos ixodídeos).

Tendo em conta este factor, verificámos que nenhum dos cães amostrados para BC estava bem desparasitado, ao passo que apenas 11 dos 28 animais amostrados para LCan apresentavam uma correta utilização dos ectoparasiticidas. Desta forma, concluímos que todos os cães cuja desparasitação externa estava incorreta, revelaram-se positivos às doenças que foram pesquisadas neste trabalho.

## VIII - RECOMENDAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Com a elaboração do presente estudo foi possível verificar que a BC e a LCan são doenças importantes nos concelhos estudados e que o seu controlo não é o mais adequado, pois o uso de ectoparasiticidas não foi realizado conforme o aconselhado pelo fabricante dos respetivos produtos utilizados. Desta forma, torna-se importante sensibilizar os proprietários que o controlo do ectoparasitas não só é benéfico para o seu animal, como para os humanos, uma vez que existem inúmeras doenças transmitidas por vetores com cariz zoonótico.

Uma vez que o contacto com os ectoparasitas é influenciado pelas características da vida do animal, aconselha-se que antes de se estabelecer um plano antiparasitário, seja realizado um estudo junto do proprietário de forma a compreender quais os riscos que cada animal corre. Assim, torna-se possível instituir um plano antiparasitário adequado para cada animal.

Nos animais que evidenciem elevado risco de contacto com ectoparasitas devem ser aplicados ectoparasiticidas com elevado espectro, ainda que possa ser necessário aplicar dois produtos em simultâneo. Uma vez que o proprietário terá que compactuar com o plano antiparasitário escolhido, fica patente a necessidade de o esclarecer sobre a importância desta ação, nomeadamente sobre a frequência de administração, do seu carácter contínuo ao longo da vida do animal e da contraparte financeira, uma vez que os tratamentos anti-parasitários preventivos têm custos associados, cujos valores monetários poderão ser superiores aos esperados.

Aquando da administração dos antiparasitários nos CAMV, aconselha-se o esclarecimento do tutor quanto ao espectro do produto e quanto à frequência de aplicação recomendada pelo fabricante. É igualmente importante mostrar quais os produtos disponíveis com o mesmo espectro de ação uma vez que, para evitar resistências, os produtos devem ser alternados. Para além disso deve-se sensibilizar os proprietários que os antiparasitários são medicamentos veterinários e que apesar de se encontrarem disponíveis noutros locais que não os CAMV, os mesmos devem ser aplicados por ou sob supervisão de um médico veterinário, pois só assim é possível garantir a correta aplicação, tendo em conta as características manifestadas pelo animal.

Deve-se investir também na formação de todos os sujeitos que lidem com a venda de medicamentos veterinários. Desta forma, garantimos que na impossibilidade de contactar um médico veterinário, a informação que lhe é cedida é a correta.

Para uma melhor instrução das pessoas, devem estar disponíveis em locais bem visíveis do CAMV, como por exemplo no balcão de atendimento ou na sala de espera, panfletos informativos sobre as diversas doenças parasitárias que podem afetar os cães e quais as que possuem cariz zoonótico.

Para este efeito recomendamos a consulta do site da “European Scientific Counsel Companion Animal Parasites”, [www.esccap.org](http://www.esccap.org), a qual é uma instituição de referência para Médicos Veterinários, Enfermeiros Veterinários, Estudantes e Proprietários, ao disponibilizar informações de carácter geral e normas de orientação terapêutica (Guidelines) elaboradas por um conjunto de peritos independentes na área da Parasitologia, Doenças Parasitárias e Saúde Pública Veterinária.

## IX - BIBLIOGRAFIA

- Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J., & Nieto, J. (2004). Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol*, 57, 1-88. doi: 10.1016/S0065-308X(04)57001-X.
- Bashir, I.N., Chaudhry, Z.I., Ahmed, S., & Saeed, M.A. (2009). Epidemiological and vector identification studies of canine babesiosis. *Pakistan Vet J.*, 29(2), 51-54.
- Bayer (2016). Advantix. Acedido em 13 de fevereiro de 2017, em <http://www.advantix.pt/pt/advantix/>.
- Bayer (2016). Seresto. Acedido em 13 de fevereiro de 2017, em: <http://www.advantix.pt/pt/advantix/>.
- Bohm, M., Leisewitz, A. L., Thompson, P. N., & Schoeman, J. P. (2006). Capillary and venous *Babesia canis rossi* parasitaemias and their association with outcome of infection and circulatory compromise. *Vet Parasitol*, 141(1-2), 18-29. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.05.002.
- Burke A. Cunha. (2016). Babesiosis. Acedido em 10 de Janeiro de 2017, em: <http://emedicine.medscape.com/article/212605-overview#showall>.
- 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., Romerom H.Q. & Varela, M.C. (1999). *Parasitología Veterinaria*. (1ª edição). (651-665). Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- Campino, L. (2013). Soluções para o controlo da Leishmaniose Canina *Veterinária Atual*, 61, 46.
- Campino, L., & Maia, C. (2010). Epidemiology of leishmaniasis in Portugal. *Acta Med Port*, 23(5), 859-864.
- Cardoso, L. (2011). Leishaniose em Portugal - Vigiar a doença e evitar o aumento da prevalência. *Veterinária Actual*, 39, 54.
- Cardoso, L., Santos, H., Neto, F., Rodrigues, M. (2006). *Leishmania e Leishmaniose Canina - aspectos epidemiológicos, clínicos e de saúde pública*. S. E. d. SDE.
- Cardoso, L., Yisaschar-Mekuzas, Y., Rodrigues, F. T., Costa, A., Machado, J., Diz-Lopes, D., & Baneth, G. (2010). Canine babesiosis in northern Portugal and molecular characterization of vector-borne co-infections. *Parasit Vectors*, 3(1), 27. doi: 10.1186/1756-3305-3-27.
- Casciotti, D. (2016). The benefits of pets for human health. 2016. Acedido em 8 de Janeiro de 2017, em: <http://center4research.org/healthy-living-prevention/pets-and-health-the-impact-of-companion-animals/>.
- Centeno-Lima, S., Do Rosário, V., Parreira, R., Maia, A. J., Freudenthal, A.M., Nijhof, A.M. & Jongejou, F. (2003). "A fatal case of human babesiosis in Portugal: molecular and phylogenetic analysis." *Trop Med Int Health* 8 (8): 760-764

- CEVA (s.d.). Vectra-3D. Acedido em 17 de Julho de 2017, em <https://www.ceva.pt/Produtos/Lista-de-Produtos/VECTRA-3D>.
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O., & Malandrin, L. (2009). *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet Res*, 40(2), 37. doi: 10.1051/vetres/2009020.
- CMPR (2017). Concelho. Acedido em 16 de fevereiro de 2017, em: <http://www.cm-pesoregua.pt/index.php/concelho>.
- Companion Animal Parasite Council (s.d.). Vector Borne Diseases- Canine Leishmaniasis. Acedido em 16 de fevereiro de 2017, em: <https://www.capcvet.org/capc-recommendations/canine-leishmaniasis>.
- Dantas-Torres, F., & Figueredo, L. A. (2006). Canine babesiosis: a Brazilian perspective. *Vet Parasitol*, 141(3-4), 197-203. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.07.030.
- Esteve (2012). Programa leispro- El auténtico control de la Leishmaniosis. Acedido em 15 de fevereiro de 2017, em: <http://vetblog.vetjg.com/wp-content/uploads/2012/04/leisguard.pdf>.
- Frézard, F. J. G. (2015). A caminho da cura da leishmaniose visceral canina. Acedido dia 18 de fevereiro de 2017, em: [http://www.canalciencia.ibict.br/pesquisa/0295 A caminho da cura da leishmanios e visceral canina.html](http://www.canalciencia.ibict.br/pesquisa/0295_A_caminho_da_cura_da_leishmanios_e_viscerai_canina.html).
- Frontline (s.d.). *Gama Frontline*. Acedido em 10 de janeiro de 2017, <http://www.frontline.pt>.
- Furlanello, T., Fiorio, F., Caldin, M., Lubas, G., & Solano-Gallego, L. (2005). Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. *Veterinary parasitology*, 134(1-2), 77-85.
- Gallego, L.S., Cardoso, L., Esteve, L. O., Corrales, G. M., Fondati, A., Giménez, M. T. P., Repiso, M. L., Freixa, C. N., Dantas-Torres, F., Otranto, D. & Pennisi, M.G. (2013). *Leishmaniosis - Una revisión actualizada*. (1ª edição). E. Servet Ed.
- Gossage, S. M., Rogers, M. E., & Bates, P. A. (2003). Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol*, 33(10), 1027-1034.
- Green, C.E. (2006). Infectious diseases of the dog and cat. *Leishmaniasis*, 3, 685-698.
- Helhazar, M., Leitão, J., Duarte, A., Tavares, L., & Fonseca, I.P. (2013). Natural infection of synanthropic rodent species *Mus musculus* and *Rattus norvegicus* by *Leishmania infantum* in Sesimbra and Sintra – Portugal. *Parasit Vectors* 6:88.
- Hornok, S., Edelhofer, R., & Farkas, R. (2006). Seroprevalence of canine babesiosis in Hungary suggesting breed predisposition. *Parasitol Res*, 99(6), 638-642. doi: 10.1007/s00436-006-0218-8.

- ICNF (2016). Calendário venatório época venatória 2016-2017. Acedido em 17 de fevereiro de 2017, em: <http://www.icnf.pt/portal/caca/cv-dc/resource/doc/calendario-venatorio-2016-v5.pdf>.
- INNO (2012). Alterações à serologia de *Leishmania* pelo método de elisa. Acedido em 20 de Abril de 2017, em: <http://innoanimalcare.blogspot.pt/2012/11/alteracoes-serologia-de-leishmania-pelo.html>
- Institute of Tropical Medicine Antwerp (s.d.). Illustrated Lecture Notes on Tropical Medicine. Acedido em 12 de janeiro de 2017, em: <http://itg.author-e.eu>.
- IPMA (2017). Clima de Portugal Continental. Acedido em 15 de fevereiro de 2017, em: <https://www.ipma.pt/pt/educativa/tempo.clima/index.jsp?page=clima.pt.xml>.
- Irwin, P. J. (2009). Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasit Vectors*, 2 *Suppl 1*, S4. doi: 10.1186/1756-3305-2-S1-S4.
- Irwin, P. J. (2010). Canine babesiosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 40(6), 1141-1156. doi: 10.1016/j.cvsm.2010.08.001.
- Kevin J. Esch, & Petersen, C. A. (2013). Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. *American Society for Microbiology - Clinical Microbiology Reviews*, 26.
- Köster, L. S., Lobetti, R. G., & Kelly, P. (2015). Canine babesiosis: a perspective on clinical complications, biomarkers, and treatment. *Dovepress*(6), 119—128.
- Lamego (2017). Mapa das Freguesias do Concelho de Lamego. Acedido em 15 de fevereiro de 2017, em: <http://www.cm-lamego.pt/contactos-links-e-outros/mapa-lamego/mapa-das-freguesias>.
- LETI (s.d.). LETIFEND, vacina contra la leishmaniosis canina. Acedido em 17 de Julho de 2017 em <http://saludanimal.leti.com/vacuna-contra-leishmaniosis-letifend/>
- Maia, C., Ferreira, A., Nunes, M., Vieira, M. L., Campino, L., & Cardoso, L. (2014). Molecular detection of bacterial and parasitic pathogens in hard ticks from Portugal. *Ticks Tick Borne Dis*, 5(4), 409-414. doi: 10.1016/j.ttbdis.2014.01.009.
- Matos, M., Alho, A. M., Owen, S. P., Nunes, T., & Carvalho, L.M. (2015). Parasite control practices and public perception of parasitic diseases: A survey of dog and cat owners. *Preventive Veterinary Medicine*, 122, 174-180
- Matos, R., Gargaté, M. J., Machado, J., Silveira, L., Santos, A. S., Costa, C. L. d., Sousa, R. d. (2014). *Doenças associadas a artrópodes vetores e roedores* (M. S. Nuncio & M. J. Alves Eds.): Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP.
- Mencke, N., Volf, P., Volfova, V. & Stanneck, D. (2003). Repellent efficacy of a combination containing imidacloprid and permethrin against sand flies (*Phlebotomus papatasi*) in dogs. *Parasitol Res*, 90(3), 108-111. doi: 10.1007/s00436-003-0905-7.

- Meyer, D. J & Harvey, J. W. (2007). *Medicina laboratorial veterinaria: interpretacion y diagnosis*. Multimedia Ediciones Veterinarias (3ª ed).
- MSD Animal Health (s.d.). Scalibor. Acedido em 15 de fevereiro de 2017, em <http://www.scalibor.pt/Sobre-nos/MSD-Saude-Animal.aspx>.
- Naucke, T. J., & Lorentz, S. (2012). First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasit Vectors*, 5, 67. doi: 10.1186/1756-3305-5-67.
- Oliveira, V. V. G. d., Alves, L. C., & Junior, V. A. d. S. (2015). Transmission routes of visceral leishmaniasis in mammals. *Ciência Rural*, 45(9), 1622-1628.
- Otranto, D., & Dantas-Torres, F. (2013). The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends Parasitol*, 29(7), 339-345. doi: 10.1016/j.pt.2013.05.003.
- ESCCAP (2012). “Control of Vector-Borne Diseases in Dogs and Cats”. from: <http://www.esccap.org/page/GL5+Control+of+VectorBorne+Diseases+in+Dogs+and+Cats/29/#.WbQbAMiGPIU>
- Pinto, C. (2016). Portugal tem 6,7 milhões de animais de estimação. *Veterinária Atual*.
- Pires, C. A. (2000). Os flebótomos (Diptera, Psychodidae) dos focus zoonóticos de leishmanioses em Portugal. *Tese de Doutoramento*. Universidade Nova de Lisboa. Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Lisboa.
- Rios, S., & Ríos, L. (2011). Principales marcadores moleculares utilizados para la identificación de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* - Principal molecular markers used to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Revista MVZ Córdoba*, 16(2), 2470-2483.
- Rosypal, A. C., Zajac, A. M., & Lindsay, D. S. (2003). Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 33(4), 921-937, viii.
- Ruiz-Fons, F., et al. (2013). “*Leishmania infantum* in free- ranging hares, Spain, 2004-2010.” *Euro Surveill* 18 (30): 20541.
- Schering-Plough (s.d.). Novibac Piro. Acedido em 18 de novembro de 2017, [http://www.ema.europa.eu/docs/pt\\_PT/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/veterinary/000084/WC500067490.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/veterinary/000084/WC500067490.pdf)
- Schnittger, L., Rodriguez, A. E., Florin-Christensen, M., & Morrison, D. A. (2012). *Babesia*: a world emerging. *Infect Genet Evol*, 12(8), 1788-1809. doi: 10.1016/j.meegid.2012.07.004.
- Schoeman, J.P. (2009). “Canine babesiosis.” *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 76:59-66
- Sikorski, L. E., Birkenheuer, A. J., Holowaychuk, M. K., McCleary-Wheeler, A. L., Davis, J. M., & Littman, M. P. (2010). Babesiosis caused by a large *Babesia* species in 7 immunocompromised dogs. *J Vet Intern Med*, 24(1), 127-131. doi: 10.1111/j.1939-1676.2009.0440.x.

- Siqueira, F. (2009). Parasitas: *Leishmania* spp e leishmaniose. Acedido em 14 de fevereiro de 2017, em: <http://fpslivroaberto.blogspot.pt/2009/12/parasitas-leishmania-spp-e-leishmaniose.html>.
- Solano-Gallego, L., & Baneth, G. (2011). Babesiosis in dogs and cats--expanding parasitological and clinical spectra. *Vet Parasitol*, 181(1), 48-60. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.04.023.
- Solano-Gallego, L., Cardoso, L., Esteve i Ordex, L., Corrales Miró, G., Fondati, A., Giménez Peña, M<sup>a</sup> Teresa., Freiza Naranjo, C., Dantas-Torres, F., Otranto, D. & Pennisi Grazia, M. (2013). Leishmaniosis – Una revisión actualizada.
- Solano-Gallego, L., Miro, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., The LeishVet, G. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors*, 4, 86. doi: 10.1186/1756-3305-4-86.
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., & Ferrer, L. (2001). Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol*, 39(2), 560-563. doi: 10.1128/JCM.39.2.560-563.2001.
- Solano-Gallego, L., Sainz, A., Roura, X., Estrada-Pena, A., & Miro, G. (2016). A review of canine babesiosis: the European perspective. *Parasit Vectors*, 9(1), 336. doi: 10.1186/s13071-016-1596-0.
- Solano-Gallego, L., Villanueva-Saz, S., Carbonell, M., Trotta, M., Furlanello, T., & Natale, A. (2014). Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan, ID Screen and Leishmania 96), a rapid test (Speed Leish K) and an in-house IFAT. *Parasit Vectors*, 7, 111. doi: 10.1186/1756-3305-7-111.
- Stenberg, E. D., & Thomas, M. B. (2014). Local adaptation to temperature and the implications for vector-borne diseases. *Trends in Parasitology*, 30(3), 115-122.
- Tarouca (2016). Caracterização Geral. Acedido em 13 de fevereiro de 2017, em: <http://www.cm-tarouca.pt/2011-06-15-21-32-01/caracterizacao-geral>.
- Trotta, M., Nicetto, M., Fogliazza, A., Montarsi, F., Caldin, M., Furlanello, T. & Solano-Gallego, L. (2012). Detection of *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, and rickettsiae in ticks removed from dogs living in Italy. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 3(5-6), 294-297.
- Vercammen, F., De Deken, R., & Maes, L. (1996). Prophylactic treatment of experimental canine babesiosis (*Babesia canis*) with doxycycline. *Vet Parasitol*, 66(3-4), 251-255.
- Viol, M. A., Guerrero, F. D., de Oliveira, B. C., de Aquino, M. C., Loiola, S. H., de Melo, G. D. & Bresciani, K. D. (2016). Identification of *Leishmania* spp. promastigotes in the intestines, ovaries, and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* actively infesting dogs. *Parasitol Res*, 115(9), 3479-3484. doi: 10.1007/s00436-016-5111-5.
- Virbac (2011). Speed Leish K. Acedido em 13 de fevereiro de 2017, em: [//www.bvt.fr/en/home/diagnostic-solutions/pour-le-veterinaire-praticien/vector-borne-and-parasitic-disea/main/produits/speed-leish-k.html](http://www.bvt.fr/en/home/diagnostic-solutions/pour-le-veterinaire-praticien/vector-borne-and-parasitic-disea/main/produits/speed-leish-k.html).

- Virbac (2017). Canileish. Acedido em 13 de fevereiro de 2017, em: <https://www.virbac.pt/home/produtos/animais-de-companhia/main/animais-de-companhia/canileish.html>.
- Wardrop, K. J., Reine, N., Birkenheuer, A., Hale, A., Hohenhaus, A., Crawford, C., & Lappin, M. R. (2005). Canine and Feline Blood Donor Screening for Infectious Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 135-142.
- World Health Organization (2016). Leishmaniasis. Acedido em 13 de fevereiro de 2017, em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.
- World Health Organization (2016). Neglected zoonotic diseases. 2016. Acedido em 13 de fevereiro de 2017, em: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/zoonoses/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/zoonoses/en/)

## X - ANEXO

### Inquérito

1. Localidade de habitação:
2. Mês de diagnóstico:
3. Nome do animal:
4. Idade do animal:
5. Sexo do animal:
  - Fêmea;
  - Macho.
6. Raça:
7. Comprimento da pelagem:
  - Curto;
  - Longo.
8. Aptidão:
  - Companhia;
  - Guarda;
  - Caça.
9. Onde dorme:
  - Dentro de casa com os tutores;
  - Fora de casa ao ar livre;
  - Fora de casa, mas dentro de um canil.
10. Convive com outros cães:
  - Sim;
  - Não
  - 10.1. Se sim, algum dos animais foi diagnosticado com Babesiose Canina? (a ser respondido apenas por tutores de animais diagnosticados com BC)
    - Sim;
    - Não
  - 10.2. Se sim, algum dos animais foi diagnosticado com LCan? (a ser respondido apenas por tutores de animais amostrados para LCan)
11. Acesso ao exterior da habitação:
  - Sim;

- Não.

Se sim:

11.1. em que período do dia?

- Manhã;
- Tarde;
- Noite.

11.2. Em espaços públicos?

- Sim
- Não

11.3. Em locais de caça?

- Sim
- Não

11.4. Contato com ribeiros, riachos, rios, charcos, lagos ou lagoas?

12. Vacinado:

- Sim
- Não

Se sim:

- Raiva
- LCan
- DHPPI+Lepto
- BC
- Raiva+ DHPPI+ Lepto
- Raiva+ DHPPI+ Lepto+ LCan

13. Desparasitado para ectoparasitas:

- Sim;
- Não;

Se sim:

13.1. Com que forma:

- Pipeta (qual?)
- Coleira (qual?)
- Spray (qual?)
- Injetável (qual?)

13.2. Com que frequência?

13.3. Nome do produto comercial?

14. O animal já foi diagnosticado com BC anteriormente? (a ser respondido apenas por tutores de animais diagnosticados com BC)

- Sim;
- Não;

15. Sinais presentes na consulta:

Hemato-linfático	Sistémicos	GI	Pele e anexos	Oftálmicos	Urínario	SNC
Palidez das mucosas	Hipertermia	Diarreia	Onicogrifose	Queratoconjuntivite seca	Hematúria	Nistagmus
Icterícia	Perda de apetite	Melena	Dermatite ulcerativa	Conjuntivite		
Epistáxis	Perda ponderal	Vómitos	Dermatite descamativa	Blefarite		
Linfadenomegália	Letargia	Náusea	Dermatite alopecica	Úlceras		
Ascite	Caquexia		Défice cicatricial			
			Hiperqueratose nasal			
			Presença de pulgas			
			Presença de carraças			

16. Internado:

- Sim;
- Não.

17. Óbito:

- Sim;
- Não.

