UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

RASTREIO PARASITOLÓGICO DE *TRITRICHOMONAS FOETUS* EM GATOS

ANDREIA GRANGEIRO JACINTO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI
Doutor Luís Madeira de Carvalho
Doutora Isabel Maria Soares Pereira da Fonseca de Sampaio
Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles

ORIENTADORA
Doutora Isabel Maria Soares Pereira da Fonseca de Sampaio

CO-ORIENTADORA
Mestre Carla Alexandra Almeida Monteiro

2016

LISBOA

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

RASTREIO PARASITOLÓGICO DE *TRITRICHOMONAS FOETUS* EM GATOS

ANDREIA GRANGEIRO JACINTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI
Doutor Luís Madeira de Carvalho
Doutora Isabel Maria Soares Pereira da Fonseca de Sampaio
Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles

ORIENTADORA
Doutora Isabel Maria Soares Pereira da Fonseca de Sampaio

CO-ORIENTADORA
Mestre Carla Alexandra Almeida Monteiro

2016

LISBOA

"*The important thing is to not stop questioning.*
Curiosity has its own reason for existence.
One cannot help but be in awe he contemplates the mysteries
of eternity, of life, of the marvelous structure of reality.
It is enough if one tries merely to comprehend a little of this mystery each day.
Never lose a holy curiosity."

Albert Einstein, 2 de Maio de 1955
in Life Magazine

Agradecimentos

Agradeço todo o apoio e ajuda que a Professora Doutora Isabel Fonseca me deu durante a realização desta dissertação, por todos os conselhos que me foram transmitidos e pela sua orientação.

À Dra. Carla Monteiro por todo a ajuda, conhecimentos, conselhos, motivação que me deu durante o estágio, por todo o tempo despendido na ajuda com a redação da dissertação. Obrigada por tudo!

À empresa B|Braun, na pessoa da Dra. Isabel Larcher Ferreira, pela oferta dos catéteres vesicais, que sem os quais não seria possível a realização deste projeto.

A toda a equipa do Hospital Escolar (médicos, enfermeiros, auxiliares, rececionistas, todos sem exceção) pela excelente receção que me foi feita, por todos os conhecimentos que transmitiram, pelas horas de trabalho e de diversão. Obrigada! Serei uma pessoa e uma médica veterinária melhor por vossa causa.

À Dra. Lídia Gomes, pelo apoio e paciência no auxílio da realização das técnicas laboratoriais, pela disponibilidade de esclarecimentos das minhas dúvidas existênciais sempre que pensava ter "avistado" um parasita!

Ao Professor Telmo pela ajuda prestada na parte estatística deste trabalho.

À Dra. Elisa Luz por todo o apoio na pesquisa de artigos de difícil acesso e pela explicação de como lhes aceder.

Ao Sr. Álvaro pela sua simpatia e ajuda em todas as situações.

Aos meus pais pelo apoio que me deram durante todo o meu percurso para atingir o sonho de criança "Ser médica veterinária!". Obrigada por nunca terem desistido e me orientarem nesta longa caminhada!

À minha irmã pela companhia e amizade e por estar sempre presente quando foi preciso.

Aos meus avós e tios por estarem sempre disponíveis para me ajudar e me apoiarem em todas as etapas da minha vida.

À minha priminha por todo o ânimo que me dá e por toda a alegria que só ela me sabe trazer.

À minha madrinha e ao meu padrinho por estarem sempre presentes na minha vida e me ajudarem a trilhar o caminho do sucesso.

A todos os outros familiares pelo apoio, motivação e carinho que me dão.

Aos meus colegas estagiários, Anabela, “Beatrizes”, Joana, João, Manuel, Maria Francisca, Mariana, Marisa, Sara, Sónia, Susana pelas horas que passámos em conjunto, pelas gargalhadas no corredor, pelo conhecimento partilhado e pela amizade criada.

À Beatriz pelas horas passadas no laboratório e pelo apoio que me deu durante este projeto, pelas horas infindáveis de conversa e pela amizade.

A todos os meus amigos, sem exceção, vocês sabem quem são, pelas horas de conversa e apoio que me deram e, espero, que continuem a dar por muitos e muitos anos.

A todos os meus colegas e amigos da Banda da Escola de Música Juventude de Mafra pelas horas que passamos juntos, pelos bons momentos partilhados, pelos sucessos partilhados, pela música que fazemos em conjunto e pela diversão que me trazem!

Ao pessoal da 2ª fila e arredores e do autocarro “23”, que nos conhecemos no início do curso e sem os quais não teria sido a mesma coisa. Obrigada pelas horas passadas… o esforço compensou!!

À Maria Tartaruga, a gata, que dá a cara pelo projeto.

À Bulla Maria por todo o “cãopanheirismo” e por todos os passeios que ficaram por dar devido ao trabalho e dedicação terem sido desviados para outros caminhos.

A todos os gatinhos que participaram neste rastreio, sem eles não seria possível!

E a todos as outras pessoas que comigo se cruzaram e que de alguma forma me ajudaram a criar e a seguir este meu caminho.

Muito Obrigada a Todos!

Resumo

Rastreio Parasitológico de *Tritrichomonas foetus* em gatos

A tritrichomonose felina é uma doença parasitária provocada pelo protozoário flagelado *Tritrichomonas foetus*, por vezes, também, designado por *T. blagburni*. Esta parasitose está associada a uma diarreia crónica ou intermitente com origem no intestino grosso, porém alguns dos animais parasitados não apresentam sinais clínicos. Está descrito que gatos jovens (<12 meses), que vivam em ambientes com mais do que um gato e que sejam de raça pura apresentem uma maior suscetibilidade de contraírem esta parasitose.

Nos últimos anos têm sido realizados diversos estudos que permitem um conhecimento cada vez mais amplo desta doença, todavia em Portugal apenas estava reportado um caso clínico e uma menção de um animal positivo. Este rastreio parasitológico teve como um dos seus objetivos avaliar a prevalência deste parasita na amostra estudada.

O rastreio parasitológico foi realizado numa amostra de 60 gatos consultados no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, em que 36,67% estava com diarreia e 15% tinha história passada de diarreia. Todos os animais foram submetidos a uma lavagem de cólon para se obter a amostra a ser inoculada no meio de cultura InPouch^{TM}TF – Feline para a pesquisa dos trofozoítos de *T. foetus*. Apenas um dos 60 animais avaliados no estudo foi positivo para *T. foetus* no meio de cultura ao 10º dia após inoculação. Os trofozoítos sobreviveram durante 37 dias após o diagnóstico. A prevalência de *T. foetus* neste rastreio foi de 1,67% (intervalo de confiança [IC] de 95%: 0,29-8,86%, N=60).

Concomitantemente, o produto da lavagem de cólon e uma amostra de três dias consecutivos de fezes naturalmente eliminadas, foram avaliados para se caracterizar outras potenciais parasitoses gastrointestinais para complementar a avaliação do animal. Os outros parasitas identificados foram: *Ancylostoma* spp. 8,33% (IC de 95%: 3,61-18,08%), *Giardia* sp. 5% (IC de 95%: 1,71-13,7%), *Cystoisospora felis*, *C. rivolta*, *Dypilidium caninum*, *Toxocara cati* e *Taenia taeniaeformis* 3,33% (IC de 95%: 0,92-11,36%) e *Aelurostrongylus abstrusus* 1,67% (IC de 95%: 0,29-8,86%).

De acordo com os resultados obtidos, a existência de infeção por *T. foetus* nos gatos em território nacional leva a que esta parasitose deva ser encarada como um potencial diagnóstico diferencial em casos de diarreia com origem no intestino grosso.

Palavras-Chave: *Tritrichomonas foetus*; gatos; diarreia; rastreio epidemiológico; prevalência; lavagem de cólon; InPouch^{TM}TF – Feline; Portugal.

Abstract

Parasitological Survey of *Tritrichomonas foetus* in cats

Feline tritrichomonosis is a parasitic disease caused by flagellates protozoan *Tritrichomonas foetus*, sometimes referred as *T. blagburni*. This parasitosis is characterized by chronic or intermittent large intestine diarrhea, however some animals don't have clinical sings. Kittens (<12 months), living in a multi-cat environment and purebreed cats have greater susceptibility for this disease.

During the last years, various studies, have been conducted allowing an extensive increase of knowledge on this disease, but in Portugal only one case has been reported and a mention of a positive animal. One of the objectives of this parasitological survey was to evaluate the prevalence rate of this parasite in a sample of cats.

This parasitological survey was achieved with a sample of 60 cats consulted of Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, on which 36,67% suffered from diarrhoea and 15% had a history of diarrhoea. In order to search for *T. foetus* trophozoites, all animals were submitted to colon saline flush and the obtained product was inoculated in to fecal culture InPouch^{TM}TF – Feline. Only one of the 60 animals in this study was positive for *T. foetus* in the fecal culture in 10th day after inoculation. The trophozoites survived for 37 days after diagnosis.

The prevalence rate of T. foetus in this parasitological survey was 1,67% (confidence level [IC] 95%: 0,29-8,86%, N=60).

Concurrently, the collected sample from the colon saline flush and a fecal sample naturally eliminated on three consecutive days were analyzed for the presence of others parasites in order to characterize other potential gastrointestinal parasitosis for further evaluation of the animal. Other parasites identified were: *Ancylostoma* spp. 8,33% (IC 95%: 3,61-18,08%), *Giardia* sp. 5% (IC 95%: 1,71-13,7%), *Cystoisospora felis*, *C. rivolta*, *Dypilidium caninum*, *Toxocara cati* and *Taenia taeniaeformis* 3,33% (IC 95%: 0,92-11,36%) and *Aelurostrongylus abstrusus* 1,67% (IC 95%: 0,29-8,86%).

According to our results, *T. foetus* occurrence in cats on national territory make this parasitosis an important to be considered in the differential diagnosis of feline large intestinal diarrhoea cases.

Keywords: *Tritrichomonas foetus*; cats; diarrhoea; parasitological survey; prevalence rate; colon saline flush; InPouch^{TM}TF – Feline; Lisbon.

Índice Geral

Agradecimentos ii
Resumo iv
Abstract v
Índice Geral vi
Lista de Figuras x
Lista de Tabelas x
Lista de Gráficos xii
Lista de Mapas xii
Lista de Abreviaturas e Siglas xiii

Introdução 1

Capítulo I – Relatório de Estágio 2
1. HE – FMV, ULisboa 2
1.1. Medicina Interna 3
1.2. Internamento 4
1.3. Cirurgia 4
1.4. Unidade de Doenças Infetocontagiosas 5
1.5. Imagiologia 5
1.5.1. Radiologia 5
1.5.2. Tomografia Computorizada 5
1.5.3. Ecografia 6
1.5.4. Endoscopia 6
1.6. Banco de sangue 6
1.7. Formação contínua 6
2. Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Sanidade Animal da FMV, ULisboa 7

Capítulo II – Revisão bibliográfica 8
1. Tritrichomonose Felina 8
2. Tritrichomonose Felina – Aparelho Reprodutor 9
3. *Tritrichomonas foetus* – Morfologia 10
4. *Tritrichomonas foetus* – Ciclo de vida 10
5. Epidemiologia 12
5.1. Distribuição Geográfica 12

5.2. Idade 15
5.3. Raça 16
5.4. Sexo 16
5.5. Ambiente 17
5.6. Outros 17
6. Co-infeções 18
7. Patogenia 19
8. Sinais Clínicos 22
9. Diagnóstico 23
9.1. Diagnóstico clínico 23
9.2. Diagnóstico laboratorial 24
9.2.1. Técnicas de colheita 24
9.2.2. Técnicas de identificação 25
9.2.2.1. Exame direto 25
9.2.2.2. Meio de cultura 26
9.2.2.3. PCR 27
9.3. Diagnóstico histopatológico 28
10. Tratamento 30
10.1. Ronidazol 31
10.2. Tinidazol 33
10.3. Outros – Novos tratamentos 33
11. Prognóstico 34
12. Controlo 34
13. Implicações na Saúde Pública 34

Capítulo III – Rastreio Parasitológico *de Tritrichomonas foetus* em Gatos 36
1. Objetivos 36
2. Material e Métodos 36
2.1. População em Estudo 36
2.2. Recolha de Informação Individual 36
2.3. Ética 37
2.4. Colheita e Conservação das amostras 37
2.4.1. Lavado de cólon 37
2.4.2. Amostra de fezes eliminadas naturalmente em 3 dias consecutivos 38
2.5. Métodos utilizados 38
2.5.1. Amostra de lavado de cólon 38
2.5.1.1. Pesquisa macroscópica de parasitas 38

2.5.1.2. Realização da cultura no meio InPouch^{TM} TF – Feline 38
2.5.1.3. Pesquisa de parasitas através do método de flutuação de Willis 39
2.5.1.4. Pesquisa de parasitas através de esfregaço 40
2.5.1.5. Preparação de esfregaços a partir do meio de cultura e sua coloração 41
2.5.2. Amostra de fezes naturalmente eliminadas em 3 dias consecutivos 41
2.5.2.1. Avaliação macroscópica 41
2.5.2.2. Pesquisa de parasitas através do método de flutuação de Willis 41
2.5.2.3. Pesquisa de parasitas através de esfregaço fecal 42
2.6. Identificação de parasitas 42
2.7. Análise estatística 42
3. Resultados 43
3.1. Caracterização da amostra 43
3.1.1. Localização geográfica e ambiente 43
3.1.2. Idade, sexo e raça 44
3.1.3. Coabitação 45
3.1.4. Plano vacinal e plano de desparasitação interna 46
3.1.5. Doenças/Afeções concomitantes 47
3.1.6. Diarreia 49
3.1.7. Outros 51
3.2. Resultados obtidos pelas diferentes técnicas 51
3.2.1. Amostra de lavado de cólon 51
3.2.1.1. Exame macroscópico 51
3.2.1.2. InPouch^{TM}TF – Feline 52
3.2.1.3. Método de flutuação de Willis 53
3.2.1.4. Esfregaço 54
3.2.2. Amostra de fezes naturalmente eliminadas em 3 dias consecutivos 54
3.2.2.1. Exame macroscópico 54
3.2.2.2. Método de flutuação de Willis 55
3.2.2.3. Esfregaço Fecal 56
3.2.3. Prevalências e intervalos de confiança dos diversos parasitas observados 57
4. Discussão 57
4.1. Tritrichomonas foetus 57
4.2. Outros Parasitas 65

Conclusão e perspetivas futuras 67

Bibliografia 68

Anexo I – Certificado de participação no curso 78

Anexo II - Autorização para colheita da amostra de lavado de cólon no âmbito da Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária “Rastreio parasitológico de *Tritrichomonas foetus* em gatos” 79

Anexo III – Panfleto de divulgação 80

Anexo IV - Inquérito 82

Anexo V – Meio de cultura InPouch^{TM} TF - Feline 85

Anexo VI – Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais 87

Anexo VII – Registo dos animais positivos de acordo com o tipo de amostra colhida e dos exames macroscópicos realizados 100

Lista de Figuras

Figura 1- (a) Esquema de *Tritrichomonas foetus*, adaptado de Gunn & Pitt (2012); (b) Imagem de *T. foetus* obtida em microscopia óptica, corado com Giemsa. (Fotografia Original) 10
Figura 2- Ciclo de vida *Tritrichomonas foetus*, adaptado de Lappin (2014).....11
Figura 3 – Principais aspetos da ação patogénica do parasita *Tritrichomonas foetus*, adaptado de Tolbert e Gookin (2016). 21
Figura 4 – Microfotografia de corte histológico de cólon de um gato com tritrichomonose felina. São visíveis vários trofozoítos de *T. foetus* no lúmen intestinal com a presença concomitante de bactérias. Imagem de microscopia eletrónica. Adaptado de Yaeger e Gookin (2005). 29
Figura 5 - Microfotografia de corte histológico de cólon de um gato com tritrichomonose felina. Hibridização com (**A**) e sem (**B**) de anticorpos monoclonias anti*T. foetus*. Imagem de microscopia eletrónica. Yaeger e Gookin (2005).....29
Figura 6 – A – Introdução do cateter maleável; B – Lavado de cólon obtido. (Fotografias originais) 38
Figura 7 – Inoculação no meio de cultura InPouch^{TM}TF - Feline. A – Meio de cultura InPouch^{TM} TF – Feline; B – Incubação dos meios de cultura numa estufa a 37ºC em posição vertical. (Fotografais originais) 39
Figura 8 – Método de flutuação de Willis para análise do lavado de cólon. A – Material (solução saturada de sacarose, suporte para tubos de ensaio, tubos de ensaio, lamelas, coador de rede, funil, copo de plástico e amostra); B – Lavado de cólon homogeneizado com a solução saturada de sacarose; C – Tubo de ensaio com a lamela. (Fotografias originais) 40
Figura 9– Esfregaço de lavado de colón. A – Após realização; B- Após coloração. (Fotografias originais).....41
Figura 10 - Esfregaço fecal. A – Após realização; B- Após coloração. (Fotografias originais) 42
Figura 11 – *Dipylidium caninum.* A – Aspeto macroscópico de um proglote; B – Pormenor de um poro genital e de ovos; C – Ovo com embrião hexacanto, ganchos dos embriões hexacantos, MO. (Fotografias originais) 52
Figura 12 – A – Ovos de Taenia taeniaeformis com embrião hexacanto, ganchos dos embriões hexacantos, MO. (Fotografias originais) 52
Figura 13 – *Tritrichomonas foetus*. A – Aspeto de um campo de um meio de cultura InPouch^{TM}TF – Feline positivo para *T. foetus*, MO; C e D – *T. foetus*, coloração Giemsa, MO. (Fotografias originais).....53
Figura 14 – Formas parasitárias identificadas no método de flutuação de Willis realizada com lavado de cólon. A – Larva L1 de *Aelurostrongylus abstrusus*, MO; B – *Toxascaris leonina*, MO; C – *Cystoisospora rivolta*, MO. (Fotografias originais) 54
Figura 15 - Quisto de *Giardia* sp. observado num esfregaço de lavado de cólon, coloração de Ziehl-Neelsen, MO. (Fotografia original) 54
Figura 16 – Parasitas observados no método de flutuação de Willis em amostras de fezes naturalmente elimindas em 3 dias consecutivos. A – *Cystoisospora felis*, MO; B – *C. rivolta*, MO; C – *Ancylostoma* spp., MO; D – *Toxocara cati* e *Ancylostoma* spp., MO; E – *T. cati*, MO; F – *Taenia taeniaeformis*, MO. (Fotografias originais) 56
Figura 17 - Quisto de *Giardia* sp. ( )observado num esfregaço fecal, MO, coloração Ziehl-Neelsen. (Fotografia original) 56

Lista de Tabelas

Tabela 1- Tempo de sobrevivência dos trofozoítos de *Tritrichomonas foetus* em diversos ambientes, adaptado de Rosypal *et al*. (2012). 12
Tabela 2 – Dados mundiais sobre a prevalência de *Tritrichomonas foetus*.....13

Tabela 2 – Dados mundiais sobre a prevalência de *Tritrichomonas foetus*.(Continuação).....14
Tabela 3 - Distinção entre diarreia com origem no intestino delgado e no grosso. Adaptado de Marks (2013a).....22
Tabela 4 – Sensibilidade das diferentes técnicas de identificação do parasita *Tritrichomonas foetus*, adaptado de [1]Gookin, *et al*. (2004) e [2]Chaoqun e Liza (2015).....26
Tabela 5 - Distribuição das raças presentes na população em estudo.....45
Tabela 6 – Substâncias ativas utilizadas na desparasitação interna da amostra em estudo.....47
Tabela 7 – Descrição de doenças/afeções, da duração e de medicação dos gatos com doenças diagnosticadas previamente à realização da lavagem de cólon.....48
Tabela 8 – Características das fezes dos gatos com diarreia no momento da colheita por lavagem de cólon.....50
Tabela 9 – Características das fezes dos gatos com história de episódios de diarreia aguda no passado (N=8).....51
Tabela 10 - Características macroscópicas das amostras de fezes eliminadas naturalmente em 3 dias consecutivos (N=52).....55
Tabela 11- Prevalências e intervalos de confiança dos diversos parasitas observados no decorrer do rastreio parasitológico (N=60).....57
Tabela 12 – Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais: sexo, concelho, idade, raça, ambiente, acesso à rua, número de gatos por habitação, partilha da caixa de areia, limpeza cruzada entre gatos e coabitantes.....87
Tabela 12 – Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais: sexo, concelho, idade, raça, ambiente, acesso à rua, número de gatos por habitação, partilha da caixa de areia, limpeza cruzada entre gatos e coabitantes (Continuação I).....88
Tabela 12 – Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais: sexo, concelho, idade, raça, ambiente, acesso à rua, número de gatos por habitação, partilha da caixa de areia, limpeza cruzada entre gatos e coabitantes (Continuação II).....89
Tabela 12 – Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais: sexo, concelho, idade, raça, ambiente, acesso à rua, número de gatos por habitação, partilha da caixa de areia, limpeza cruzada entre gatos e coabitantes (Continuação III).....90
Tabela 13– Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais: Desparasitação (frequência e produto utilizado), Vacinação e Doença/Afeção (qual, há quanto tempo surgiu e medicação atual).....91
Tabela 13– Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais: Desparasitação (frequência e produto utilizado), Vacinação e Doença/Afeção (qual, há quanto tempo surgiu e medicação atual) (Continuação I).....92
Tabela 13– Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais: Desparasitação (frequência e produto utilizado), Vacinação e Doença/Afeção (qual, há quanto tempo surgiu e medicação atual) (Continuação II).....93
Tabela 13– Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais: Desparasitação (frequência e produto utilizado), Vacinação e Doença/Afeção (qual, há quanto tempo surgiu e medicação atual) (Continuação III).....94
Tabela 13– Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais: Desparasitação (frequência e produto utilizado), Vacinação e Doença/Afeção (qual, há quanto tempo surgiu e medicação atual) (Continuação IV).....95
Tabela 14 – Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais: Diarreia e sua caracterização e Observações.....96
Tabela 14 – Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais: Diarreia e sua caracterização e Observações (Continuação I).....97
Tabela 14 – Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais: Diarreia e sua caracterização e Observações (Continuação II).....98

Tabela 14 – Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais: Diarreia e sua caracterização e Observações (Continuação III). 99
Tabela 15 – Registo dos animais positivos nas técnicas realizadas. 100
Tabela 15 – Registo dos animais positivos nas técnicas realizadas (Continuação). 101

Lista de Gráficos

Gráfico 1- Divisão aproximada nas diferentes áreas do HE - FMV, ULisboa 2
Gráfico 2 – Distribuição dos gatos pelos diversos ambientes. 44
Gráfico 3 – Distribuição das idades da população em estudo 44
Gráfico 4 - Representação do número total de gatos por habitação os quais coabitavam com outros gatos (N=32). 45
Gráfico 5 – Plano vacinal (N=32). 46
Gráfico 6 – Programa de desparasitação interna dos gatos em estudo. 47
Gráfico 7 – Presença de doenças/afeções concomitantes diagnosticadas previamente à realização da lavagem de cólon. 48
Gráfico 8 – Presença de diarreia na população em estudo. 49
Gráfico 9 – Frequência absoluta dos gatos com diarreia na altura da colheita por lavagem de cólon de acordo com o tempo em que o sinal clínico surgiu (N=22). 49

Lista de Mapas

Mapa 1 - Distribuição por concelhos dos gatos em estudo. 43

Lista de Abreviaturas e Siglas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

CAMV's - Centros de atendimento médico-veterinários

CISH – Hibridização cromogénica *in situ*

CML – Concentração mínima letal

EUA – Estados Unidos da América

EVDS - *European Veterinary Dental Society*

FA – Frequência absoluta

FeLV – Vírus da leucemia felina

FIV – Vírus da imunodeficiência felina

FMV, ULisboa – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

FR – Frequência relativa

HE – FMV, ULisboa – Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

IC – Intervalo de confiança

ITS – *Internal transcribed spacer*

LC – Lavagem de cólon

MO – Microscopia óptica

OR – *Odds ratio*

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PO – *Per os*

SRD – Sem raça definida

rARN – Ácido ribonucleíco ribossómico

cm – centímetros

g – grama

IgE - Imunoglobulinas E

kg – quilograma

L1 – Larvas do primeiro estádio

mg – miligrama

mL – mililitros

mm – milimetros

nº - Número

N – Tamanho da amostra

p – Nível de significância

q – A cada

rpm – Rotações por minuto

x - Vezes

µg – micrograma

µL - microlitros

µm – micrómetros

= - Igual

% - Percentagem

ºC – graus Celsius

< - Menor

> - Maior

≥ - Maior ou igual

Ø - Diâmetro

Introdução

São muitas as situações clínicas em que um gato surge com diarreia à consulta, sendo considerado por Little (2011a) um dos principais problemas de saúde dos gatos jovens, comummente relacionadas com a alimentação e doenças infeciosas e parasitárias. Entre estas causas estão presentes várias hipóteses, como: intolerância/alergia a um determinado alimento, mudança brusca da alimentação, alimentos avariados, panleucopénia felina, leucemia felina, imunodeficiência felina, helmintes (nemátodes e céstodes) e protozoários (*Giardia*, *Tritrichomonas*, *Cryptosporidium*, *Toxoplasma*, *Cystoisospora*, entre outros) (Gough, 2007; Willard, 2010; Bowman, 2014).

A tritrichomonose felina é uma doença parasitária causada por *Tritrichomonas foetus*, que apenas em 2003 foi identificado como agente primário de diarreia em gatos (Levy *et al*., 2003), causando diarreia crónica ou intermitente com origem no intestino grosso, embora alguns animais permaneçam sem sinais clínicos (Levy *et al*., 2003; Manning, 2010; Gookin, 2012; Gookin & Levy, 2015; Chaoqun & Liza, 2015).

Nos últimos anos vários estudos têm sido publicados sobre esta doença e referidos casos em diversos países. Em Portugal pouco se conhece sobre a tritrichomonose felina, mas já está relatado por Valente *et al*. (2015) um caso confirmado desta doença e mencionado por Gomes (2015) a infeção de um animal, contudo esta é, muitas vezes, esquecida no momento da elaboração de uma lista de diagnósticos diferenciais quando surgem gatos com história de diarreia.

O tema escolhido para a redação desta dissertação de mestrado advém do interesse na medicina felina conjugado com a oportunidade de desenvolvimento de um rastreio parasitológico de um parasita do qual pouco se conhece em Portugal. Este rastreio parasitológico surgiu no contexto de um estágio na área da clínica de pequenos animais realizado no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (HE – FMV, ULisboa) conjugado com a parte laboratorial realizada no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Sanidade Animal da mesma instituição, que englobou várias atividades, as quais serão descritas resumidamente no capítulo seguinte.

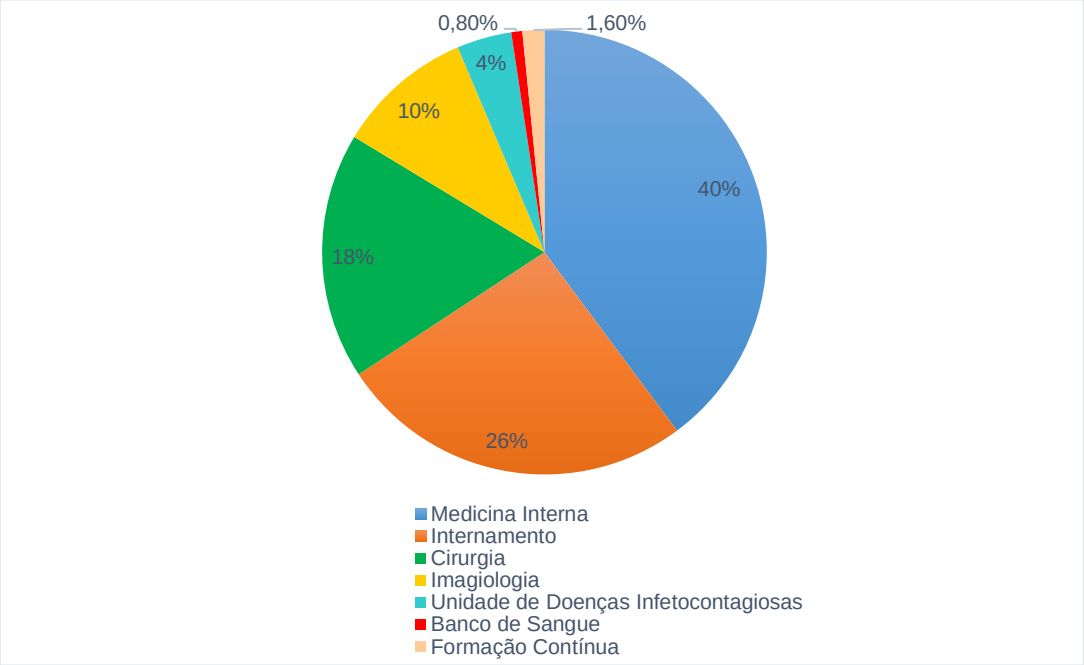
Capítulo I – Relatório de Estágio

O estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária decorreu no HE – FMV, ULisboa e no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Sanidade Animal, de setembro de 2015 a março de 2016 sob orientação da Professora Doutora Isabel Pereira da Fonseca e co-orientação da Mestre Carla Monteiro. A parte laboratorial prolongou-se até ao final do mês de Abril do mesmo ano.

1. HE – FMV, ULisboa

As atividades estiveram repartidas em diversas áreas: medicina interna, internamento, cirurgia, unidade de doenças infectocontagiosas, imagiologia, banco de sangue e formação contínua. A área de imagiologia compreendeu a radiologia, a tomografia computorizada, ecografia, endoscopia, bem como procedimentos ecoguiados. A circulação pelas diferentes áreas compreendeu turnos rotativos de 8 horas em medicina interna, imagiologia e cirurgia, turnos de 12 horas (diurnas ou noturnas) no internamento, turnos de 5 horas na unidade de doenças infetocontagiosas complementadas com 3 horas de medicina interna, turnos estes, que muitas vezes, foram alargados. O gráfico 1 representa de uma forma aproximada a divisão entre as diferentes áreas do HE – FMV, ULisboa, havendo uma estimativa de 1250 horas de estágio.

Gráfico 1- Divisão aproximada nas diferentes áreas do HE - FMV, ULisboa



1.1. Medicina Interna

A medicina interna engloba vários tipos de consultas, como: de primeira opinião, de referência, de segunda opinião e de seguimento. As consultas de primeira opinião ocorrem quando os proprietários vêm a uma consulta de medicina geral para dar resposta a uma alteração que surgiu no seu animal; as consultas de referência consistem em consultas de especialidade (dermatologia, oftalmologia, cardiologia, ortopedia, neurologia, oncologia, endocrinologia, comportamento animal, doenças infeciosas, animais exóticos e anatomia patológica) a que os clientes podem decidir por sua iniciativa aceder, mas muitas das vezes são casos aconselhados pelos médicos de medicina interna do HE – FMV, ULisboa ou referenciados por outros centros de atendimento médico-veterinários (CAMV's). As consultas de segunda opinião decorrem quando os proprietários decidem aceder ao Hospital para terem outra opinião especializada, depois de já terem realizado consultas de primeira opinião noutro(s) CAMV('s). As consultas de seguimento são consultas em que são acompanhados os casos clínicos que poderão resultar de qualquer um dos tipos referidos anteriormente bem como da cirurgia. No HE – FMV, ULisboa são realizadas, ainda, consultas de medicina preventiva (vacinações, desparasitações, *check-up* e consultas de rotina) e consultas em que são realizados apenas procedimentos técnicos requeridos por outros CAMV´s (análises clínicas, outros exames complementares ou procedimentos técnicos específicos).

Durante as consultas com os vários médicos veterinários do Hospital realizou-se a discussão dos casos clínicos enumerando a lista de problemas, os diagnósticos diferenciais, os exames complementares requisitados, o diagnóstico presuntivo e/ou definitivo, o tratamento e a evolução expectável dos casos. Os procedimentos técnicos inerentes às consultas acompanhadas foram: obtenção da história pregressa, realização de exame físico geral e exames específicos direcionados (ortopédico, neurológico, oftalmológico, cardíaco, entre outros), colheita de amostras biológicas (sangue, urina, pelos, líquidos de derrame, etc.), vacinações, punções aspirativas por agulha fina, citologias auriculares e de pele, abdominocenteses e toracocenteses, administração de medicações, entre outras, sendo possível um contacto próximo com os clientes na transmissão de informações sobre o caso clínico do seu animal, como de indicações para este.

A comunicação com o cliente é um aspeto fundamental, para garantir que a mensagem e informações importantes sejam transmitidas corretamente, são entregues aos clientes informações por escrito, umas de carácter obrigatório como as prescrições médicas, os termos de anestesia/sedação, internamento e eutanásia e outras de carácter informativo (ex. notas de alta, informações relevantes sobre a doença, indicações sobre os cuidados a ter). As informações por escrito, tanto na consulta como nas outras áreas tem um papel fundamental, pois reduzem erros e dúvidas dos clientes, para além de simplificarem a comunicação.

1.2. Internamento

O internamento encontra-se dividido em diversas frações: internamento geral, internamento cirúrgico, internamento de quimioterapia e internamento de doenças infetocontagiosas (descrito na secção 1.4), onde existiu a possibilidade de contactar com as diversas particularidades inerentes a cada um destes serviços. De uma forma geral procedeu-se à preparação e administração de medicamentos, monitorização e cuidados gerais dos pacientes hospitalizados, assim como de pacientes críticos.

Os casos clínicos eram discutidos com o médico responsável, sobre as decisões a tomar em cada um. Diversos procedimentos técnicos foram executados durante passagem pelo internamento: cateterização, cálculo e administração de fluidoterapia, oxigenoterapia, transfusões de sangue, maneio da dor, alimentação entérica, algaliação, abdominocentese, toracocentese, tratamento e manutenção de feridas e elaboração de diversos tipos de pensos (ex. pensos simples, Robert-Jones, etc.).

Com a supervisão do médico responsável escalonado para o internamento e da equipa de enfermagem, realizou-se a alta de pacientes, o que permitiu a interação com os seus responsáveis explicando as recomendações para o paciente, nomeadamente a nível nutricional, da terapêutica farmacológica e não farmacológica e a data da sua reavaliação.

1.3. Cirurgia

Na cirurgia realizou-se a preparação do animal antes da entrada no bloco operatório, preparação e monitorização pré e intra-anestésica, assim como funções de ajudante de cirurgia e circulante.

Foi possível observar e participar em cirurgias de diversos tipos: cirurgia de tecidos moles (ovariohisterectomias, orquiectomias, resolução de piómetras, cesarianas, laparotomias exploratórias, ureteres ectópicos, remoção de nódulos, enxertos de pele, etc.), oftalmologia (facoemulsificação, cateterismo do ducto lacrimal, entre outras), ortopedia (ressecção da cabeça do fémur, amputação de membros e dígitos, resolução de rotura de ligamentos cruzado do joelho, etc.), neurologia (resolução de hérnias discais), odontologia (destartarização, realização de modelos para aparelho ortodôntico, colocação de aparelho ortodôntico, extrações dentárias, etc.). Observaram-se também cirurgias de animais exóticos, como por exemplo extração dentária.

Na sequência das cirurgias em que participou como ajudante de cirurgião foram executados pequenos procedimentos técnico-cirúrgicos sob orientação e supervisão do cirurgião responsável, como por exemplo a execução de suturas de aproximação, suturas intradérmicas e suturas de pele. Houve também a possibilidade de executar destartarizações. A existência de um aparelho de radiografia intraoral levou à possibilidade de aprendizagem e da realização do posicionamento e revelação específicos deste tipo de aparelho. As cirurgias ortodônticas para extração dentária eram

precedidas de uma avaliação através de radiografia intraoral completa, sendo realizado no final do procedimento novas radiografias intraorais para verificação do trabalho realizado.

Sempre que possível, os pacientes eram acompanhados na reavaliação pela aluna, quer para maneio da dor, ajuste de medicação e observação e desinfeção das suturas e realização de pensos. Mais uma vez, o contacto com os proprietários foi fundamental nesta fase para esclarecer dúvidas e compreender algumas dificuldades sentidas em casa no maneio dos pacientes. Aquando de hospitalização dos pacientes intervencionados na cirurgia, os cuidados supracitados eram realizados no internamento com auxílio da equipa de enfermagem e do médico responsável por essa unidade.

1.4. Unidade de Doenças Infetocontagiosas

Na unidade de doenças infetocontagiosas houve a possibilidade de executar as atividade previamente citadas no internamento geral com a ressalva de serem tomadas medidas de proteção individual (utilização de máscara e touca, luvas, protetores de calçado e batas descartáveis. Em casos de maior risco para a saúde humana, foi utilizado fato completo descartável e óculos de proteção) de forma a evitar ao máximo contaminações dos executantes, dos animais envolventes e do meio ambiente. A unidade de doenças infetocontagiosas está dividida em zonas (sala de cães, sala de gatos, sala de preparação do material, sala de pequena cirurgia e realização de exames e sala de consulta de fichas dos animais hospitalizados) de forma evitar contaminações cruzadas e do meio envolvente.

1.5. Imagiologia

1.5.1. Radiologia

Na radiologia houve a oportunidade de acompanhar os médicos responsáveis e ajudar na execução dos posicionamentos específicos, revelação e discussão das imagens obtidas. Houve ainda a possibilidade de executar funções de anestesista. A atividade diária da equipa de radiologia consiste na execução de exames intercalados com a medicina interna (animais de companhia e exóticos), pré e pós-cirúrgico, acompanhamento cirúrgico e de casos referenciados.

Existiu a oportunidade de acompanhar a realização de exames específicos como controlo oficial da displasia da anca, mielografias, vaginouretrografia e trânsito baritado, bem como de todos os outros exames mais comuns, radiografia torácica, abdominal, membros, etc.

1.5.2. Tomografia Computorizada

A passagem pela secção da tomografia computorizada permitiu a colaboração dos procedimentos inerentes a este tipo de exame: cateterização do animal, indução e manutenção da anestesia, intubação do paciente, posicionamento específico e preparação e administração de líquido de contraste. Foi possível a análise crítica das imagens resultantes dos exames realizados e colaborar

na execução de relatórios dos exames tomográficos realizados pela equipa assim como na sua discussão.

A existência de uma equipa de radiologia responsável pela radiologia e tomografia computorizada no HE – FMV, ULisboa possibilita o foco nestas atividades e a realização de exames de casos internos bem como de casos referenciados

1.5.3. Ecografia

Na secção de ecografia foi possível o acompanhamento da realização de ecografias abdominais, torácicas (ecocardiografia e massas pulmonares), reprodutivas e cervicais (tiróide), e de assistir a diversos procedimentos ecoguiados: cistocenteses, punções ecoguiadas de osso, citologias de diversos órgãos ou massas e biópsias. Durante os exames foi sempre possível adquirir algumas técnicas e conhecimentos sobre os exames realizados.

1.5.4. Endoscopia

Na área de endoscopia observou-se a realização de vários procedimentos de endoscopia digestiva alta, com enfoque nas gastroscopias para remoção de corpos estranhos, acompanhando-se todo o procedimento de anestesia até à recuperação dos animais.

1.6. Banco de sangue

A existência da unidade banco de sangue integrado no HE – FMV, ULisboa permitiu o acompanhamento de todo o processo, desde dádivas a transfusões.

Foi possível colaborar em colheitas de sangue de animais dadores, em tipificações do grupo sanguíneo e em transfusões sanguíneas, nesta última desempenhando um papel ativo na sua monitorização e controlo.

1.7. Formação contínua

Uma das vantagens de estagiar no HE – FMV, ULisboa é a existência de clínicos sempre disponíveis a ensinar e partilhar o seu conhecimento em diversas áreas. Durante o estágio houve oportunidade de assistir a palestras, sobre:

- Urgências;
- Transfusões sanguíneas/Banco de Sangue;
- Animais exóticos – Conhecimentos gerais;
- Mamíferos exóticos;
- Eletrocardiografia;
- Nova Insulina no Mercado - ProZinc®.

Adquiriu-se também competências ao nível da colaboração e organização de cursos, ao participar como colaboradora na organização do curso básico e avançado de dentisteria organizado pela *European Veterinary Dental Society* (EVDS) em associação com a Faculdade de Medicina

Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV, ULisboa) tendo sido possível a realização do curso básico, completando não só o módulo teórico como também o prático (comprovativo – Anexo I).

2. Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Sanidade Animal da FMV, ULisboa

Paralelamente ao trabalho desenvolvido no HE – FMV, ULisboa foi realizado o trabalho laboratorial no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Sanidade Animal da FMV, ULisboa com uma estimativa de 150 horas de trabalho laboratorial.

O trabalho laboratorial consistiu na realização de técnicas coprológicas (flutuação, esfregaços fecais e culturas) para análise das amostras de fezes naturalmente eliminadas e de lavado de cólon entregues pelos proprietários e colhidas nas consultas do HE –FMV,ULisboa, respetivamente. Por vezes, as amostras de fezes eram recolhidas durante os períodos de hospitalização dos animais.

Capítulo II – Revisão bibliográfica

1. Tritrichomonose Felina

A tritrichomonose felina é uma doença parasitária que afeta os gatos sendo caracterizada por uma diarreia com origem no intestino grosso originada por um protozoário flagelado denominado *Tritrichomonas foetus* (Lappin, 2014), pertencendo à classe Parabasalia, ordem Trinchomonadida, família Trichomonidae e género *Tritrichomonas* (Gookin & Levy, 2015; Chaoqun & Liza, 2015).

Esta é uma doença dita contagiosa (Purina, 2007) e classificada por alguns autores como uma pandemia (Tolbert, Stauffer & Gookin, 2013), ou seja, uma doença que tem a capacidade de ultrapassar as fronteiras dos países, afetando a globalidade do planeta e um grande número de indivíduos (European Centre for Disease Prevention and Control [ECDC], 2012).

O parasita *T. foetus* apenas foi identificado como agente primário de diarreias com origem no intestino grosso em gatos em 2003 (Levy *et al*., 2003), todavia a primeira descrição deste parasita em gatos remonta ao ano de 1922 por Cunha e Muniz, num gato da América do Sul, sendo designado como *Trichomonas felis* (citado em Kessel, 1928). A partir do ano de 1996 houve um aumento significativo de estudos sobre este parasita bem como casos de animais positivos e de casos clínicos (Yaeger & Gookin, 2005; Stockdale, Givens, Dykstra & Blagburn, 2009).

Tradicionalmente, *Tritrichomonas foetus* é reconhecido como agente de tritrichomonose venérea dos bovinos, causando infertilidade das novilhas, abortos, piómetras e, menos frequentemente, mumificação fetal. Os transmissores deste agente são os touros, contudo não apresentam sinais clínicos (Bowman, 2014).

Vários têm sido os estudos realizados para tentar perceber se a espécie parasita dos bovinos e felinos é a mesma. A infeção experimental de gatos com inoculados de *T. foetus* provenientes de bovinos não conduziu a doença (Stockdale *et al*., 2008), verificando-se o mesmo em relação aos bovinos inoculados com *T. foetus* felino (Stockdale *et al*., 2007), sugerindo a impossibilidade de infeção cruzada entre estas duas espécies. Para além disso têm sido efetuados estudos genómicos de isolados de *T. foetus* bovino e felino em que têm sido identificadas diferenças genéticas significativas (Šlapeta, Craig, McDonell & Emery, 2010; Walden, *et al*., 2013). Šlapeta *et al*. (2012) afirmam que o genótipo de *T. foetus* bovino e de *T. foetus* felino diferem 1% entre si.

Walden *et al*. (2013) propuseram uma alteração da nomenclatura de *T. foetus* parasita dos gatos domésticos (*Felis catus*) para *Tritrichomonas blagburni* n.sp., baseada nas diferenças genéticas encontradas entre a espécie de parasita dos bovinos e dos felinos. No entanto, ao longo de todo este trabalho manter-se-á a designação de *Tritrichomonas foetus*.

É de realçar que um estudo recente afirma que a espécie que parasita os bovinos e os felinos é a mesma, contudo existem variações intraespecíficas relacionadas com o hospedeiro, justificadas por um padrão de expressão diferente dos genes de virulência de acordo com o hospedeiro infetado, conseguindo demonstrar com este trabalho que o parasita se conseguiu adaptar a um novo

hospedeiro (o gato) e a um novo microbiótopo (o intestino) (Morin-Adeline, Lomas, O´Meally, Stack & Šlapeta, 2014).

Existem outras espécies pertencentes ao género *Tritrichomonas* como *T. suis*, parasita comensal da cavidade nasal e trato gastroinestinal dos suínos, e espécie *T. mobiliensis,* agente de gastrite em símios portadores do vírus da imunodeficiência e encontrado em musaranhos associado a conteúdo cecal liquefeito (Frey & Müller, 2012; Šlapeta *et al*., 2012; Morin-Adeline *et al*., 2014; Gookin & Levy, 2015). Todavia, através de estudos genómicos concluíu-se que *T. suis* e *T. foetus* bovino são uma única espécie (Frey & Müller, 2012; Morin-Adeline *et al*., 2014) tendo uma correspodência de 100% entre os seus genótipos (Šlapeta *et al*., 2012). Assume-se que entre *T. foetus* felino e bovino e *T. mobiliensis* exista uma grande proximidade (Frey & Müller, 2012), Šlapeta *et al*. (2012) referem que existe uma diferença de 0,4% entre *T. foetus* felino e *T. mobiliensis*, uma diferença de 0,7% entre *T. foetus* bovino e *T. mobiliensis* e uma diferença de 1% entre *T. foetus* felino e bovino. Para além das proximidades genómicas, *T. foetus* já foi descrito na espécie canina (Kessel, 1928; Gookin, Birkenheuer, John, Spector & Levy, 2005), concluindo-se que não existe uma grande especificidade entre os hospedeiros destes parasitas (Gookin *et al*., 2001; Manning, 2010; Gookin, 2012).

2. Tritrichomonose Felina – Aparelho Reprodutor

Foi reportado no Canadá a presença de trofozoítos de *T. foetus* no interior do útero de uma gata de raça Exótica, com história de piómetra, identificados através de visualização direta e por métodos moleculares (reação em cadeia da polimerase [PCR]). Nas suas fezes não foi identificado o parasita. No gatil em que vivia (com gatos de raça persa e exótica e um gato doméstico sem raça definida [SRD]) foi identificado o parasita em amostras fecais analisadas pelas mesmas técnicas de laboratório descritas anteriormente (Dahlgren, Gjerde & Pettersen, 2007).

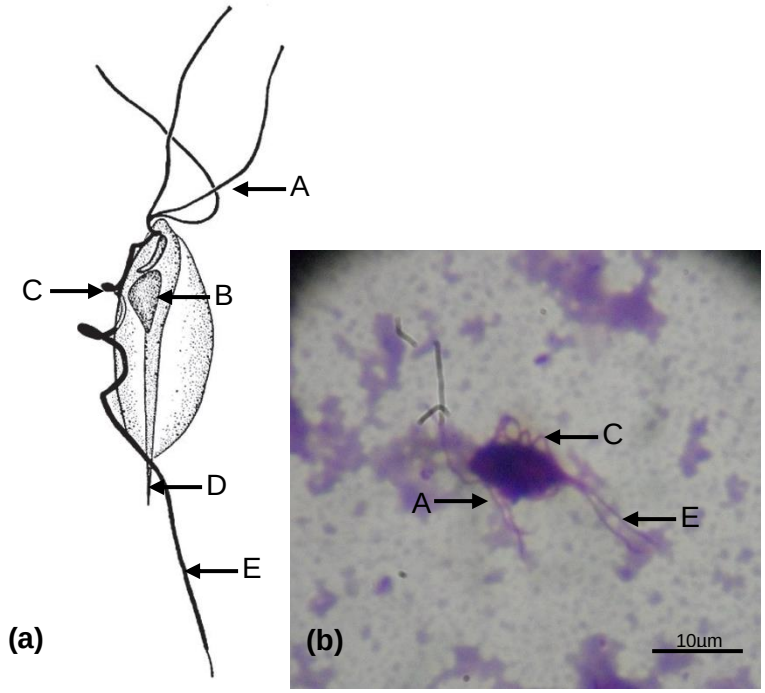
Numa tentativa de perceber se *T. foetus* seria ou não capaz de desencadear doença no trato reprodutivo, Gray, Hunter, Stone e Gookin (2010) conduziram um estudo, no ano de 2008, que envolvia 61 gatos de raça pura, provenientes de 36 gatis de criação, onde para além de avaliarem a prevalência deste parasita nas fezes também o faziam nos tecidos dos órgãos reprodutores. Foi identificado uma prevalência de 25% deste parasita nos gatos analisados, sendo que em 67% dos gatis foi identificado *T. foetus*, não havendo evidência de colonização do trato reprodutivo por este parasita. Tendo em conta estes resultados os autores afirmam que o trato reprodutivo não tem um papel relevante na transmissão da doença.

Gruffydd-Jones *et al*. (2013) referem que embora tenha sido identificado *T. foetus* no trato reprodutor, este parasita não está envolvido em doenças reprodutivas dos felinos.

3. *Tritrichomonas foetus* – Morfologia

T. foetus é um protozoário flagelado que apenas existe sob a forma de trofozoíto medindo 10 a 26 µm de comprimento por 3 a 15 µm de largura, o seu corpo tem a forma de uma pera, possuindo 3 flagelos anteriores orientados todos na mesma direção, um flagelo posterior que surge no final da membrana ondulante presente no corpo do parasita, um núcleo, um complexo de Golgi e um axóstilo (organelo que cruza todo o corpo do trofozoíto, tendo uma forma de haste, que faz protrusão na extremidade posterior) (Figura 1) (Tolbert & Gookin, 2009; Manning, 2010; European Scientific Counsel Companion Animal Parasites [ESCCAP], 2011; Gookin, 2012; Walden *et al*., 2013). Como organelos endoplasmáticos possui, também, as hidrogenossomas (Pereira-Neves, Menna-Barreto & Benchimol, 2016).

Figura 1- (a) Esquema de *Tritrichomonas foetus*, adaptado de Gunn & Pitt (2012); (b) Imagem de *T. foetus* obtida em microscopia óptica, corado com Giemsa. (Fotografia Original)



Â - Flagelos anteriores, B - Núcleo, C- Membrana ondulante, D - Axóstilo, E - Flagelo posterior.

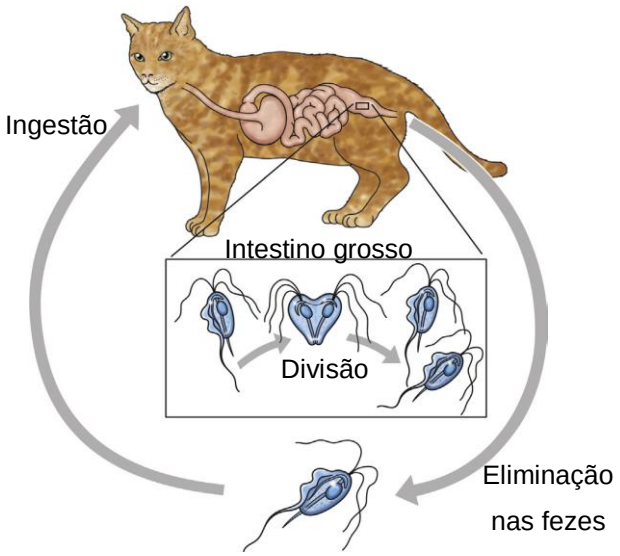
Recentemente, Pereira-Neves, Gonzaga, Mena-Barreto e Benchimol (2015) descrevem a presença de complexos intracelulares que controlam a degradação das proteínas citoplasmáticas, denominadas proteossomas, que exercem funções na diferenciação e replicação celular, bem como na homeostasia celular.

4. *Tritrichomonas foetus* – Ciclo de vida

T. foetus é um parasita obrigatório com capacidade de sobreviver em ambientes de anaerobiose, mas que tolera a sobrevivência em ambientes aeróbios (Tolbert & Gookin, 2009; Hale, Norris &

Šlapeta, 2009). Depende das bactérias endógenas do hospedeiro e das suas secreções e nutrientes ingeridos para sobreviver (Manning, 2010). Multiplica-se na mucosa do intestino grosso, através de divisão binária, sendo os trofozoítos produzidos excretados nas fezes dos animais, já na sua forma infetante, favorecendo a transmissão fecal-oral (Figura 2) (Gookin, 2012; Gruffydd-Jones *et al*., 2013).

Figura 2- Ciclo de vida *Tritrichomonas foetus*, adaptado de Lappin (2014).



Os trofozoítos podem ser detectados nas fezes dos felinos 14 dias após infeção (ESCCAP, 2011). A impossibilidade de formação de quistos pelo parasita *T. foetus* leva a que sobrevivência no meio exterior e no ambiente hostil ao qual são expostos após a ingestão por um novo hospedeiro seja um desafio acrescido comparativamente às espécies que possuem esta capacidade (Tolbert & Gookin, 2009; Chaoqun & Liza, 2015).

Pensa-se que em ambientes desfavoráveis (diminuição dos nutrientes disponíveis, a presença de fármacos e alterações abruptas de temperatura) o parasita *T. foetus* se transforme numa forma reversível de pseudoquisto ou endoflagelar, caracterizada por uma conformação arredondada com interiorização dos flagelos. Esta forma está descrita principalmente *in vitro*, mas já foi descrita em secreções prepuciais de bovino infetado (Pereira-Neves, Campero, Martínez & Benchimol, 2011).

Pereira-Neves *et al*. (2016) afirmam num estudo recente que, *in vitro*, a gliotoxina produzida por alguns tipos de fungos tem a capacidade de inibir os proteossomas produzidos por *T. foetus*, levando à sua transformação irreversível na forma endoflagelar e, posteriormente, à sua morte.

O ferro é um elemento necessário para a sobrevivência do parasita *T. foetus*, a sua diminuição leva à transformação reversível na forma endoflagelar e à inibição da sua proliferação, sugerindo que o ferro exerça um papel na regulação celular deste parasita (característica estudada em espécimes de *T. foetus* bovino) (Castro *et al*., 2016).

Alguns estudos têm sido realizados com o intuito de estudar a resiliência de *T. foetus* em diversos ambientes. Segundo Rosypal *et al*. (2012) este parasita tem a capacidade de sobreviver e, desta forma, poder ser infetante nos seguintes meios: água (tanto destilada como da torneira), urina de gato, comida húmida e seca e em papel de filtro (Tabela 1). Porém, o mesmo já não acontece no caixa de areia (Tabela 1). Hale *et al*. (2009) referem que os trofozoítos têm a capacidade de sobreviver durante sete dias nas fezes de gatos à temperatura ambiente.

Tabela 1- Tempo de sobrevivência dos trofozoítos de *Tritrichomonas foetus* em diversos ambientes, adaptado de Rosypal *et al*. (2012).

Condição Experimental	**Tempo de exposição (min)**	**Crescimento/Dias após Exposição**
Água destilada	30	Positivo/1dia
Água da torneira	30	Positivo/1dia
Urina de gato	≥180	Positivo/1dia
Comida seca de gato	30	Positivo/2dia
Comida caseira de gato	120	Positivo/4dia
Comida húmida de gato	≥180	Positivo/1dia
Caixa de areia	5	Negativo
Papel de filtro	15	Positivo/1dia

Num estudo publicado por Saag, McDonell e Šlapeta (2011), os autores assumem a possibilidade de as lesmas (*Limax maximus* e *Limacus flavus*) poderem ter um papel na transmissão passiva de trofozoítos de *T. foetus*, contaminando os alimentos com as suas fezes, actuando como fomites. O autores afirmam também que os trofozoítos têm a capacidade de sobreviver durante cinco dias consecutivos em alimentos de gato.

É de realçar que comportamentos como a partilha da caixa de areia entre diferentes gatos e a limpeza cruzada do pelo levam a maiores riscos de ingestão de trofozoítos e consequentemente o aumento da probabilidade de infeção por *T. foetus* e de contrair tritrichomonse felina (Tolbert & Gookin, 2009; Tysnes, Gjerde, NØcltvedt & Skancke, 2011).

5. Epidemiologia

5.1. Distribuição Geográfica

A tritrichomonose felina foi classificada como uma pandemia, sendo esperada uma distribuição mundial (Tolbert *et al*., 2013), no entanto não existem registos de prevalências, nem casos de animais positivos relatados em todos os países do mundo.

Como referido anteriormente o primeiro caso conhecido ocorreu em 1922, num gato residente na América do Sul (citado em Kessel, 1928). Vários estudos têm sido realizados com intuito de perceber a prevalência deste parasita nos diversos países do mundo (Tabela 2), todavia estas prevalências são bastantes díspares, devido às diferentes populações incluídas nas amostras bem como pelos diferentes testes de identificação utilizados. A prevalência mais elevada ocorreu na Nova Zelândia, referindo Kingsbury, Marks, Cave e Grahn (2010) que 82% de gatos (13/22) afetados em que realizaram as colheitas (felinos de raça em exposições) estavam infetados por *T. foetus*. As prevalências elevadas referidas em alguns dos estudos conduzem a algumas questões, tal como o facto de se centrarem em ambientes muitos específicos como exposições felinas, gatis de criação, abrigos de animais, gatos com diarreias crónicas e que vivem em ambientes com mais do que um gato, levando a acreditar que num panorama mais geral as prevalências sejam inferiores (ESCCAP, 2011). Existem também algumas variações das prevalências consoante o método de pesquisa utilizado (Gruffydd-Jones *et al*., 2013).

Tabela 2 – Dados mundiais sobre a prevalência de *Tritrichomonas foetus*.

País		Prevalência	Método Utilizado	Referência
EUROPA	**Alemanha**	15,7%[a] (36/230)	Meio de cultura e PCR	(Kuehner *et al*., 2011)
	Alemanha e Áustria	19,4% (6/31)	PCR	(Steiner *et al*., 2007)
	Áustria	2.9%[b] (4/102)	CISH e PCR	(Mostegl *et al*., 2012)
	Áustria	2,5% (1/40)	Meio de cultura	(Hinney *et al*., 2015)
	Espanha	25%[c] (5/20)	Exame direto, meio de cultura e PCR	(Miró *et al*., 2011)
	Espanha	38,7%[d] (36/93)	Meio de cultura e PCR	(Arranz-Solís *et al*., 2016)
	Finlândia	28,3% (17/60)	PCR	Citado em (Chaoqun & Liza, 2015)
	França	14,3%[a] (20/140)	Meio de cultura e PCR	(Profizi *et al*., 2013)
	Grécia	20% (6/30)	PCR	(Xenoulis, Saridomichelakis, Read, Suchodlski & Steiner, 2010)
	Holanda	2%[e] (1/53) 4%[f] (2/47) 0%[g] (0/54)	PCR	(van Doorn, de Bruin, Jorritsma, Ploeger & Schoormans, 2009)
	Itália	32%[h] (24/74)	Exame direto e meio de cultura	(Holliday, Deni & Gunn-Moore, 2009)
	Itália	0% (0/273)	Meio de cultura	(Mugnaini *et al*., 2012)
	Itália	2%[g] (3/146)	PCR	(Mancianti *et al*., 2015)
	Noruega	21,2%[a] (11/52)	Exame direto, meio de cultura e PCR	(Tysnes, Gjerde, NØcltvedt & Skancke, 2011)
	Polónia	7,3% (10/135)	Meio de cultura e PCR	Citado em (Chaoqun & Liza, 2015)

Tabela 3 – Dados mundiais sobre a prevalência de *Tritrichomonas foetus*.(Continuação)

País		Prevalência	Método Utilizado	Referência
EUROPA	**Reino Unido**	14,4%[e] (60/111)	PCR	(Gunn-Moore, McCann, Reed, Simpson & Tennant, 2007)
	Reino Unido	18,8%[e] (total 1088 amostras)	PCR	(Paris, Wills, Balzer, Shaw & Gunn-Moore, 2014)
	Reino Unido	20% (32/163)	PCR	Citado em (Chaoqun & Liza, 2015)
	Suíça	24,4%[i] (11/45)	Meio de cultura e PCR	(Frey *et al*., 2009)
	Suíça	26%[i] (27/105)	Meio de cultura e PCR	(Burgener, Frey, Hook & Gottstein, 2009)
ÁSIA	**Japão**	8,8% (13/147)	Meio de cultura e PCR	(Doi *et al*., 2012)
AMÉRICA	**Brasil**	1,8% (1/56)	Exame direto e PCR	(Duarte *et al*., 2015)
	Canadá (Sul de Ontário)	0,7%[j] (1/140) 0%[l] (0/46) 23,6%[a] (14/55)	Meio de cultura e PCR	(Hosein *et al*., 2013)
	Canadá (Ilha do Príncipe Eduardo)	0%[m] (0/100) 0%[l] (0/100) 1/5[n]	Meio de cultura	(Raab, Greenwood, Vanderstiche & Gelens, 2016)
	EUA (Exposição internacional felina)	31%[a] (36/117)	Exame direto, meio de cultura e PCR	(Gookin *et al*., 2004)
	EUA	10%[j] (17/77)	Meio de cultura e PCR	(Stockdale, Givens, Dykstra & Blagburn, 2009)
	EUA	25%[f] (15/61)	Exame direto, PCR e análise imunohistoquímica	(Gray, Hunter, Stone & Gookin, 2010)
	EUA (Norte da Califórnia)	2,9%[e] (5/170) 4,0%[e] (5/125) 0%[g] (0/54)	Meio de cultura PCR Meio de cultura e PCR	(Queen, Marks & Farver, 2012)
	EUA	39%[o] (27/68)	PCR	(Polak, Levy, Crawford, Leurenegger & Moriello, 2014)
OCEÂNIA	**Austrália**	0%[f] (0/82) 0%[l] (0/52)	Meio de cultura e PCR	(Bissett *et al*., 2009)
	Nova Zelândia	13,6%[a] (3/22) 82%[a] (18/22)	Meio de cultura PCR	(Kingsbury, Marks, Cave & Grahn, 2010)

[a]Gatos de exposições, [b]Lâminas do arquivo do Instituto de Patologia e Forense de Medicina Veterinária da Universidade de Medicina Veterinária de Áustria, [c]Gatil de criação de gatos Persas, [d]Gatos com diarreia crónica provenientes de lares com mais do que um gato, [e]Gatos com diarreia, [f]Gatos de gatis de criação, [g]Gatos saudáveis, [h]Colónia resgatada com diarreia crónica de intestino grosso, [i]Gatos com diarreia crónica, [j]Colheitas efetuadas numa clínica, [l]Gatos de abrigos de animais, [m]Gatos de colónia, [n]Gatos de particulares e [o]Gatos com diarreia provenientes de abrigos particulares de grandes dimensões (do inglês *sanctuary*).

Em alguns países não se conhece a prevalência deste parasita, mas já foram descritos casos. Lim *et al*. (2010) relatam os primeiros casos na Coreia, descrevendo-o em dois gatos Siameses da mesma ninhada. Bell *et al*., 2010 descrevem a presença do parasita *T. foetus* na Austrália, não havendo um estudo de prevalência, mas a referência a 38 animais positivos. Na Polónia foi descrito um caso de um gato macho de 6 meses de idade e de raça British Shorthair (DąbroWska, Karamon, KochanoWski, JędrYcko & Cencek, 2015). Köster, Chow e Yao (2015) registaram a presença de 29 gatos positivos num intervalo de 5 anos (2009-2014) em Hong Kong, China, sendo que a maioria eram gatos jovens (mediana de 10 meses), 86% de raças definidas e que 66% eram machos. Chaoqun e Liza (2015) referem que foi relatado no ano de 2015 o primeiro caso na Suécia.

Pouco se sabe sobre *T. foetus* em Portugal. O único caso publicado, até ao momento da elaboração desta dissertação de mestrado integrado em Medicina Veterinária, foi descrito por Valente *et al*. (2015) numa gata doméstica SRD de 5 meses de idade que apresentava diarreia crónica com origem no intestino grosso com 6 semanas de duração. Há mencão da infeção de um gato por Gomes (2015), observado num hospital veterinário do concelho de Lisboa.

5.2. Idade

A tritrichomonose felina está relatada em animais desde as 3 semanas até aos 12 anos de idade (Gunn-Moore, McCann, Reed, Simpson & Tennant, 2007; Stockdale *et al*., 2009; Bell *et al*., 2010; Kuehner *et al*., 2011; Doi *et al*., 2012), variando, com os estudos, principalmente a mediana referida. Gunn-Moore *et al*. (2007) afirmam ser de 7 meses, Bell *et al*. (2010) de 8 meses e Kuehner *et al*. (2011) de 1 ano. Vários são os autores que referem que a idade é um fator de risco para esta doença, todavia este facto não é unânime.

Paris, Wills, Balzer, Shaw e Gunn-Moore (2014) assumem que a prevalência de *T. foetus* diminui com o aumento da idade dos gatos, afirmando ser estatisticamente significativo uma maior prevalência em felinos com menos de 12 meses. Este dado é apoiado por outros autores, Gunn-Moore *et al*. (2007) que afirmam com um p=0,0026 ser mais frequente em gatos com idade igual ou inferior a 1 ano, o mesmo é reforçado Arranz-Solís *et al*. (2016) com p=0,014 e OR de 3,56, sendo estes dados considerados estatisticamente significativos. Foi possível ainda noutros estudos apontar esta correlação positiva com a idade, 81% dos animais tem idade inferior a 12 meses, 62% dos gatos com menos de 12 meses, 70% dos gatos com idade inferior a 1 ano (p=0,034) e 85% dos animais com menos de 1 ano de idade referido respetivamente por Burgener, Frey, Hook & Gottstein (2009), Bell *et al*. (2010), Kuehner *et al*. (2011) e Profizi *et al*. (2013).

Por outro lado, num estudo realizado numa colónia resgatada em Itália é referido percentagens superiores de gatos infetados com mais de um ano de idade, sendo referido que 67% dos animais positivos (16/24) tinham uma idade superior a 1 ano (Holliday, Deni & Gunn-Moore, 2009).

Outros autores não conseguiram demonstrar a existência de uma relação estatisticamente significativa entre a idade dos gatos e a infeção por *T. foetus* (Tysnes *et al*., 2011; Hosein *et al*., 2013; Doi *et al*., 2012).

5.3. Raça

Sugere-se que a raça possa ser um fator de predisposição à tritrichomonose felina. Este dado é apoiado em vários estudos (Steiner *et al*., 2007; Hosein *et al*., 2013). Bell *et al*. (2010) descrevem que 92% dos gatos positivos no seu estudo eram de raça. Em um estudo realizado na Suíça todos os 27 gatos positivos para a infeção por *T. foetus* eram gatos de raça ou fruto de cruzamentos entre raças puras (Burgener *et al*., 2009). Paris *et al*. (2014) assumem ser estatisticamente significativo (p<0,001) a relação entre ser gatos de raça e a prevalência deste parasita.

Gunn-Moore *et al*. (2007) propõem que a existência de genes relacionados com a raça estejam correlacionados com a suscetibilidade ao *T. foetus* (presença em animais de raça p=0,018), mas é de realçar que mais de 70% da amostragem provém de animais de raça. Um estudo realizado apenas em animais de raça na Alemanha, demonstrou que existe uma associação estatisticamente significativa (p<0,001) com os gatos de raça Bosques da Noruega, o que não acontece com mais nenhuma raça (Kuehner *et al*., 2011).

Por outro lado, alguns autores afirmam não existir relação entre ser um gato de raça e a prevalência elevada de tritrichomonose felina (Stockdale *et al*., 2009; Doi *et al*., 2012; Arranz-Solís *et al*., 2016). Holliday et al. (2009) utilizaram apenas gatos domésticos SRD e obtiveram uma prevalência de 32% na amostra estudada.

5.4. Sexo

Vários estudos apontam para que não exista associação entre o sexo do gato e esta parasitose (Gunn-Moore *et al*., 2007; Stockdale *et al*., 2009; Kuehner *et al*., 2011; Tysnes *et al*., 2011; Hosein *et al*., 2013; Arranz-Solís *et al*., 2016).

Em apenas dois estudos é referida uma divisão mais específica entre o sexo, contudo não é referida a existência de uma relação estaticamente significativa. No estudo realizado na Suíça os animais positivos (27/105) dividiam-se em 41% fêmeas, 33% machos, em que 15% das fêmeas eram esterilizadas e 11% dos machos eram castrados (Burgener, Frey, Hook & Gottstein, 2009), contudo no estudo australiano 70% eram fêmeas e 30% machos no total de 38 animais positivos (Bell *et al.*, 2010).

Uma perspetiva diferente aos outros estudos, Gray *et al*. (2010) afirmam haver uma diferença significativa na prevalência em gatas jovens e gatos jovens (p=0,009), sendo mais prevalente nos gatos machos jovens.

5.5. Ambiente

Não se sabe ao certo se o ambiente em que os gatos vivem predispõe à existência do protozoário *T. foetus,* uma vez que existem estudos que apoiam este facto e outros que o contrariam.

Gookin *et al*. (2004) sugerem uma relação entre o elevado número de animais presentes em casa e a presença *T. foetus*. Burgener *et al*. (2009) afirmaram que 93% dos animais positivos viviam em ambientes com mais do que um gato, e que 78% dos animais positivos viviam apenas no interior, 18% tinham acesso ao exterior e 4% viviam exclusivamente no exterior. Mas, Doi *et al*. (2012) afirmam não existir relação entre viver apenas no interior ou exterior ou em ambos.

O estudo realizado por Xenoulis *et al*. (2013) sugere a possibilidade de os ambientes com elevada população de gatos serem um fator para a infeção por este parasita, sendo que na amostra estudada 59% dos animais estavam infetados desde a adoção (seja em animais provenientes de gatis, abrigos ou lojas de animais). Hosein *et al*. (2013) expõem que é estatisticamente significativo e, por esta razão, um fator de suscetibilidade a esta doença a coabitação com outros felinos com história de diarreia no espaço de seis meses e a presença de mais de cinco gatos no mesmo espaço físico. Paris *et al*., 2014 também concluíram que o aumento da densidade populacional numa casa é um fator de risco para a infeção com este parasita.

Kuehner *et al*. (2011) referem a prevalência de 15,7%, no entanto não foi possível relacionar a infeção por *T. foetus* e a densidade populacional bem como com a área em metros quadrados por gato. Tysnes *et al*. (2011) assumem, também que não há relação entre a prevalência desta parasitose e o número de gatos por habitação.

Alguns estudos referem prevalências diferentes para a infeção dos gatis por *T. foetus*. Gray, Hunter, Stone e Gookin (2010) indicam que 67% dos gatis por eles estudados estavam infetados com este parasita, Kuehner *et al*. (2011) afirmam ser 18,5% dos gatis e Profizi *et al*. (2013) serem 15,9% dos gatis. Assume-se existir uma forte relação entre a presença de diarreias nos gatis e a prevalência de *T. foetus* nos mesmos (Gookin *et al*., 2004).

5.6. Outros

Sugere-se pelos resultados obtidos por Gookin *et al*., 2004, Kuehner *et al*. (2011), Tysnes *et al*. (2011), Profizi *et al*. (2013) e Hosein *et al*. (2013) que os seguintes factores não estão relacionados com a infeção por *T. foetus*: dieta, fonte de água, proximidade com o campo, relação entre o número de gatos que utilizam a caixa de areia, presença de cães, peso dos felinos e com o número de viagens realizadas pelos gatos.

Tolbert e Gookin (2009) afirmam que a partilha da caixa de areia e a limpeza cruzada entre gatos poderá facilitar a transmissão de trofozoítos e desta forma favorecer a infeção dos gatos pelo parasita.

6. Co-infeções

A existência de *T. foetus* e outros parasitas no mesmo animal é bastante frequente (Chaoqun & Liza, 2015). A sua presença com outros protozoários é o mais frequente, mas estão relatadas outras ocorrências. Vários são os estudos em que relatam a co-infeção entre *T. foetus* e *Giardia* sp., todavia as percentagens referidas são variáveis, sendo 52%, 54%, 67% e 31% referidas respetivamente por Burgener *et al*. (2009), Bell *et al*. (2010) e Polak, Levy, Crawford, Leurenegger e Moriello (2014) e Köster *et al*. (2015). Steiner *et al*. (2007) também relatam esta co-infeção, bem como Kingsbury *et al*. (2010), que, afirmam não ser possível avaliar se esta co-infeção é um fator de risco para a tritrichomonose felina devido ao baixo número de amostras no seu estudo. Relativamente a esta co-infeção entre o *T. foetus* e *Giardia* sp. Gookin *et al*., (2004) assumem que não existe uma relação estatiscamente significativa (p=0,075) entre os dois, mas a prevalência da co-infeção é de 12%, sendo verificada em 16% dos gatis analisados.

Num estudo em larga escala incluindo 1882 gatos com diarreia concluíu-se que 62,5% apresentavam uma co-infeção e a prevalêcia de tritrichomonose felina no total da amostra foi de 18,8%. Percebeu-se que existe co-infeção frequente com *T. foetus* e o coronavírus felino e *Clostridium perfrigens*, por vezes associado ainda com *Giardia* sp.. A combinação entre *Giardia* sp. e/ou *Crypstosporidium* spp. e *T. foetus* é também comum, suspeitando-se que a presença destas coccídeas favoreçam a infeção por *T. foetus* (Paris *et al*., 2014).

Gookin *et al*. (2001) realizaram uma infeção experimental em gatos com trofozoítos de *T. foetus* e concluiram que a co-infeção com oocistos de *Crystosporidium* spp. levava a que a diarreia presente nestes animais fosse mais grave e se desencadeasse mais precocemente do que nos gatos apenas infetados com *T. foetus*. Os gatos com a infeção mista continuaram a excretar trofozoítos após a resolução da diarreia (p<0,001) (Gookin *et al*., 2001). Contrariamente Kuehner *et al*. (2011) afirmam que a co-infeção entre *T. foetus* e outros parasitas não acarreta o agravamento dos sinais clínicos da tritrichomonose felina, sendo a prevalência de co-infeção de 36,1%. Neste estudo a prevalência de co-infeção de *Giardia* sp. dos animais positivos para *T. foetus* é de 27,7% e com *Cystoisospora* spp. de 16,7% (3 animais apresentavam infeção pelos três parasitas). Apenas foi diagnosticado um caso de co-infeção com *Cryptosporidium* spp. (Kuehner *et al.*, 2011).

Num estudo realizado no Brasil em gatos presentes à consulta, 5,2% de gatos eram positivos para protozoários flagelados da classe Parabasalia. O diagnóstico foi feito com recurso ao meio de cultura Diamond e baseando-se na morfologia dos trofozoítos (dos Santos, de Jesus, McIntosh, Berto & Lopes, 2015). Aquando de uma avaliação com recurso a técnicas moleculares (PCR) percebeu-se que havia uma co-infeção nos felinos de *T. foetus* com *Pentatrichomonas hominis*. É de realçar que existem diferenças morfológicas entre estas duas espécies, *T. foetus* apresenta 3 flagelos anteriores enquanto *P. hominis* apresenta 5 (dos Santos, *et al*., 2015). *P. hominis* é considerado protozoário comensal do trato digestivo dos gatos (Mostegl *et al*., 2012).

Bell *et al*. (2010) relatam no seu estudo co-infeção tripla entre *T. foetus*, *Toxocara* spp. e *Eucoleus* spp. em dois gatos que viviam no mesmo gatil e Stockdale et al. (2009) referem a co-infeção de *T. foetus* com os seguintes agentes: *Cryptosporidium* spp., *Cystoisospora* spp., *Giardia* sp., dermatófitos e coronavírus. Também está relatada a co-infeção de *T. foetus* com *Toxascaris leonina* (Gookin *et al*., 1999).

Mancianti *et al*. (2015) relatam que na sua população de estudo (146 animais) havia 2% de prevalência de *T. foetus*, não havendo casos de co-infeção.

7. Patogenia

Pouco se conhece sobre a patogenia de *T. foetus* e existem, ainda, muitas dúvidas de como este microrganismo causa diarreia nos felinos (Gruffydd-Jones *et al*., 2013). Especula-se que os fatores ambientais, o hospedeiro e a multiplicação dos trofozoítos estejam envolvidos na patogenia da tritrichomonose felina (Gookin, Breitschwert, Levy, Gager & Benrud, 1999; Manning, 2010), mais especificamente a interação entre o microbiótopo intestinal do hospedeiro, a adesão dos trofozoítos ao epitélio intestinal e a produção de citotoxinas e enzimas pelo agente infetante (Yaeger & Gookin, 2005; Gookin & Levy,2015). Sabe-se que a presença unicamente de trofozoítos de *T. foetus* não é o suficiente para desencadear diarreia nos gatos infetados, uma vez que gatos portadores deste parasita podem não ter sinais clínicos (Gookin *et al*., 2001). Miró *et al*. (2011) referem a possibilidade da diarreia ser desencadeada por fatores de *stress*, visto que no seu estudo, em que descrevem o primeiro caso de tritrichomonose felina em Espanha e identificam um gatil com a presença de *T. foetus*, afirmaram que o gato apenas desenvolveu diarreia após se mudar para o novo ambiente.

Numa tentativa de compreender a patogenia da tritrichomonose felina vários são os trabalhos que se têm desenvolvido, baseando-se em estudos histológicos, de infeção experimental, *in vitro* e de comparação entre outras espécies do género *Tritrichomonas*. Após a infeção experimental de 8 gatos com trofozoítos administrados por intubação orogástrica, foi possível perceber que a colonização de *T. foetus* ocorre na mucosa intestinal do íleo, ceco e cólon (Gookin *et al*., 2001). Contudo, a colonização que se verifica nos animais com infeções naturais restringe-se apenas ao ceco e cólon (Gookin & Levy, 2015).

Tendo em conta as características comuns entre diversas espécies pertencentes ao género *Tritrichomonas* e alguns estudos não publicados, Tolbert e Gookin (2016) afirmam que o ambiente intestinal do hospedeiro (microbiótopo, pH, potencial de oxidação-redução e minerais) tem influência na suscetibilidade e na resposta à tritrichomonose felina. No estudo experimental supracitado de infeção experimental não foi identificado, durante o tempo de estudo (203 dias), uma inflamação significativa da mucosa intestinal (Gookin *et al*., 2001). Contudo, Kessel (1928), afirma que em cortes histológicos de intestino de gatos com infeção natural foi possível verificar a presença de um reação inflamatória catarral, havendo em alguns dos cortes evidência de necrose do epitélio

e ulceração superficial e Gookin *et al*. (1999) afirmam que em gatos com tritrichomonose felina, através de biópsia intestinal, apresentam colite, tiflite e enterite linfoplasmócitica. Tanto os gatos experimentalmente infetados, como os naturalmente infetados, apresentavam diarreia, podendo-se concluir que a origem da diarreia estava relacionada entre a adesão do parasita ao epitélio intestinal e não à inflamação desenvolvida (Tolbert *et al*., 2013).

Yaeger e Gookin (2005) afirmam que no resultado de uma infeção natural por *T. foetus* no gato desencadeia-se uma colite linfoplasmocítica e neutrofílica que pode ser ligeira a moderada, para além de hipertrofia, hiperplasia e um aumento da atividade mitótica das células epiteliais das criptas intestinais, perda das células caliciformes, formação de microabcessos nas criptas e diminuição da mucosa intestinal das áreas afetadas. Nos cortes histológicos de intestino de gatos infetados podem ser visíveis trofozoítos de *T. foetus*, havendo uma prevalência de 56%, sendo estes observados em 83% dos casos na superficíe do epitélio intestinal e em detritos presentes na supreficíe da mucosa e somente em 43% em camadas mais profundas (Yaeger & Gookin, 2005). Mostegl *et al*. (2012) afirmam também ser possível a observação dos trofozoítos no lúmen tal como invadindo o epitélio intestinal.

A interação entre os trofozoítos e a camada de muco presente através de enzimas (mucinases) e a posterior adesão ao epitélio intestinal representa uma etapa fundamental na colonização e na patogencidade de *T. foetus* (Tolbert & Gookin, 2016). Singh, Walia e Kanwar (2016) referem que as lectinas produzidas pelo parasita têm um papel importante na sua interação com as células intestinais. Sabe-se que o ferro é um elemento fundamental na interação parasita-hospedeiro, tanto *in vitro* como *in vivo* (Castro *et al*., 2016). Um estudo *in vitro* com células epiteliais de jejuno de porco demonstrou que este parasita adere em monocamadas e que é necessária a presença de células viáveis para que possa aderir ao epitélio, havendo um processo ativo de adesão não dependente do citoesquelo de *T. foetus* (Tolber *et al*., 2013). Tendo em conta a patogenia de *Trichomonas vaginalis* assume-se que durante esta adesão ao epitélio intestinal exista uma transformação da forma dos trofozoítos de *T. foetus* para uma forma amebóide de modo a aumentar a área de contacto com os enterócitos (Tolbert & Gookin, 2016).

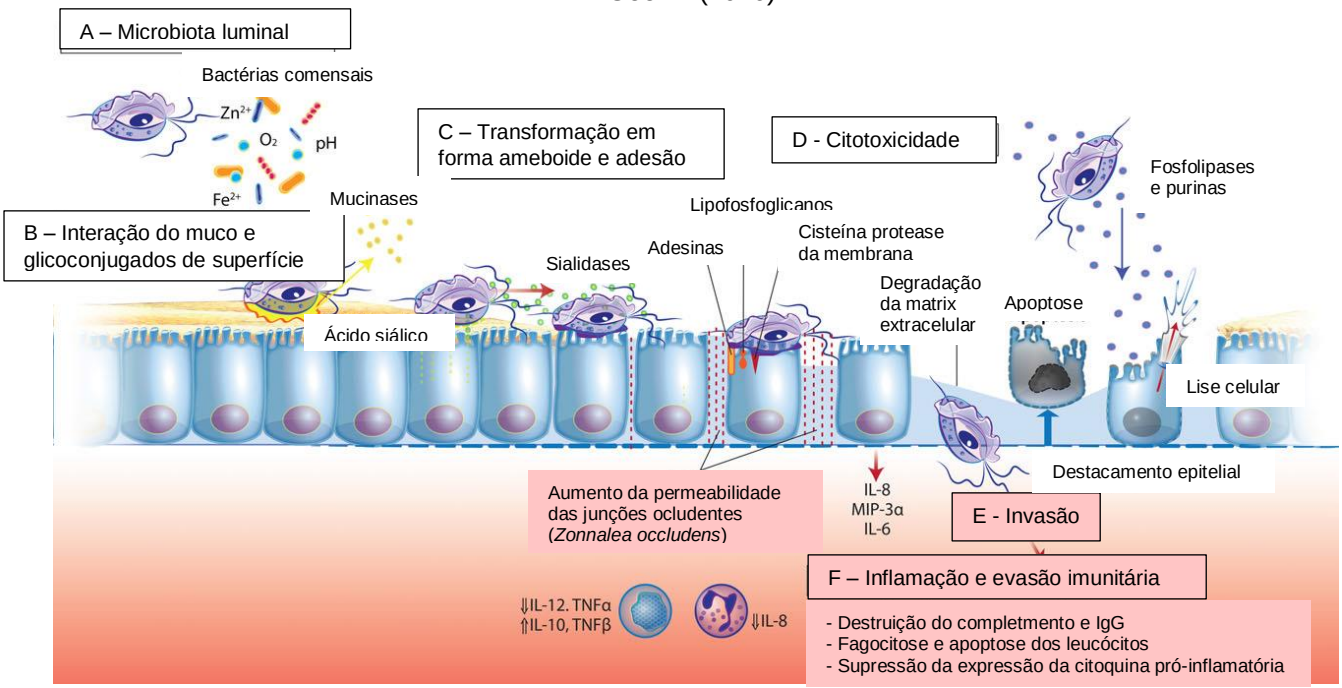
Em cortes histológicos de intestino de gatos infetados experimentalmente e com a utilização de técnicas de imunohistoquímica foi possível apurar a existência de antigénios de *T. foetus* na superfície dos enterócitos (Gookin *et al*., 2001). Tolbert *et al.* (2013) dizem existir uma interação entre este protozoário e a mucosa intestinal através de recetores-ligandos específicos. Para que esta adesão ocorra são necessárias algumas moléculas como lectinas ligadas ao ácido siálico, adesinas, lipofosfoglicanos e proteases celulares (Tolbert & Gookin, 2016). Em outro estudo *in vitro,* com recurso também a células epiteliais de jejuno de porco, percebeu-se que *T. foetus* tem a capacidade, aquando de um contacto directo, de desencandear efeitos citotóxicos sobre essas células, ativando mecanismos de apoptose (Tolbert, Stauffer, Brand & Gookin, 2014). Uma das

causas da patogenicidade deste agente é a produção de proteases (ESCCAP, 2011), sendo característica do género *Tritrichomonas*. As proteases (enzimas envolvidas no catabolismo das proteínas) têm uma função específica na interação hospedeiro-parasita (Morin-Adeline *et al*., 2014). *T. foetus* felino tem a capacidade de produzir a cisteína protease, causadora da citotoxicidade das células do epitélio intestinal quando se encontram em estreito contacto (Tolbert *et al*., 2014).

Tolbert e Gookin (2016) afirmam que para além da capacidade de induzir a apoptose dos enterócitos, a cisteína protease tem a capacidade de degradar o muco, imunoglobulinas e a matrix extracelular. Assumem a possibilidade de *T. foetus* à semelhança de *T. vaginalis* produzir fosfolipases e purinas, ambas com capacidades citolíticas (Tolbert & Gookin, 2016). A produção destas toxinas por *T. foetus* conduz também ao desenrolar da resposta inflamatória da mucosa intestinal afetada (Gruffydd-Jones *et al*., 2013).

A tritrichomonose felina é uma doença de longo curso devido à capacidade que o seu agente etiológico tem de se evadir ao sistema imunitário, utilizando para isso estratégias como a indução de apoptose, a degradação de componentes do sistema imunitário, a modulação da produção de citoquinas pelo hospedeiro e a variação de fenótipos apresentados (Tolbert & Gookin, 2016). A diarreia originada pela adesão do parasita ao epitélio intestinal (Tolbert *et al*.,2013), agravada pela inflamação desencadeada no intestino é, potencialmente, favorecida pela alteração da barreira epitelial do intestino e do transporte de iões e por alterações provocadas na motilidade intestinal (Tolbert & Gookin, 2016). É de realçar o facto de a sintomatologia apresentada pelos gatos não aparentar estar relacionada com o número de trofozoítos que os estão a parasitar (Manning, 2010). Os mecanismos patogénicos de *T. foetus* encontram-se esquematizados na figura 3.

Figura 3 – Principais aspetos da ação patogénica do parasita *Tritrichomonas foetus*, adaptado de Tolbert e Gookin (2016).



8. Sinais Clínicos

Os sinais clínicos apresentados pelos gatos infetados com *T. foetus* podem ir desde uma infeção subclínica (animais sem sinais clínicos) até uma diarreia crónica incurável (Manning, 2010). Normalmente, a infeção de gatos jovens tem como consequência a presença de sinais, no entanto quando esta infeção ocorre em gatos mais velhos estes podem não os apresentar (Gookin, 2012; Gookin & Levy, 2015). É importante realçar que todos os gatos podem apresentar diarreia, embora esta tenha uma maior prevalência em animais com menos de 12 meses (International Cat Care, 2014).

Num estudo realizado na Alemanha concluiu-se que 64% (p<0,001) dos gatos positivos para *T. foetus* apresentavam diarreia na altura da colheita e que 61% (p=0,027) dos gatos positivos apresentavam história de diarreia nos últimos 6 meses (Kuehner *et al*., 2011). Por outro lado, num estudo conduzido no território francês por Profizi *et al*. (2013) apenas 15% dos gatos infetados com *T. foetus* apresentavam diarreia. Hosein *et al*. (2013) afirmam que a presença de diarreia ou história de diarreia nos últimos 6 meses não apresenta uma relação estatiscamente significativa e Gray *et al*. (2010) assumem, no estudo realizado nos EUA, não existir uma diferença significativa na prevalência de *T. foetus* nos felinos e a presença de diarreia.

A tritrichomonose felina é caracterizada por uma diarreia crónica ou intermitente com origem no intestino grosso (Gookin & Levy, 2015; Chaoqun & Liza, 2015). É importante diferenciar se a origem da diarreia apresentada pelo animal, para tal devesse ter em consideração as características descritas na tabela 3.

Tabela 4 - Distinção entre diarreia com origem no intestino delgado e no grosso. Adaptado de Marks (2013a).

Sinal	Intestino Delgado	Intestino Grosso
Frequência da defecação	Normal a ligeiramente aumentado	Marcadamente aumentado
Volume fecal	Normal a aumentado	Diminuído
Presença de muco	Normalmente ausente	Frequentemente presente
Presença de sangue	Melena	Hematoquézia
Tenesmo	Ausente	Frequentemente presente
Urgência na defecação	Ausente	Frequentemente presente
Vómito	Por vezes presente	Por vezes presente
Esteatorreia	Por vezes persente	Ausente
Disquézia	Ausente	Por vezes presente
Perda de peso	Comum	Incomum

A diarreia típica desta parasitose é descrita por apresentar uma cor amarela-esverdeada, fétida, pastosa a semi-formada, descrita normalmente como parecendo “fezes de vaca” e contendo frequentemente sangue e/ou muco (Gookin *et al*., 1999; Levy *et al*., 2003; Gookin & Levy, 2015; Chaoqun & Liza, 2015). Contrariamente aos outros autores, Willard (2010) afirma ser rara a presença de sangue e muco nas fezes destes animais.

Os animais afetados por esta doença têm, por vezes, episódios de flatulência e tenesmo (Gookin *et al*., 1999), sendo característico um aumento do número das defecações (Manning, 2010).

Quando os gatos têm uma diarreia grave, pode ocorrer incontinência fecal e, até prolapso rectal (Manning, 2010; Gookin, 2012; Gookin & Levy, 2015). Nos gatos mais jovens, o ânus pode surgir com edema, eritema e dor, havendo uma inflamação do ânus e da zona perianal (Gookin *et al*., 1999; Gookin, 2012; Gookin & Levy, 2015).

Os gatos com tritrichomonose felina quando se apresentam à consulta normalmente mantêm o apetite e uma boa condição corporal, mas em ambientes de poucos cuidados podem apresentar debilidade (Little, 2011b; Gookin, 2012; Gookin & Levy, 2015). Contrariamente ao expectável, num estudo australiano, quase metade dos gatos positivos apresentavam uma baixa condição corporal (Bell *et al*., 2010).

Num estudo retrospetivo realizado por Xenoulis *et al*. (2013) foi reportado a prevalência de outros sinais clínicos que podem ocorrer em gatos com tritrichomonose: depressão em 24%, diminuição do apetite ou anorexia em 22%, perda de peso em 20%, dor abdominal em 9% e aumento do apetite em 3%, Chaoqun e Liza (2015) referem poder existir um estado de piréxia dos animais afetados.

Após infeção experimental de gatos com trofozoítos de *T. foetus* percebeu-se que a diarreia ocorre no mínimo durante 7 semanas (Gookin *et al*., 2001). Por outro lado, Gookin *et al*. (1999) afirmam que a diarrreia pode ter uma duração no tempo muito variável, entre 2 dias e 3 anos (mediana de 5 meses). Em outro estudo, 88% dos casos, os sinais clínicos resolvem-se espontaneamente em 2 anos após infeção por *T. foetus* (mediana de 9 meses) (Foster, Gookin, Poore, Stebbins & Levy, 2004).

9. Diagnóstico

O diagnóstico da tritrichomonose felina baseia-se fundamentalmente num diagnóstico laboratorial, mas como em todas as outras doenças o diagnóstico advém de uma suspeita clínica que se fundamenta na apresentação clínica, na história pregressa e na epidemiologia.

9.1. Diagnóstico clínico

A obtenção de um diagnóstico definitivo de tritrichomonose felina está inerente a utilização de métodos laboratoriais que demonstrem a presença do parasita no gato, todavia a apresentação e história clínica é fundamental para que o médico veterinário consiga encaminhar o caso.

O sinal clínico típico desta doença é a diarreia crónica ou intermitente com origem no intestino grosso e os animais mais frequentemente afetados são gatos jovens que vivam em ambientes com a presença de mais do que um felino (Gookin & Levy, 2015; Chaoqun & Liza, 2015). Sabe-se que o aparecimento de felinos jovens à consulta com história de diarreia é bastante frequente (Little, 2011a), por essa mesma razão é necessário uma boa investigação do caso clínico e história pregressa com recurso a métodos complementares de diagnóstico de forma a enumerar os diagnósticos diferenciais mais prováveis (Little, 2011a,b; Little, 2013).

Os principais diagnósticos diferenciais para gatos jovens com diarreia são as diferentes parasitoses (toxacarose, toxascariose, coccícidiose – giardiose, cripstosporidiose e cistoisosporose, tritrichomonose), as viroses (panleucopénia felina, leucemia felina e imunodeficiência felina), as bacterioses (salmonelose, campilobacteriose e clostridiose), a dieta e a ingestão de corpos estranhos (Gough, 2007; Little,2013).

Os exames complementares laboratorias que permitem um diagnóstico definitivo de tritrichomonose felina são exame direto das fezes, utilização de meios de cultura específicos, PCR e biópsias intestinais (Gunn-Moore, *et al*., 2007; Gookin & Levy, 2015).

Na tritrichomonose felina não são encontradas alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos (Manning, 2010), mas quando a diarreia é grave podem surgir alterações como hipocaliémia, hiponatrémia e hipoclorémia, não por consequência direta do parasita, mas sim pelas perdas que decorrem da diarreia (Lappin, 2014). Através da ultrassonografia é possível a verificação de sinais compatíveis com diarreia de origem no intestino grosso e, por vezes, a presença de linfoadenomegália regional (Helps & Tasker, 2010), estas alterações são pouco frequentes e não específicas, verificando-se o mesmo com a utilização da radiografia abdominal (Lappin, 2014).

9.2. Diagnóstico laboratorial

Vários são os tipos de amostras que podem chegar ao laboratório para serem processadas pelas diversas técnicas existentes para a identificação de *T. foetus*. É importante realçar que nenhum dos testes apresenta 100% de sensibilidade, isto é, a presença de um resultado negativo não garante que o animal não possa estar infetado por este parasita (falso negativo) (Levy & Gookin, 2013).

9.2.1. Técnicas de colheita

Existem várias técnicas que podem ser utilizadas para a colheita das amostras fecais. A mais simples, mas a menos desejável, é a recolha da amostra fecal após defecação na caixa de areia (Gookin & Dybas, 2009). Deverá tentar-se proceder à recolha o mais rapidamente possível e de forma higiénica, tentando evitar contaminações por parte dos outros animais (Gookin & Dybas, 2009; Tolbert & Gookin, 2009; Gookin, 2012; Gookin & Levy, 2015). Pode recorrer-se, também, à utilização de uma zaragatoa rectal, contudo é um método que permite uma amostra de pouca qualidade e na maioria das vezes apenas é recolhido muco (Gookin & Dybas, 2009). Outra técnica

disponível é a recolha com uma zaragatoa com extremidade em laço ou *fecal loop* (instrumento de colheita de fezes intrarrectal) cuja extremidade é perfurada ficando retida a amostra, sendo esta técnica de colheita classificada como razoável (Gookin & Dybas, 2009; Tolbert & Gookin, 2009; Gookin, 2012, Gookin & Levy, 2015).

O melhor método de recolha de amostras para a pesquisa de *T. foetus* e o diagnóstico de tritrichomonose felina designa-se por lavagem de colón, o qual consiste na utilização de um catéter maleável que se introduz pelo ânus até ao cólon do animal instilando-se uma pequena quantidade (10mL) de solução salina estéril, que é depois aspirada com recurso a uma seringa. Obtêm-se a amostra, que é designada por lavado de cólon (Gookin & Dybas, 2009; Tolbert & Gookin, 2009; Gookin, 2012, Gookin & Levy, 2015).

As amostras fecais devem ser recolhidas de animais que não estejam sujeitos a antibioterapia há pelo menos 7 dias e devem ser processadas com brevidade, sem ultrapassar as 6 horas, visto diminuir a sensibilidade das técnicas de identificação (Gookin & Dybas, 2009; Tolbert & Gookin, 2009; Hale *et al*., 2009; Gookin & Levy, 2015). As amostras não devem ser refrigeradas (Gookin & Dybas, 2009; Tolbert & Gookin, 2009; Gookin & Levy, 2015). Hale *et al*. (2009) demonstraram que a refrigeração das amostras para pesquisa de *T. foetus* conduz a uma diminuição da capacidade de diagnosticar o animal como positivo e que deixa de ser possível a visualização de trofozoítos móveis, possivelmente pela formação da forma endoflagelar ou de pseudoquisto (Pereira-Neves *et al.*, 2011).

9.2.2. Técnicas de identificação

9.2.2.1. Exame direto

O exame direto consiste na observação de uma pequena quantidade de amostra fecal diluída em solução salina, com exceção do lavado de colón em que basta colocar uma gota do produto obtido sobre uma lâmina de microscópio (Gookin, 2012; Gookin & Levy, 2015). A preparação realizada deve ser avaliada com recurso a um microscópio óptico utilizando ampliações de 200 e 400x (Gookin, 2012; Gookin & Levy, 2015). Idealmente o exame direto deverá ser realizado com amostras colhidas há menos de 2 horas (Helps & Tasker, 2010).

Neste método é importante fazer a distinção com *Giardia* sp.. A forma dos dois parasitas é bastante semelhante sendo distinguidos pela sua motilidade (para melhor percepção dessa característica verificar o vídeo realizado por Gookin e Levy, 2012 disponível em https://www.youtube.com/watch?v=aF06jlbcF8E) e pela presença da membrana ondulante apenas em *T. foetus* (Tolbert & Gookin, 2009; Gookin, 2012; Gookin & Levy, 2015). Deve, também, fazer-se a distinção de *T. foetus* com *P. hominis*, mas é uma tarefa difícil de realizar ao microscópio óptico, sem fixação e coloração, sendo a sua distinção feita de forma presuntiva (Gookin, 2009; Gookin, 2012; Gookin & Levy, 2015). De relembrar que *P. hominis* é considerado um protozoário flagelado não patogénico presente no microbiótopo intestinal felino (Mostegl *et al*., 2012).

O exame direto apresenta uma baixa sensibilidade (Gookin, 2012; Gookin & Levy, 2015). Num estudo realizado por Gookin *et al*. (2004) em 36 animais positivos para *T. foetus* apenas 5 foram identificados através do exame direto (Tabela 4), verificando-se uma sensibilidade de 14,7% (Chaoqun & Liza, 2015). A sensibilidade desta técnica pode ser aumentada através da realização de diversas preparações e sua avaliação ao microscópio (Little, 2011b). A existência de resultados falsos negativos é comum devido ao baixo número de trofozoítos presentes na amostra ou devido à sua excreção intermitente (Lappin, 2014).

Tabela 5 – Sensibilidade das diferentes técnicas de identificação do parasita *Tritrichomonas foetus*, adaptado de [1]Gookin, *et al*. (2004) e [2]Chaoqun e Liza (2015).

Técnica de identificação	**Animais positivos (N=36)[1]**	**Sensibilidade[2]**
Exame direto	5/36	14,7%
Meio de Diamond modificado	9/36	26,4%
InPouch™ TF - Feline	20/36	58,8%
PCR	34/36	--

9.2.2.2. Meio de cultura

Existem dois tipos de meio de cultura que podem ser utilizados: o meio de Diamond modificado ou o meio de cultura vendido comercialmente pela Biomed Diagnostics designado por InPouch™ TF – Feline (Tolbert & Gookin, 2009; Chaoqun & Liza, 2015). Ambos apresentam uma sensibilidade superior à observação direta (Tolbert & Gookin, 2009; Chaoqun & Liza, 2015).

O meio de Diamond modificado consiste num meio enriquecido com extrato de levedura e suplementado com soro inativado de cavalo e agentes antibacterianos (anfotericina A, penicilina G e gentamicina) (Gookin, 2012; Hardy Diagnostics, n. d.). É necessário prepará-lo de forma estéril e mantê-lo dessa forma até à inoculação da amostra a analisar (Gookin, 2012). A incubação deste meio deve proceder-se a 37ºC (Gookin, 2012). A sensibilidade deste meio de cultura é de 26,4% (Tabela 4). De realçar que neste meio podem desenvolver-se outros parasitas levando a um diagnóstico incorreto (Gookin, Stauffer, & Levy, 2007b).

O meio de cultura InPouch™ TF – Feline é considerado o teste *Gold Standard* para a pesquisa de *T. foetus* (BIOMED, 2012b; Ceplecha *et al*., 2013; Lappin, 2014). InPouch™ TF – Feline é um meio seletivo contendo inibidores de crescimento de leveduras, bolor e bactérias que permite o transporte e o crescimento de *T. foetus*, contendo tripticase, protease, peptona, extrato de levedura, maltose, aminoácidos, sais, antifúngicos e antibacterianos numa solução salina com um tampão fosfato (BIOMED diagnostics, 2013). No meio de cultura InPouch™ TF – Feline deverá ser inoculada uma pequena quantidade de amostra fecal previamente colhida, no máximo há 6 horas (Gookin, Foster, Poore, Stebbins & Levy, 2003; Tolbert & Gookin, 2009; Little, 2011b; Gookin, 2012; Gookin & Levy,

2015). Deve ser incubado numa posição vertical e em estufa a 37ºC ou à temperatura ambiente (25ºC) (Tolbert & Gookin, 2009; Gookin & Levy, 2015). A vantagem de ser incubado na estufa traduz-se numa maior rapidez de desenvolvimento do parasita, sendo esperado o seu crescimento dentro de 72 horas (Gookin *et al*., 2003; Gookin & Levy, 2015). Apenas se pode descartar a possibilidade de ser positivo ao fim de 12 dias de incubação (Gookin *et al*., 2003; Helps & Tasker, 2010; BIOMED diagnostics, 2013).

Este meio de cultura deverá ser avaliado com o microscópio óptico com recurso a ampliações de 200 e 400x (Gookin & Levy, 2015). Gookin *et al*. (2003) afirmaram no seu estudo que *Giardia lamblia* e *P. hominis* não têm capacidade de sobreviver mais de 24 horas neste meio de cultura tanto à temperatura ambiente como a 37ºC. Num estudo com o objetivo de avaliar a prevalência de *P. hominis* não foi possível detetar, através de PCR, o ADN deste parasita nos meios de cultura InPouch^{TM} TF – Feline (Gookin *et al*., 2007b). Apenas foi possível o seu diagnóstico através de PCR com amostra de fezes (Gookin *et al*., 2007b). Ceplecha *et al*. (2013) contradizem os estudos anteriores, afirmando que este meio não é selectivo para *T. foetus* podendo crescer *P. hominis* e para os deferenciar deverá recorrer-se a PCR. A BIOMED diagnostics (2013) assume que *Giardia* sp. não sobrevive mais de 24 horas no meio de cultura, mas que *P. hominis* tem a capacidade de crescer embora seja pouco frequente.

Segundo os fabricantes deste meio basta a existência de um a dez trofozoítos no inoculado para que se obtenha um resultado positivo (BIOMED, 2012b), contudo Sherding (2013) afirma ser necessário existirem na amostra pelo menos 1000 trofozoítos para que sejam detetados. Gookin *et al*. (2003) defendem que basta um trofozoíto para se desenvolver no meio de cultura InPouch^{TM} TF – Feline desde que não haja material fecal, todavia é necessário um número igual ou superior a 1000 trofozoítos por 0,05g de fezes para que seja possível o seu diagnóstico nesta técnica laboratorial.

A sensibilidade deste meio de cultura depende dos estudos considerados, sendo referido o valor de 55% (Gookin & Dybas, 2009), 58,8% (Chaoqun & Liza, 2015) (Tabela 4). Em condições experimentais foi definida uma sensibilidade de 83% (Hale *et al*., 2009). Kingsbury *et al*. (2010) demonstraram que existe uma diferença entre os resultados obtidos por este meio de cultura e por PCR, com o meio de cultura detectaram-se três animais positivos enquanto com a PCR foram diagnosticados 18 num total de 22 animais estudados.

9.2.2.3. PCR

Esta técnica de pesquisa de ADN de *T. foetus* tem uma maior sensibilidade que os meios de cultura (Gookin & Levy, 2015). Num estudo realizado por Gookin *et al*. (2004) foi possível diagnosticar como positivos 34 de 36 felinos infetados (Tabela 4). Esta técnica molecular apresenta uma elevada especificidade não sendo amplificado o ADN nem de *Giardia* sp. nem de *P. hominis* (Manning,

2010). Uma vantagem sobre o meio de cultura é a de os resultados poderem ser disponibilizados mais rapidamente (Manning, 2010).

Ao contrário das outras técnicas de pesquisa, nem todos os métodos de recolha de material são passíveis de serem usados na PCR, não devendo utilizar-se amostras obtidas através de zaragatoas rectais (Sherding, 2013). Pode utilizar-se material obtido através dos meios de cultura para a realização de PCR (Gookin, Birkenheuer, Breitschwerdt & Levy, 2002).

A combinação entre a utilização de meio de cultura e a utilização de PCR leva a um aumento dos animais identificados como infetados por *T. foetus*, sendo reportado por Gookin *et al*. (2002) a deteção de 75% dos animais positivos. A técnica de PCR recomendada é *single-tube nested* PCR, ocorrendo a amplificação da porção conservada do parasita *T. foetus* ITS1 e ITS2 e o gene 5.8S do rARN (Gookin *et al*., 2002). O limite de deteção desta técnica é de 10 trofozoítos por 200mg de fezes (Gookin *et al*., 2002), por outro lado Stauffer, Birkenheuer, Levy, Marr e Gookin (2008) dizem bastar haver um número igual ou superior a 10 trofozoítos por 100mg de fezes para que o resultado seja positivo.

É necessário ter precauções na extração do ADN, uma vez que existem agentes inibidores de PCR na dieta, no microbiótopo intestinal e decorrentes de doenças concomitantes, não sendo recomendada a utilização em gatos dos testes de PCR comercializados para tritrichomonose bovina (Stauffer *et al*., 2008; Gookin & Levy, 2015).

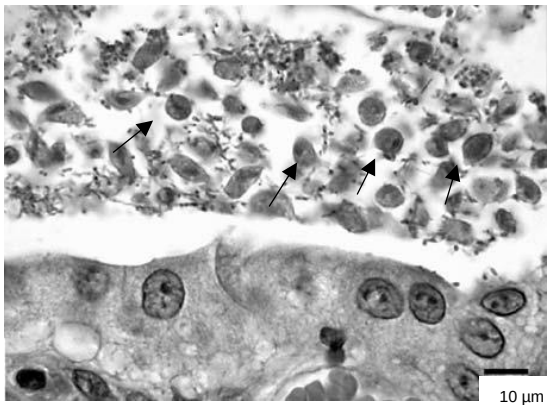
9.3. Diagnóstico histopatológico

Deve apenas recorrer-se a um diagnóstico histopatológico quando as técnicas mais simples não são suficientes para chegar a um diagnóstico definitivo (Gookin, 2009). As biópsias intestinais não são um método de diagnóstico muito fiável devido ao facto dos trofozoítos serem bastante sensíveis e se encontrarem no lúmen intestinal, sendo difíceis de preservar durante a realização das biópsias (Gookin & Levy, 2015). A maioria dos trofozoítos encontram-se na superficíe do epitélio intestinal (ou nos detritros adjacentes) e apenas um pequeno número atinge zonas mais profundas (Yaeger & Gookin, 2005; Mostegl *et al*., 2012). Para que seja provável a detecção de um animal infetado com *T. foetus* (com um intervalo de confiança (IC) ≥95%) requere-se a colheita de seis fragmentos de intestino através de técnicas de biópsia (colonoscopia ou laparotomia) ou de necrópsia (Yaeger & Gookin, 2005; Lappin, 2014; Chaoqun & Liza, 2015). Não existe ainda um estudo que permita relacionar as lesões histopatológicas encontradas e o número e localização dos trofozoítos existentes, contudo Mostegl *et al*. (2012) assumem ser possível a sua relação.

A tritrichomonose felina é caracterizada, a nível histopatológico, por uma colite linfoplasmocítica e neutrofílica que pode ir de ligeira a moderada, sendo visível também hipertrofia, hiperplasia e um aumento da atividade mitótica das células epiteliais das criptas intestinais, perda das células caliciformes, formação de microabcessos nas criptas e diminuição da mucosa intestinal nas áreas

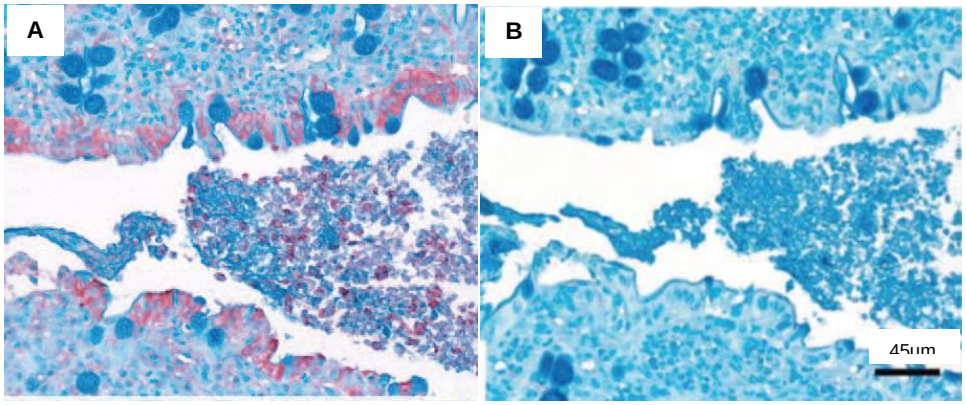
afetadas (Yaeger & Gookin, 2005). Os trofozoítos, em corte histológico, apresentam o citoplasma eosinofílico e um núcleo ovalado hipercrómico (diâmetro 1-1,5 µm), com uma forma alongada semelhante a uma lágrima ou uma meia-lua (7-8 µm de comprimento por 4-5 µm de largura), não sendo possível visualizar os flagelos (Yaeger & Gookin, 2005) (Figura 4).

Figura 4 – Microfotografia de corte histológico de cólon de um gato com tritrichomonose felina. São visíveis vários trofozoítos de *T. foetus* ( )no lúmen intestinal com a presença concomitante de bactérias. Imagem de microscopia eletrónica. Adaptado de Yaeger e Gookin (2005).



Podem ser utilizadas técnicas de imunohistoquímica (Gookin *et al*., 2001; Gray *et al*., 2010) (Figura 5) como a hibridização flurescente *in situ* (Gookin, Stone, Yaeger, Meyerholz & Moisan, 2010b) e hibridização cromogénica *in situ* (Mostegl *et al*., 2012) em lâminas de cortes histológicos de forma a evidenciar os trofozoítos de *T. foetus*. A partir de preparações fixadas de cortes histológicos pode ser extraído o ADN deste protozoário flagelado e submetidos a técnicas moleculares de PCR (Gookin *et al*., 2010b).

Figura 5 - Microfotografia de corte histológico de cólon de um gato com tritrichomonose felina. Hibridização com (**A**) e sem (**B**) de anticorpos monoclonias anti*T. foetus*. Imagem de microscopia eletrónica. Yaeger e Gookin (2005).



10. Tratamento

O tratamento da tritrichomonose felina apenas está indicado nos animais que apresentem sinais clínicos e nos quais tenha sido identificado o parasita (ABCD CatsVets, 2015). Contudo não existe informação sobre as consequências da infeção subclínica nestes animais, mas sabe-se que são potenciais transmissores do parasita a outros gatos (Gookin & Levy, 2015).

Encontram-se descritos na literatura diversos tratamentos contra a tritrichomonose felina que incluem o febendazol, a furazolidona, o metronidazol, a nitazoxanida, a paramomicina, o tinidazol e o ronidazol (Chaoqun & Liza, 2015; Foster *et al*., 2004). Conhece-se a suscetibilidade do parasita *T. foetus* aos 5-nitroimidazóis (metronidazol, ronidazol e tinidazol), decorrente da sua capacidade de metabolização anaeróbia, através da qual transformam estes fármacos em radicais iónicos autotóxicos polares que causam lesão no ADN (Plumb, 2015; Gookin & Levy, 2015).

O tratamento com alguns agentes antimicrobianos (albendazol, amoxicilina, clindamicina, enrofloxacina, eritromicina, febendazol, furazolidona, metronidazol, pamoato de pirantel, sulfadimetoxina e trimetropim-sulfadiazina) não levam à resolução da tritrichomonose felina, todavia durante a sua administração existe uma melhoria da consistência das fezes e não é possível o isolamento do parasita *T. foetus*. Sabe-se que *in vitro* o febendazol, furazolidona e metronidazol não têm capacidade de eliminar este parasita (Gookin *et al*., 1999).

Foi desenvolvido um estudo *in vitro* no qual foram testados cinco fármacos antimicrobianos no sentido de determinar a concentração mínima letal (CML)[1] ao fim de 24 horas relativamente a *T. foetus* (Kather, Marks & Kass, 2007). Concluíu-se que o omeprazol, inibidor da bomba de protões, mas que tem demostrado capacidade de inibir o *T. foetus* (Kather, Marks, & Kass, 2007; Plumb, 2015) e a paramomicina não têm capacidade letal (CML> 80µg/mL), o metronidazol e a furazolidona necessitam de uma concentração relativamente elevada (1,25>CML<2,5 µg/mL) e o ronidazol é o fármaco que apresenta capacidade letal (0,26>CML<1,25 µg/mL) com uma concentração inferior (Kather *et al*., 2007). A paramomicina está associada a casos de falência renal aguda (Gookin *et al*., 1999).

O metronidazol não tem capacidade para erradicar a infeção por *T. foetus*. Os animais infetados apresentam melhorias durante a sua administração, contudo não conduz à cura (Gookin *et al*., 2006; Gookin & Levy, 2015). Acredita-se que o parasita *T. foetus* apresente resistência ao tratamento com metronidazol devido às falhas terapêuticas que ocorrem comummente aquando da sua utilização (Gookin, Stauffer, Dybas & Cannon, 2010a).

A tentiva de controlo de diarreia provocada pela tritrichomonose felina com a alteração da dieta para dietas gastrointestinais, a utilização de suplementos dietéticos (iogurte, olmo, abóbora e glutamina), de probióticos, de tratamentos homeopáticos e corticoterapia não influencia no combate desta doença (Foster *et al*., 2004; Tolbert & Gookin, 2009; Gookin, 2009; Gookin & Levy, 2015; Tolbert &

[1] CML – Concentração do fármaco a partir do qual o microrganismo deixa de ter motilidade

Gookin, 2016). Todavia, é importante a terapêutica de suporte para além da antimicrobiana específica (Manning, 2010; Köster, Chow & Yao, 2015).

Em suma, os fármacos que parecem levar a sucessos terapêuticos no tratamento da tritrichomonose felina são o ronidazol e o tinidazol, que serão seguidamente abordados.

10.1. Ronidazol

O ronidazol é considerado o fármaco de eleição contra a tritrichomonose felina (Papich *et al*., 2012; Gruffydd-Jones *et al*., 2013; Plumb, 2015). É um antiparasitário pertencente aos 5-nitroimidazóis, que apresenta um potencial carcinogénico (Plumb, 2015). Este fármaco não está licenciado para a utilização em gatos, em Portugal apenas está disponível para pombos (Direção Geral de Alimentação e Veterinária [DGAV], n. d.).

Este fármaco apresenta uma rápida e completa absorção após administração oral, assim como após administração endovenosa, tem um tempo de semi-vida elevado e uma *clearence* lenta, sendo ainda detetado ao fim de 48 horas no plasma sanguíneo (LeVine *et al*., 2011).

A utilização de doses elevadas de ronidazol está associada a alterações gastrointestinais (vómitos e diarreia) e efeitos neurotóxicos reversíveis, podendo os gatos apresentarem tremores, letargia, anorexia, ataxia, nistagmos, convulsões ou mudanças de comportamento. Deve suspender-se de imediato a terapêutica caso ocorram estes sinais, e se necessário administrar benzodiazepinas (Rosado, Specht & Marks, 2007; Tolbert & Gookin, 2009; Plumb, 2015). Supõem-se que a combinação da rápida absorção deste fármaco, a sua elevada biodisponibilidade e a sua lenta eliminação conduza aos efeitos neurotóxicos associados (LeVine *et al*., 2011).

LeVine *et al*. (2011) sugerem que a absorção deste fármaco ocorre principalmente no estômago e intestino delgado, atuando depois no intestino grosso através de difusão a partir da circulação sanguínea, sendo mais um fator que predispõe à ocorrência de efeitos neurotóxicos. Têm sido desenvolvidos estudos com o objetivo de formular um comprimido ou uma cápsula gastroresistente de ronidazol que apenas tenha o seu expoente máximo de libertação no intestino grosso. O revestimento de comprimidos com goma de guar ou a formulação de cápsulas à base dessa substância têm mostrado evidências *in vitro* e *in vivo* de permitirem apenas libertação do ronidazol a nível do local desejado (cólon), levando à minimização dos efeitos neurotóxicos (Papich *et al*., 2012; Grellet *et al*., 2015). Outros revestimentos têm vindo a ser testados, Kavianinia *et al*. (2016) demonstraram, *in vitro,* que a associação de 75% de quitosana e de 25% aminoácido dianidrico pirometílico confere uma proteção elevada desta substância ativa, sendo absorvida apenas 2% sistemicamente na passagem pelo estômago e intestino delgado parecendo uma ideia promissora para a redução dos efeitos neurotóxicos.

Não se conhece os efeitos da administração de ronidazol durante a gestação nas gatas, contudo nos estudos realizados com coelhas foi notada uma diminuição do peso dos fetos em doses de 30

mg/kg/dia, mas sem efeitos teratogénicos (Plumb, 2015). Por esta razão não deverá ser administrado esta substância ativa a gatas gestantes nem a animais muito jovens (Sherding, 2013; Lappin, 2014).

Num estudo realizado Gookin *et al*. (2006) verificou-se que ao fim de 24 horas após o início de tratamento (10mg/kg de ronidazol, PO, q24h, 14 dias) de um gato naturalmente infetado, os trofozoítos já não eram detetados, iniciando-se imediatamente a melhoria da consistência das fezes e estando normalizadas ao fim de 10 dias. Não foram observados sinais de toxicidade, todavia passados 85 dias do tratamento surgiu diarreia com hematoquézia e muco, sendo possível a identificação de *T. foetus*. Os mesmos autores demonstraram que gatos infetados experimentalmente com trofozoítos de *T. foetus* tratados com 10mg/kg de ronidazol, PO, q12h, 14 dias, apresentaram melhorias iniciais, mas houve recidiva da infeção entre as 3 e a 20 semanas. Tal não aconteceu aos que foram submetidos a doses superiores (30 ou 50mg/kg de ronidazol, PO, q12h, 14 dias). Em nenhum dos casos foi observado sinais de reações adversas (Gookin *et al*., 2006). Lim, Park, Ahn, Oh e Shin (2012) concluíram que a administração de ronidazol na dose 50 mg/kg, PO, q12h, 14 dias é eficaz no tratamento da tritrichomonose felina induzida em gatos domésticos SRD. A farmacocinética do ronidazol leva a crer que a administração deste fármaco duas vezes ao dia poderá conduzir a acumulação e desta forma levar a neurotoxicidade (LeVine *et al*., 2011).

Lalor e Gunn-Moore (2012) demonstram que doses inferiores de ronidazol (10-30mg/kg, PO, q24h, 14 dias) estão associadas à resolução da tritrichomonose felina. A dose que está aconselhada atualmente para o combate da tritrichomonose felina é de 30 mg/kg, PO, q24h, 14 dias (Tolbert & Gookin, 2009; Helps & Tasker, 2010; Xenoulis *et al*., 2013; Gruffydd-Jones *et al*., 2013; Gookin & Levy, 2015; Grellet *et al*., 2015).

Não se conhece a prevalência de resistências ao tratamento da tritrichomonose felina com ronidazol, mas Gookin *et al*. (2010a) concluiram que existe em meio aeróbio. Utilizaram isolados de *T. foetus* colhidos de animais refratários ao tratamento com ronidazol e, *in vitro*, estudaram a sua CML em meio anaeróbio (CML ≥ 1µg/mL) e aeróbio (CML ≥ 100µg/mL) (Gookin *et al*., 2010a).

Outras causas para o insucesso da terapêutica com ronidazol incluem a utilização de uma dose ou duração da terapêutica reduzidas, a administração de formulações destinadas a outras espécies animais (por exemplo: ronidazol a 10%, em pó, para pombos), ingestão insuficiente do fármaco ou ainda por re-infeção através dos seus coabitantes (Tolbert & Gookin, 2009; Gookin, 2012; Gookin & Levy, 2015).

A associação da terapêutica com probióticos permite diminuir as recidivas após o fim da terapêutica (Lalor & Gunn-Moore, 2012; International Cat Care, n. d.). Durante o período em que o animal está a ser medicado com este fármaco, deverá ser monitorizada a sua eficácia clínica, quer através da

evolução da consistência das fezes, quer da presença dos efeitos adversos e da pesquisa do parasita (Plumb, 2015).

Se a diarreia persistir 14 dias após o fim do tratamento com ronidazol e após um teste de identificação de *T. foetus* negativo, deve considerar-se outras causas de diarreia (Tolbert & Gookin, 2009; Gookin, 2012). Contudo, a tritrichomonose felina apenas pode dar-se como completamente resolvida após um resultado negativo de PCR a partir das 20 semanas após o fim do tratamento (Sherding, 2013).

10.2. Tinidazol

O tinidazol é um fármaco antipararasitário pertencente à segunda geração da família dos 5-nitroimidazóis, e pouco se conhece sobre a sua utilização na medicina veterinária (Plumb, 2015; Gookin *et al*., 2007a). Este fármaco tem como efeitos adversos alterações gastrointestinais (vómito, diarreia e inapetência), mas a sua administração com alimento minimiza os seus potenciais efeitos adversos. Nos humanos está descrita a possibilidade de ocorrência de convulsões como efeito secundário ao tinidazol (Plumb, 2015).

O tinidazol tem capacidade de atravessar a placenta e de ser excretado no leite materno e nos ratos machos pode ocorrer a diminuição da fertilidade (Plumb, 2015).

T. foetus não tem a capacidade de se multiplicar *in vitro* após a presença de 0,1µg/mL de tinidazol (Gookin *et al*., 2006), mas Gookin *et al*. (2007a) afirmam que os trofozoítos de *T. foetus* perdem a capacidade de multiplicação apenas com 1µg/mL de tinidazol.

Gookin *et al*. (2007a) conduziram um estudo em animais infetados experimentalmente com trofozoítos de *T. foetus* para averiguarem a eficácia do tinidazol, concluíram que este fármaco não deverá ter muita utilidade na clínica, uma vez que 2 de 4 gatos, submetidos ao tratamento, apresentaram sinais de nova infeção num período de 33 semanas após o término da terapêutica (tinidazol 30 mg/kg, PO, q24h, 14 dias). Por outro lado, Pennisi, Napoli, Ingrà e Persichetti (2012) afirmam que o tratamento com tinidazol (30 mg/kg, PO, q24h, 14 dias, com cápsulas gastroresistentes) foi eficaz em 5 gatos FIV positivos com tritrichomonose felina, além de resolver a giardiose presente concomitantemente em 4 gatos.

10.3. Outros – Novos tratamentos

Tolbert, Brad e Gould (2016) e Singh *et al*. (2016) sugerem, respetivamente, a utilização de agentes inibidores da cisteína protease e de carbohidratos inibidores das lectinas, moléculas envolvidas na patogenia de *T. foetus*, todavia são necessários mais estudos para compreender a sua real aplicabilidade.

11. Prognóstico

Assume-se que o prognóstico dos felinos com tritrichomonose felina a curto e longo prazo é bom (Helps & Tasker, 2010, Manning, 2010 e International Cat Care, 2014). Em 88% (23/26) dos casos de tritrichomonose felina observa-se uma resolução espontânea da diarreia ao fim de 2 anos (mediana 9 meses), todavia 54-55% destes gatos continuam positivos por PCR para *T. foetus* (Foster *et al*., 2004; Tolbert & Gookin, 2009; Manning, 2010), podendo excretar trofozoítos nas suas fezes e consequentemente infetar outros gatos (International Cat Care, 2014).

Após a resolução desta parasitose os animais mantêm uma boa condição corporal e um exame físico normal. Os parâmetros analíticos encontram-se sem quaisquer alterações (Manning, 2010).

12. Controlo

Deve-se tentar isolar os animais infetados com o parasita *T. foetus*, evitando a partilha da caixa de areia com qualquer outro animal (Rothrock, 2014; Companion Animal Parasite Council, 2015). Não é recomendado a reintrodução de gatos que foram identificados como positivos para *T. foetus* em ambientes com mais gatos (Lappin, 2014).

Os trofozoítos de *T. foetus* sobrevivem à temperatura ambiente em matéria fecal durante 7 dias (Hale *et al.*, 2009), mas na sua ausência o tempo de sobrevivência é reduzido (Rosypal *et al*., 2012). Por essa mesma razão, considera-se imperativo uma limpeza frequente da caixa de areia como método preventivo desta parasitose (Marks, 2010).

A maioria dos desinfetantes tem capacidade para eliminar este parasita, sendo aconselhado proceder-se à lavagem e secagem dos utensílios usados pelos gatos (comedouros, bebedouros, caixa de areia, camas, brinquedos, etc.) com produtos à base de amoníaco (Manning, 2010; Marks, 2010; ESCCAP, 2011; Rothrock, 2014).

Deverão ser adotados métodos de higiene pessoal para evitar que os próprios proprietários atuem como disseminadores do parasita (ESCCAP, 2011; International Cat Care, 2014).

A redução do número de animais por habitação e de fatores de *stress* levará a uma menor probabilidade de infeção dos gatos por *T. foetus* (Lappin, 2014). Os felinos afetados por esta parasitose não adquirem imunidade e, até à presente data, não existe nenhuma vacina contra este parasita (Lappin, 2014) ou antiparasitário adequado.

13. Implicações na Saúde Pública

O parasita *T. foetus* não é patogénico para o Homem, contudo tem sido descrito em pessoas imunodeprimidas (Manning, 2010), conduzindo a infeções oportunistas. Okamoto *et al*. (1998) relatam que um indivíduo com leucemia mielóide, submetido a transplante alogénico de células estaminais de sangue periférico foi diagnosticado com uma meningoencefalite, uma epididimite e uma prostatite nas quais foram identificados trofozoítos de *T. foetus*. Duboucher *et al*. (2006)

descreveram um caso de co-infeção por *T. foetus* (bovino) num paciente seropositivo para o vírus da imunodeficiência humana com pneumonia por *Pneumocystis*. Zalonis, Pillay, Secor, Humburg e Aber (2011) relatam um caso de peritonite por *T. foetus* (bovino) num homem com imunodeficiência (artrite reumatóide, esplenectomia e cirrose criptogénica). Suzuki *et al*. (2016) descrevem o caso de um indivíduo com uma agamaglobulinémia adquirida complicada com uma colecistite onde foi identificado na bilís *T. foetus* (genótipo bovino/suíno). Tendo em conta estes relatos é importante considerar o facto do parasita *T. foetus* poder ter um potencial zoonótico, principalmente nas pessoas imunodeprimidas (ESCCAP, 2011).

Para além destes relatos, o potencial zoonótico deste parasita deverá ser ponderado devido à inexistência de uma elevada especificidade entre o hospedeiro e o parasita, sendo de realçar o estreito contacto entre os humanos e os gatos (Gookin *et al*., 2001; Manning, 2010; Gookin, 2012). Mas, alguns autores afirmam o contrário, não considerando *T. foetus* como um potencial agente zoonótico (Gruffydd-Jones *et al*., 2013; Companion Animal Parasite Council, 2015).

Capítulo III – Rastreio Parasitológico *de Tritrichomonas foetus* em Gatos

1. Objetivos

Este trabalho teve como principais objetivos:

a) Rastreio parasitológico de *Tritrichomonas foetus* em gatos domésticos que se apresentassem à consulta no HE – FMV, ULisboa e de gatos cujos proprietários tivessem tido conhecimento do estudo através do panfleto de divulgação do projeto;
b) Recolha de informação sobre cada um dos animais em estudo através de preenchimento de um inquérito por parte dos proprietários, com vista à caracterização da população em estudo e avaliação de possíveis fatores de risco;
c) Comparação dos resultados obtidos utilizando como amostras o lavado de colón e as fezes naturalmente eliminadas em de três dias consecutivos;
d) Identificação de potenciais co-infeções com outros endoparasitas – protozoários e helmintes.

2. Material e Métodos

2.1. População em Estudo

A amostra presente neste estudo consistiu em 60 gatos que se apresentaram à consulta no HE – FMV, ULisboa ou que tiveram conhecimento do projeto. Todos os gatos eram potenciais participantes no rastreio parasitológico, a não ser que estivessem sujeitos a antibioterapia ou, que esta não tivesse terminado há pelo menos oito dias, ou se os animais se encontrassem gravemente debilitados ou o seu temperamento não permitisse a realização da colheita.

Todos os proprietários foram devidamente informados sobre em que consistia o projeto, das colheitas a realizar e das principais características da tritrichomonose felina. Caso concordassem em que o seu gato integrasse o estudo era preenchido uma ficha de autorização (Anexo II) e distribuído um panfleto informativo (Anexo III), onde estavam sumarizados os sinais clínicos da tritrichomonose felina, explicado o modo de transmissão e de identificação do agente etiológico.

Após a realização de todas as técnicas laboratoriais os responsáveis pelos gatos eram informados dos resultados obtidos e, caso fosse identificado algum parasita, era informado o médico veterinário assistente e discutido qual a melhor terapêutica a aplicar.

2.2. Recolha de Informação Individual

Foi pedido aos proprietários dos gatos que integraram o rastreio parasitológico, o preenchimento de um inquérito (Anexo IV) no dia em que se procedia à realização da lavagem de cólon. O inquérito destinava-se a apurar se os gatos apresentavam sinais clínicos característicos de tritrichomonose felina, caracterizar o ambiente em que viviam e os seus hábitos, obter informação do plano de desparasitação interna e plano vacinal e indagar sobre a presença de doenças concomitantes.

2.3. Ética

Foi submetido à Comissão de Ética e Bem Estar Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa um pedido de autorização para a realização de estudo, o qual foi aceite.

2.4. Colheita e Conservação das amostras

Para a realização deste rastreio parasitológico foram realizadas duas colheitas de amostras distintas. Na consulta procedeu-se à lavagem de cólon dos gatos para obtenção de amostra de lavado de cólon e era solicitado aos proprietários que realizassem a colheita de fezes naturalmente eliminadas em 3 dias consecutivos, em casa. Caso os animais estivessem hospitalizados (a recuperar de uma cirurgia ou se apresentassem sintomatologia compatível com tritrichomonose felina), as colheitas eram efetuadas durante esse período.

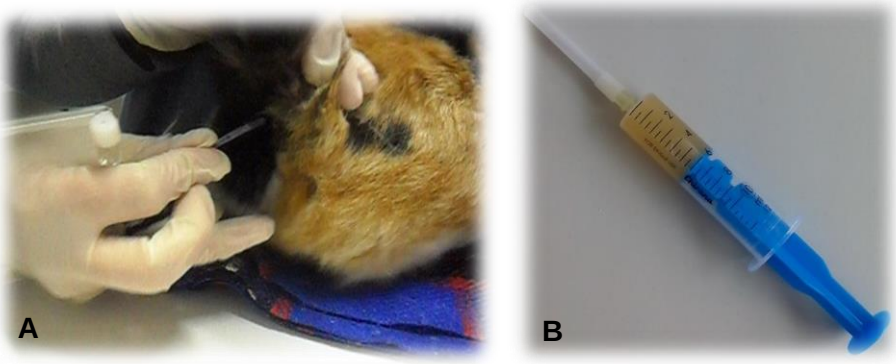
2.4.1. Lavado de cólon

Esta amostra foi obtida através de uma lavagem ao colón dos gatos, realizada sem recurso a sedação, durante a consulta, com exceção de cinco animais que tiveram de realizar procedimentos sob anestesia e, nesses casos, foi utilizado o tempo anestésico para a realização da técnica. Esses animais foram anestesiados com recurso a combinações de dexmedetomidina (15 µg/kg), cetamina (2,5 mg/kg) e metadona (0,2 mg/kg) (3 animais) ou medetomidina (30 µg/kg), quetamina (2,5 mg/kg) e metadona (0,2 mg/kg) (2 animais), sendo sido mantidos com anestesia volátil com isoflurano (±2%). A colheita era realizada sem recurso a sedação, uma vez que os gatos toleravam bem o procedimento, sendo apenas necessário a realização de uma boa contenção.

A técnica utilizada foi a descrita por Gookin e Dybas (2009) e Tolbert e Gookin (2009), consistindo na introdução através ânus do gato de um catéter maleável (Actreen® Glys Luer Lock, CH 08 [Ø-2,7mm], com 45cm de comprimento, B|Braun, referência 227408A) até ao colón (Figura 6-A). Consoante o porte do animal, introduziam-se 15-20cm do catéter através do qual se instilava 10mL de NaCl a 0,9% (soro fisiológico), à temperatura de 37ºC para evitar choque térmico. Após uma pequena massagem abdominal aspirava-se a maior quantidade possível de lavado de colón (Figura 6-B). O vídeo da realização desta técnica de colheita de amostra fecal por lavagem do colón pode ser consultado em http://hdl.handle.net/10400.5/12383 .

O lavado de colón recolhido de cada animal foi identificado e guardado à temperatura ambiente, sendo processado no intervalo de tempo mais reduzido possível, sem nunca se ultrapassar as seis horas após a colheita (Gookin & Dybas, 2009, Tolbert & Gookin, 2009, Hale *et al*., 2009 e Gookin & Levy, 2015).

Figura 6 – A – Introdução do cateter maleável; B – Lavado de cólon obtido. (Fotografias originais)



2.4.2. Amostra de fezes eliminadas naturalmente em 3 dias consecutivos

As amostras de fezes de 3 dias consecutivos, naturalmente eliminadas, foram recolhidas pelos proprietários dos gatos a partir da caixa de areia, mantidas num recipiente plástico hermético e guardadas em refrigeração até entrega no HE – FMV, ULisboa, no final do período de recolha. No caso dos animais internados, a amostra de fezes de 3 dias consecutivos foi recolhida durante a hospitalização pela equipa presente (médico veterinário, enfermeiro veterinário ou estagiário), seguindo os mesmos passos que os proprietários.

Aquando da receção das amostras no HE – FMV, ULisboa, estas eram guardadas em refrigeração até ao momento da sua análise em laboratório, que decorria no prazo mais curto possível (no máximo 72 horas após entrega).

2.5. Métodos utilizados

2.5.1. Amostra de lavado de cólon

2.5.1.1. Pesquisa macroscópica de parasitas

À chegada deste tipo de amostra ao Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV, ULisboa, as amostras foram analisadas macroscopicamente e pesquisada a presença de proglotes e de outras formas parasitárias.

2.5.1.2. Realização da cultura no meio InPouch^{TM} TF – Feline

No laboratório, 2 mL de lavado de colón foram transferidos para um tubo de centrífuga que foi sujeito a uma centrifugação durante 5 minutos a 800rpm. Do sedimento formado recolheu-se uma amostra do tamanho de um bago de arroz (J. Gookin, comunicação pessoal, Outubro 18, 2015)[2], sendo estabelecido, para uma melhor uniformização, que correspondia a 15µL. Esta quantidade foi inoculada na câmara superior do meio de cultura InPouch^{TM} TF – Feline (Figura 7-A), procedendo-

[2] Anteriormente ao contacto com a investigadora Jody Gookin, três meios de cultura foram inoculados com uma gota de lavado de cólon (Gookin & Dybas, 2009), levando a uma grande produção de gás no meio de cultura.

se seguidamente à passagem da amostra para a câmara inferior do meio de cultura e ao encerramento da bolsa que contém o meio.

O meio de cultura foi colocado a incubar em posição vertical (Figura 7-B), numa estufa a 37ºC, sendo avaliado, diariamente, até ao 12º dia após inoculação (Gookin *et al*., 2003; Tolbert & Gookin, 2009; Gookin & Dybas, 2009; Gookin & Levy, 2015). Neste trabalho a avaliação foi realizada ao microscópio óptico com ampliações de 100x e 400x.

As caraterísticas do meio de cultura especificadas pelos fabricantes encontram-se no Anexo V.

Figura 7 – Inoculação no meio de cultura InPouch^{TM}TF - Feline. A – Meio de cultura InPouch^{TM} TF – Feline; B – Incubação dos meios de cultura numa estufa a 37ºC em posição vertical. (Fotografais originais)

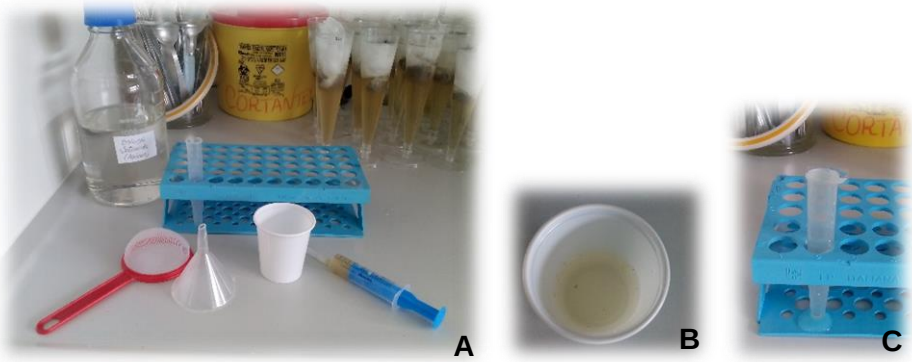
2.5.1.3. Pesquisa de parasitas através do método de flutuação de Willis

Em todas as amostras de lavado de cólon foi realizada esta técnica qualitativa, de acordo com o seguinte protocolo (Figura 8-A):

a) Num copo pequeno de plástico colocar 5-8mL de solução saturada de sacarose e 2mL de produto obtido da lavagem de cólon;
b) Homogeneizar com uma vareta de vidro (Figura 8-B);
c) Verter a solução obtida com recurso a um funil e a um coador de rede para um tubo de ensaio, formando um pequeno menisco;
d) Cobrir com uma lamela de vidro (Figura 8-C).
e) Deixar repousar pelo menos 15 minutos, ao fim dos quais retirar cuidadosamente a lamela e colocar sobre uma lâmina de vidro;
f) Avaliar a amostra no microscópio óptico nas ampliações de 40x, 100x e 400x.

A técnica utilizada para a flutuação de Willis (Thienpont, Rochette & Vanparus, 1979) foi adaptada pela primeira vez à avaliação do produto de lavagem de cólon.

Figura 8 – Método de flutuação de Willis para análise do lavado de cólon. A – Material (solução saturada de sacarose, suporte para tubos de ensaio, tubos de ensaio, lamelas, coador de rede, funil, copo de plástico e amostra); B – Lavado de cólon homogeneizado com a solução saturada de sacarose; C – Tubo de ensaio com a lamela. (Fotografias originais)



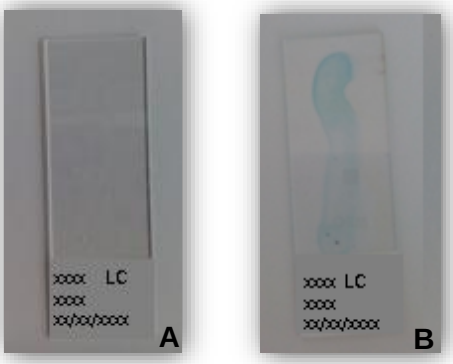
2.5.1.4. Pesquisa de parasitas através de esfregaço

A técnica utilizada para a realização do esfregaço com o produto da lavagem de cólon consistiu no seguinte: após a identificação da lâmina, colocou-se uma gota de lavado de colón que foi distribuída uniformemente pela lâmina (Figura 9-A). Procedeu-se à secagem ao ar da lâmina, à qual se seguiu a fixação e coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada (Casemore, Amstrong & Sands,1985) de acordo com os seguintes passos:

a) Cobrir a lâmina com metanol, durante um minuto (fixação);
b) Decorrido este tempo e sem lavar, cobrir toda a lâmina com fucsina e aguardar 10 minutos;
c) Lavar a lâmina com água corrente;
d) Cobrir com álcool clorídrico a 1%;
e) Lavar em água corrente;
f) Cobrir a lâmina com verde de malaquite a 0,4%, durante 30 segundos;
g) Lavar novamente com água corrente;
h) Deixar secar naturalmente as lâminas;
i) Quando estiverem totalmente secas (Figura 9-B), observar ao microscópio óptico com uma ampliação de 1000x com recurso a óleo de imersão.

Esta técnica foi adaptada pela primeira vez ao produto de lavagem de cólon.

Figura 9– Esfregaço de lavado de colón. A – Após realização; B- Após coloração. (Fotografias originais)



2.5.1.5. Preparação de esfregaços a partir do meio de cultura e sua coloração

Após a deteção de um meio de cultura (InPouch^{TM} TF – Feline) com resultado positivo, recolheu-se, com ajuda de uma pipeta, uma pequena porção do seu conteúdo que depois foi depositada em várias lâminas de vidro. As lâminas preparadas foram deixadas a secar à temperatura ambiente e posteriormente coradas recorrendo à técnica de Giemsa, que consiste em:

a) Fixação das preparações com metanol durante 1 minuto;
b) Eliminar o excedente e cobrir com Giemsa durante 5 minutos;
c) Lavar a lâmina com água corrente;
d) Deixar secar naturalmente as lâminas;
e) Quando estiverem totalmente secas, observar ao microscópio óptico com uma ampliação de 1000x com recurso a óleo de imersão.

2.5.2. Amostra de fezes naturalmente eliminadas em 3 dias consecutivos

2.5.2.1. Avaliação macroscópica

Após a chegada das amostras de fezes naturalmente eliminadas em 3 dias consecutivos ao Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV, ULisboa classificaram-se as fezes quanto à sua consistência e coloração e verificaram-se macroscopicamente a presença de presença de proglotes e de outras formas parasitárias.

2.5.2.2. Pesquisa de parasitas através do método de flutuação de Willis

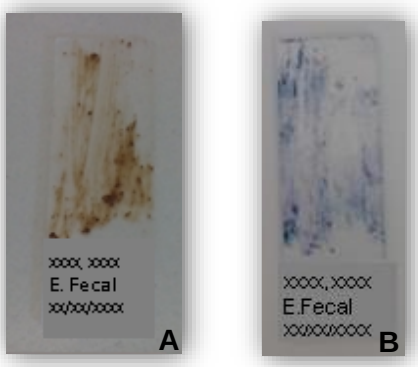
A técnica de flutuação utilizada é uma técnica qualitativa (querendo isto dizer que não existe a necessidade de utilização de quantidades específicas). As amostras recebidas encontravam-se em recipientes distintos, tendo sido necessário juntar as amostras dos três dias e homogeneizá-las devidamente.

Após este procedimento, retirou-se uma pequena quantidade de fezes (1 a 2g), seguindo-se o protocolo descrito em 2.5.1.3., com a alteração no ponto a) em que a quantidade de solução saturada de sacarose utilizada foi de 10-15mL.

2.5.2.3. Pesquisa de parasitas através de esfregaço fecal

A técnica utilizada para a realização do esfregaço fecal com a amostra de fezes recolhida em 3 dias consecutivos consistiu em: após homogeneizar as fezes, com recurso a uma vareta de vidro espalhar uma pequena quantidade de fezes sobre uma lâmina de vidro, previamente identificada, formando uma fina camada de amostra (Figura 10-A). As lâminas foram deixadas a secar naturalmente. Posteriormente, procedeu-se à fixação e coloração (Figura 10-B), segundo o protocolo descrito em 2.5.1.4..

Figura 10 - Esfregaço fecal. A – Após realização; B- Após coloração. (Fotografias originais)



2.6. Identificação de parasitas

Para a identificação dos parasitas encontrados na avaliação macroscópica e nas flutuações foram utilizados as seguintes referências de apoio: Thienpont *et al*., 1979; Bowman, Fogarty e Barr, 2002; Otranto, Brianti e Dantas-Torres, 2013; Rinaldi, Cringoli, Pepe, Beugnet e Ballweber, 2015, baseando-se nas características morfológicas e dimensões apresentadas.

2.7. Análise estatística

Para o armazenamento dos dados, sua análise estatística e apresentação dos resultados obtidos recorreu-se a dois programas informáticos: programa Excel Microsoft® Office 2013 (Microsoft Corporation, EUA) e R, versão 3.1.0® (The R Foundation for Statistical Computing, 2016). Foram realizadas técnicas de estatística descritiva, como cálculo de frequências absolutas e relativas e medianas de forma a descrever os resultados obtidos da análise realizadas no laboratório, bem como da interpretação dos resultados obtidos nos inquéritos. A construção de mapas, gráficos e tabelas com recurso ao Excel Microsoft® Office 2013 foi realizada tendo esses dados como base.

Para o cálculo da prevalência dos diversos parasitas identificados foi utilizada a seguinte fórmula: (nº de animais positivos x 100) / (nº de animais analisados), para o cálculo do intervalo de confiança recorreu-se ao website EpiTools epidemiological calculators (disponível em: http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=CIProportion), utilizando o método de Wilson.

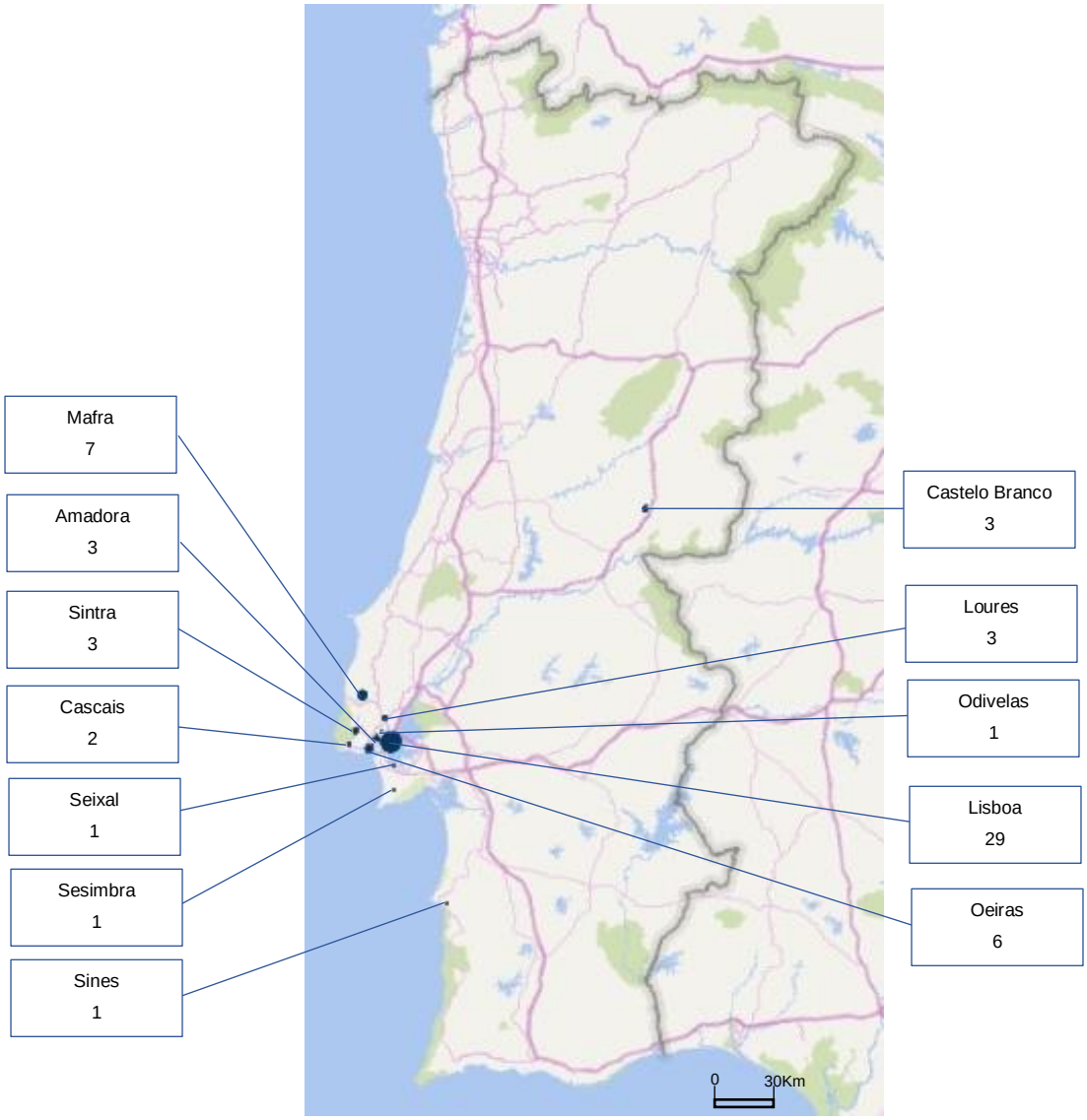
3. Resultados

3.1. Caracterização da amostra

3.1.1. Localização geográfica e ambiente

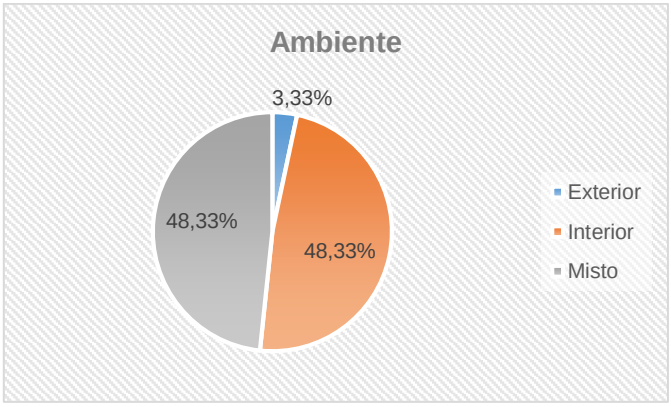
A amostra em estudo, na sua grande maioria 48,33% (29/60), pertencia ao concelho de Lisboa, tendo sido o concelho de Mafra (11,67%, 7/60) o segundo mais representado. Seguindo-se os concelhos de Oeiras (10%, 6/60), Amadora/Castelo Branco/Loures/Sintra (5%, 3/60), Cascais (3,33%, 2/60) e Odivelas/Seixal/Sesimbra/Sines (1,67%) correspondendo a um animal por concelho (Mapa 1) (Anexo VI – Tabela 12).

Mapa 1 - Distribuição por concelhos dos gatos em estudo.



Um total de 48,33% (29/60) dos gatos não tinham acesso à rua, vivendo apenas no interior das habitações dos seus responsáveis, sendo que a mesma percentagem de gatos vivia com acesso ao exterior e interior, e apenas 3,33% (2/60) da amostra vivia apenas no exterior (Gráfico 2) (Anexo VI – Tabela 12).

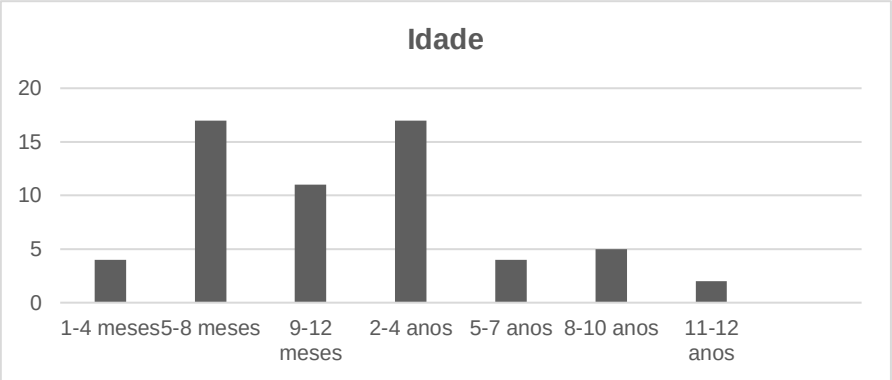
Gráfico 2 – Distribuição dos gatos pelos diversos ambientes.



3.1.2. Idade, sexo e raça

Os gatos em estudo apresentavam uma mediana de idade de um ano, sendo que o animal mais jovem tinha dois meses de idade e o mais velho 12 anos de idade (Gráfico 3) (Anexo VI – Tabela 12).

Gráfico 3 – Distribuição das idades da população em estudo



Relativamente ao sexo, a população dividia-se em 16,67% (10/60) de fêmeas inteiras, 28,33% (17/60) de fêmeas ovarioisterectomizadas, 26,67% (16/60) de machos inteiros e 28,33% (17/60) de machos orquiectomizados (Anexo VI – Tabela 12).

A amostra em estudo foi constituída por 60 gatos domésticos (*Felis catus domesticus*), na sua maioria eram gatos SRD (76,67% - 46/60). A raça mais representada foi a persa (11,67% - 7/60), seguindo-se a raça Abissínio (3,33% - 2/60). Todas as outras presentes (British Shorthair, Scottish Straight, Siamês, Sphinx e Cruzado de Persa) contaram com um exemplar, correspondendo a 1,67% da amostra (Tabela 5) (Anexo VI – Tabela 12).

Tabela 6 - Distribuição das raças presentes na população em estudo

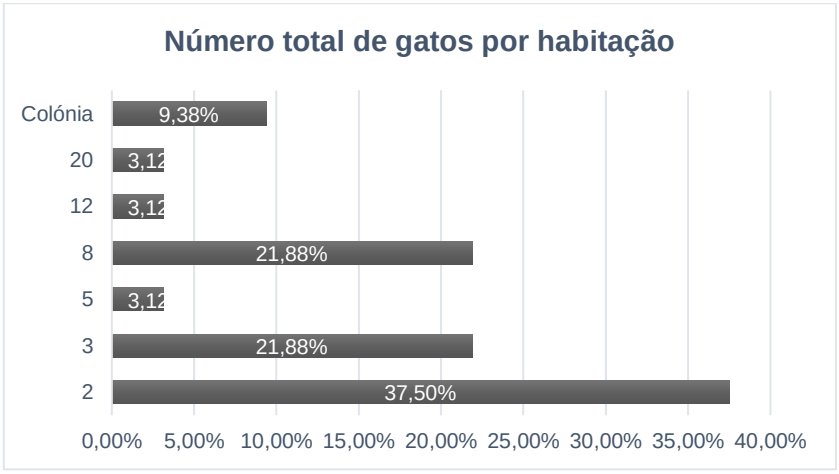
Raça	Frequência relativa (FR)	Frequência absoluta (FA)
SRD	76,67%	46
Persa	11,67%	7
Abissínio	3,33%	2
XPersa	1,67%	1
British Shorthair	1,67%	1
Scottish Straight	1,67%	1
Siamês	1,67%	1
Sphinx	1,67%	1

3.1.3. Coabitação

A população de estudo foi constituída por 60 gatos, provenientes de 49 lares, uma vez que participaram no estudo gatos diferentes que residiam no mesmo lar.

Tendo em conta toda a população em estudo 46,67% dos gatos não compartilhavam o seu espaço com mais nenhum gato, mas 53,33% (32/60) faziam-no, estando representado no gráfico 4 o número de total de gatos por habitação e sua percentagem. Três gatos viviam em colónia, com pouca interação com a população humana. (Anexo VI – Tabela 12).

Gráfico 4 - Representação do número total de gatos por habitação os quais coabitavam com outros gatos (N=32).



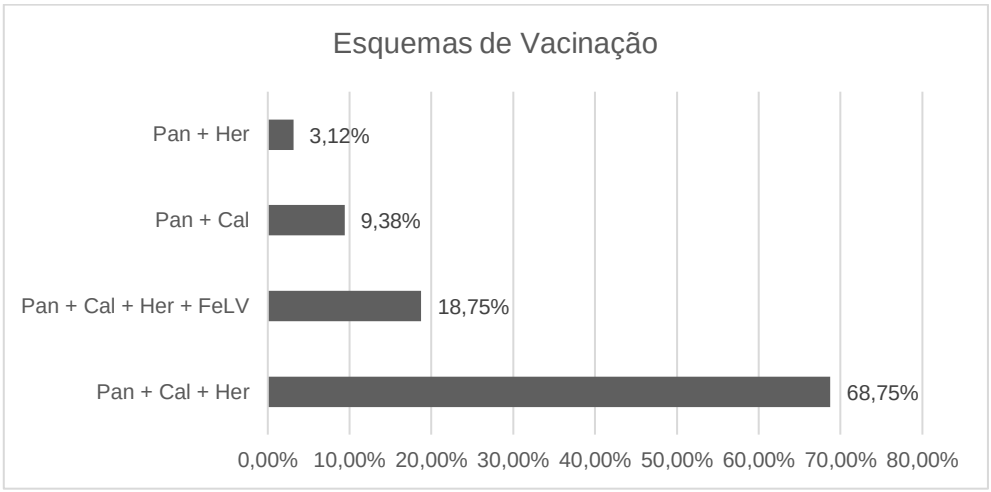
Dos gatos que viviam em ambiente com mais do que um gato, 90,62% (29/32) compartilha a sua caixa de areia com os seus coabitantes e a mesma percentagem realizava a limpeza cruzada com os outros gatos (Anexo VI – Tabela 12).

Em 58,33% (35/60) dos gatos estudados não coabitavam com mais nenhum tipo de animais, sendo que os que coabitavam estavam divididos em 28,33% com cães, 3,33% com pássaros, porquinhos-da-índia e cães e animais de quinta e 1,67% com animais de rua (Anexo VI – Tabela 12).

3.1.4. Plano vacinal e plano de desparasitação interna

Um total de 53,33% (32/60) da população de gatos em estudo mantinha um plano vacinal atualizado, estando o mesmo descrito no gráfico 5 (Anexo VI – Tabela 13).

Gráfico 5 – Plano vacinal (N=32).



Pan - Panleucopénia, Cal – Calicivírus e Her - Herpesvírus.

Relativamente ao plano de desparasitação interna há a referir que 23,33% (14/60) dos gatos estudados não realizavam desparasitação interna (Gráfico 6). Dos gatos com desparasitação interna atualizada (76,67%, 46/60), na sua maioria eram desparasitados a cada 6 meses (41,30%, 19/46) (Gráfico 6) e as substâncias ativas mais utilizadas foram a milbemicina oxima em associação com o praziquantel (41,30%, 19/46) (Tabela 6) (Anexo VI – Tabela 13).

Gráfico 6 – Programa de desparasitação interna dos gatos em estudo.

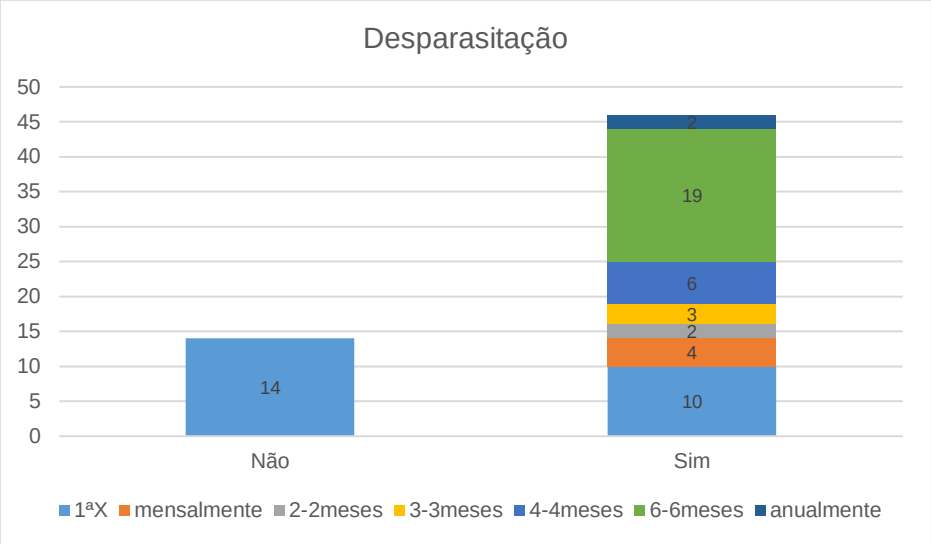


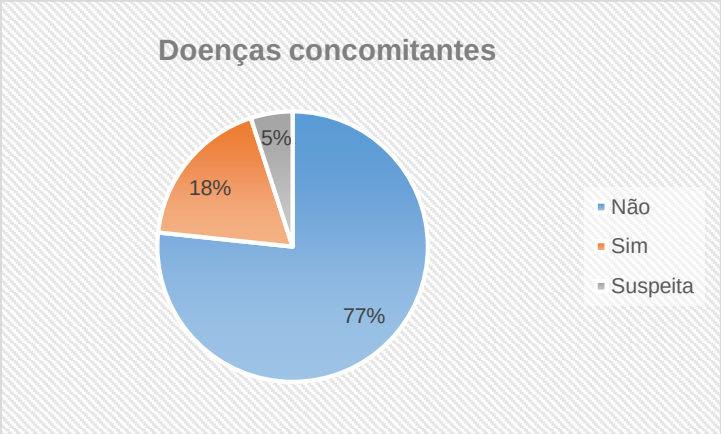
Tabela 7 – Substâncias ativas utilizadas na desparasitação interna da amostra em estudo.

Substância(s) ativa(s) utilizada(s)	**FR**	**FA (total 46)**
Febendazol	2,17%	1
Febendazol+Praziquantel	2,17%	1
Milbemicina Oxima+Praziquantel	41,30%	19
Oxibendazol+Niclosamida	4,35%	2
Pirantel	2,17%	1
Praziquantel+Pirantel	19,57%	9
Praziquantel+Pirantel/Emodepside+Praziquantel	2,17%	1
Praziquantel+Pirantel/Imidaclopride+Moxidectina	2,17%	1
Praziquantel+Pirantel/Oxibendazol+Niclosamina/Febendazol	6,52%	3
Não sabe	17,39%	8

3.1.5. Doenças/Afeções concomitantes

Aos proprietários dos gatos em estudo foi questionado se até à data da consulta do dia da lavagem de cólon tinha sido diagnosticado alguma doença, 77% (46/60) responderam que não, 5% (3/60) responderam que os seus animais eram suspeitos para uma determinada doença e 18% (11/60) que tinham uma doença diagnosticada (Gráfico 7) (Anexo VI – Tabela 13).

Gráfico 7 – Presença de doenças/afeções concomitantes diagnosticadas previamente à realização da lavagem de cólon.



Os gatos com suspeita de doenças concomitantes foram as seguintes: gato nº16 - cardiomiopatia hipertrófica (suspeita há dois anos e sem qualquer medicação), gato nº 43 - alergia alimentar (suspeita há 4 meses e a realizar dieta de prescrição médica com ração hipoalergénica) e gato nº52 - asma (suspeita há 1 mês, medicado com salbutamol e fluticasona) (Anexo VI – Tabela 13).
As doenças/afeções dos gatos previamente diagnosticadas estão resumidas na tabela 7.

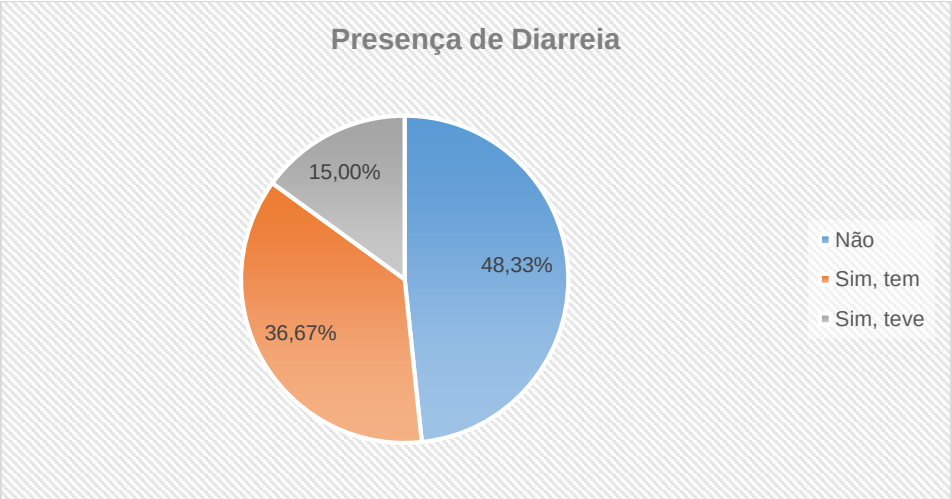
Tabela 8 – Descrição de doenças/afeções, da duração e de medicação dos gatos com doenças diagnosticadas previamente à realização da lavagem de cólon.

Animal Nº	**Doença/Afeções**	**Diagnosticada há…**	**Medicação**
2	Coriza	1 mês	Sem medicação
5	Asma e Displasia da anca	2 anos	Salbutamol e Fluticasona
9	Massa vulvar ulcerada	3 meses	Sem medicação
10	Calo ósseo após fratura do fémur	não sabe	Sem medicação
11	Criptosporidiose	1 mês	Sem medicação
23	Herpesvirose	3/4 anos	Lisina
27	Adenocarcinoma mamário	1 mês	Sem medicação
33	Asma (Elevação das IgE estruturais)	6 meses	Salbutamol (caso necessite)
42	Panleucopénia Felina	6 meses	Sem medicação
48	Dermatite	3 anos	Sem medicação
49	Quistos renais	2 anos	Sem medicação

3.1.6. Diarreia

Na população de felinos analisada verificou-se que 48,33% (29/60) não estavam com diarreia no momento da colheita das amostras nem tinham registo anterior de diarreias (Gráfico 8), mas um destes animais (gato nº 26) encontrava-se com hematoquézia, acompanhada por hematúria e vómito, sendo que estes sinais clínicos já tinham a duração de 1 mês anteriormente à lavagem de cólon efetuada (Anexo VI – Tabela 14).

Gráfico 8 – Presença de diarreia na população em estudo.



Uma percentagem de 36,67% (22/60) dos animais em estudo apresentava diarreia (Gráfico 8). Destes 40,9% (9/22) apresentava-se com uma diarreia aguda (<14 dias de duração) e 54,5% (12/22) diarreia crónica, não sendo conhecido quando se tinha iniciado o episódio de diarreia em um dos gatos (4,5%), uma vez que vivia numa colónia (Gráfico 9).

Gráfico 9 – Frequência absoluta dos gatos com diarreia na altura da colheita por lavagem de cólon de acordo com o tempo em que o sinal clínico surgiu (N=22).

A caracterização da consistência das fezes e a presença ou ausência de muco e/ou sangue, bem como a cor apresentada pelas mesmas são descritas na tabela 8. Os responsáveis referiram que 54,55% (12/22) dos gatos com diarreia apresentavam aumento do número de dejeções e que 72,73% (16/22) não apresentava urgência na defecação. Referiram, ainda, que um dos gatos apresentava concomitantemente vómitos e em dois dos gatos as fezes tinham um cheiro diferente do habitual. Um gato pertencente a este grupo (gato nº4) apresentava eosinofilia num hemograma realizado previamente à colheita (Anexo VI – Tabela 14).

Tabela 9 – Características das fezes dos gatos com diarreia no momento da colheita por lavagem de cólon.

Característica das fezes	FA	FR	Cor das fezes	FA	FR
Líquidas	4	18,18%	Amarela	6	27,27%
Líquidas/Pastosas	1	4,55%	Amarela clara/Castanha	1	4,55%
Líquidas/Pastosas com muco e sangue	2	9,09%	Castanha	11	50,00%
Pastosas	11	50,00%	Castanha alaranjada	4	18,18%
Pastosas com muco	1	4,55%			
Pastosas com sangue	2	9,09%			
Pastosas com muco e sangue	2	9,09%			

Uma percentagem de 15% dos gatos (9/60) não apresentava diarreia no momento da colheita de amostras (Gráfico 8), contudo tinham história anterior. Com exceção de um animal, todos os outros tiveram episódios pontuais de diarreia aguda com a duração de poucos dias a duas semanas. Os seus responsáveis, na maioria, conseguiram identificar uma causa provável desse episódio, como a mudança de ração, a administração de um antibiótico ou a ingestão de um alimento estranho à dieta habitual. Estes episódios não foram possíveis de situar no tempo, a não ser nos casos em que os responsáveis referem ter ocorrido há 1,5 anos (gato nº 36) ou há 6 meses (gato nº43) (Anexo VI – Tabela 14).

As características das fezes e a sua coloração estão descritas na tabela 9. Nenhum destes animais apresentou urgência na defecação durante o episódio de diarreia e 37,5% (3/8) apresentaram aumento do número das defecações. Foi relatado que na altura da diarreia um dos gatos apresentava vómitos (gato nº43) e outro as fezes tinham cheiro fétido (gato nº28) (Anexo VI– Tabela 14). Um dos animais deste grupo (gato nº24) apresentava eosinofilia num hemograma atual (Anexo VI – Tabela 14).

Tabela 10 – Características das fezes dos gatos com história de episódios de diarreia aguda no passado (N=8).

Características das fezes	FA	FR	Cor das Fezes	FA	FR
Líquidas	1	12,50%	Amarela clara	1	12,50%
Líquidas com muco e sangue	1	12,50%	Amarelas clara/Castanha	1	12,50%
Pastosas	5	62,50%	Castanha	5	62,50%
Pastosas com sangue	1	12,50%	Castanha clara	1	12,50%

Um único gato tinha história prévia de diarreia crónica com duração de 3 meses, tendo este episódio decorrido há 4 anos. A mesma foi caracterizada por fezes líquidas a pastosas, sem muco ou sangue de uma tonalidade amarela clara a castanhas e com um cheiro fétido, sem aumento nem urgências das defecações (gato nº3) (Anexo VI – Tabela 14).

3.1.7. Outros

Três gatos que integraram o rastreio parasitológico provenientes do mesmo lar tinham sido submetidos a variados ciclos de antibioterapia variada previamente à colheita por lavagem de cólon (gatos nº17 a 19) (Anexo VI – Tabela 14).

Foi referido pelos responsáveis de 3 gatos em estudo que estes viajavam com regularidade para os arquipélagos portugueses. Um destes animais (gato nº 1) apresentava episódios esporádicos de presença de sangue nas fezes (Anexo VI – Tabela 14).

3.2. Resultados obtidos pelas diferentes técnicas

3.2.1. Amostra de lavado de cólon

3.2.1.1. Exame macroscópico

Em duas amostras observaram-se proglotes do céstode *Dipylidium caninum* e em outras duas proglotes da espécie *Taenia taeniaeformis*.

Os proglotes das duas espécies eram mais compridos que largos (Figura 11-A), apresentado o proglote de *D. caninum* poros genitais duplos (Figura 11-B) e canais osmorreguladores alongados. Ao microscópio foram visualizados ovos contendo embriões hexacanto nas duas espécies (Figura 11-B e C e Figura 12) (Anexo VII).

Figura 11 – *Dipylidium caninum.* A – Aspeto macroscópico de um proglote; B – Pormenor de um poro genital (↑) e de ovos (▲) ; C – Ovo com embrião hexacanto, ganchos (⇧)dos embriões hexacantos, MO. (Fotografias originais)

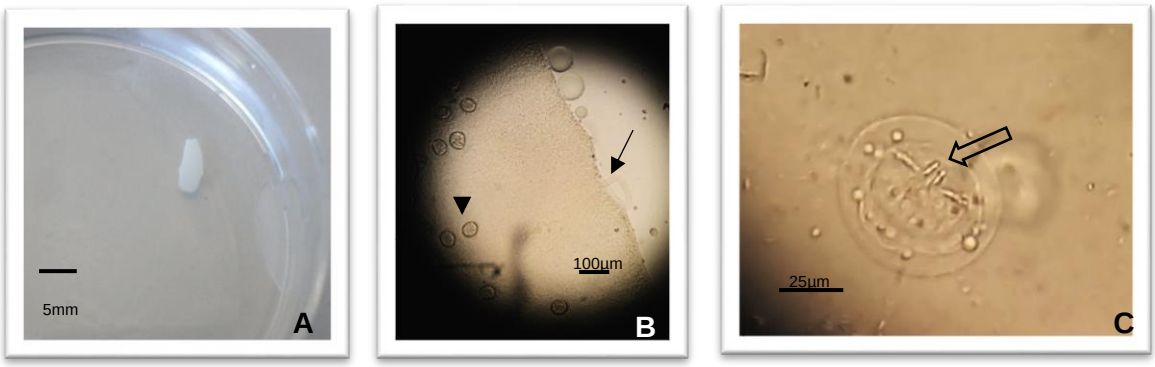
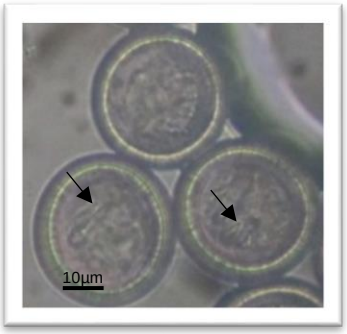


Figura 12 – A – Ovos de *Taenia taeniaeformis* com embrião hexacanto, ganchos (↑) dos embriões hexacantos, MO. (Fotografias originais)

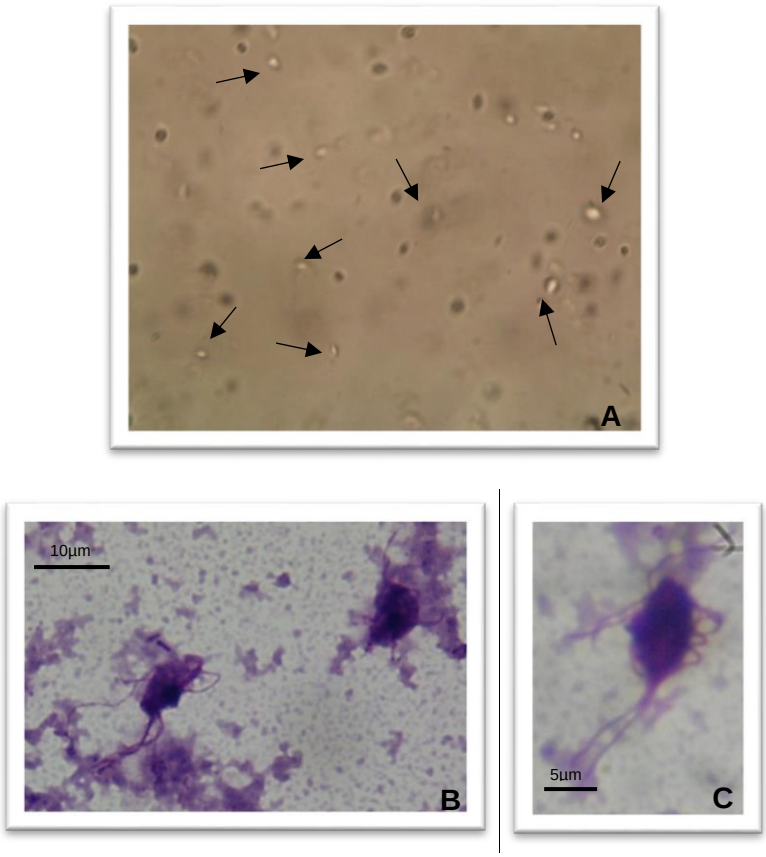


3.2.1.2. InPouch^{TM}TF – Feline

O desenvolvimento de *T. foetus* (Figura 13-A) foi observado em apenas um dos meios de cultura InPouch^{TM}TF – Feline (1,67%, com IC de 95%: 0,29-8,86%; N=60) ao 10º dia após inoculação. O meio de cultura foi mantido na estufa e verificada regularmente a viabilidade dos trofozoítos, os quais mantiveram a sua motilidade durante 37 dias, após o diagnóstico. Pode ser consultado em http://hdl.handle.net/10400.5/12383 vídeo da observação do meio de cultura InPouch^{TM} TF – Feline, onde é visível a mobilidade demonstrada pelos trofozoítos.

Foram realizadas lâminas definitivas com material colhido deste meio e coradas com Giemsa, sendo o seu resultado visível nas figuras 13-B e 13-C.

Figura 13 – *Tritrichomonas foetus*. A – Aspeto de um campo de um meio de cultura InPouch^{TM}TF – Feline positivo para *T. foetus* (↑), MO; C e D – *T. foetus*, coloração Giemsa, MO. (Fotografias originais)



O gato que foi positivo para a tritrichomonose felina é um macho inteiro de 3 anos de idade e da raça Abissínio. Vive no concelho de Lisboa, sem acesso ao exterior, mas viaja todos os anos para a Ilha da Madeira, onde tem acesso ao exterior, sendo considerado um gato de ambiente misto. Convive com mais dois gatos, com os quais partilha a caixa de areia. Realiza desparasitação interna duas vezes ao ano com praziquantel e pirantel e tem a vacinação atualizada (Panleucopénia felina, Herpesvírus, Calicivírus e FeLV). Foram diagnosticadas, há 2 anos, asma e displasia da anca. Na altura da colheita estava sob terapêutica com salbutanol e fluticasona em nebulização. Os seus proprietários referiram que não se encontrava com diarreia, mas houve um episódio no passado, coincidente com a toma de um antibiótico, em que apresentou fezes pastosas castanhas, sem aumento nem urgência das defecações. Não foram verificadas co-infeções (Anexo VII). Os gatos que coabitavam com este animal positivo foram negativos na cultura.

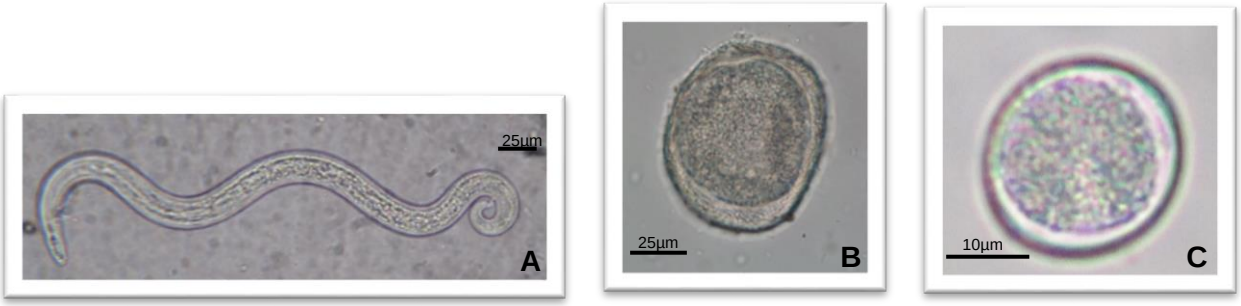
3.2.1.3. Método de flutuação de Willis

A maioria das amostras de lavado de cólon foi considerada negativa na técnica de flutuação de Willis. Apenas três amostras foram positivas, identificando-se parasitas distintos.

Na amostra do gato nº 38 (Anexo VII) foram visualizadas larvas com morfologia típica de parasitas pulmonares, sendo classificadas como larvas L1 de *Aelurostrongylus abstrusus* (Figura 14-A), uma

vez que apresentavam extremidade anterior arredondada com abertura oral terminal e cauda em forma de S. Numa das amostras positivas foram observados ovos com morfologia e dimensões (Ø - 80µm) compatíveis com *Toxascaris leonina* (Figura 14-B) e em outra foram visualizadas oocistos de *Cystoisospora rivolta* (Ø - 25µm) (Figura 14-C) (Anexo VII).

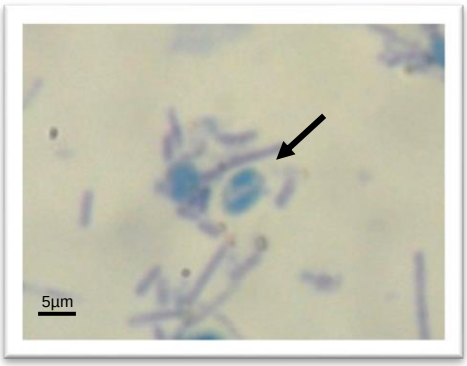
Figura 14 – Formas parasitárias identificadas no método de flutuação de Willis realizada com lavado de cólon. A – Larva L1 de *Aelurostrongylus abstrusus*, MO; B – *Toxascaris leonina*, MO; C – *Cystoisospora rivolta*, MO. (Fotografias originais)



3.2.1.4. Esfregaço

Apenas um dos esfregaços efetuados com o produto da lavagem de cólon foi positivo, observando-se quistos compatíveis com *Giardia* sp. (Figura 15) (Anexo VII).

Figura 15 - Quisto de *Giardia* sp.(↑) observado num esfregaço de lavado de cólon, coloração de Ziehl-Neelsen, MO. (Fotografia original)



3.2.2. Amostra de fezes naturalmente eliminadas em 3 dias consecutivos

Apenas foram analisadas 52 amostras de fezes naturalmente eliminadas em 3 dias consecutivos, uma vez que oito dos responsáveis dos gatos que integraram o rastreio parasitológico não entregaram estas amostras no HE – FMV, ULisboa.

3.2.2.1. Exame macroscópico

A avaliação macroscópica das amostras de fezes colhidas em 3 dias consecutivos permitiu concluir que 50% das amostras apresentava alterações, as quais se encontram listadas na tabela 10.

Tabela 11 - Características macroscópicas das amostras de fezes eliminadas naturalmente em 3 dias consecutivos (N=52).

Consistência e alterações	Frequência absoluta	Percentagem
Fezes normais	26	50%
Fezes pastosas	6	11,54%
Fezes diarreicas	10	19,23%
Fezes diarreicas com muco	3	5,77%
Fezes diarreicas com sangue	1	1,92%
Fezes diarreicas com muco e sangue	1	1,92%
Fezes diarreicas com cheiro fétido	4	7,69%
Fezes diarreicas escuras	1	1,92%

3.2.2.2. Método de flutuação de Willis

Através da técnica de flutuação aplicada às amostras de fezes recolhidas em 3 dias consecutivos verificou-se que 19,23% (10/52) das amostras eram positivas, diagnosticando-se parasitoses mistas (4/10) e por um único agente (6/10) (Anexo VII).

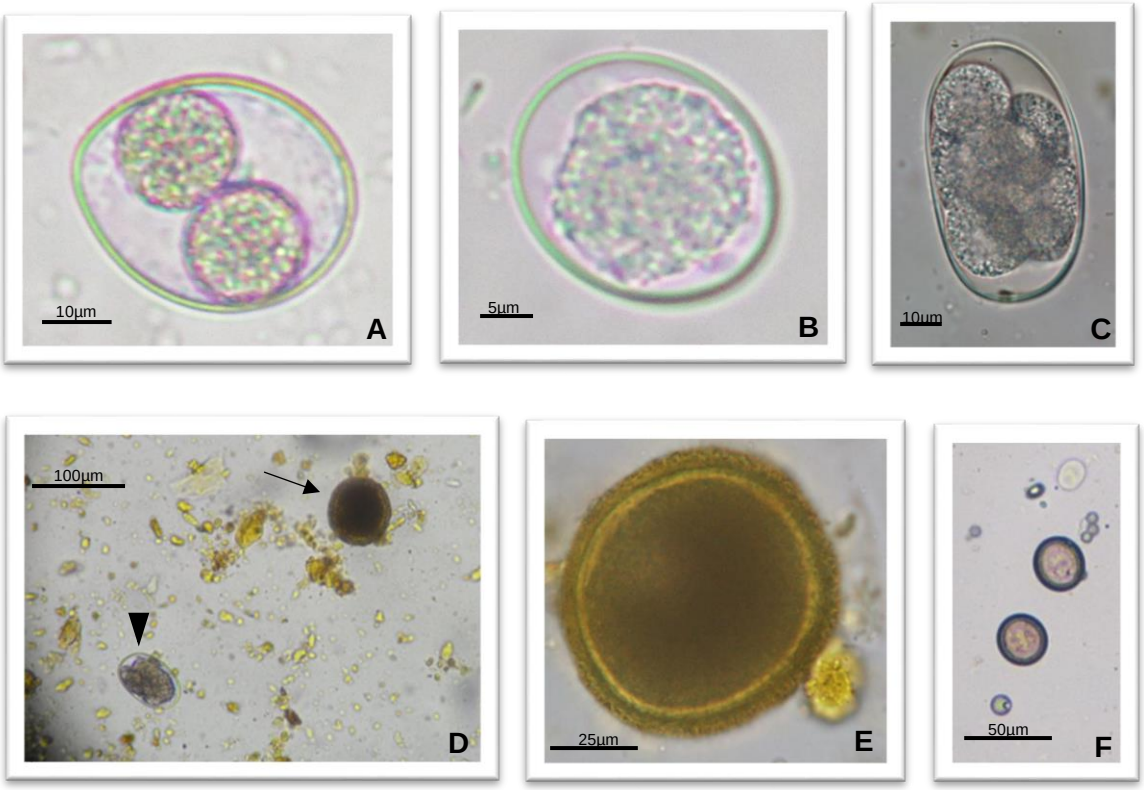
Foram vários os animais com infeção pelo género *Cystoisospora* spp.. Tendo em conta as suas dimensões de referência e espécies que parasitam o gato, foi possível classificar os oocistos observados, em duas amostras como pertencentes à espécie *C. felis* (Ø - 40µm) (Figura 16-A) e outras duas à espécie *C. rivolta (*Ø - 25µm) (Figura 16-B).

No gato nº 10, para além de ter sido identificada *C. rivolta* observaram-se ovos com morfologia compatível com *Ancylostoma* spp.. Em dois gatos analisados foi detectada infeção apenas por *Ancylostoma* spp. (Figura 16-C) e em dois animais este parasita estava associado a *Toxocara cati* (Figuras 16-C a E) (Anexo VII).

Na amostra do gato nº7 analisado por esta técnica, foi observado a presença de ovos de céstode, que através de medição foram classificados como *T. taeniaeformis* (Ø - 30µm) (Figura 16-F) e a presença de ovos de oxiurídeos, tendo sido classificado como um pseudoparasita (Anexo VII).

Foi observado na flutuação das amostras de fezes recolhidas em 3 dias consecutivas do gato nº38 a presença de larvas com características compatíveis a larvas pulmonares, sendo classificadas como *Aelurostrongylus abstrusus*, uma vez que anteriormente, na amostra de lavado de cólon analisada pelo método de flutuação de Willis, tinha sido identificadas este mesmo parasita (Anexo VII).

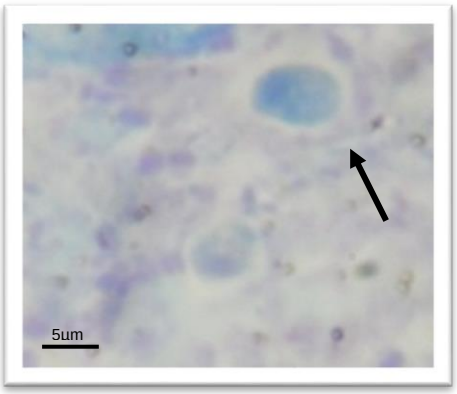
Figura 16 – Parasitas observados no método de flutuação de Willis em amostras de fezes naturalmente elimindas em 3 dias consecutivos. A – *Cystoisospora felis*, MO; B – *C. rivolta*, MO; C – *Ancylostoma* spp., MO; D – *Toxocara cati* (↑) e *Ancylostoma* spp. (▲), MO; E – *T. cati*, MO; F – *Taenia taeniaeformis*, MO. (Fotografias originais)



3.2.2.3. Esfregaço Fecal

Nos esfregaços fecais realizados a partir das amostras de fezes colhidas em 3 dias consecutivos três (5,77%) observaram-se formas parasitárias compatíveis com quistos de *Giardia* sp. (Figura 17) (Anexo VII). Não foram observados oocistos de *Cryptosporidium* spp..

Figura 17 - Quisto de *Giardia* sp. (↑)observado num esfregaço fecal, MO, coloração Ziehl-Neelsen. (Fotografia original)



3.2.3. Prevalências e intervalos de confiança dos diversos parasitas observados

Na tabela 11 estão descritas as várias prevalências e IC de 95% associados aos parasitas observados nas diversas técnicas utilizadas na elaboração deste estudo.

Tabela 12- Prevalências e intervalos de confiança dos diversos parasitas observados no decorrer do rastreio parasitológico (N=60).

Parasita	Prevalência	Intervalo de confiança de 95%
Tritrichomonas foetus	1,67%	0,29-8,86%
Aelurostrongylus abstrusus	1,67%	0,29-8,86%
Toxascaris leonina	1,67%	0,29-8,86%
Cystoisospora felis	3,33%	0,92-11,36%
C. rivolta	3,33%	0,92-11,36%
Dipylidium caninum	3,33%	0,92-11,36%
Toxocara cati	3,33%	0,92-11,36%
Taenia taeniaeformis	3,33%	0,92-11,36%
Giardia sp.	5%	1,71-13,7%
Ancylostoma *spp.*	8,33%	3.61-18,07%

4. Discussão

4.1. Tritrichomonas foetus

A tritrichomonose felina é uma parasitose sobre a qual se têm desenvolvido vários estudos nos últimos anos, desde estudos de prevalência, a descrições de casos clínicos, a tentativas de explicação da patogenia, estudos moleculares, entre outros.

Esta parasitose foi considerada uma pandemia (Tolbert *et al*., 2013), estando reportada em inúmeros países de todo o mundo, não sendo conhecida a prevalência em Portugal, apenas se sabe da existência, pelo relato de um caso clínico por Valente *et al*. (2015) e pela menção de Gomes (2015). O objetivo principal deste rastreio parasitológico é o estudo da prevalência do parasita *T. foetus* na população estudada, o qual foi atingido. Os restantes objetivos definidos para este projeto desenvolvido no âmbito da dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária também foram, na sua maioria, atingidos.

Através da realização de um questionário aos responsáveis dos gatos que integraram o estudo foi possível a caracterização da população, embora não se tenha conseguido relacionar as características questionadas com o facto de estarem infetados ou não com o parasita *T. foetus*, uma vez que apenas foi identificado um animal positivo.

Cerca de metade da população em estudo residia no concelho de Lisboa, a mesma percentagem de gatos apenas vivia no interior das suas habitações não tendo contacto com o exterior e, também,

a mesma percentagem vivia em ambiente misto. Os estudos publicados apontam para que área de localização das habitações dos gatos e viver em excluisividade no interior ou exterior ou em ambos não esteja relacionado com a infeção por *T. foetus* (Gookin *et al*., 2004; Kuehner *et al*., 2011; Tysnes *et al*., 2011;Doi *et al*., 2012; Profizi, *et al*., 2013).

A mediana de idades dos gatos que integraram este rastreio foi de um ano de idade. A maioria dos autores defende que ter idade inferior a um ano é um factor de risco para a infeção por *T. foetus* e para o desenvolvimento da doença (Gunn-Moore *et al*., 2007; Burgener *et al*., 2009; Bell *et al*., 2010; Kuehner *et al*., 2011; Profizi *et al*., 2013; Paris *et al*., 2014; Arranz-Solís *et al*., 2016), Paris *et al*. (2014) afirmam que a prevalência de infeção por *T. foetus* diminui com o aumento da idade dos gatos. Todavia alguns autores, Tysnes *et al*. (2011), Doi *et al*. (2012) e Hosein *et al*. (2013), não conseguiram demonstrar uma associação estatisticamente significativa entre a idade e a presença deste parasita.

Gray *et al*. (2010) assumem que a infeção por *T. foetus* é mais prevalente em gatos jovens machos (p=0,009), mas outros autores afirmam não existir nenhuma relação entre este parasita e o sexo do gato (Gunn-Moore *et al*, 2007; Stockdale *et al*., 2009; Burgener *et al*., 2009; Bell *et al*., 2010; Kuehner *et al*., 2011; Tysnes *et al*., 2011; Hosein *et al*., 2013; Arranz-Solís *et al*., 2016). Neste estudo estavam presentes 45% de fêmeas e 55% de machos.

Uma grande percentagem dos animais (76,67%, 46/60) não tinha uma raça definida. Vários são os estudos que apontam para que os gatos de raças puras estejam mais susceptíveis à infeção por *T. foetus* (Steiner *et al*., 2007; Gunn-Moore *et al*., 2007; Burgener *et al*., 2009; Kuehner *et al.*, 2011; Hosein *et al*., 2013; Paris *et* al., 2014), porém existe autores que afirmam não existir relação (Stockdale *et al*, 2009; Doi *et al*., 2012; Arranz-Solís *et al*., 2016).

Uma percentagem de 53,33% dos gatos rastreados partilham o seu lar com outros gatos, sendo que a maioria (37,50%) vivia apenas com mais um gato. Muitos autores assumem que este fator possa predispor à infeção pelo parasita *T. foetus* (Gookin *et al*., 2004; Burgener *et al*., 2009; Xenoulis *et al*., 2013; Paris *et al*., 2014). Hosein *et al*. (2013) assumem existir uma associação estatisticamente significativa (p<0,05) entre a prevalência do parasita *T. foetus* e habitar num local com mais de cinco gatos. Neste estudo 21,69% (13/60) dos gatos habitavam num lar com um número igual ou superior a cinco gatos. Contrariamente aos outros autores, Kuehner *et al*. (2011) no seu estudo, em gatos de raça na Alemanha, não conseguiram relacionar o facto de existência deste parasita e de os animais viverem em lares com vários gatos, tal como Tysnes et al. (2011).

É apontado por Tolbert e Gookin (2009) que a partilha da caixa de areia e a limpeza cruzada do pelo favoreçam a transmissão de trozoítos. Os responsáveis que referem ter mais do que um gato afirmam em 90,62% dos casos que os seus gatos utilizam a mesma caixa de areia e a mesma percentagem efetuam limpezas cruzadas do pelo.

Apenas 41,67% coabitava com animais de outras espécies, mas este fator parece não estar relacionado com a presença de *T. foetus* nos gatos (Kuehner *et al*., 2011; Profizi *et al*., 2013).

Em nenhum dos estudos encontrados sobre este tema foi verificado a existência de uma referência ao plano vacinal, às desparasitações internas e às doenças/afeções concomitantes como sendo ou não um fator predisponente à infeção por este parasita, todavia foram introduzidas estas perguntas nos questionários efetuados aos responsáveis pelos animais. As doenças/afeções concomitantes observadas não se encontravam diretamente relacionadas com o parasitismo por *T. foetus*.

As últimas diretrizes de vacinação afirmam que é essencial a vacinação contra o parvovírus felino, o calicivírus felino, o herpervírus felino-1 e a raiva, essencial nas zonas endémicas, sendo opcional a realização das vacinas contra FeLV, FIV, *Chlamydia felis* e *Bordotella bronchiseptica* e não recomendada a vacinação contra a peritonite infeciosa felina. Relativamente ao FeLV realçam o facto de ser recomendada a vacinação de animais com acesso ao exterior (Day, Horzinek, Schultz & Squires, 2016). Em Portugal, a Raiva está oficialmente erradicada desde o ano de 1961 (Direção Geral de Alimentação e Veterinária [DGAV], 2012) e segundo a Portaria nº81/2002 de 24 de Janeiro a vacinação antirrábica dos gatos não é obrigatória, a não ser para os gatos de exposição. Apenas 53,33% da população estudada era vacinada e destes a maioria possuía as vacinas ditas de essenciais, com exceção da anti-rábica. Não foi questionado aos proprietários se realizavam a vacina antirrábica, porém foram verificados os boletins de saúde dos animais para a resposta ao plano vacinal e nenhum apresentava esta vacina.

Apenas 23,33% dos animais em estudo não realizavam desparasitações internas, percentagem inferior à relatada por Matos, Alho, Owen, Nunes e Carvalho (2015) em animais com mais de um ano no qual se observaram que 36,4% dos gatos não eram desparasitados internamente. As moléculas mais utilizadas foram milbemicina oxima associada a praziquantel e praziquantel associado a pirantel, que continuam a ser as moléculas mais utilizadas no HE – FMV, ULisboa (Matos *et al*., 2015). É de realçar que 17,39% dos proprietários dos gatos não sabe que medicamento utilizava.

O plano de desparasitação deve ser definido pelo médico veterinário tendo em conta a epidemiologia do local em que o animal reside e o seu estilo de vida. As directizes da ESCCAP referem que se devem realizar desparasitações pelo menos trimestralmente, embora o intervalo entre desparasitações possa ser alargado se forem efetuados testes coprológicos para avaliação da carga parasitária real do animal, permitindo, ainda, a utilização de antiparasitários direcionados aos parasitas identificados (ESCCAP, 2010; Matos *et al*., 2015). A maioria (41,30%, 19/46) dos gatos incluídos no presente estudo realizava desparasitações de 6 em 6 meses.

Uma percentagem de 51,67% da amostra do estudo apresentava diarreia ou tinha história passada desta condição clínica, existindo animais com diarreia aguda e crónica, definindo-se como diarreia crónica aquela com mais de 14 dias de duração (Marks, 2013a). O sinal clínico típico da

tritrichomonose felina é a presença de diarreia com origem no intestino grosso crónica ou intermitente (Manning, 2010; Gookin, 2012; Gookin & Levy, 2015; Chaoqun & Liza, 2015). Kuehner *et al*. (2011) afirmam no seu estudo que 61% dos gatos positivos para o parasita *T. foetus* (*p*=0,027) tinham história de diarreia nos últimos 6 meses.

A diarreia aguda conduz muitos animais aos CAMV's, mas muitas vezes são episódios auto-limitantes que requerem uma terapêutica mínima e sem necessidade de recorrer a exames complementares de diagnóstico. No entanto os episódios de diarreia crónica necessitam de uma abordagem distinta, pois muitas vezes são refratários ao tratamento empírico, sendo necessário elaborar um bom plano de diagnóstico (Leib, 2005; Marks, 2013a). Porém, algumas causas de diarreia aguda necessitam de uma abordagem mais agressiva como é o caso da diarreia causada por parvovírus, obstrução intestinal e gastroenterite hemorrágica (Leib, 2005). A distinção entre diarreia com origem no intestino delgado e grosso é um elemento necessário para que se possa chegar a um diagnóstico final, baseando-se nas características da diarreia apresentadas pelos animais.

A construção de um bom plano de diagnóstico e a recolha de uma boa história pregressa será fundamental para se obter um diagnóstico definitivo correto e uma abordagem terapêutica efetiva, pois a resolução incompleta do problema conduzirá a insatisfação e frustração do proprietário e, possivelmente, sofrimento ao animal (Marks, 2013b). A combinação de todos os dados do animal (história clínica, exame físico, epidemiologia) complementado com os exames complementares de diagnóstico selecionados ponderadamente permite alcançar o diagnóstico definitivo e terapêutica adequada e efetiva (Jergens, 2005; Marks, 2013a,b). É necessário lembrar que algumas das causas de diarreia podem ter origem secundárias, i. e., não terem origem no sistema gastrointestinal, como por exemplo hipertiroidismo (Marks, 2013b).

Foi referido, pelos responsáveis, que três dos animais em estudo viajavam frequentemente para os arquipélagos portugueses. No entanto, Hosein *et al*. (2013) referem não existir uma relação estatisticamente significativa entre os animais viajarem e estarem parasitados por *T. foetus*.

Foi verificado que dois gatos tinham alterações no hemograma recente, sendo verificado eosinofilia. A eosinofilia está associada a parasitoses, mas em nenhum deles foi identificado parasitas nas técnicas laboratoriais efetuadas. Outros diagnósticos diferenciais para a eosinofilia são doenças imunomediadas (como atopia, asma, complexo granulomatoso eosinofílico, entre outras) infeções bacterianas e fúngicas e neoplasias (leucemia neutrofílica e tumores associados a eosinofilia como fibrossarcoma e linfoma) (Gough, 2007).

Para a realização deste rastreio do parasita *T. foetus* foi utilizado como método de pesquisa o *Gold Standard*, o meio de cultura InPouch^{TM}TF – Feline, (BIOMED, 2012b; Ceplecha *et al*., 2013; Lappin, 2014) e para colheita da amostra fecal realizaram-se lavagens de cólon, o método considerado por

Gookin e Dybas (2009) como o método de eleição. Apenas um animal dos 60 testados foi positivo para *T. foetus* sendo a prevalência no rastreio de 1,67% (IC de 95%: 0,29-8,86%; N=60).

Algumas hipóteses podem ser levantadas quanto à razão da existência de uma prevalência tão baixa na amostra estudada, como por exemplo a população alvo, técnica de pesquisa utilizada, a sensibilidade do teste e problemas na execução, que serão especificadas seguidamente.

As prevalências reportadas deste parasita são muito variadas oscilando de 0% (Bissett *et al*., 2009; van Doorn, de Bruin, Jorritsma, Ploeger, & Schoormans, 2009; Mugnaini *et al*., 2012; Queen, Marks, & Farver, 2012; Hosein *et al*., 2013; Raab, Greenwood, Vanderstichel & Gelens, 2016) a 82% (Kingsbury *et a*l., 2010), estas variações devem-se, provavelmente, às populações em estudo e às técnicas de pesquisa utilizadas serem distintas entre os diversos estudos de prevalência realizados. As prevalências mais elevadas são observados nos estudos realizados com gatos de raça em exposições, Kingsbury *et al*. (2010) reportam 82% em gatos numa exposição na Nova Zelândia e Gookin *et al*. (2004) reportam 31% em gatos numa exposição internacional felina nos EUA e com gatos com diarreia crónica provinientes de ambientes de mais do que um gato, Arranz-Solís *et al*. (2016) reportaram 38,7% num estudo realizado em Espanha com esta população alvo. Como exemplo da variação das prevalências desta parasitose com a população alvo, pode observar-se as variações que ocorreram num estudo conduzido por Hosein *et al*. (2013) no Sul de Ontário, Canadá, onde foi observado uma prevalência de 23,6% em gatos de exposições felinas, 0,7% em gatos que foram consultados numa clínica veterinária e 0% em gatos de um abrigo de animais. O presente rastreio foi realizado com animais presentes a consulta no HE – FMV, ULisboa, não havendo nenhum animal de exposição e apenas 36,67% dos gatos apresentava diarreia na altura da colheita, dos quais 54,56% (12/22) apresentava diarreia crónica, estas características da amostra poderão ter conduzido à baixa prevalência detetada.

As diferentes técnicas de identificação de *T. foetus* podem conduzir a resultados distintos utilizando a mesma amostra, existindo estudos de prevalência onde se pode verificar essas diferenças: Gookin *et al*. (2004) afirmam que identificaram 5 animais no total de 36 amostras positivas com exame direto, 9/36 com meio de cultura Diamond modificado, 20/36 com InPouch^{TM}TF – Feline e 34/36 com PCR e Kingsbury *et al*. (2010) concluíram que 3/22 eram positivas com o meio de cultura (InPouch^{TM}TF – Feline) e 18/22 eram positivas utilizando PCR.

Devido às diferenças demonstradas anteriormente apenas se poderá comparar os resultados observados no presente rastreio parasitológico realizado com estudos que tenham sido realizados tendo uma população alvo semelhante (gatos presentes a consulta) e utilizando o mesmo método de deteção do parasita *T. foetus* (InPouch^{TM}TF – Feline). A prevalência de 1,67% no rastreio parasitológico é bastante semelhante à obtida num estudo no Japão realizado por Doi *et al*. (2012) onde foi relatada a prevalência de 1,72% (1/58) com os meios de cultura InPouch^{TM}TF - Feline, embora a prevalência final de todo o estudo tenha sido de 8,8%, uma vez que se analizaram 147

amostras recorrendo a métodos distintos de identificação do parasita (PCR e dois meios de cultura diferentes). Assim, a prevalência calculada tem por base a combinação de todos os resultados obtidos pelas diferentes técnicas de identificação.

A prevalência registada neste rastreio parasitológico foi superior à prevalência de 0% em Itália descrita por Mugnaini *et al*. (2012) e 0,7% (1/140) observada em amostras colhidas numa clínica veterinária do Sul de Ontário, Canadá (Hosein *et al*., 2013). Contudo, existem estudos que relatam prevalências superiores, nomeadamente: 10% (17/77) em gatos consultados nos EUA (foi realizado PCR nos meios de cultura para confirmar a presença de *T. foetus*) (Stockdale *et al*., 2009) 7,3% (10/135) na Polónia (Chaoqun & Liza, 2015), 2,5% (1/40) na Áustria (Hinney *et al*., 2015) e 20% (1/5) na Ilha do Príncipe Eduardo, Canadá (Raab *et al*., 2016). Algumas das diferenças observadas nas prevalências referidas poderão estar relacionadas com as diferenças de dimensão da população em estudo, visto existirem estudos realizados com apenas 5 animais (Raab *et al*., 2016) e outros com 273 (Mugnaini *et al*., 2012), o presente estudo contou com uma amostra de 60 gatos. Embora o meio de cultura seja considerado o método *Gold Standard* (Ceplecha *et al*., 2013; Lappin, 2014), não é o método com a maior sensibilidade, havendo sensibilidades diferentes descritas por vários autores: Gookin e Dybas (2009) afirmam ser de 55% e Chaoqun e Liza (2015) de 58,8%. O método de pesquisa que tem maior sensibilidade para a deteção do agente etiológico da tritrichomonose felina é o PCR (Gookin & Levy, 2015).

Para além das diferentes sensibilidade descritas pelos diferentes autores para o meio de cultura InPouch^{TM}TF – Feline, Gookin et al. (2003) afirmam ser necessário 1000 trofozoítos por 0,05g de fezes para se que seja possível a detecção de *T. foetus*, mas que na ausência de material fecal basta 1 trofozoíto para que seja possível. Embora, os fabricantes deste meio afirmam ser apenas necessário a presença de um a dez trofozoítos no inoculado para que se obtenha um resultado positivo (BIOMED, 2012b), sem especificar se está ou não presente material fecal. Por esta mesma razão, caso algum dos gatos tivesse a eliminar um pequeno número de trofozoítos, o teste não teve capacidade para os detectar, é de salientar que com a lavagem de colón foi possível reduzir a quantidade de matéria fecal presente na amostra inoculada.

É de realçar que as três primeiras culturas foram realizadas de acordo com Gookin e Dybas (2009) (inoculando uma gota no meio de cultura InPouch^{TM}TF – Feline). No entanto, os resultados não foram os esperados devido a uma elevada produção de gás. Após contacto com a investigadora Jody Gookin foi possível a realização da inoculação do lavado de cólon no meio de cultura InPouch^{TM}TF – Feline com a técnica correta, uma vez que esta não está publicada explicitamente, embora esteja descrita a sua utilização (Gookin & Dybas, 2009; Tolbert & Gookin, 2009; Gookin, 2012; Steiner, 2013; Gookin & Levy, 2015).

Apesar de um dos meios de cultura ter sido inoculado de forma correta (técnica descrita em 2.5.1.2 do capítulo III) ocorreu a produção de grande quantidade de gás, possivelmente devido ao

sobrecrescimento de bactérias presentes na amostra, tal como está descrito o desenvolvimento de bactérias contaminantes da microbióta do semegma bovino no meio de cultura equivalente para a pesquisa de *T. foetus* bovino (InPouch^{TM}TF – Bovine, Biomed Diagnostics). Nos casos descritos nesse estudo verificou-se a formação de gás na bolsa do meio de cultura, que levou à alteração do pH do meio, à diminuição dos nutrientes disponíveis e acumulação dos metabolitos de excreção das bactérias provocando alterações na morfologia e motilidade dos trofozoítos de *T. foetus* bovinos, tendo estes uma replicação mais lenta ou, até mesmo, a perda de viabilidade (Clothier, Villanueva, Torain, Hult & Wallace, 2015). Embora na composição destes meios de cultura estejam presentes fatores de inibição de crescimento bacteriano, de leveduras e fúngico, poderão não ser suficientes para contaminações elevadas (BIOMED, 2012a; BIOMED diagnostics, 2013; Clothier *el at*., 2015).

Sabe-se que o meio de cultura InPouch^{TM}TF – Feline permite o desenvolvimento do parasita *P. hominis* (Ceplecha *et al*., 2013 e BIOMED diagnostics, 2013), um protozoário comensal do trato digestivo dos gatos (Mostegl *et al*., 2012), porém é pouco frequente, sendo recomendado para a sua distinção a realização de PCR (Ceplecha *et al*., 2013 e BIOMED diagnostics, 2013). Neste estudo não se procedeu à técnica de identificação molecular para certificar que os trofozoítos pertenciam à espécie *T. foetus*, todavia foram realizados esfregaços a partir do meio de cultura positivo e corados com a técnica de Giemsa de forma a avaliar as características morfológicas.

Foi possível a visualização de trofozoítos com um corpo em forma de pera com um comprimento de 10µm, com a presença de três flagelos anteriores, de uma membrana ondulante, e um flagelo posterior (Figura 1-(b)), coincidentes com as características morfológicas descritas para os trofozoítos de *T. foetus* (Levy *et al*., 2003;Tolbert & Gookin, 2009; ESCCAP, 2011 e Walden *et al*., 2013), a principal diferença entre os trofozoítos de *T. foetus* e *P. hominis* é, que os últimos, apresentam 5 flagelos anteriores (Levy *et al*., 2003; Gookin, 2012; dos Santos *et al*., 2015), característica não observada no presente trabalho.

O meio de cultura InPouch^{TM}TF – Feline foi detetado como positivo ao fim do 10º dia após inoculação e incubação na estufa a 37ºC, embora Gookin *et al*. (2003) e Gookin e Levy (2015) afirmam que uma das vantagens da incubação na estufa a 37ºC seja o rápido desenvolvimento dos trofozoítos, sendo esperado um resultado ao fim de três dias. Mas, está recomendada a avaliação diária deste meio de cultura até ao 12º dias após inoculação (Gookin *et al*., 2003; Helps & Tasker, 2010; BIOMED diagnostics, 2013).

É de realçar que os trofoziítos mantiveram a sua motilidade até ao 37º dia após diagnóstico do meio de cultura como positivo.

Os gatos parasitados com *T. foetus* podem apresentar diarreia crónica ou intermitente de intestino grossso, ou não demonstrarem quaisquer sinais clínicos, principalmente gatos mais velhos (Manning, 2010; Gookin, 2012; Gookin & Levy, 2015; Chaoqun & Liza, 2015). O único caso positivo

para a presença de *T. foetus* neste rastreio foi de um gato sem diarreia (sinal clínico típico). Sabe-se que existe uma maior prevalência de gatos com menos de 12 meses de idade com diarreia aquando desta parasitose (International Cat Care, 2014), porém, no presente estudo o gato positivo tinha três anos de idade.

O gato no qual foi detetado o parasita era de raça Abissínio, sendo que muitas vezes o facto de os gatos serem de raças puras ou originados dos seu cruzamentos é indicado como um fator de predisposição para a tritrichomonose felina ou infeção com este parasita (Steiner *et al*., 2007; Burgener *et al*., 2009; Bell *et al*., 2010; Hosein *et al*., 2013; Paris *et al*., 2014). Foi apontado no estudo de Gunn-Moore *et al*. (2007) a possibilidade da existência de fatores genéticos que predisponham à infeção por *T. foetus*, mas com a ressalva da infeção poder estar relacionada com o maneio a que os gatos de raça pura estão sujeitos nos gatis de criação conduzir à infeção dos animais (densidade populacional e medidas de higiene). Em um estudo realizado na Alemanha concluíu-se que havia uma relação estatiscamente significativa (p<0,001) entre a raça Bosques da Noruega e infeção por *T. foetus*, não sendo possível verificar esta correlação com mais nenhuma raça (Kuehner *et al*., 2011).

A co-infeção entre *T. foetus* e outros parasitas é bastante frequente (Chaoqun & Liza, 2015), estando relatadas diversas combinações, como *Giardia* sp. (Gookin *et al*., 2004; Steiner *et al*., 2007; Burgener *et al*., 2009; Stockdale *et al*., 2009, Bell *et al*., 2010; Polak *et al*., 2014; Paris *et al*., 2014), *Cryptosporidium* spp. (Stockdale *et al*., 2009; Kuehner *et al*., 2011), *Cystoisospora* spp. (Stockdale *et al*., 2009; Kuehner *et al*., 2011), *Pentatrichomonas hominis* (Mostegl *et al*., 2012; dos Santos *et al*., 2015) e nemátodes (Gookin *et al*., 1999; Stockdale *et al*., 2009; Bell *et al*., 2010), situação esta que não foi verificada no rastreio realizado.

Este felino coabitava com outros dois gatos, como anteriormente foi afirmado, vários autores Gookin *et al*. (2004), Burgener *et al*. (2009), Xenoulis *et al.* (2013), Hosein *et al*. (2013) e Paris *et al*., 2014), assumem ser um fator de risco para a infeção por este parasita.

Os seus coabitantes foram testados sendo o seu resultado negativo, embora partilhassem a caixa de areia, comportamento referido como favorecedor da transmissão de trofozoítos entre gatos Tolbert & Gookin, 2009; Tysnes *et al*., 2011). Sabe-se que os trofozoítos são viáveis durante sete dias à temperatura ambiente nas fezes de gato (Hale *et al*., 2009), todavia Rosypal *et al*. (2012) afirmam não existir viabilidade dos trofozoítos no caixa de areia e Kuehner *et al.* (2011) assumem que no seu estudo não foi possível relacionar estatisticamente o número de gatos por caixa de areia e a presença de doença.

Embora se saiba que este animal possa constituir uma de fonte infeção para os outros gatos com quem coabita não foi instituída nenhuma terapêutica, uma vez que apenas está recomendada a realização de terapêutica farmacológica a animais sintomáticos (ABCD CatsVets, 2015) e, é de realçar, os efeitos secundários associados à terapêutica de eleição traduzidos em: efeitos

neurotóxicos e alterações gastrointestinais (Rosado *et al*., 2007; Tolbert & Gookin, 2009; Plumb, 2015). O tratamento de eleição consiste na administração oral de ronidazol na dose de 30mg/kg, a cada 24 horas durante 14 dias (Tolbert & Gookin, 2009; Helps & Tasker, 2010; Xenoulis *et al*., 2013; Gruffydd-Jones *et al*., 2013; Gookin & Levy, 2015; Grellet *et al*., 2015). Têm sido realizados estudos para a criação de um revestimento à base de goma de guar (Papich *et al.,* 2012; Grellet *et al*., 2015) e, mais recentemente, de 75% de quitosana e 25% de aminoácido dianídrico pirometílico (Kavianinia *et al*., 2016) para tentar reduzir a neurotoxicidade associada ao fármaco de eleição, permitindo uma libertação apenas ao nível do colón. Muito recentemente Tolbert *et al*. (2016) e Singh *et al*. (2016) sugerem, respetivamente, a utilização agentes inibidores da cisteína protease e de carbohidratos inibidores das lectinas, moléculas envolvidas na patogenia de *T. foetus*, como possibilidade de virem a constituir um futuro tratamento contra este parasita.

As indicações dadas aos seus responsáveis foram a realização de medidas higio-sanitárias do meio ambiente utilizado pelo gato, se possível, evitar a partilha da caixa de areia e, idealmente, o isolamento do animal positivo de forma a eliminar a hipótese de transmissão do parasita aos outros gatos (Marks, 2010; Manning, 2010; ESCCAP, 2011; Rothrock, 2014; Companion Animal Parasite Council,, 2015).

Deverá ser evitado o contacto deste gato com pessoas imunodeprimidas, uma vez que já foram descritas várias infeções oportunistas por *T. foetus*, embora naquelas em que se tenha avaliado geneticamente a sua origem se tenha concluido terem origem bovina (Okamoto *et al*., 1998; Duboucher *et al*., 2006; Manning, 2010; Zalonis *et al.*, 2011; ESCCAP, 2011; Suzuki *et al*., 2016).

4.2. Outros Parasitas

Os outros parasitas identificados no rastreio parasitológico de *T. foetus* foram os seguintes: *A. abstrusus*, *Ancylostoma* spp., *C. felis*, *C. rivolta, D. caninum, Giardia* sp., *T. cati, T. leonina* e *T. taeniaeformis*. Verificou-se algumas co-infeções entre as quais: *T. taeniaeformis* e um ovo de oxiurídeo, considerado como um pseudoparasita, uma vez que não está descrito em gatos, podendo estar presente devido aos hábitos caçadores do felino (Bowman, 2014); *D. caninum*, *C. rivolta* e *Ancylostoma* spp.; *T. taeniaeformis*, *Ancylostoma* spp. e *T. cati*; *Ancylostoma* spp., *T. cati* e *Giardia* sp. (Anexo VII), todos estes parasitas estão reportados em estudos realizados em Portugal (Payo-Puente *et al*., 2008; Duarte *et al*., 2010; Ferreira *et al*., 2011; Waap, Gomes & Nunes, 2013), todavia as populações estudadas são gatos de rua ou de abrigo sendo por isso difícil de comparar as prevalências entre esses estudos e o presente rastreio, uma vez que as populações estudadas são populações mais susceptíveis a parasitoses, estando possivelmente a prevalência sobrestimada.

É importante referir que alguns destes parasitas têm carácter zoonótico, entre os quais *Giardia* sp., estando associada a diarreia. Porém o reservatório mais importante para os humanos é a própria população humana (The Center for Food Security & Public Health [CFSPH), 2012), sendo afirmado

pela ESCCAP (2011) não existirem evidências da transmissão deste parasita pelos gatos ao Homem. No que se refere a *T. cati* encontra-se associado à larva *migrans* visceral e ocular (CFSPH, 2013b) e *Ancylostoma spp.*, parasita zoonótico, provocando a larva *migrans* cutânea, contudo é rara a sua ocorrência (CFSPH, 2013a,b)

O produto da lavagem de cólon apenas está descrito para a pesquisa de *T. foetus* (Gookin & Dybas, 2009; Tolbert & Gookin, 2009; Gookin, 2012; Gookin & Levy, 2015), mas neste projeto foi avaliado de uma forma mais abrangente, através do método flutuação de Willis e de esfregaço direto.

A avaliação macroscópica da amostra recolhida pela lavagem de cólon permitiu observar em quatro amostras proglotes, que após identificação foram classificados com pertencentes à espécie *D. caninum* e *T. taeniaeformis*. Na flutuação observou-se oocistos de *C. rivolta*, ovos de *T. leonina* e larvas L1 de *A. abstrusus* e num dos esfregaços a presença de quistos de *Giardia* sp. (Anexo VII). Esta análise permitiu verificar que os resultados obtidos da análise do lavado de cólon e das amostras de fezes de 3 dias não são coincidentes, mas sim complementares pois houve parasitas distintos observados no mesmo animal com recurso às diferentes técnicas (Anexo VII). É de realçar que nos dois animais parasitados por *D. caninum* apenas foi observado o parasita na amostra obtida pela lavagem de cólon, o contrário, também é válido, uma vez que foram vários animais diagnosticados como parasitados por *Ancylostoma* spp. através das amostras de fezes naturalmente eliminadas em 3 dias consecutivos e em nenhuma amostra de lavado de cólon desses animais foi observado esse tipo de ovos, tal como para *T. cati*. Apenas num dos animais positivos para *C. rivolta* e *Giardia* sp. os resultados foram coincidentes nos dois tipos de amostras obtidas pelas duas técnicas colheita distintas utilizadas (Anexo VII).

Por estas razões considera-se que o produto da lavagem de cólon deve ser analisado em simultâneo com amostras fecais eliminadas naturalmente em 3 dias consecutivos e por diferentes técnicas laboratoriais por forma a obter um diagnóstico muito mas abrangente.

Todos os animais foram submetidos a terapêutica adequada contra as parasitoses diagnosticadas.

Conclusão e perspetivas futuras

O estágio curricular no HE – FMV, ULisboa permitiu adquirir e desenvolver conhecimentos e competências fundamentais, principalmente a nível prático, na área da Clínica de Animais de Companhia, mais especificamente na interação entre o médico veterinário e o cliente, medicina interna e outras especialidades, internamento, métodos complementares de diagnóstico e cirurgia.

O desenvolvimento do rastreio parasitológico permitiu executar diversas técnicas no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Sanidade Animal da FMV, ULisboa, fundamental para o desenvolvimento profissional, pelo desenvolvimento de prática laboratorial e conhecimento na realização de técnicas coprológicas e identificação de parasitas gastrointestinais.

Muitos estudos têm sido realizados nos últimos anos sobre o parasita *T. foetus* levando a um conhecimento cada vez mais amplo sobre esta parasitose, tornando-a numa doença com maior relevâncias clínica, porém, em Portugal, muitas vezes é esquecido como um potencial diagnóstico diferencial de animais com diarreia crónica ou intermitente de intestino grosso, pois pouco se sabe da doença no território português.

Este rastreio parasitológico permitiu concluir que na população estudada a prevalência do parasita *T. foetus* foi de 1,67% (IC de 95%: 0,29-8,86%; N=60), utilizando como técnica de pesquisa o meio de cutura InPouch^{TM} TF – Feline, usando como amostra o produto da lavagem de colón.

Foi possível verificar que a técnica de colheita de amostra fecal por lavagem de cólon, não tem apenas aplicabilidade na observação de trofozoítos de *T. foetus*, podendo ser utilizada para a observação de outros tipos de parasitas gastrointestinais e pulmonares.

Considera-se pertinente a realização de outros estudos em território nacional com o objetivo de estudar a prevalência desta parasitose em amostras de maiores dimensões, bem como em populações com maior probabilidade de os animais estarem parasitados, como por exemplo exposições felinas, de forma a comparar com as prevalências conhecidas nos outros países. Para além disso, seria importante a realização de estudos em associação com outros países, de forma estudar uma população felinos mais abrangente, para que se compreendam quais os fatores de risco epidemiológico desta doença parasitária.

Seria também de extrema importância o desenvolvimento de uma terapêutica farmacológica mais efetiva e segura para os gatos, uma vez que as que se encontram disponíveis não estão homologadas para a utilização em gatos e apresentam efeitos secundários graves.

É importante referir que a divulgação de informação sobre este parasita à comunidade médico-veterinária é fundamental para o diagnóstico e tratamento dos animais que estejam parasitados.

Bibliografia

ABCD CatsVets. (2015). *European Advisory Board on Cat Diseases, ABCD*: *Tritrichomoniasis*. Acedido em 9 de Junho de 2016, disponível em: http://www.abcdcatsvets.org/tritrichomoniasis/

Arranz-Solís, D., Pedraza-Díaz, S., Miró, G., Rojo-Montejo, S., Hernández, L., Ortega-Mora, L. M. & Collantes-Fernández, E. (2016). *Tritrichomonas foetus* infection in cats with diarrhea from densely housed origins. *Veterinary Parasitology,* 221: 118-122.

Bell, E. T., Gowan, R. A., Lingard , A. E., McCoy, R. J., Šlapeta, J., & Malik, R. (2010). Naturally occurring *Tritrichomonas foetus* infections in Australian cat: 38 cases. *Journal of Feline Medicine and Surgery,* 12: 889-898.

BIOMED. (2012a). *InPouch^{TM}TF - Tritrichomonas foetus Test.* Acedido em 6 de Julho de 2016, disponível em: http://biomeddiagnostics.com/resources/files/100-005%20InPouch-TF%20Insert%20Rev%20H.pdf

BIOMED. (2012b). *InPouch^{TM} TF Feline (Tritrichomonas foetus Feline).* Acedido em 1 de Junho de 2016, disponível em: http://biomeddiagnostics.com/resources/files/InPouch%20TF%20Feline.pdf

BIOMED diagnostics. (2013). *InPouch^{TM} TF - Feline, Tritrichomonas foetus Test.* Acedido em 1 de Junho de 2016, disponível em: http://biomeddiagnostics.com/resources/files/100-159%20TF%20Feline%20Insert%20Rev%20%20E.pdf

Bissett, S. A., Stone, M. L., Malik, R., Norris, J. M., O'Brien, C., Mansfield, C. S., Nicholls, J. M., Griffin, A. & Gookin, J. L. (2009). Observed occurrence of *Tritrichomonas foetus* and other enteric parasites in Australian cattery and shelter cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery,* 11: 803-807.

Bowman, D. D. (2014). *Georgis's Parasitology for Veterinarians* (10th ed.). Missouri: Elsevier.

Bowman, D. D., Fogarty, E. A. & Barr, S. C. (2002). *Parasitology - Diagnosis and Treatment of Common Parasitisms in Dogs and Cats.* Jackson: Teton NewMedia.

Burgener, I. A., Frey, C. F., Hook, P. H. & Gottstein, B. (2009). *Tritrichomonas foetus*: A new intestinal parasite in Swiss cats. *Schweiz. Arch. Tierheilk,* 151 (nº8): 383-389.

Casemore, D. O., Armstrong, M., & Sands, R. L. (1985). *Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis*.

Journal of Clinical Pathology, 38, 1337-1341.

Castro, C., Menna-Barreto, R. F., Fernandes, N. d., Saboia-Vahia, L., Dias-Lopes, G., Britto, C., Cuervo, P. & Jesus, J. B. (2016). Iron-modulated pseudocyst formation in *Tritrichomonas foetus*. *Parasitology,* 143(nº8): 1034-1042.

Ceplecha, V., Svoboda, M., Čepička, I., Husník, R., Horáčková , K. & Svobodavá, V. (2013). InPouch^{TM} TF-Feline medium is not specific for *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary Parasitology,* 196: 503-505.

Chaoqun, Y. & Liza, S. K. (2015). *Tritrichomonas foetus* infection, a cause of chronic diarrhea in the domestic cat - Review. *Veterinary Research,* 46 (nº35).

Clothier, K. A., Villanueva, M., Torain, A., Hult, C. & Wallace, R. (2015). Effects of bacterial contamination of media on the diagnosis of *Tritrichomoans foetus* by culture and real-time PCR. *Veterinary Parasitology,* 208: 143-149.

Companion Animal Parasite Council. (2015). *Current Advice on Parasite Control: Intestinal Parasites - Trichomonisasis*. Acedido em 9 de Junho de 2016, disponível em: http://www.capcvet.org/capc-recommendations/trichomoniasis

DąbroWska, J., Karamon, J., KochanoWski, M., JędrYcko, R. & Cencek, T. (2015). *Tritrichomonas foeutus* infection in cat - first detection in Poland. *Acta Parasitologica,* 60 (nº4): 605-608.

Dahlgren, S. S., Gjerde, B. & Pettersen, H. y. (2007). First record of natural *Tritrichomonas foetus* infection of the feline uterus – Case Report. *Journal of Small Animal Practice ,* 48: 654-657.

Day, M. J., Horzinek, M. C., Schultz, R. D. & Squires, R. A. (2016). Guidelines for the Vaccination of Dogs and Cats - Compiled by the Vaccination Guidelines Group (VGG) of the World Small Animal Veterinary Association (WSAVA). *Journal of Smalll Animal Practice,* 57.

Direção Geral de Alimentação e Veterinária [DGAV]. (2012). *Raiva - Plano de Contigência, Portugal.* Acedido em 12 de Julho de 2016, disponível em: http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=3667466&generico=150515&cboui=150515

Direção Geral de Alimentação e Veterinária. (n. d.). *MedVet - Base de Dados de Medicamentos, Produtos e Biocidas de uso Veterinário*. Acedido em 8 de Junho de 2016, disponível em: http://medvet.dgav.pt/Listagem?substancia=Ronidazol&count=10

Doi, J., Hirota, J., Morita, A., Fukushima, K., Kamijyo, H., Ohta, H., Yamasaki, M., Takahashi, T., Katakura, K. & Oku, Y. (2012). Intestinal *Tritrichomonas suis* (=*T. foetus*) Infection in Japanese Cats. *J. Vet. Med. Sci.,* 74 (nº4): 413-417.

dos Santos, C. S., de Jesus, V. L., McIntosh, D., Berto, B. P. & Lopes, C. W. (2015, Dezembro). Co-infection by *Tritrichomonas foetus* and *Pentatrichomonas hominis* in asymptomatic cats. *Pesq. Vet. Bras.,* 35 (nº12*)*: 981-989.

Duarte, A., Castro, I., Fonseca, I. M., Almeida, V., Carvalho, L. M., Meireles, J., Fazendeiro, M. I., Tavares, L. & Vaz, Y. (2010). Survey of infectious and parasitic diseases in stray cats at the Lisbon Metropolitan Area, Portugal. *Journal of Feline Medicine and Surgery,* 12: 441-446.

Duarte, R. P., Nakamura, A. A., Viol, M. A., Silva, J. E., Rocha, P. R., Meireles, M. V. & Machado, G. F. (2015). The Occurrence of *Tritrichomonas foetus* in Brazilian Cats. *International Cat Care Vets 2015 European Congress: Feline Dermatology and Haematology - Scientific Proceddings, Porto 1-5 July* (p. 135). Porto: international cat care.

Duboucher, C., Caby, S., Dufernez, F., Chabé, M., Gantois, N., Delgado-Viscogliosi, P., Billy, C., Barré, E., Torabi, E., Capron, M., Pierce, R. J., Dei-cas, E. & Viscogliosi, E. (2006). Case Reports - Molecular identification of *Tritrichomonas foetus*-like organismos as coinfecting agents of human *Pneumocystis* pneumonia. *Journal of Clinical Mocrobiology,* 44 (nº3): 1165-1168.

European Centre for Disease Prevention and Control [ecdc]. (2012). *European Centre for Disease Prevention and Control: Definition of a Pandemic*. Acedido em 16 de Maio de 2016, disponível em: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/pandemic_preparedness/basic_facts/Pages/definition_of_pandemic.aspx

European Scientific Counsel Companion Animal Parasites [ESCAAP]. (2010, September). *Worm Control in Dogs and Cats - ESCAAP Guideline 01.* 2nd Edition. Worcestershire: ESCCAP.

European Scientific Counsel Companion Animal Parasites [ESCAAP]. (2011). *ESCCAP Guidelines 06: Control of Intestinal Protozoa inDogs and Cats.* Worcestershire: ESCCAP.

Ferreira, F. S., Pereira-Baltasar, P., Parreira, R., Padre, L., Vilhena, M., Tavira, L. T., Atouguia, J. & Centeno-Lima, S. (2011). Intestinal parasites in dogs and cats from the district of Évora, Portugal. *Veterinary Parasitology,* 179: 242-245.

Foster, D. M., Gookin, J. L., Poore, M. F., Stebbins, M. E. & Levy, M. G. (2004). Outcome of cats with diarrhea and *Tritrichomonas foetus* infection. *Journal of the American Veterinary Medical Association,* 225 (nº6): 888-892.

Frey, C. F. & Müller, N. (2012). *Tritrichomonas* - Systematics of an enigmatic genus. *Molecular and Cellular Probes,* 26: 132-136.

Frey, C. F., Schild, M., Hemphill, A., Stünzi, P., Müller, N., Gottstein, B. & Burgener, I. A. (2009). Intestinal *Tritrichomonas foetus* infection in cats in Switzerlan detected by in vitro cultivation and PCR. *Parasitol Res,* 104: 783-788.

Gomes, T. R. V. (2015). *Clínica de animais de companhia*. Relatório de estágio do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Évora:Escola de Ciências e Tecnologias – Departamento de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.

Gookin, J. (2009). *Tritrichomonas foetus* - An Emerging Cause of Feline Diarrhea. *19th Europian College of Veterinary Internal Medicine-Companion Animals Congress*, (pp. 52-54). Porto.

Gookin, J. L. (2012). Trichomoniasis. In Greene, C. E., *Infectious Diseases of the Dog and Cat* (4th ed.). (pp. 797-801). Missouri: Elsevier.

Gookin, J. L. & Dybas, D. (2009). *An Owners Guide To Diagnosis and Treatment of Cats Infected with Tritrichomonas foetus.* Acedido em 31 de Maio de 2016, disponível em: https://cvm.ncsu.edu/wp-content/uploads/2016/05/ownersguide-to-feline-t-foetus.pdf

Gookin, J. L. & Levy, M. G. (2015). Trichomonosis. In Beugnet, F. & Halos, L., *Parasitoses & Vector Borne Diseases of Cats* (pp. 57-65). Lyon: Merial.

Gookin, J. L., Birkenheuer, A. J., Breitschwerdt, E. B. & Levy, M. G. (2002). Single-Tube Nested PCR for Detection of *Tritrichomonas foetus* in Feline Feces. *Journal of Clinical Microbiology,* 40 (nº11): 4126-4130.

Gookin, J. L., Birkenheuer, A. J., John, V. S., Spector, M. & Levy, M. G. (2005). Molecular characterization of Trichomonads from feces of dogs with diarrhea. The *Journal of Parasitology,* 91 (nº4): 939-943.

Gookin, J. L., Breitschwert, E. B., Levy, M. G., Gager, R. B. & Benrud, J. G. (1999). Diarrhea associated with trichomonosis in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association,* 215 (nº10): 1450-1454.

Gookin, J. L., Copple, C. N., Papich, M. G., Poore, M. F., Stauffer, S. H., Birkenheuer, A. J., Twedt, D. C. & Levy, M. G. (2006). Efficacy of Ronidazol for Treatment of Feline *Tritrichomonas foetus* Infection. *J Vet Intern Med,* 20: 536-543.

Gookin, J. L., Foster, D. M., Poore, M. F., Stebbins, M. E. & Levy, M. G. (2003). Use of a commercially available culture system for dianosis of *Tritrichomonas foetus* infection on cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association,* 222 (nº10): 1376-1379.

Gookin, J. L., Levy, M. G., Law, J. M., Papich, M. G., Poore, M. F. & Breitschwerdt, E. B. (2001). Experimental infection of cats with *Tritrichomonas foetus*. *American Journal of Veterinary Research,* 62 (nº11): 1690-1697.

Gookin, J. L., Stauffer, S. H., Coccaro, M. R., Poore, M. F., Levy, M. G. & Papich, M. G. (2007a). Efficacy of tinidazole for treatment of cats experimentally infected with *Tritrichomonas foetus*. *American Journal of Veterinary Research,* 86 (nº10).

Gookin, J. L., Stauffer, S. H. & Levy, M. G. (2007b). Identification of *Pentatrichomonas hominis* in feline fecal samples by polymerase chain reaction assay. *Veterinary Parasitology,* 145: 11-15.

Gookin, J. L., Stauffer, S. H., Dybas, D. & Cannon, D. H. (2010a). Documentation of *in vivo and in vitro* aerobic resistance of feline *Tritrichomonas foetus* isolates to ronidazol - Brief Comminication. *J Vet Intern Med,* 24: 1003-1007.

Gookin, J. L., Stone, M. R., Yaeger, M. R., Meyerholz, D. K. & Moisan, P. (2010b). Fluorescence *in situ* hybridization for identification of *Tritrichomonas foetus* in formalin-fixed and paraffin-embedded histological specimens of intestinal trichomonosis. *Veterinary Parasitology,* 172: 139-143.

Gookin, J. L., Stebbins, M. E., Hunt, E., Burlone, K., Fulton, M., Hochel, R., Tlaat, M., Poore, M. & Levy, M. G. (2004). Prevalence of and risk factors for feline *Tritrichomonas foetus* and *Giardia* infection. *Journal of Clinical Microbiology,* 42 (nº6): 2707-2710.

Gough, A. (2007). *Differential Diagnosis in Small Animal Medicine.* Osford: Blackwell Publishing.

Gray, S. G., Hunter, S. A., Stone, M. R. & Gookin, J. L. (2010). Assessment of reproductive tract disease in cats at risk for *Tritrichomonas foetus infection*. *American Journal of Veterinary Research,* 71 (nº1): 76-81.

Grellet, A., Makhlouf, S. E., Desquilbet, L., Hovhannessian, F., Boogaerts, C., Dore, V., Anthony, M., Esoana, B., Prouillac, C., Kirilov, P., Polack, B. & Perrot, S. (2015). Efficacy of guar gum-based ronidazol capsules as a treatment for *Tritrichomonas foetus* intection in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*.

Gruffydd-Jones, T., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Hartmann, K., Hosie, M. J., Lloret, A., Marsilo, F., Mõsti, K., Pennisi, M. G., Radford, A. D., Thiry, E., Truyen, U. & Horzinek, M. C. (2013). Tritrichomoniasis in Cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery,* 15: 647-649.

Gunn, A. & Pitt, S. J. (2012). Parasitology - An Integrated Approach. Hoboken: Wiley-Blackwell.

Gunn-Moore, D. A., McCann, T. M., Reed, N., Simpson, K. E. & Tennant, B. (2007). Prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection in cats with diarrhoea in the UK. *Journal of Feline Medicine and Surgery,* 9: 214-218.

Hale, S., Norris, J. M. & Šlapeta, J. (2009). Prolonged resilience of *Tritrichomonas foetus* in cat faeces at ambient temperature. *Veterinary Parasitology,* 166: 60-65.

Hardy Diagnostics. (s. d.). *Modified Diamonds Medium*. Acedido em 1 de Junho de 2016, disponível em: https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/ModDiamondsMed.htm

Helps, C. & Tasker, S. (2010). *Tritrichomonas foetus* in cats. *Veterinary Times,* 40 (nº27). Acedido em 31 de Maio de 2016, disponível em: http://www.langfordvets.co.uk/sites/default/files/tritrichomonas.pdf

Hinney, B., Ederer, C., Stengl, C., Wilding, K., Štrkolcová, G., Harl, J., Flechl, E., Fuerhrer, H. & Joachim, A. (2015). Enteric protozoa of cats and their zoonotic potencial - a field study from Austria (Short Communication). *Parsitol Res,* 114: 2003-2006.

Holliday, M., Deni, D. & Gunn-Moore, D. A. (2009). *Tritrichomonas foetus* infection in cats with diarrhoea in a rescue in Italy. *Journal of Feline Medicine and Surgery,* 11: 131-134.

Hosein, A., Kruth, S. A., Pearl, D. L., Richardson, D., Maggs, J. C., Peach, H. A. & Peregrine, A. S. (2013). Isolation of *Tritrichomonas foetus* from cats sample at a cat clinic, cat shows and a humane society in southern Ontaro. *Journal of Feline Medicine and Surgery,* 15 (nº8): 706-711.

International Cat Care. (2014). *Tritrichomonas foetus infection in cats*. Acedido em 15 de Maio de 2016, disponível em: http://icatcare.org/advice/cat-health/tritrichomonas-foetus-infection-cats

Jergens, A. E. (2005). Chronic diarrhoea. In Hall, E. J., Simpson, J. W. & Williams, D. A.. *BSAVA Manual of Canine and Feline Gastroenterology* (2nd ed.) (pp. 82-86). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.

Kather, E. J., Marks, S. L. & Kass, P. H. (2007). Determination of the in vitro susceptibility of feline *Tritrichomonas foetus* to 5 antimicrobial agents. *J Vet Intern Med,* 21: 966-970.

Kavianinia, I., Plieger, P. G., Cave, N. J., Gopakumar, G., Dunowska, M., Kandile, N. G. & Harding, D. R. (2016). Design and evaluation of a novel chitosan-based system for colon-specific drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules,* 85: 539-546.

Kessel, J. F. (1928, June). Trichomoniasis in Kittens. *Transaction of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* XXII (nºI): 61-80.

Kingsbury, D. D., Marks, S. L., Cave, N. J. & Grahn, R. A. (2010). Identification of *Tritrichomonas foetus* and *Giardia* spp. infection in pedigree show cats in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal,* 58 (nº1): 6-10.

Köster, L. S., Chow, C. & Yao, C. (2015). Trichomonosis in cats with diarrhoea in Hong Kong, China 2009 and 2014 Open Reports. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. Acedido em 19 de Maio de 2016, diposnível em: https://www.researchgate.net/publication/288672479_Trichomonosis_in_cats_with_diarrhoea_in_Hong_Kong_China_between_2009_and_2014

Kuehner, K. A., Marks, S. L., Kass, P. H., Sauter-Louis, C., Grahn, R. A., Baruttzki, D. & Hartmann, K. (2011). *Tritrichomonas foetus* infection in purebred cats in Germany: Prevalence of clinical signs and the role of co-infection with other enteroparasites. *Journal of Feline Medecine and Surgery, 13*: 251-258.

Lalor, S. M. & Gunn-Moore, D. A. (2012). Effects of concurrent ronidazol and probiotic therapy in cats with *Tritrichomonas foetus* - Associated diarrhoea. *Congress Abstracts - Clinical/research abstracts accepted for presentation at ISFM Congress 2012. 14 (650-658)*, p. 651. Budapest: Journal of Feilie Medicine and Surgery .

Lappin, M. R. (2014). Trichomoniases. In Sykes, J. E., *Canine and Feline Infectious Diseases* (pp. 779-784). Missouri: Elsevier.

Leib, M. S. (2005). Acute diarrhoea. In Hall, E. A. , Simpson, J. W. & Williams, D. A., *BSAVA Manual of Canine and Feline Gastroenterology* (2nd ed.) (pp. 78-81). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.

LeVine, D. N., Papich, M. G., Gookin, J. L., Davidson, G. S., Davis, J. L. & Hayes, R. B. (2011). Ronidazol pharmacokinetics after intravenous and oral immediate-release capsule administration in healthy cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery,* 13: 244-250.

Levy, M. G., Gookin, J. L., Poore, M., Birkenheuwe, A. J., Dyskstra, M. J. & Litaker, R. W. (2003). *Tritrichomonas foetus* and not *Pentatrichomonas hominis* is the etiologic agent of feline trichomonal diarrhea. *Journal of Parasitology,* 89(nº1): 99-104.

Levy, M. & Gookin, J. L. (2013). Update on feline trichomonosis and giardiosis: clinical revelance, diagnosis and treatment. *10th Merial Symposium on Parasitosis & Arthropod-bones Diseases - Cat & Dog parasiticides, an innovation-driven field, Dubai 11th-15th November 2013* (pp. 75-81). Dubai: Merial, parasit´Xpert.

Lim, S., Park, S.-I., Ahn, K.-S., Oh, D.-S. & Shin, S.-S. (2012). Efficacy of ronidazol for treatment of cats experimentally infected with a korean isolate of *Tritrichomonas foetus* - Brief Communication. *Korean J Parasitol,* 50 (nº2): 161-164.

Lim, S., Park, S.-I., Ahn, K.-S., Oh, D.-S., Ryu, J.-S. & Shin, S.-S. (2010). First report of feline intestinal trichomoniasis caused by *Tritrichomonas foetus* in Korea. *Korean J Parasitol.,* 48 (nº3): 247-251.

Little, S. (2011a). Diarrhea in kittens and young cats. *World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceddings, 2011.* Acedido em 28 de Abril de 2016, disponível em: http://www.vin.com/members/cms/project/defaultadv1.aspx?id=5124223&pid=11343&&print=1

Little, S. (2011b). *Tritrichomonas foetus* diarrhea in Cats: The new kid on the block. *ABVP 2011.* Acedido em 28 de Abril de 2016, disponível em: http://www.vin.com/members/cms/project/defaultadv1.aspx?id=4865786&pid=11330&&print=1

Little, S. (2013). Diagnosis and Management of Diarrhea in Kittens and Young Cats. *International Society of Feline Medicine 2013.* Acedido em 28 de Abril de 2016, disponível em: http://www.vin.com/members/cms/project/defaultadv1.aspx?id=6084358&pid=11380&&print=1

Mancianti, F., Nardoni, S., Mugnaini, L., Zambernardi, L., Guerrini, A., Gazzola, V. & Papini, R. A. (2015). A retrospective molecular study of select intestinal protozoa in healthy pet cats from Italy. *Journal of Feline Medicine and Suregery,* 17 (nº2): 163-167.

Manning, K. (2010, August). Update on the diagnosis and management of *Tritrichomonas foetus* infections in Cats – Topical review. *Topics in Companion Animal Medicine,* 25 (nº25): 145-148.

Marks, S. L. (2010). Optimizing the diagnosis & treatment of feline *Giardia & Tritrichomona*s - Associated diarrhea. *Western Veterinary Conference 2010.* Acedido em 10 de Junho de 2016, disponível em: http://www.vin.com/members/cms/project/defaultadv1.aspx?meta=VIN&pId=11300&id=4438965

Marks, S. L. (2013a). Diarrhea. In R. J. Washabau, & M. J. Day, *Canine & Feline Gastroenterology* (pp. 99-108). Missouri: ELsevier.

Marks, S. L. (2013b). Rational approach to chronic diarrhea in cats. *Western Veterinary Conference 2013.* Acedido em 17 de Jullho de 2016, disponível em: http://www.vin.com/members/cms/project/defaultadv1.aspx?id=6000921&pid=11371&

Matos, M., Alho, A. M., Owen, S. P., Nunes, T. & Carvalho, L. M. (2015). Parasite control practices an public perception of parasitic diseases: A survey of dog and cat owners. *Preventive Veterinary Medicine,* 122: 174-180.

Miró, G., Hernández, L., Montoya, A., Arranz-Solís, D., Dado, D., Rojo-Montejo, S., Mendoza-Ibarra, J. A., Ortega-Mora, L. M. & Pedraza-Díaz, S. (2011). First description of naturally acquired *Tritrichomonas foetus* infection in a Persian cattery in Spain. *Parasitol Res,* 109: 1151-1154.

Morin-Adeline, V., Lomas, R., O´Meally, D., Stack, C. & Šlapeta, J. (2014). Comparative transcriptomics reveals striking similarities between the bovine and feline isolates of *Tritrichomonas foetus*: consequences for in silico drug-target identification. *BMC Genomics,* 14.

Mostegl, M. M., Wetsscher, A., Richter, B., Nedorost, N., Dinhopl, N. & Weissenböck, H. (2012). Detection of *Tritrichomonas foetus* and *Pentatrichomonas hominis* in intestinal tissue

specimens of cats by chromogenic *in situ* hybridization. *Veterinary Parasitology,* 183: 209-214.

Mugnaini, L., Papini, R., Gorini, G., Passantino, A., Merildi, A. & Mancianti, F. (2012). Pattern and predictive factores of endoparasitism in cats in Central Italy. *Revue de médecine vétérinaire,* 163 (nº2): 89-94.

Okamoto, S., Wakui, M., Sato, N., Ishida, A., Tanabe, M., Takeuchi, T., Fukushima, S., Yamada, T. & Ikeda, Y. (1998). Case report: *Tritrichomonas foetus* meningoencephalitis after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation,* 21: 89-91.

Otranto, D., Brianti, E. & Dantas-Torres, F. (2013). *Troglostrongylus* brevior and a nonexistent 'dilemma' - Letter. *Trends in Parasitology,* 29 (nº11): 517-518.

Papich, M. G., LeVine, D. N., Gookin, J. L., Davidson, G. S., Stagner, W. C. & Hayes, R. B. (2012). Ronidazol pharmacokinetics in cats following delivery of a delayed-release guar gum formulation. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics,* 36: 399-407.

Paris, J. K., Wills, S., Balzer, H.-J., Shaw, D. J. & Gunn-Moore, D. A. (2014). Enteropathogen co-infection in UK cats with diarrhoea. *BMC Veterinary Research,* 10 (nº13).

Payo-Puente, P., Botelho-Dinis, M., Urueña, A. M., Payo-Puente, M., Gonzalo-Orden, J. M. & Rojo-Vazquez, F. A. (2008). Prevalence study of the lungworm *Aelurostrongylus abstrusus* in stray cats of Portugal. *Journal of Feline Medicine and Surgery,* 10: 242-246.

Pennisi, M. G., Napoli, E., Ingrà, L. A. & Persichetti, M. F. (2012). Pilot study on efficacy and safety of Tinidazole against natural *Tritrichomonas foeutus* infection in cats. *Congress Abstracts - Clinical/research abstracts accepted for presentation at ISFM Congress 2012. 14 (650-658)*, p. 657. Budapest: Journal od Feline Medicine and Surgery.

Pereira-Neves, A., Campero, C. M., Martínez, A. & Benchimol, M. (2011). Identification of *Tritrichomonas foetus* pseudocysts in fresh preputial secretion samples from bulls. *Veterinary Parasitology,* 175: 1-8.

Pereira-Neves, A., Gonzaga, L., Mena-Barreto, R. F. & Benchimol, M. (2015). Characterisation of 20S proteasome in *Tritrichomonas foetus* and Its Role during the cell cycle and transformation into endoflagellar form. *Plos|One*. Acedido em 13 de Junho de 2016, disponível em: http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0129165

Pereira-Neves, A., Menna-Barreto, R. F. & Benchimol, M. (2016). The fungal metabolite gliotoxin inhibits proteasome proteolytic activity and induces an irreversible pseudocystic transformation and cell death in *Tritrichomonas foetus*. *Parasitology Research*, 1-13. Acedido em 4 de Junho de 2016, disponível em: http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00436-016-5061-y

Plumb, D. C. (2015). *Plumb's Veterinary Drug Handbook* (8th Edition). from VIN. Acedido em 28 de Abril de 2016, disponível em: http://www.vin.com/members/cms/project/defaultadv1.aspx?id=4692473&pid=451&&print=1

Polak, K. C., Levy, J. K., Crawford, P. C., Leurenegger, C. M. & Moriello, K. A. (2014). Infectious diseases in large-scale cat hoarding investigations. *The Veterinary Journal,* 201: 189-195.

Portaria nº81/2002 de 24 de Janeiro. *Diário da República nº20 - I Série B*. Ministério das Finanças, da Administração Interna, da Economia, da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas e do Ambiente e do Ordenamento do Território. Lisboa.

Profizi, C., Cian, A., Meloni, D., Hugonard, M., Lambert, V., Groud, K., Gagnon, A.-C., Viscogliosi, E. &. Zenner, L. (2013). Prevalence of *Tritrichomonas foetus* infections in French catteries. *Veterinary Parasitology,* 196: 50-55.

Purina. (2007). Researchers Investigate *T. foetus* Infection in Catteries. *Purina Pro Club Update*, 6 (nº3).

Queen, E. V., Marks, S. L. & Farver, T. B. (2012). Prevalence of selected bacterial and parasitic agents in feces from diarrheic and healthy control cats from Northerm California. *J Vet Intern Med,* 26: 54-60.

Raab, O., Greenwood, S., Vanderstichel, R. & Gelens, H. (2016). A cross-sectional study of *Tritrichomonas foetus* infection in feral and shelter cats in Prince Edward Island, Canada. *The Canadian Journal of Veterinary Research,* 57: 265-270.

Rinaldi, L., Cringoli, G., Pepe, P., Beugnet, F., & Ballweber, L. (2015). Coproscopy Diagnosis. In Beugnet, F. & Halos, L., *Parasitoses & Vector Borne Diseases of Cats* (pp. 119-147). Lyon: Merial.

Rosado, T. W., Specht, A. & Marks, S. L. (2007). Neurotoxicosis in 4 cats receiving ronidazol - Case Reports. *J Vet Med,* 21: 328-331.

Rosypal, A. C., Ripley, A., Walden, H. D. S., Blagburn, B. L., Grant, D. C. & Lindsay, D. S. (2012). Survival of a feline isolate of *Tritrichomonas foetus* in water, cat urine, cat food and cat litter (Short communication). *Veterinary Parasitology*, 185: 279-281.

Rothrock, K. (2014). *Tritrichomoniasis*. Acedido em 10 de Junho de 2016, disponível em: http://www.vin.com/Members/Associate/Associate.plx?from=GetDzInfo&DiseaseId=823

Saag, M. V., McDonell, D. & Šlapeta, J. (2011). Cat genotype *Tritrichomonas foetus* survives passage thourgh the alimentary tract of two common slug species. *Veterinary Parasitology,* 177: 262-266.

Sherding, R. (2013). Update on Intestinal Giardia and Tritrichomonas Infections. *Atlantic Coast Veterinary Conference 2013.* Acedido em 28 de Abril de 2016, disponível em: http://www.vin.com/members/cms/project/defaultadv1.aspx?id=5956207&pid=11390&&print=1

Singh, R. S., Walia, A. K. & Kanwar, J. R. (2016). Protozoa lectins and their role in host-pathogen interations. *Biotechnology Advances,* 34: 1018-1029.

Šlapeta, J., Craig, S., McDonell, D. & Emery, D. (2010). *Tritrichomonas foetus* from domestic cats and cattle are genetically distinc. *Experimental Parasitology,* 126: 209-213.

Šlapeta, J., Müller, N., Stack, C. M., Walker, G., Lew-Tabor, A., Tachezy, J. & Frey, C. F. (2012). Comparative analysis of *Tritrichomonas foetys* (Riedmüller, 1928) cat genotype, *T. foetus* (Riedmüller, 1928) cattle genotype and *Tritrichomonas suis* (Davaine, 1875) at 10 DNA loci. *International Journal for Parasitology,* 42: 1123-1149.

Stauffer, S. H., Birkenheuer, A. J., Levy, M. G., Marr, H. & Gookin, J. L. (2008). Evaluation of four DNA extraction methods for the detection of *Tritrichomonas foetus* in feline stool specimens by polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest,* 20: 639-641.

Steiner, J. (2013). Diagnostic Approach to Gastroinestinal, Pancreatic, and Hepatobiliary Problems. In Washabau, R. J. & Day, R. J., *Canine & Feline Gastroenterotology* (pp. 177-204). Missouri: Elsevier.

Steiner, J. M., Xenoulis, P. G., Suchodolski, J. S., Globokar, M., Huisinga, E. & Thuere, S. (2007). Identification of Tritrichomonas as foetus DNA in feces from cats with diarrhea from Germany and Austria (Abstract #281). In *American College of Veterinary Internal Medicine Abstracts 2007* (p. 649). ACVIM.

Stockdale, H. D., Dillon, A. R., Newton, J. C., Bird, R. C., BonDurant, R. H., Deinnocentes, P., Barney, S., Bulter, J., Land, T., Spencer, J. A., Lindsay, D. S. & Blagburn, B. L. (2008).

Experimental infection of cats (*Felis catus*) with *Tritrichomonas foetus* isolated from cattle. *Veterinary Parasitology,* 154: 156-161.

Stockdale, H. D., Givens, M. D., Dykstra, C. C. & Blagburn, B. L. (2009). *Tritrichomonas foetus* infections in surveyed pet cats. *Veterinary Parasitology,* 160: 13-17.

Stockdale, H., Rodning, S., Givens, M., Carpenter, D., Lenz, S., Spencer, J., Dykstra, C., Lindsay, D. & Blagburn, B. (2007, December). Experimental infections of cattle with a feline isolate of *Tritrichomonas foetus*. *The Journal of Parasitology,* 93 (nº6): 1429-1434.

Suzuki, J., Kobayashi, S., Osuka, H., Kawahata, D., Oishi, T., Sekiguchi, K., Hamada, A. & Iwata, S. (2016). Characterization of a human isolate of *Tritrichomonas foetus* (cattle/swine genotype) infected by a zoonotic opportunistic infection. *The Journal of Veterinary Medical Science,* 78(nº4): 633-640.

The Center for Food Security & Public Health [CFSPH]. (2012). *The Center for Food Security & Public Health - Transboundary and Emerging Diseases of Animals: Giardiasis .* Acedido em 14 de Julho de 2016, disponível em: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/giardiasis.pdf

The Center for Food Security & Public Health [CFSPH]. (2013a). *The Center for Food Security & Public Health - Transboundary and Emerging Diseases of Animals: Zoonotic Hookworms.* Obtido em 14 de Julho de 2016, disponível em: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/hookworms.pdf

The Center for Food Security & Public Health [CFSPH]. (2013b). *The Center for Food Security & Public Health -Transboundary and Emerging Diseases of Animals: Larva Migrans Overview.* Obtido em 14 de Julho de 2016, disponível em: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/larva_migrans.pdf

Thienpont, D., Rochette, F., & Vanparus, O. F. (1979). *Diagnosing Helminthiasis Throug Coprological Examination.* Janssen Research Foundation.

Tolbert, M. K. & Gookin, J. L. (2009, August). *Tritrichomonas foetus*: A New Agent of Feline Diarrhea. *Compendium: Continuing Education for Veterinarians ®*, 374-390.

Tolbert, M. K., Brad, M. D., & Gould, E. N. (2016). *In vitro* effects of cysteine protease inhibitors on *Trichomonas foetus* - induced cytopathic changes in porcine intestinal epithelial cells. *American Journal of Veterinary Research,* 77 (nº8): 890-897.

Tolbert, M. K. & Gookin, J. L. (2016). Mechanisms of *Tritrichomonas foetus* pathogenecity in cats with Insights from venereal trichomonosis (Review). *Journal of Veterinary Interna Medicine,* 30: 516-526.

Tolbert, M. K., Stauffer, S. H. & Gookin, J. L. (2013). Feline *Tritrichomonas foetus* adhere to intestinal epithelium by receptor-ligand-dependent mechanisms. *Veterinary Parasitology,* 192: 75-82.

Tolbert, M. K., Stauffer, S. H., Brand, M. D. & Gookin, J. L. (2014). Cysteine protease activity of feline *Tritrichomonas foetus* promotes adhesion-dependent cytotoxicity to intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity,* 87 (nº7): 2851-2859.

Tysnes, K., Gjerde, B., NØcltvedt, A. & Skancke, E. (2011). A cross-sectional study of *Tritrichomonas foetus* infection among healthy cats at shows in Norway. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53 (nº39).

Valente, J. D., Manteigas, F. S., Santos, F. A., Fonseca, M. J., Delgado, R. L. & Bagarrão, S. A. (2015). Tricomoníase felina: o primeiro caso reportado em Portugal. Em *VI Encontro de Formação Organização Médicos Veterinários - Centro de Congressos de Lisboa 12 & 13 Dezembro 2015* [CD]. Lisboa.

van Doorn, D., de Bruin, M., Jorritsma, R. A., Ploeger, H. W., & Schoormans, A. (2009). Prevalence of *Tritrichomonas foetus* among Dutch cats (Abstrat). *Tijdschr Diergeneeskd,* 134 (nº17): 698-700. Acedido em 20 de Maio de 2016, disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19774881

Waap, H., Gomes, J. & Nunes, T. (2013). Parasite communities in stray cat populations from Lisbon, Portugal - Abstract. *Journal of Helminthogy,* 88 (nº4): 389-395. Acedido em 13 de Julho de 2016, disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=cystoisospora+%2B+Portugal+%2B+cat

Walden, H. S., Dykstra, C., Dillon, A., Rodning, S., Givens, D., Bird, R., Newton, J. & Lindsay, D. (2013). A new species of *Tritrichomonas* (Sarcomastigophora: Trichomonida) from the domestic cat (*Felis catus*). *Parasitol Res,* 112: 227-223.

Willard, M. (2010). Distúrbios do Sistema Digestório. In Nelson, R. W. & Couto, C. G., *Medicina Interna de Pequenos Animais* (Tradução 4ªEdição) (pp. 360-366; 455-456). Rio de Janeiro: Mosby - Elsevier.

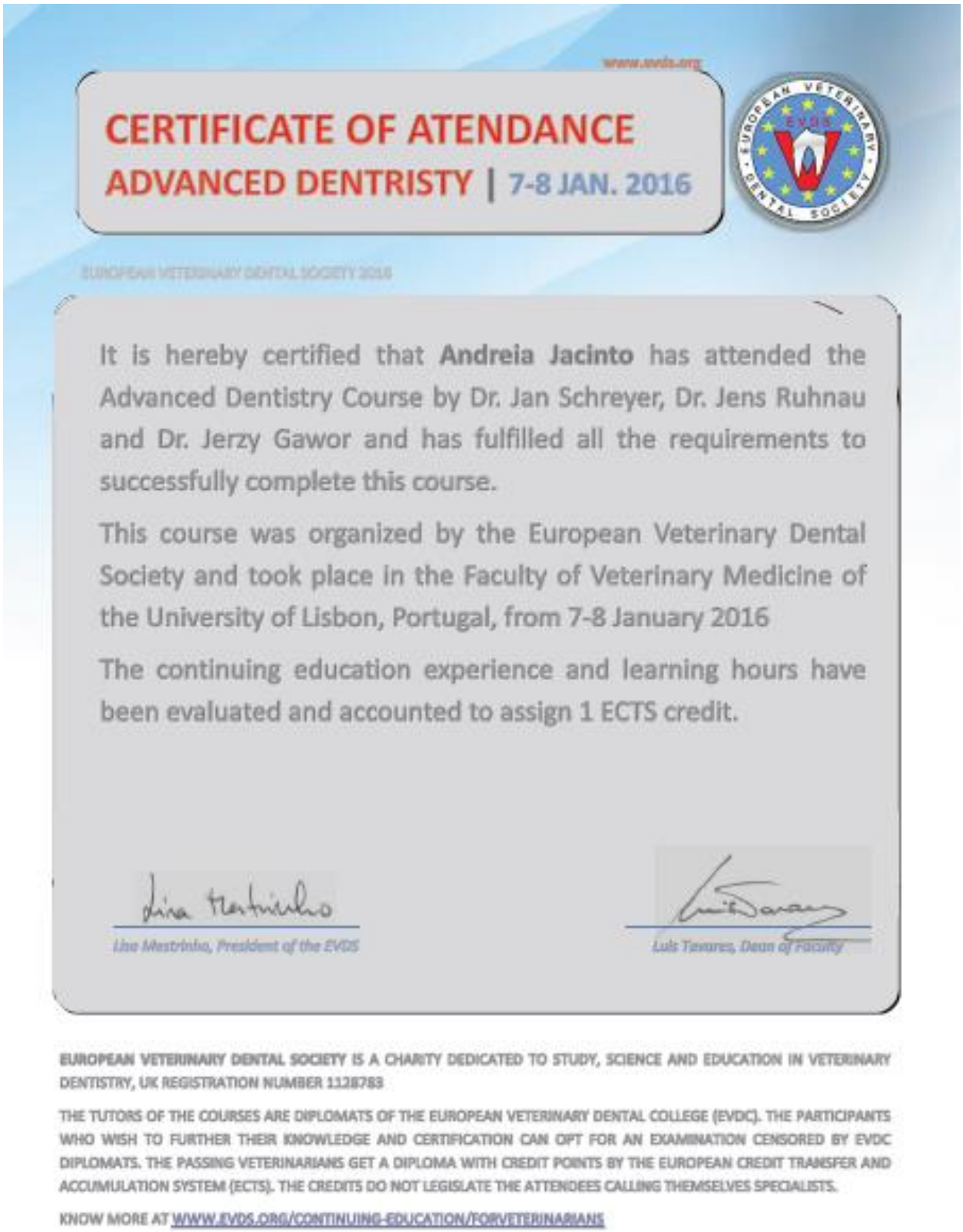
Xenoulis, P. G., Lopinski, D. J., Read, S. A., Suchodoiski, J. S. & Steiner, J. M. (2013). Intestinal *Tritrichomonas foetus* infection in cats: a retrospective study of 104 cases. *Journal of Feline Medicine and Surgery,* 15 (nº12): 1098-1103.

Xenoulis, P. G., Saridomichelakis, M. N., Read, S. A., Suchodlski, J. S, & Steiner, J. M. (2010). Short Communication: Detection of *Tritrichomonas foetus* in cats in Greece. *Journal of Feline Medicine and Surgery,* 12: 831-833.

Yaeger, M. J. & Gookin, J. L. (2005). Histologic Features Associated with *Tritrichomonas foetus*-induced Colitis in Domestic Cats. *Vet Pathol,* 42: 797-804.

Zalonis, C. A., Pillay, A., Secor, W., Humburg, B. & Aber, R. (2011). Rare Case of Trichomonal Peritonitis. *Emerging Infectious Diseases,* 17 (nº7): 1312-1313.

Anexo I – Certificado de participação no curso



www.evds.org

CERTIFICATE OF ATENDANCE

ADVANCED DENTRISTY | 7-8 JAN. 2016

EUROPEAN VETERINARY DENTAL SOCIETY 2016

It is hereby certified that **Andreia Jacinto** has attended the Advanced Dentistry Course by Dr. Jan Schreyer, Dr. Jens Ruhnau and Dr. Jerzy Gawor and has fulfilled all the requirements to successfully complete this course.

This course was organized by the European Veterinary Dental Society and took place in the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Lisbon, Portugal, from 7-8 January 2016

The continuing education experience and learning hours have been evaluated and accounted to assign 1 ECTS credit.

Lisa Mestrinho, President of the EVDS

Luis Tavares, Dean of Faculty

EUROPEAN VETERINARY DENTAL SOCIETY IS A CHARITY DEDICATED TO STUDY, SCIENCE AND EDUCATION IN VETERINARY DENTISTRY, UK REGISTRATION NUMBER 1128783

THE TUTORS OF THE COURSES ARE DIPLOMATS OF THE EUROPEAN VETERINARY DENTAL COLLEGE (EVDC). THE PARTICIPANTS WHO WISH TO FURTHER THEIR KNOWLEDGE AND CERTIFICATION CAN OPT FOR AN EXAMINATION CENSORED BY EVDC DIPLOMATS. THE PASSING VETERINARIANS GET A DIPLOMA WITH CREDIT POINTS BY THE EUROPEAN CREDIT TRANSFER AND ACCUMULATION SYSTEM (ECTS). THE CREDITS DO NOT LEGISLATE THE ATTENDEES CALLING THEMSELVES SPECIALISTS.

KNOW MORE AT WWW.EVDS.ORG/CONTINUING-EDUCATION/FORVETERINARIANS

Anexo II - Autorização para colheita da amostra de lavado de cólon no âmbito da Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária "Rastreio parasitológico de *Tritrichomonas foetus* em gatos"

Eu, _____ proprietário do (a) _____, nascido (a) em _____ autorizo que seja realizada uma lavagem do cólon no âmbito do trabalho de investigação destinado à elaboração da Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária "Rastreio parasitológico de *Tritrichomonas foetus* em gatos".

____/____/_____

_____

O seu gato teve ou tem diarreia?

O parasita *Tritrichomonas foetus* pode ser a causa!

Como se realiza a lavagem do cólon?

Tem alguns riscos para o animal?

Com recurso a um cateter flexível inserido através do ânus do animal, introduz-se no intestino uma pequena quantidade de soro fisiológico, o qual é seguidamente aspirado arrastando consigo fragmentos de fezes e parasitas. O procedimento é rápido e bem tolerado, pela maioria dos animais.

Já, no laboratório, a amostra colhida na consulta é processada o mais rapidamente possível. O resultado estará disponível sem qualquer custo para o proprietário uma vez que se insere num trabalho de investigação.

Agradecemos a vossa colaboração!

Com o apoio:

B|BRAUN
SHARING EXPERTISE

Andreia Jacinto (aluna MIMV)
Drª Carla Monteiro (co-orientadora)
Prof.ª Doutora Isabel Fonseca (orientadora)

Para mais informações, não hesite a contactar-nos:
parasitasgatos@gmail.com

O que é *Tritrichomonas foetus*?

Tritrichomonas foetus é um parasita protozoário flagelado, que somente em 2003 foi identificado como agente causal de diarreia nos gatos.

Este parasita encontra-se na porção terminal do intestino dos gatos, podendo causar diarreia e, apenas, é visível com recurso ao microscópio.

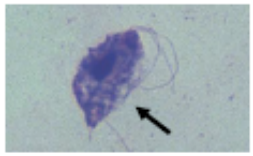


Imagem 1— *Tritrichomonas foetus*.
Fonte: Zajac, A. M. & Conboy, G. A. (2012). *Veterinary Clinical Parasitology.* (8th Edition). Wiley-Blackwell.

A maioria dos gatos infetados com este parasita não apresenta sinais da doença, embora alguns, principalmente os mais jovens possam ter diarreia.

Verifica-se, por vezes, que alguns gatos com diarreia crónica podem estar infetados por *Tritrichomonas foetus*.

https://i-media-cache-ak0.pinimg.com/736x/20/07/70/200770702bf664a94cdc7151d4c1dcaa65.jpg

Como se transmite?

O parasita *Tritrichomonas foetus* transmite-se entre gatos por ingestão do parasita eliminado nas fezes.

Quando os gatos têm por hábito fazerem a limpeza do pelo a outros e/ou partilhem a sua caixa de areia têm maior probabilidade de ingerirem o parasita do outro gato e ficarem fetados. Por esta razão, gatos que habitem com outros têm maior probabilidade de estarem afetados por este parasita e, por isso, se numa ninhada houver um animal parasitado, é muito provável que os outros gatinhos também o estejam.

Não existe evidência, até ao momento, que este parasita tenha capacidade de infetar humanos imunocompetentes.

Como se pode diagnosticar?

Para um diagnóstico correto desta parasitose é necessário a colheita de uma amostra fecal para seguidamente realizar, em laboratório, algumas técnicas específicas para se observar o parasita, uma vez que pode ser confundido com outro bastante semelhante (*Giardia* spp.).

Existem vários tipos de amostras fecais que se podem recolher, mas, a que permite resultados mais fiáveis é a obtida por lavagem do cólon.

Anexo IV - Inquérito

Inquérito no âmbito da Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

"Rastreio parasitológico de *Tritrichomonas foetus* em gatos"

Nome do Proprietário: _____

Local/Região onde reside: _____

Nome do animal: _____ Data de nascimento: __/__/_____

Fêmea ☐ Fêmea Castrada ☐ Macho ☐ Macho Castrado ☐

Raça: _____

1. Onde vive o gato?
    a. No interior ☐
    b. No exterior ☐
    c. No interior e exterior ☐
2. O seu gato tem acesso à rua?
    a. Sim ☐
    b. Não ☐
3. Tem mais do que um gato?
    a. Sim ☐ Quantos? ____
    b. Não ☐
4. Se sim, os seus gatos costumam (assinale as respostas válidas).
    a. Partilhar a caixa de areia ☐
    b. Lamberem-se uns aos outros ☐
5. Para além de gatos, coabita com outros animais?
    a. Sim ☐ Qual ou Quais? _____
    b. Não ☐
6. Administra algum tipo de desparasitação interna?
    a. Sim ☐
    b. Não ☐
        i. Se sim,

Com que frequência? 2 em 2 meses ☐

3 em 3 meses ☐

4 em 4 meses ☐

6 em 6 meses ☐

Anualmente ☐

Outra ☐ Qual?_____

Qual o produto que utiliza? _____

7. O seu gato tem a vacinação atualizada?
   a. Sim ☐
   b. Não ☐
      i. Se sim, quais? (Assinalar as que estão atualizadas)

         Panleucopénia felina ☐

         Herpesvírus ☐

         Calicívirus ☐

         FeLV ☐

8. O seu gato tem de alguma doença diagnosticada?
   a. Sim ☐
   b. Não ☐
      i. Se sim

         Qual ou Quais? _____

         Quando surgiu?_____

         Está a sob alguma medicação? Qual ou Quais?_____

         _____

9. O seu gato está ou esteve com diarreia?
   a. Sim, tem. ☐ Há quanto tempo? _____
   b. Sim, teve. ☐ Durante quanto tempo? _____
   c. Não. ☐

Apenas responda às próximas questões se o seu gato **ESTÁ OU ESTEVE COM DIARREIA**.

1. Características das fezes (assinale as respostas válidas).
    a. Líquidas ☐
    b. Pastosas ☐
    c. Com muco ☐
    d. Com sangue ☐
2. O número de defecações do seu gato aumentou?
    a. Sim ☐
    b. Não ☐
3. Qual a cor das fezes?
    a. Amarelas claras ☐
    b. Cor-de-laranja ☐
    c. Castanhas ☐
    d. Brancas ☐
    e. Pretas tipo “borras de café” ☐
    f. Vermelhas ☐
4. O seu gato apresentava urgência na defecação?
    a. Sim ☐
    b. Não ☐

Observações:

Muito Obrigada pela Colaboração!

Anexo V – Meio de cultura InPouch™ TF - Feline

Microscopic Evaluation - Place the viewing clip horizontally over the lower chamber and close the clip. (Using the clip is optional). Observe with a microscope under low power (10x). Use a higher power (20x or 40x) if necessary for confirmation. READING TIP: Trichomonads gravitate to the edges of the InPouch™. If none are seen along the edges, briefly scan the liquid. Make sure to focus in the liquid and not the textured plastic of the pouch. Do not mistake Brownian motion of small debris particles for evidence of trichomonad activity.

Repeat the evaluations daily for the presence of motile trichomonads for **2-4 days (after inoculation).** If no *T. Foetus* is seen, continue to evaluate the InPouch™ culture every other day up to 12 days.

DISPOSAL

All InPouches™ should be autoclaved or disposed of by equivalent means at **BIOSAFETY LEVEL 2.**

***Tritrichomonas foetus* LIVE CULTURE**

BioMed Diagnostics maintains a live culture of *T. foetus* (clinical isolate) for QC purposes. This live culture (positive control) can be purchased from BioMed Diagnostics **(Catalog #11-1115).** Live cultures are available only in the United States.

To maintain an active culture, inoculate a new pouch with one drop (approximately 40µl) of the actively growing culture and incubate at 37ºC for 24 hours. They can then be moved to a 32ºC incubator or to room temperature. Subculture every 3-4 days when the organisms reach a concentration of 1 x 10^5/ml.

Limitations to the Procedure

In feline samples, *P. hominis* and Giardia are contaminants. Giardia does not survive in the InPouch™ media beyond 24 hours, and *P. hominis* will grow but is uncommon. PCR testing is the best way to distinguish between trichomonads (2).

The InPouch™ medium suppresses but does not eliminate yeast and bacterial growth. A build-up of gas from bacterial growth can be vented by opening the pouches inside a **BIOHAZARD LEVEL 2 HOOD or OUT OF DOORS.**

Too much fecal material can make the medium too cloudy to examine. Subculture, if necessary, into another InPouch™.

WARNING: This product contains a chemical known to the State of California to cause cancer, birth defects and other reproductive harm.

References

1.Gookin, et al., Use of commercially available culture system for the diagnosis of *Trichomonas foetus* in cats. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2003; 222: 1376-1379.

2. Gookin, J.L. et al. Identification of Pentatrichomonas hominis in feline fecal samples by polymerase chain reaction assay. Vet Parasitology. 2007; 145: 11-15

Document No. 100-159 Rev. E 9/2013 TEK 205

InPouch™ TF - Feline

Tritrichomonas foetus Test

Catalog No. 11-1107 5 Test Kit
Catalog No. 11-1110 10 Test Kit
Catalog No. 11-1103 100 Test Kit
Catalog No. 11-1115 Live Culture

A SELECTIVE CULTURE SYSTEM FOR THE DIAGNOSIS OF *Tritrichomonas foetus*

For Veterinary Use Only
For *In Vitro Diagnostic* Use Only

Manufactured by

BIOMED DIAGNOSTICS

1388 Antelope Road
White City, OR 97503
1-800-964-6466
(541) 830-3000
fax: (541) 830-3001
www.biomeddiagnostics.com
email: info@biomeddiagnostics.com

InPouch™ TF - Feline *Tritrichomonas foetus* Test

INTRODUCTION

T. foetus can cause chronic feline diarrhea. The incidence of this infection has been found widely as further research has been conducted (1).

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

The InPouch™ TF is a self-contained system for the detection of *T. foetus* from feline fecal samples. The proprietary medium is selective for the transport and growth of the trichomonad, while inhibiting the growth of yeast, mold and bacteria which might interfere with a reliable diagnosis.

The InPouch™ consists of a high barrier, oxygen resistant, plastic pouch with two V-shaped chambers connected by a narrow passage. This two-compartment system allows direct observation (**wet mount**) of a newly collected specimen in the upper chamber before expressing the contents into the lower chamber for **culture**.

The InPouch™ is sensitive enough that **an inoculum containing as little as 1 organism is sufficient to potentially result in a presumptive positive test.**

Presumptive positive pouches for *T. foetus* can be tested via a PCR procedure to verify the result. Transport and off-site testing can be performed easily due to the flexible packaging and integral design of the pouch.

REAGENTS

The InPouch™ medium contains the following: trypticase, protease, peptone, yeast extract, maltose and other nutrients, amino acids, salts, antifungal and antimicrobial agents in a normal saline phosphate buffer.

PRECAUTIONS

For *in vitro diagnostic use* only. **The pouch is labeled for veterinary microbial identification and test results only.** All specimens should be handled according to CDC-NIH recommendations for potentially infectious organisms at **BIOHAZARD LEVEL 2.**

STORAGE AND SHELF LIFE

Never refrigerate or freeze the InPouches™. Store uninoculated InPouches™ at room temperature (18ºC to 25ºC) horizontally, away from direct sunlight. Product shelf life is 12 months from the date of manufacture. Do not use an InPouch™ if it appears to be cloudy, leaky, dark brown, dry, or if the medium has thick syrup-like consistency.

SPECIMEN COLLECTION

MATERIALS NEEDED

- InPouch™ TF pouches
- Package Insert (this document)
- Microscope clips (optional and sold separately)
- Disposable gloves
- Wooden applicator sticks/sterile cotton-tipped swabs
- Microscope

The specimen collection technique is important regardless of the nutrient medium used for culturing.

Method 1.....Insert a sterile cotton swab directly into the cat's rectum. It is not necessary to collect feces with the rectal swab since *T. foetus* clings to the cellular lining of the colon. Any feces obtained should only coat the swab. The swab should be free of anything that could kill *T. foetus*, ie. lubricants.

Method 2.....Alternately, with a clean wooden applicator stick or a sterile cotton swab, obtain approximately 0.03grams (smaller than a peppercorn) of feces that has been voided within 1-2 hours of collection.

The specimen should NOT be refrigerated or frozen.

INOCULATION

Step 1.....If necessary, manually express the liquid of the InPouch™ so that there is approximately 1 ml in the upper chamber. **Be sure that the liquid in the upper chamber is below the closure tape to prevent fluid from leaking upon opening.**

Step 2.....Tear the pouch open at the notch just above the closure. Open the pouch by pulling the closure tape's middle tabs apart.

Step 3.....Insert the swab or stick into the liquid of the pouch's upper chamber. The swab can be "milked" out by pressing the tip of the swab between the fingers through the flexible walls of the pouch. Avoid placing an excessive amount of feces in the pouch. Dispose of the swab.

Step 4.....**For wet mount** examination, squeeze the top to close, roll the top edge down twice and fold over the end tabs. **For culture or transport**, express the media into the lower chamber and roll the pouch down until the tape is at the top of the label. Fold the wire tape's end tabs to lock the roll.

Use the BioMed label to write animal identification information.

TRANSPORT

InPouch™ TF is an excellent device for the transport of samples. The plastic pouch resists damage in transport and maintains viability. Inoculated InPouches™ should be maintained between 15ºC - 37ºC.

Laboratory Procedures

Wet Mount - Immediate microscopic examination. Place the viewing clip horizontally over the upper chamber and close the clip. (Using the clip is optional). Observe with a microscope under low power 10x, using 20x or 40x if necessary for confirmation.

Immediate Specimen Concentration - It is possible to concentrate the cellular material by standing the pouch vertically or by placing it in a shirt pocket for at least 15 minutes prior to microscopic evaluation. The trichomonads will concentrate at the bottom of the chamber.

Incubation and Examination

Incubate the pouch vertically at 35ºC - 37ºC for 18-24 hours. After initial incubation, keep the pouch at room temperature in the dark. The pouch can be kept in the dark vertically without incubation.

Mixing - before reading the pouch, pull the pouch up and down across the edge of a table approximately 3-4 times.

Anexo VI – Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais

Tabela 13 – Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais: sexo, concelho, idade, raça, ambiente, acesso à rua, número de gatos por habitação, partilha da caixa de areia, limpeza cruzada entre gatos e coabitantes.

	Sexo	Concelho	Idade	Raça	Ambiente	Acesso à rua	Quantos gatos no total?	Partilha caixa	Limpeza cruzada do pelo	Coabitantes
1	MC	Oeiras	3a	SRD	Misto	Sim	1	--	--	Cão
2	M	Lisboa	2m	SRD	Interior	Não	8	Não	Não	Cão
3	MC	Lisboa	5a	SRD	Misto	Sim	1	--	--	Não
4	FC	Lisboa	1a	SRD	Misto	Sim	1	--	--	Não
5	M	Lisboa	3a	Abissínio	Misto	Sim	3	Sim	Não	Não
6	M	Lisboa	11a	SRD	Misto	Sim	3	Sim	Sim	Não
7	FC	Mafra	2a	SRD	Misto	Sim	1	--	--	Cães + Animais de quinta
8	F	Amadora	3m	SRD	Misto	Sim	Colónia	Sim	Sim	Não
9	FC	Lisboa	12a	Siamês	Misto	Sim	1	--	--	Não
10	F	Sines	2a	SRD	Exterior	Sim	Colónia	Sim	Sim	Animais de rua
11	MC	Lisboa	8m	SRD	Interior	Não	1	--	--	Não
12	M	Lisboa	5m	X Persa	Misto	Sim	2	Sim	Sim	Cão
13	MC	Lisboa	1a	SRD	Misto	Sim	2	Sim	Sim	Cão
14	MC	Lisboa	7m	SRD	Interior	Não	1	--	--	Não
15	FC	Lisboa	3a	SRD	Interior	Não	8	Sim	Sim	Não
16	FC	Lisboa	3a	SRD	Interior	Não	8	Sim	Sim	Não
17	F	Castelo Branco	7m	Persa	Misto	Sim	8	Sim	Sim	Cão

Tabela 14 – Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais: sexo, concelho, idade, raça, ambiente, acesso à rua, número de gatos por habitação, partilha da caixa de areia, limpeza cruzada entre gatos e coabitantes (Continuação I).

	Sexo	Concelho	Idade	Raça	Ambiente	Acesso à rua	Quantos gatos no total?	Partilha caixa	Limpeza cruzada do pelo	Coabitantes
18	F	Castelo Branco	8m	Persa	Misto	Sim	8	Sim	Sim	Cão
19	M	Castelo Branco	6m	Persa	Misto	Sim	8	Sim	Sim	Cão
20	M	Lisboa	7m	SRD	Misto	Sim	2	Sim	Sim	Não
21	M	Lisboa	7m	SRD	Misto	Sim	2	Sim	Sim	Não
22	M	Mafra	6m	SRD	Misto	Sim	1	--	--	Cães + Animais de quinta
23	MC	Lisboa	4a	Sphinx	Interior	Não	1	--	--	Cão
24	FC	Oeiras	2a	SRD	Interior	Não	1	--	--	Cão
25	MC	Lisboa	1a	Persa	Interior	Não	1	--	--	Não
26	MC	Oeiras	10a	British Shorthair	Interior	Não	1	--	--	Cão
27	FC	Lisboa	8a	Abissínio	Misto	Sim	3	Sim	Sim	Não
28	M	Loures	8m	SRD	Interior	Não	1	--	--	Não
29	MC	Lisboa	1a	SRD	Misto	Sim	2	Sim	Sim	Pássaros
30	MC	Lisboa	2a	SRD	Interior	Não	1	--	--	Cão
31	F	Mafra	3a	SRD	Exterior	Sim	Colónia	Sim	Sim	Cão
32	F	Amadora	7m	SRD	Misto	Sim	2	Sim	Sim	Porquinhos-da--Índia

Tabela 15 – Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais: sexo, concelho, idade, raça, ambiente, acesso à rua, número de gatos por habitação, partilha da caixa de areia, limpeza cruzada entre gatos e coabitantes (Continuação II).

	Sexo	Concelho	Idade	Raça	Ambiente	Acesso à rua	Quantos gatos no total?	Partilha caixa	Limpeza cruzada do pelo	Coabitantes
33	FC	Amadora	1a	SRD	Misto	Sim	2	Sim	Sim	Porquinhos-da--Índia
34	MC	Lisboa	10m	SRD	Interior	Não	3	Sim	Sim	Não
35	FC	Lisboa	3a	SRD	Interior	Não	8	Sim	Sim	Não
36	FC	Lisboa	4a	SRD	Interior	Não	12	Não	Sim	Cão
37	FC	Sesimbra	10a	Persa	Misto	Sim	2	Não	Não	Não
38	F	Loures	6m	SRD	Interior	Não	1	--	--	Não
39	F	Cascais	2a	SRD	Misto	Sim	20	Sim	Sim	Cão
40	M	Lisboa	2a	SRD	Misto	Sim	1	--	--	Não
41	M	Odivelas	10a	Persa	Interior	Não	5	Sim	Sim	Não
42	MC	Seixal	8m	SRD	Interior	Não	1	--	--	Pássaros
43	MC	Sintra	11m	SRD	Interior	Não	3	Sim	Sim	Não
44	F	Sintra	11m	SRD	Interior	Não	3	Sim	Sim	Não
45	FC	Loures	8m	SRD	Interior	Não	1	--	--	Não
46	M	Sintra	6m	Scottish Straight	Interior	Não	1	--	--	Não
47	M	Lisboa	5m	SRD	Interior	Não	1	--	--	Não
48	FC	Lisboa	6a	SRD	Misto	Sim	2	Sim	Sim	Não
49	FC	Lisboa	5a	SRD	Misto	Sim	2	Sim	Sim	Não
50	FC	Oeiras	7a	SRD	Misto	Sim	3	Sim	Sim	Não

Tabela 16 – Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais: sexo, concelho, idade, raça, ambiente, acesso à rua, número de gatos por habitação, partilha da caixa de areia, limpeza cruzada entre gatos e coabitantes (ContinuaçãoIII).

	Sexo	Concelho	Idade	Raça	Ambiente	Acesso à rua	Quantos gatos no total?	Partilha caixa	Limpeza cruzada do pelo	Coabitantes
51	MC	Oeiras	10a	SRD	Misto	Sim	1	--	--	Cão
52	FC	Lisboa	1a	SRD	Interior	Não	1	--	--	Não
53	F	Lisboa	2m	SRD	Interior	Não	2	Sim	Sim	Não
54	FC	Mafra	1a	SRD	Misto	Sim	1	--	--	Cão
55	MC	Cascais	2a	SRD	Interior	Não	1	--	--	Não
56	M	Oeiras	9m	Persa	Interior	Não	1	--	--	Não
57	M	Lisboa	2m	SRD	Misto	Sim	1	--	--	Cão
58	M	Mafra	8m	SRD	Interior	Não	1	--	--	Coelho
59	MC	Mafra	2a	SRD	Interior	Não	1	--	--	Não
60	MC	Mafra	3a	SRD	Interior	Não	2	Sim	Sim	Não

M – Macho; MC – Macho castrado; F – Fêmea; FC – Fêmea castrada; m - Meses; a – Anos; SRD – Sem raça definida; X – cruzado.

Tabela 17– Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais: Desparasitação (frequência e produto utilizado), Vacinação e Doença/Afeção (qual, há quanto tempo surgiu e medicação atual).

	Desparasitação interna	Frequência	Produto utilizado	Vacinação	Doença/ Afeção	Qual?	Há quanto tempo foi diagnosticada	Medicação atual
1	Sim	6-6 meses	Praziquantel+Pirantel	Pan+Her+Cal	Não	--	--	--
2	Sim	1.ª vez	Milbemicina Oxima+Praziquantel	Não	Sim	Coriza	1m	Não
3	Sim	3-3 meses	Milbemicina Oxima+Praziquantel	Não	Não	--	--	--
4	Sim	1.ª vez	Não sabe	Pan+Her+Cal	Não	--	--	--
5	Sim	6-6 meses	Praziquantel+Pirantel	Pan+Her+Cal+ FeLV	Sim	Asma; Displasia da Anca	2a	Salbutamol; Fluticasona. (inaláveis)
6	Sim	6-6 meses	Praziquantel+Pirantel	Pan+Her+Cal	Não	--	--	--
7	Sim	6-6 meses	Praziquantel+Pirantel	Não	Não	--	--	--
8	Não	--	--	Não	Não	--	--	--
9	Sim	anualmente	Não sabe	Não	Sim	Massa vulvar ulcerada	3m	Não
10	Não	--	--	Não	Sim	Fratura do fémur esquerdo (presença de calo ósseo)	Não sabe	Não
11	Sim	2-2 meses	Pirantel	Pan+Her+Cal	Sim	Criptosporidiose	1m	Não
12	Sim	6-6 meses	Praziquantel+Pirantel	Pan+Her+Cal	Não	--	--	--
13	Sim	6-6 meses	Milbemicina Oxima+Praziquantel	Pan+Her+Cal	Não	--	--	--

Tabela 18– Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais: Desparasitação (frequência e produto utilizado), Vacinação e Doença/Afeção (qual, há quanto tempo surgiu e medicação atual) (Continuação I).

	Desparasitação interna	Frequência	Produto utilizado	Vacinação	Doença/ Afeção	Qual?	Há quanto tempo foi diagnosticada	Medicação atual
14	Sim	1.ª vez	Febendazol+Praziquantel	Pan+Herp+Cal	Não	--	--	--
15	Sim	6-6 meses	Milbemicina Oxima+Praziquantel	Não	Não	--	--	--
16	Sim	6-6 meses	Milbemicina Oxima+Praziquantel	Pan+Her+Cal	Suspeita	CMH	2a	Não
17	Sim	mensalmente	Praziquantel+Pirantel/Oxibendazole+Niclosamida/Febendazol	Pan+Cal	Não	--	--	--
18	Sim	mensalmente	Praziquantel+Pirantel/Oxibendazole+Niclosamida/Febendazol	Pan+Cal	Não	--	--	--
19	Sim	mensalmente	Praziquantel+Pirantel/Oxibendazole+Niclosamida/Febendazol	Pan+Cal	Não	--	--	--
20	Não	--	--	Não	Não	--	--	--
21	Não	--	--	Não	Não	--	--	--
22	Não	--	--	Não	Não	--	--	--
23	Sim	4-4 meses	Milbemicina Oxima+Praziquantel	Pan+Her+Cal	Sim	Herpesvirose	3/4a	Lisina

Tabela 19– Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais: Desparasitação (frequência e produto utilizado), Vacinação e Doença/Afeção (qual, há quanto tempo surgiu e medicação atual) (Continuação II).

	Desparasitação interna	Frequência	Produto utilizado	Vacinação	Doença/ Afeção	Qual?	Há quanto tempo foi diagnosticada	Medicação atual
24	Sim	1.ª vez	Milbemicina Oxima+Praziquantel	Não	Não	--	--	--
25	Sim	4-4 meses	Milbemicina Oxima+Praziquantel	Pan+Her+Cal	Não	--	--	--
26	Sim	6-6 meses	Não sabe	Pan+Her+Cal	Não	--	--	--
27	Sim	6-6 meses	Praziquantel+Pirantel	Não	Sim	Adenocarcinoma mamário	1 mês	Não
28	Não	--	--	Pan+Her+Cal	Não	--	--	--
29	Sim	6-6 meses	Oxibendazol+Niclosamida	Pan+Her+Cal	Não	--	--	--
30	Sim	3-3 meses	Milbemicina Oxima+Praziquantel	Pan+Her+Cal	Não	--	--	--
31	Sim	6-6 meses	Não sabe	Pan+Her+Cal	Não	--	--	--
32	Sim	4-4 meses	Milbemicina Oxima+Praziquantel	Pan+Her+Cal+ FeLV	Não	--	--	--
33	Sim	4-4 meses	Milbemicina Oxima+Praziquantel	Pan+Her+Cal+ FeLV	Sim	Asma com elevação das IgE estruturais	6m	Sabultamol (em necessidade)
34	Sim	1.ª vez	Praziquantel+Pirantel/Imidaclopride+Moxidectina	Pan+Her+Cal	Não	--	--	--
35	Sim	6-6 meses	Milbemicina Oxima+Praziquantel	Não	Não	--	--	--

Tabela 20– Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais: Desparasitação (frequência e produto utilizado), Vacinação e Doença/Afeção (qual, há quanto tempo surgiu e medicação atual) (Continuação III).

	Desparasitação interna	Frequência	Produto utilizado	Vacinação	Doença/ Afeção	Qual?	Há quanto tempo foi diagnosticada	Medicação atual
36	Sim	6-6 meses	Milbemicina Oxima+Praziquantel	Não	Não	--	--	--
37	Sim	3-3 meses	Milbemicina Oxima+Praziquantel	Pan+Her+Cal+ FeLV	Não	--	--	--
38	Sim	2-2 meses	Praziquantel+Pirantel	Não	Não	--	--	--
39	Não	--	--	Não	Não	--	--	--
40	Não	--	--	Não	Não	--	--	--
41	Não	--	--	Não	Não	--	--	--
42	Sim	4-4 meses	Milbemicina Oxima+Praziquantel	Não	Sim	Panleucopénia	6m	Não
43	Sim	6-6 meses	Milbemicina Oxima+Praziquantel	Pan+Her+Cal	Suspeita	Alergia alimentar	4m	Ração hipoalergénica
44	Sim	6-6 meses	Milbemicina Oxima+Praziquantel	Pan+Her+Cal	Não	--	--	--
45	Não	--	--	Não	Não	--	--	--
46	Sim	1.ª vez	Não sabe	Pan+Her+Cal	Não	--	--	--
47	Sim	mensalmente	Milbemicina Oxima+Praziquantel	Pan+Her+Cal	Não	--	--	--
48	Sim	6-6 meses	Não sabe	Pan+Her+Cal	Sim	Dermatite	3a	Não
49	Sim	6-6 meses	Não sabe	Pan+Her	Sim	Quistos renais	2a	Não

Tabela 21– Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais: Desparasitação (frequência e produto utilizado), Vacinação e Doença/Afeção (qual, há quanto tempo surgiu e medicação atual) (Continuação IV).

	Desparasitação interna	Frequência	Produto utilizado	Vacinação	Doença/ Afeção	Qual?	Há quanto tempo foi diagnosticada	Medicação atual
50	Sim	anualmente	Praziquantel+Pirantel/ Emodepside+Prazquantel	Pan+Her+Cal+ FeLV	Não	--	--	--
51	Sim	6-6 meses	Milbemicina Oxima+Praziquantel	Pan+Her+Cal+ FeLV	Não	--	--	--
52	Sim	1.ª vez	Febendazol	Não	Suspeita	Asma	1m	Salbutamol Futicazona
53	Sim	1.ª vez	Praziquantel+Pirantel	Não	Não	--	--	--
54	Não	--	--	Não	Não	--	--	--
55	Sim	4-4 meses	Oxibendazol+Niclosamida	Pan+Her+Cal	Não	--	--	--
56	Não	--	--	Não	Não	--	--	--
57	Sim	1.ª vez	Praziquantel+Pirantel	Não	Não	--	--	--
58	Sim	1.ª vez	Não sabe	Não	Não	--	--	--
59	Não	--	--	Não	Não	--	--	--
60	Não	--	--	Não	Não	--	--	--

Pan – Panleucopénia felina; Her – Herpesvírus; Cal – Calicivírus; FeLV – Vírus da leucemia felina; CMH – Cardiomiopatia hipertrófica; m – Meses; a – Anos.

Tabela 22 – Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais: Diarreia e sua caracterização e Observações.

	Diarreia	Há quanto tempo	Duração	Caraterísticas das fezes	Cor das fezes	Aumento defeções	Urgência defeção	Observações
1	Não	--	--	--	--	--	--	Viaja 2x/ano para os Açores; Presença de sangue nas fezes sem diarreia, em episódios esporádicos
2	Não	--	--	--	--	--	--	--
3	Sim esteve	4a	3m	Líquidas + Pastosas	Amarelas claras/Castanhas	Não	Não	Fezes com cheiro fétido
4	Sim está	1s	Em percurso	Pastosas	Castanhas	Não	Não	Eosinofilia;Alteração da dieta coincidente início da diarreia
5	Sim esteve	Não sabe	Não sabe	Pastosas	Castanhas	Não	Não	Nas férias viaja para a Madeira onde tem acesso ao exterior; Diarreia coincidente com toma de AB
6	Sim esteve	Não sabe	Não sabe	Pastosas	Castanhas	Não	Não	Nas férias viaja para a Madeira onde tem acesso ao exterior; Diarreia coincidente com toma de AB
7	Não	--	--	--	--	--	--	--
8	Não	--	--	--	--	--	--	--
9	Não	--	--	--	--	--	--	--
10	Sim está	Não sabe	Em percurso	Pastosas com muco	Castanhas	Não	Não	--
11	Sim está	7m	Em percurso	Líquidas	Castanhas	Não	Não	--
12	Sim está	2m	Em percurso	Líquidas/Pastosas, com sangue e muco	Amarelas claras/Castanhas	Sim	Sim	--

Tabela 23 – Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais: Diarreia e sua caracterização e Observações (Continuação I).

	Diarreia	Há quanto tempo	Duração	Caraterísticas das fezes	Cor das fezes	Aumento defeções	Urgência defeção	Observações
13	Sim esteve	Não sabe	2/3d	Líquidas, com muco e sangue	Amarelas claras/Castanhas	Sim	Não	--
14	Não	--	--	--	--	--	--	--
15	Não	--	--	--	--	--	--	--
16	Não	--	--	--	--	--	--	--
17	Sim está	5m	Em percurso	Pastosas	Amarelas claras	Sim	Sim	Já fez vários AB sem resultado, mas não fazia AB há pelo menos 8 dias
18	Sim está	5m	Em percurso	Pastosas	Amarelas claras	Sim	Sim	Já fez vários AB sem resultado, mas não fazia AB há pelo menos 8 dias
19	Sim está	5m	Em percurso	Pastosas	Amarelas claras	Sim	Sim	Já fez vários AB sem resultado, mas não fazia AB há pelo menos 8 dias
20	Sim está	1m	Em percurso	Pastosas	Castanhas	Não	Não	--
21	Sim está	1m	Em percurso	Pastosas	Castanhas	Não	Não	--
22	Sim está	1s	Em percurso	Líquidas	Amarelas claras	Sim	Não	--
23	Sim está	2d	Em percurso	Pastosas	Castanhas	Não	Não	--
24	Sim esteve	Não sabe	1d	Pastosas	Castanhas claras	Não	Não	Eosinofilia; Diarreia coincidente com mudança de ração.
25	Sim está	1d	Em percurso	Líquidas	Castanhas	Sim	Sim	Presença de vómito
26	Não	--	--	--	--	--	--	Hematoquézia, hematúria e vómito há 1 mês
27	Não	--	--	--	--	--	--	--

Tabela 24 – Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais: Diarreia e sua caracterização e Observações (Continuação II).

	Diarreia	Há quanto tempo	Duração	Caraterísticas das fezes	Cor das fezes	Aumento defeções	Urgência defeção	Observações
28	Sim esteve	Não sabe	1d	Pastosas	Castanhas	Sim	Não	Presença de fezes com cheiro fétido; Diarreia coincidente com ingestão de alimento estranho
29	Sim está	Desde sempre	Em percurso	Pastosas com sangue	Castanhas	Não	Não	--
30	Não	--	--	--	--	--	--	--
31	Não	--	--	--	--	--	--	--
32	Sim está	2s	Em percurso	Pastosas	Castanhas alaranjadas	Sim	Não	Fezes com cheiro fétido
33	Sim está	1d	Em percurso	Pastosas	Castanhas alaranjadas	Sim	Não	Fezes com cheiro fétido
34	Sim está	1d	Em percurso	Pastosas	Castanhas	Não	Não	--
35	Não	--	--	--	--	--	--	--
36	Sim esteve	1,5a	1/2d	Líquidas	Castanhas	Não	Não	Diarreia coincidente com mudança de ração
37	Não	--	--	--	--	--	--	--
38	Sim esteve	Não sabe	1/2s	Pastosas com sangue	Amarelas claras	Sim	Não	--
39	Sim está	Pelo menos 2d	Em percurso	Líquidas	Castanhas	Não	Não	--
40	Não	--	--	--	--	--	--	--
41	Sim está	2/3s	Em percurso	Pastosas com sangue	Castanhas alaranjadas	Sim	Não	--
42	Sim está	4m	Em percurso	Líquidas/Pastosas, com muco e sangue	Amarelas claras	Sim	Sim	--
43	Sim esteve	6m	1s	Pastosas	Castanhas	Não	Não	Presença de vómito

Tabela 25 – Resultados dos inquéritos realizados aos responsáveis pelos animais: Diarreia e sua caracterização e Observações (Continuação III).

	Diarreia	Há quanto tempo	Duração	Caraterísticas das fezes	Cor das fezes	Aumento defeções	Urgência defeção	Observações
44	Não	--	--	--	--	--	--	--
45	Não	--	--	--	--	--	--	--
46	Sim está	3m	Em percurso	Líquidas/Pastosas	Amarelas claras	Sim	Não	--
47	Não	--	--	--	--	--	--	--
48	Não	--	--	--	--	--	--	--
49	Não	--	--	--	--	--	--	--
50	Não	--	--	--	--	--	--	--
51	Não	--	--	--	--	--	--	--
52	Não	--	--	--	--	--	--	Após LC a gata eliminou uma cord de grandes dimensões
53	Não	--	--	--	--	--	--	--
54	Não	--	--	--	--	--	--	--
55	Não	--	--	--	--	--	--	--
56	Sim está	Pelo menos 2m	Em percurso	Pastosas com muco e sangue	Castanhas	Não	Não	--
57	Sim está	Pelo menos 1s	Em percurso	Pastosas	Castanhas alaranjadas	Sim	Não	--
58	Não	--	--	--	--	--	--	--
59	Não	--	--	--	--	--	--	--
60	Não	--	--	--	--	--	--	--

a – anos; d – dias; s – semanas; m – meses; AB – Antibiótico; LC – Lavagem de cólon.

Anexo VII – Registo dos animais positivos de acordo com o tipo de amostra colhida e dos exames macroscópicos realizados

Tabela 26 – Registo dos animais positivos nas técnicas realizadas.

Animal Nº	Lavado de cólon				Fezes colhidas em 3 dias consecutivos		
	E. Macroscópico	**Flutuação**	**Esfregaço**	**InPouch™TF - Feline**	**E. Macroscópico/ consistência**	**Flutuação**	**Esfregaço**
5	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo *T. foetus*	Negativo/Normal	Negativo	Negativo
7	Proglote de *T. taeniaeformis*	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo/Normal	Ovos de *T. taeniaformis* e ovos tipo oxiurídeos (pseudoparaita)	Negativo
8	Negativo	Ovos de *T.leonina*	Negativo	Negativo	X	X	X
10	Proglotes de *Dipylidium caninum*	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo/Fezes diarreicas com muco	Oocistos *de C. rivolta* e ovos de *Ancylostoma* spp.	Negativo
12	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo/Fezes diarreicas com muco	Oocistos de *C. felis*	Negativo
15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo/Normal	Negativo	Quistos de *Giardia* sp.
20	Proglote de *T. taeniaeformis*	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo/Fezes diarreicas	Ovos de *Ancylostoma* spp. e ovos de *T.cati*	Negativo
21	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo/Fezes pastosas	Ovos de *Ancylostoma* spp.	Negativo
22	Negativo	Oocistos de *C. rivolta*	Negativo	Negativo	Negativo/Fezes diarreicas	Oocistos de *C. rivolta*	Negativo

Tabela 27 – Registo dos animais positivos nas técnicas realizadas (Continuação).

Animal Nº	Lavado de cólon			Fezes colhidas em 3 dias consecutivos		
	E. Macroscópico	**Flutuação**	**E. Macroscópico**	**Flutuação**		**E. Macroscópico**
29	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo/Fezes diarreicas com muco e sangue	Ovos de *Ancylostoma* spp. e ovos de *T. cati*	Quistos de *Giardia* sp.
38	Negativo	Larvas L1 de *A. abstrusus*	Negativo	Negativo	Negativo/Fezes diarreicas	Larvas compatíveis com larvas L1 de parasitas pulomonares	Negativo
39	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo/Normal	Ovos de *Ancylostoma* spp.	Negativo
47	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo/Normal	Oocistos de *C. felis*	Negativo
52	Proglote de *D. caninum*	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo/Normal	Negativo	Negativo
56	Negativo	Negativo	Quistos de *Giardia* sp.	Negativo	Negativo/Fezes diarreicas	Negativo	Quistos de *Giardia* sp.

X – Não foi realizado a análise, pois não foi entregue a amostra de fezes de 3 dias.

Com o Apoio: