



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**DETEÇÃO DA INFEÇÃO POR *BABESIA* SPP., *HEPATOZOO*N SPP., *LEISHMANIA* SPP.,
*EHR*LICHIA SPP. E *DIROFILARIA IMMITIS* EM GATOS (*FELIS CATUS DOMESTICUS*)
POR TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS DIRETAS E SEROLÓGICAS NO CONCELHO DE
ALCOCHETE**

MARIA JOÃO NOBRE DA VEIGA CARVALHO TEIVES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da

Fonseca de Sampaio

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

ORIENTADOR

Doutora Isabel Maria Soares

Pereira da Fonseca de Sampaio

CO-ORIENTADOR

Dra Maria Alexandra Costa Basso

2015

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**DETEÇÃO DA INFEÇÃO POR *BABESIA* SPP., *HEPATOZOON* SPP., *LEISHMANIA* SPP.,
EHRlichia SPP. E *DIROFILARIA IMMITIS* EM GATOS (*FELIS CATUS DOMESTICUS*)
POR TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS DIRETAS E SEROLÓGICAS NO CONCELHO DE
ALCOCHETE**

MARIA JOÃO NOBRE DA VEIGA CARVALHO TEIVES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da

Fonseca de Sampaio

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

ORIENTADOR

Doutora Isabel Maria Soares

Pereira da Fonseca de Sampaio

CO-ORIENTADOR

Dra Maria Alexandra Costa Basso

2015

LISBOA

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Doutora Isabel Pereira da Fonseca, pelos conhecimentos e ensinamentos, pelo incentivo e simpatia e pela orientação e empenho manifestado no acompanhamento desta dissertação de mestrado.

À Dr.^a Ana Maria Leal, colega de curso e amiga, que se disponibilizou para apresentar este projeto ao laboratório Merial e que ajudou na localização de bibliografia.

À Professora Doutora Cristina Costa, da Nova IMS, Universidade Nova de Lisboa pela preciosa ajuda na elaboração da parte estatística da dissertação.

À Merial Portuguesa pelo apoio financeiro na aquisição dos testes específicos para gatos na deteção de anticorpos anti-*Dirofilaria immitis* e ao projeto PTPC/CVT/118566/2010

À Dr.^a Lídia Gomes, pelos ensinamentos, ajuda e boa disposição nas manhãs de terça-feira.

Ao Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV pela realização das análises.

À bibliotecária, Dr.^a Elisa Luz, incansável na busca de artigos.

Ao meu marido Duarte pelo amor e paciência e pela ajuda na formatação da dissertação.

Aos meus filhos, Tomás, João e Helena, que se ressentiram um pouco com a falta da atenção da mãe nos últimos meses mas que são tudo para mim.

À minha mãe e irmã que ficaram a tomar conta dos meus filhos para que eu pudesse concluir este projeto.

À minha colega de trabalho, Dr.^a Vanessa Pinto pelo companheirismo e ajuda na recolha de sangue aos gatos.

À Doutora Ana Sofia Lopes da Universidade Lusófona, pelos conselhos valiosos e ajuda na revisão da parte prática do trabalho.

À Dr.^a Ana Cristina Carvalho pela ajuda na formatação da dissertação.

À Dr.^a Susana Melo, pela sua amizade e incentivo para terminar este trabalho.

Aos donos de todos os gatos que integraram este estudo e aos próprios gatos que serviram de base para este trabalho!

RESUMO

Deteção da infeção por *Babesia spp.*, *Hepatozoon spp.*, *Leishmania spp.*, *Ehrlichia spp.* e *Dirofilaria immitis* em gatos (*Felis catus domesticus*) por técnicas parasitológicas diretas e serológicas no concelho de Alcochete

As doenças transmitidas por vetores (DTV), pela sua grande proliferação a nível mundial, são um problema que tem vindo a ganhar importância nos últimos anos. Estas doenças são mais comuns em cães e a sua importância na população felina ainda é pouco conhecida.

Na presente dissertação pretende-se detetar diferentes hemoparasitas e/ou anticorpos a eles dirigidos, numa população de 40 gatos oriundos do concelho de Alcochete. A pesquisa de parasitas foi feita através de esfregaços de sangue para deteção de *Babesia spp.*, *Hepatozoon spp.*, *Ehrlichia spp.* e microfilárias de *Dirofilaria*; exame de gota a fresco para pesquisa de microfilárias de *Dirofilaria*; imunofluorescência indireta (IFI) para pesquisa de anticorpos anti-*Babesia spp.*, anti-*Ehrlichia spp.* e anti-*Leishmania spp.* e *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) para pesquisa de anticorpos anti-*Dirofilaria immitis*. Não foram visualizadas formas de parasitas nos esfregaços de sangue e o exame de gota a fresco não revelou presença de microfilárias. A deteção de anticorpos por IFI revelou prevalências de 5% (2/40) para *Babesia spp.*, 20% (8/40) para *Ehrlichia spp.* e 0% para *Leishmania spp.* A pesquisa de anticorpos anti-*Dirofilaria immitis* pelo método de ELISA revelou 0% de prevalência. Neste estudo foram avaliados vários fatores (características físicas, habitat, anamnese, história clínica, presença de ectoparasitas, programas de profilaxia) e a sua influência sobre os resultados positivos. Os resultados obtidos mostraram associação estatística significativa entre habitat, contacto com outros animais e alterações no hemograma e a positividade a infeção por *Ehrlichia spp.* e entre contacto com outros animais e a positividade a infeção por *Babesia spp.*, apresentando valores de p menores que 0,05.

Palavras-chave: gato, DTV, *Babesia spp.*, *Hepatozoon spp.*, *Leishmania spp.*, *Ehrlichia spp.* e *Dirofilaria immitis*, esfregaços sanguíneos, IFI, ELISA e Alcochete.

ABSTRACT

Detecting infection by *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., *Leishmania* spp., *Ehrlichia* spp. and *Dirofilaria immitis* in felines (*Felis Catus Domesticus*) in the Alcochete District, using parasitological and serological techniques.

Vector Borne Diseases (VBD), are of growing interest and concern recently, having become more widespread. These diseases are more common in canines and their impact on feline populations is still little known.

The present dissertation aimed to detect different types of hemoparasites or related antibodies in a group of 40 cats in the Alcochete district. The analysis of the parasites was done through blood smears for the detection of *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., *Ehrlichia* spp. and *Dirofilaria immitis*; drop test for *Dirofilaria immitis* microfilariae; Indirect Immuno-Fluorescence (IFI) to assess the presence of antibodies anti-*Babesia* spp., anti-*Ehrlichia* spp. and anti-*Leishmania* spp. and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) to search for antibodies anti-*Dirofilaria immitis*. No parasites were found in the blood smears and the fresh drop test did not reveal the presence of microfilariae.

Detection by IFI indicated a 5% (2/40) prevalence for *Babesia* spp., 20% (8/40) prevalence for *Ehrlichia* spp. and 0% prevalence for *Leishmania* spp. The ELISA method also indicated 0% prevalence for *Dirofilaria immitis*. The study evaluated different environmental elements and physical characteristics of the cats (including their habitat, anamnesis, clinical history, presence of ectoparasites, deworming and vaccination programs and changes in blood count). The analysis assessed the possible influence of these elements on positive infection results for the different VBD under study. The results showed a statistically significant relationship between habitat, contact with other animals, changes in blood count and infection by *Ehrlichia* spp. The study further showed a statistically significant relationship between contact with other animals and positive results for infection by *Babesia* spp., with *p* values under 0,05. Finally, a brief description of the clinical cases of animals that tested positive using the IFI technique was presented.

Key words: cat, VBD, *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., *Leishmania* spp., *Ehrlichia* spp. e *Dirofilaria immitis*, blood smears, IFI and ELISA.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE GERAL	vii
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE GRÁFICOS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO II: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1 – BABESIOSE FELINA.....	3
1.1 - Etiologia.....	3
1.2 – Ciclo biológico.....	4
1.3 – Distribuição geográfica e epidemiologia	5
1.4 - Patogenia	6
1.5 - Sinais Clínicos e alterações analíticas.....	7
1.6 - Diagnóstico.....	8
1.6.1 – Detecção do parasita em esfregaço de sangue corado	8
1.6.2 – Métodos moleculares.....	9
1.6.3 – Métodos serológicos	9
1.7 - Tratamento	9
1.8 - Profilaxia.....	10
1.9 – Importância em saúde pública	11
2 – HEPATIZONOSE FELINA.....	11
2.1 - Etiologia.....	12
2.2 – Ciclo de vida.....	12
2.3 – Distribuição geográfica e epidemiologia	13

2.4 - Patogenia	13
2.5 – Sinais clínicos e alterações analíticas	14
2.6 - Diagnóstico.....	14
2.7 - Tratamento	15
2.8 – Profilaxia.....	15
2.9 – Importância em saúde pública	15
3 - LEISHMANIOSE FELINA.....	15
3.1 - Etiologia.....	15
3.2 – Ciclo biológico.....	16
3.3 – Distribuição geográfica e epidemiologia	17
3.4 - Patogenia	18
3.5 – Sinais clínicos e alterações analíticas	19
3.6 - Diagnóstico.....	19
3.6.1 – Métodos parasitológicos diretos.....	20
3.6.2 – Métodos serológicos	20
3.6.3 – Métodos moleculares.....	21
3.7 - Tratamento	21
3.8 – Profilaxia.....	22
3.9 – Importância em saúde pública	22
4 – ERLIQUIOSE FELINA	23
4.1 - Etiologia.....	23
4.2 – Ciclo biológico.....	24
4.3 – Distribuição geográfica e epidemiologia	24
4.4 - Patogenia	25
4.5 – Sinais clínicos e alterações analíticas	26
4.6 - Diagnóstico.....	26
4.6.1 – Detecção do parasita em esfregaço de sangue corado	27
4.6.2 – Métodos serológicos	28

4.6.3 – Métodos moleculares.....	28
4.7 - Tratamento	29
4.8 – Profilaxia.....	30
4.9. – Importância em saúde pública	30
5 -DIROFILARIOSE FELINA.....	31
5.1 - Etiologia.....	31
5.2 – Ciclo biológico.....	31
5.3 – Distribuição geográfica e epidemiologia	31
5.4 - Patogenia	32
5.5 – Sinais clínicos	34
5.6 - Diagnóstico.....	35
5.6.1 – Métodos serológicos	35
5.6.2 – Diagnóstico imagiológico.....	36
5.6.3 – Diagnóstico ecocardiográfico	37
5.6.4 – Outros meios de diagnóstico.....	37
5.7 - Tratamento	37
5.8 - Profilaxia.....	39
5.9 – Importância em saúde pública	39
6 – SITUAÇÃO EM PORTUGAL DE AGENTES DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR VETORES EM GATOS	
.....	41
6.1- Babesiose felina	41
6.2 –Hepatozoonose felina	41
6.3 – Leishmaniose felina	41
6.4 – Erliquiose felina	42
6.5 – Dirofilariose felina	42
CAPITULO III – Deteção de infeção por <i>Babesia</i> spp., <i>Hepatozoon</i> spp., <i>Leishmania</i> spp., <i>Ehrlichia</i> spp. e <i>Dirofilaria immitis</i> em gatos (<i>Felis catus domesticus</i>), por técnicas parasitológicas diretas e serológicas no concelho de Alcochete	43
1.Objetivos	43

2. Materiais e Métodos	43
2.1 Caracterização geográfica e climática da área do estudo.....	43
2.2. Caracterização da população em estudo	44
2.2.1. – Exame clínico e recolha de informação através de Inquéritos	45
2.3 – Colheita de amostras e processamento	45
2.4 – Esfregaços sanguíneos.....	46
2.5 – Hemograma	46
2.6 – Testes serológicos	47
2.6.1 – Pesquisa de anticorpos anti- <i>Babesia</i> spp. e anti - <i>Ehrlichia</i> spp. pela técnica de IFI (Megacor®)	47
2.6.2 – Pesquisa através de imunofluorescência indireta de anticorpos para <i>Leishmania</i> spp. (<i>Leishmania</i> Spot IF, BioMérieux®)	48
2.6.3 – Pesquisa de anticorpos contra <i>D. immitis</i> (HESKA® Solo Step® FH).....	49
2.7. Análise Estatística.....	51
3 – Resultados	52
3.1 – Caracterização da População	52
3.2 - Resultados obtidos no exame físico e hemograma	55
3.3 – Resultados obtidos na pesquisa de hemoparasitas	56
3.3.1 - Detecção de hemoparasitas em esfregaços de sangue e gota a fresco	56
3.3.2 – Detecção de anticorpos anti- <i>Babesia</i> spp. por IFI	56
3.3.3 - Detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> spp. por IFI.....	57
3.3.4 - Detecção de anticorpos anti- <i>Ehrlichia</i> spp. por IFI	57
3.3.5 - Detecção de anticorpos anti- <i>Dirofilaria immitis</i> através do método de ELISA	60
3.4 – Apresentação dos casos clínicos	60
3.4.1. Gatos co-infetados por <i>Babesia</i> spp. e <i>Ehrlichia</i> spp.	60
3.4.2. Gatos positivos para infeção por <i>Ehrlichia</i> spp.	61
3.5 – Associação estatística.....	64
3.6 – Limitações do estudo	66
4. Discussão.....	67

4.1 - Detecção de hemoparasitas por esfregaço sanguíneo e gota a fresco	67
4.2 – Detecção de anticorpos anti- <i>Babesia</i> spp. por IFI	70
4.3 – Detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> spp. por IFI	72
4.4 – Detecção de anticorpos anti- <i>Ehrlichia</i> spp. por IFI	75
4.5 - Detecção de anticorpos anti- <i>Dirofilaria immitis</i> por ELISA.....	79
5 – Considerações finais.....	83
BIBLIOGRAFIA.....	85
ANEXOS.....	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Babesia</i> spp. intraeritrocitária.....	4
Figura 2 - Imagem de Alcochete.....	44
Figura 3 – Material usado na técnica de IFI.....	49
Figura 4 – Material usado na detecção de anticorpos anti- <i>Dirofilaria immitis</i>	50
Figura 5 – Teste de Heska® Solo Step Feline Heartworm negativo.....	50
Figura 6 – Resultados da pesquisa de anticorpos anti- <i>Ehrlichia</i> spp. obtidos por IFI.....	58
Figura 7 – Imagem de uveíte num gato.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos gatos em estudo por grupos etários (N=40).....	52
Tabela 2 – Distribuição da população em estudo consoante a condição corporal (N=40).....	53
Tabela 3 – Co-habitação dos gatos em estudo com outros animais, animais doentes e pessoas doentes.....	53
Tabela 4 – Frequência absoluta e relativa (%) da desparasitação interna, externa e vacinação da população em estudo (N=40).....	54
Tabela 5 – Sinais clínicos apresentados pelos animais em estudo (N=40).....	55
Tabela 6 – Alterações no hemograma registadas na população em estudo (N=40).....	56
Tabela 7 – Alterações do hemograma apresentadas pelos animais seropositivos para <i>Babesia</i> spp.(N=2).....	56
Tabela 8 – Características físicas, habitat, anamnese, história clínica, presença de ectoparasitas e programas de desparasitação dos dois animais positivos para <i>Babesia</i> spp..	57
Tabela 9 – Sinais clínicos exibidos pelos animais positivos para <i>Ehrlichia</i> spp.....	58
Tabela 10 – Alterações do hemograma apresentadas pelos animais seropositivos para <i>Ehrlichia</i> spp. (N=8).....	59
Tabela 11 – Características físicas, habitat, anamnese, história clínica, presença de ectoparasitas e programas de desparasitação dos animais positivos para <i>Ehrlichia</i> spp.....	59
Tabela 12 – Frequência absoluta e frequência relativa (%) dos agentes testados na amostra populacional (N=40).....	60
Tabela 13 – Associação estatística entre a infeção por <i>Babesia</i> spp. e <i>Ehrlichia</i> spp. e as características físicas, habitat, anamnese, história clínica, presença de ectoparasitas, programas de desparasitação e vacinação e alteração no hemograma dos animais seropositivos para <i>Babesia</i> spp e <i>Ehrlichia</i> spp.....	64

Tabela 14 – Associação entre infeção por <i>Ehrlichia</i> spp. e tipo de habitat (Gatos de interior, Gatos de exterior e Misto).....	65
Tabela 15 – Associação entre infeção por <i>Ehrlichia</i> spp. e contacto com outros animais.....	65
Tabela 16 – Associação entre infeção por <i>Ehrlichia</i> spp. e resultados do hemograma.....	66
Tabela 17 - Associação entre infeção por <i>Babesia</i> spp. e contacto com outros animais	66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição de sexos na amostra.....	52
Gráfico 2 – Distribuição da população consoante o tipo de habitat.....	53
Gráfico 1 - Número de animais positivos a <i>Ehrlichia</i> spp. e número de animais co-infetados com <i>Ehrlichia</i> spp.e <i>Babesia</i> spp.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

- °C – Graus Celcius
- µL – Microlitro
- µm – Micrómetro
- µg - Micrograma
- AML – Área Metropolitana de Lisboa
- BID – A cada doze horas
- DTV – Doenças transmitidas por vetores
- DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic acid*)
- EDTA – Ácido etilendiamino tetra-acético (do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*)
- ELISA – Ensaio imunoenzimático (do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay*)
- EUA – Estados Unidos da América
- FeLV – Vírus da leucemia felina (do inglês *Feline leukemia vírus*)
- FIV – Vírus da imunodeficiência felina (do inglês *Feline immunodeficiency vírus*)
- FMV – Faculdade de Medicina Veterinária
- HARD – do inglês *Heartworm associated respiratory disease*
- IFI – Imunofluorescência indireta
- IgG – Imunoglobulinas G
- IM – Via intramuscular
- kg – Quilograma
- L1 – Primeiro estado larvar
- L2 – Segundo estado larvar
- L3 – Terceiro estado larvar
- L4 – Quarto estado larvar
- L5 – Quinto estado larvar
- LVZ – Leishmaniose visceral zoonótica
- mg - Miligrama
- ml – Mililitro
- n – Número de animais
- nm - Nanómetro
- NUT – Nomenclatura das Unidades Territoriais
- PBS - Tampão fosfato salino (do inglês *Phosphate buffered saline*)
- PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase chain reaction*)
- PO – Por via oral (Per os)
- qPCR – PCR quantitativo (do inglês *quantitative PCR*)
- rpm – Rotações por minuto

SC – Via subcutânea

spp. – Espécies

TAC – Tomografia Axial Computorizada

ULISBOA – Universidade de Lisboa

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO

A importância e a frequência de algumas doenças transmitidas por vetores está a aumentar na Europa, devido a vários fatores humanos, animais e ambientais, entre eles alterações bioclimáticas que favorecem o desenvolvimento dos vetores; alterações ambientais que suportam o aumento numérico de populações de “novas” espécies reservatório selvagens; aumento do número de animais “familiares” que acompanham os donos nas suas deslocações de férias para áreas endémicas e aumento da população de cães e gatos de rua, os quais não recebem os cuidados de saúde necessários e o controle adequado de doenças (Irwin, 2002; Vilhena et al., 2013; Pennisi, 2014).

O aquecimento global tem tendência a aumentar o período de risco para a infeção e a manter um alto nível de incidência do mesmo. A sua importância tem relevo, por exemplo na escolha da altura correta para a implementação de medidas preventivas (Genchi, Rinaldi, Mortarino, Genchi & Cringoli, 2009).

As doenças transmitidas por vetores são doenças provocadas por uma grande variedade de agentes patogénicos, que incluem bactérias, vírus, protozoários e helmintes, afetam hospedeiros vertebrados e são transmitidas através de vetores artrópodes, principalmente carraças, pulgas, mosquitos e flebotomos. Algumas doenças de transmissão vetorial (DTV) podem colocar em risco a vida dos felinos, podem desenvolver-se após um período de incubação muito longo e constituem um desafio de diagnóstico particularmente devido aos seus sinais clínicos pouco específicos (Beugnet & Marié, 2009; Otranto & Dantas-Torres, 2010).

É importante perceber que o conceito de doenças “raras” ou “exóticas” já não é aplicável. Qualquer doença pode aparecer em qualquer parte do mundo e é responsabilidade dos veterinários manterem um conhecimento atualizado destas doenças, saberem as tendências de distribuição dos vetores locais e regionais e estarem a par dos destinos ou origem de viagem dos seus clientes de modo a conseguirem alcançar um diagnóstico fiável (Baneth et al., 2012).

Há pouca informação disponível sobre a prevalência das DTV em gatos em Portugal, deste modo pareceu interessante fazer um estudo de deteção de prevalência de vários hemoparasitas transmitidos por vetores, entre eles *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., *Leishmania* spp., *Ehrlichia* spp. e *Dirofilaria immitis*. Os estudos de prevalência são importantes para determinar os agentes causadores de doença clínica nas diversas áreas geográficas, podendo deste modo eleger um tratamento eficaz, direcionado e específico e instaurar uma profilaxia adequada.

Este trabalho ambiciona ainda tentar estabelecer associações estatísticas significativas entre diversos fatores (características do animal, ambiente circundante, programas de desparasitação, entre outros) e a presença de positividade à infeção provocada pelos agentes em estudo.

Para enquadramento do assunto inicialmente será apresentada uma breve revisão bibliográfica sobre cada doença provocada pelos hemoparasitas analisados, seguindo-se a descrição do trabalho experimental e por fim a discussão dos resultados e considerações finais.

CAPÍTULO II: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 – BABESIOSE FELINA

No final do século dezanove, o Dr. Victor Babes identificou microrganismos presentes nos eritrócitos de gado na Romênia como causa da hemoglobinúria bovina ou *redwater disease*. Mais tarde encontrou formas similares em eritrócitos de ovelhas. Estes elementos foram posteriormente chamados de *Babesia bovis* e *Babesia ovis* respectivamente e o gênero foi denominado *Babesia* em honra do Dr. Babes (Uilenberg, 2006). *Babesia* spp. são consideradas os segundos parasitas mais encontrados no sangue de mamíferos depois dos tripanossomas e há mais de cem espécies conhecidas, havendo informação limitada no que diz respeito a reservatórios e vetores predominantes para cada uma delas (Schnittger, Rodriguez, Florin-Christensen & Morrison, 2012; Esch & Petersen, 2013).

1.1 - Etiologia

A família Babesiidae é caracterizada por parasitas intraeritrocitários não-pigmentados que se reproduzem dentro dos glóbulos vermelhos dando origem a duas ou quatro células-filhas (Boustani & Gelfand, 1996). Os gêneros *Babesia* e *Theileria* pertencem ao filo Apicomplexa, Classe Piroplasma e ordem Piroplasmida (Homer, Aguilar-Delfin, Telford III, Krause & Persing, 2000; Schnittger et al., 2012). As espécies de *Babesia* são caracterizadas morfológicamente como formas pequenas ou grandes, que vão de redondas ou subesféricas, a piriformes podendo formar um ângulo agudo no interior do glóbulo vermelho (Navarrete & Nieto, 1999). Há características fenotípicas, tais como o tamanho dos piroplasmas e o número de células-filhas, que podem ajudar na identificação e diferenciação de espécies durante o exame microscópico, tendo no entanto pouco valor em termos de classificação taxonômica. Os piroplasmas podem ser distinguidos em dois grupos pelo seu diâmetro: pequenas babésias e theilérias (cerca de 1,5 x 2 µm) e grandes babésias (cerca de 5 x 2,5 µm). Todas as babésias de pequenas dimensões assim como todos os parasitas *Theileria* se dividem em quatro merozoítos (formação em cruz de Malta), enquanto que as babésias de grandes dimensões se dividem em dois merozoítos (Schnittger et al., 2012). Quatro espécies de *Babesia* causam doença clínica em gatos: *B. felis*, *B. cati*, *B. leo* e *B. microti-like* (Jacobson, Schoeman & Lobetti, 2000; Shaw, Birtles & Day, 2001; Criado-Fornelio, Martinez-Marcos, Buling-Saraña & Barba-Carretero, 2003b; Bosman, Venter & Penzhorn, 2007; Ayoob, Prittie & Hackner, 2010; Hartmann et al., 2013). *Babesia felis* ocorre comumente nos felinos domésticos, podendo também afetar felinos selvagens (Criado-Fornelio et al., 2003b; Penzhorn, Schoeman & Jacobson, 2004; Kumar, Shekhar, Haque &

Mahto, 2008). *B. cati*, tal como *B. felis* é uma forma pequena de babesia, normalmente responsável por quadros clínicos leves (Ayoob et al., 2010; Hartmann et al., 2013) e encontrada principalmente na Índia (Mudaliar, Achary & Alwar, 1950, citado por Schoeman, Lobeti, Jacobson & Penzhorn, 2001). *B. leo* é geneticamente similar a *B. felis* e é comum em leões na África do Sul (Bosman et al., 2007). Casos reportados de Portugal e Espanha documentaram infecção natural por *B. microti*-like em gatos domésticos (Criado-Fornelio et al., 2003b). Uma nova espécie denominada *B. hongkongensis*, foi descoberta em secções de rim de um gato em Hong-Kong (Wong, Poon, Hui & Yuen, 2012). A classificação taxonómica das espécies de *Babesia* que se baseava inicialmente apenas na morfologia dos parasitas, tem vindo a ser atualizada com a introdução dos métodos moleculares que identificam várias espécies de *Babesia* rotineiramente, as quais não eram possíveis de identificar através da observação microscópica (Schnittger et al., 2012).

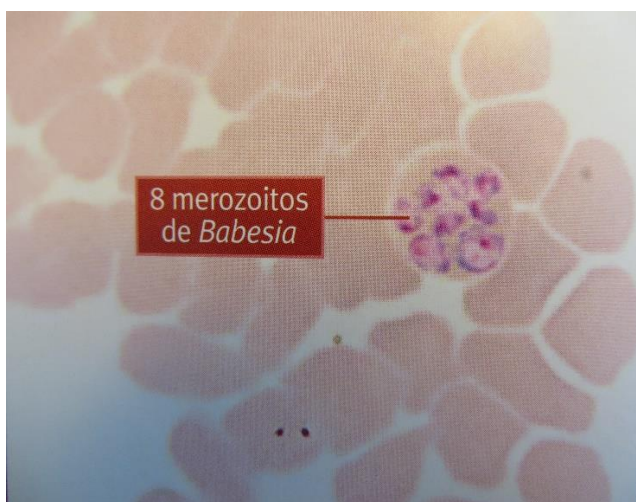


Figura 1- *Babesia* spp. intraeritrocitária (adaptado de Amella, 2006)

1.2 – Ciclo biológico

Há pouca informação sobre transmissão de babesiose em gatos e assume-se que todas as espécies de *Babesia* sejam transmitidas através de uma carraça vetor. Carraças dos géneros *Ixodes*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Amblyomma* e *Haemophysalis* já foram identificadas como responsáveis de infestação de gatos e são provavelmente os vetores de transmissão (Ayoob et al., 2010). Quando as carraças infetadas se alimentam, os esporozoítos são regurgitados para a corrente sanguínea do hospedeiro (Hartmann et al., 2013). Neste, os parasitas aderem à membrana dos eritrócitos e invadem o citoplasma celular onde formam trofozoítos, em forma de anel. O parasita replica-se nos eritrócitos e forma merozoítos através de merogonia (Kumar et al., 2008; Schnitter et al., 2012). Estas estruturas aparecem como inclusões ligadas umas às outras nas suas extremidades formando tetraedros (Hartmann et al., 2013). Os merozoítos podem sofrer divisões

adicionais formando oito ou mais parasitas na mesma célula e eventualmente podem destruir a célula ficando livres na corrente sanguínea e disponíveis para invadir novas células. Alguns merozoítos param a divisão e transformam-se em gamontes ou pré-gametócitos (Kumar et al., 2008; Ayoob et al., 2010; Schnitter et al., 2012). As carraças alimentam-se de sangue infetado e ingerem os gamontes que se diferenciam em gametas, os quais se fundem e originam o zigoto, ocorrendo desenvolvimento sexual do parasita que é seguido de esporogonia nos tecidos da carraça, incluindo as glândulas salivares (Chauvin, Moreau, Bonnet, Plantard & Malandrin, 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Esch & Petersen, 2013). Aqui tem lugar um ciclo final de diferenciação e multiplicação originando esporozoítos que vão infetar o hospedeiro vertebrado depois da carraça ter atingido o próximo estadio, ocorrendo transmissão transestadial, ou seja, a carraça infeta-se num estadio evolutivo e transmite o parasita no estadio seguinte (por exemplo, a babesia é adquirida em larva e é transmitida na fase de ninfa) (Boustani & Gelfand, 1996; Navarrete & Nieto, 1999; Kumar et al., 2008; Chauvin et al., 2009). Em algumas *Babesia* spp., há invasão dos ovários e ovos e formam-se esporozoítos infetantes nas glândulas salivares da próxima geração, originando transmissão transovárica e assegurado a infeção das gerações posteriores de carraças (Uilenberg, 2006; Kumar et al., 2008; Esch & Petersen, 2013). O ciclo de vida da carraça é completado quando ocorre a deposição de ovos e a morte da carraça (Boustani & Gelfand, 1996; Esch & Petersen, 2013). A maturação dos esporozoítos ocorre aquando da fixação da carraça, sendo necessário um tempo de fixação de 2-3 dias antes que a transmissão possa ocorrer em gatos (Ayoob et al., 2010).

1.3 – Distribuição geográfica e epidemiologia

A distribuição da babesiose é praticamente mundial, havendo sido diagnosticada em todos os continentes em maior ou menor grau (Navarrete & Nieto, 1999; Ayoob et al., 2010; Schnittger et al., 2012; Bosman et al., 2013). A maior parte dos casos clínicos de babesiose em gatos é provocada por *Babesia felis* e ocorrem em África, principalmente em zonas costeiras (Jacobson et al., 2000; Schoeman et al., 2001; Criado-Fornelio et al., 2003b; Penzhorn et al., 2004; Kumar et al., 2008; Ayoob et al., 2010; Hartmann et al., 2013). *B. felis* ainda não foi reportada na Europa até à data (Hartmann et al., 2013), sendo a espécie patogénica mais importante em gatos. Ocorre usualmente em gatos com menos de 3 anos de idade sem qualquer predileção de sexo ou raça (Jacobson et al., 2000; Schoeman et al., 2001; Kumar et al., 2008). Além da transmissão usual através de carraças, também ocorre transmissão iatrogénica através de transfusões de sangue (Hartmann et al., 2013). Quanto à transmissão vertical, a avaliação de esfregaços de sangue obtidos de gatinhos recém-nascidos de mães infetadas não revelou parasitémia, no entanto, um estudo efetuado por

Jacobson et al. (2000) documentou um caso de transmissão vertical (Ayoob et al., 2010). A virulência é determinada primariamente pela espécie de parasita envolvida (Hartmann et al., 2013). Uma grande variedade de animais selvagens tem vindo a ser infetada por *Babesia* spp., incluindo, entre outros, leões, lince, panteras, elefantes, girafas, antílopes, rinocerontes e algumas aves. Apesar da prevalência destas infeções entre os animais selvagens estar a aumentar, as infeções subclínicas parecem ser regra geral e os casos clínicos reportados estão relacionados com *stress* ou introdução de animais criados em áreas livres de carraças em regiões com carraças infetadas (Schoeman et al., 2001; Schnittger et al., 2012). A babesiose tem caráter sazonal não por si mesma mas como consequência da sazonalidade dos vetores, no entanto nos locais onde as condições favoráveis (temperatura e humidade) se mantêm durante todo o ano, esta sazonalidade perde-se (Navarrete & Nieto, 1999). O(s) vetor(es) para as espécies de *Babesia* em gatos ainda não foram completamente identificados (Ayoob et al., 2010; Schnittger et al., 2012; Hartman et al., 2013). As fontes de parasitas são os ixodídeos infetados, os doentes com babesiose e sobretudo os denominados portadores saudáveis que são constituídos pelos carnívoros que embora estejam parasitados não apresentam sinais clínicos (Navarrete & Nieto, 1999).

1.4 - Patogenia

A patologia que o género *Babesia* inflige ao hospedeiro varia consideravelmente consoante as diferentes espécies e subespécies envolvidas e também com o estado imunitário individual, idade, infeções concomitantes e resposta à infeção (Irwin, 2009; Ayoob et al., 2010; Solano-Gallego & Baneth, 2011). O período de incubação reportado para *B. felis* é 3-28 dias (Ayoob et al., 2010). O nível de parasitémia está dependente da imunocompetência do hospedeiro, cronicidade da infeção e presença de doença concomitante, não estando necessariamente relacionado com a gravidade dos sinais clínicos e podendo persistir por semanas ou meses (Boustani & Gelfand, 1996; Ayoob et al., 2010). A anemia hemolítica pode ser resultado da lise direta dos glóbulos vermelhos devido à replicação intracelular dos parasitas o que causa uma combinação de hemólise intra e extravascular (Solano-Gallego & Baneth, 2011). O envolvimento hepatocelular resulta primariamente da anemia uma vez que esta origina hipoxia do parênquima hepático que por sua vez provoca necrose centrolobular com aumento da atividade enzimática associada. Estas alterações hepáticas podem também originar colestase secundária que resulta do aumento de volume celular provocado pelos danos hepáticos que por sua vez vai fazer a compressão dos canalículos biliares e consequente hiperbilirrubinémia (Penzhorn et al., 2004; Ayoob et al., 2010). Foi observada hiperglobulinémia em gatos, que pode ser descrita como uma combinação das proteínas da

fase aguda e crônica que são produzidas em resposta aos antígenos do parasita (Penzhorn et al., 2004). A imunidade às espécies de *Babesia* é dependente da reação imune desenvolvida em resposta aos eritrócitos infetados ou merozoítos livres mas na maior parte dos casos não há eliminação do parasita. Os gatos que recuperam dos sinais clínicos normalmente permanecem portadores crônicos (Ayoob et al., 2010; Esch & Petersen, 2013; Hartmann et al., 2013).

1.5 - Sinais Clínicos e alterações analíticas

Manifestações comuns da infecção aguda por *Babesia* spp. em diferentes hospedeiros incluem febre, anemia, hemoglobinúria, icterícia, letargia e anorexia sendo que o estado crônico é geralmente sem sinais clínicos (Ayoob et al., 2010; Solano-Gallego & Baneth, 2011). Em contraste com a babesiose noutros animais domésticos, a babesiose felina tende a ser menos grave, não é associada a pirexia e a icterícia é um achado ocasional (Futter & Belonje, 1980, citado por Penzhorn et al., 2004; Baneth et al., 2004; Navarrete & Nieto, 1999; Jacobson et al., 2000; Schoeman et al., 2001). Os sinais clínicos são mais comuns em jovens adultos (Schoeman et al., 2001; Schoeman & Leisewitz, 2006) e incluem prostração, perda de peso, mau estado geral, seguido de anemia, edema, hemoglobinúria, hepatomegalia, esplenomegalia, vômitos, diarreias, sinais clínicos respiratórios, dificuldades locomotoras, mialgias, paralisia, paresia e incoordenação (Breitschwerdt, 1995; Navarrete & Nieto, 1999; Schoeman et al., 2001; Penzhorn et al., 2004; Kumar et al., 2008; Ayoob et al., 2010; Bosman et al., 2013). A maioria dos sinais clínicos ocorre como consequência da anemia regenerativa macrocítica, hipocrômica, a qual é de origem multifatorial, induzindo inúmeras respostas imunes que podem levar à disfunção orgânica múltipla (Navarrete & Nieto, 1999; Kumar et al., 2008; Ayoob et al., 2010). Muitos dos casos que apresentam febre têm doença concomitante diagnosticada (Hartmann et al., 2013). Nos adultos a apresentação é normalmente crônica com reaparecimento da doença quando há diminuição das resistências do hospedeiro, como consequência de *stress*, intervenção cirúrgica, gravidez, doenças concomitantes entre outros (Navarrete & Nieto, 1999).

As alterações do hemograma geralmente demonstram um decréscimo no hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos; anemia, normalmente macrocítica hipocrômica associada a anisocitose, poiquilocitose e reticulocitose. Não há alterações características na contagem de leucócitos (quando estas existem estão normalmente associadas a doença ou infecção concomitante) e a trombocitopenia é um achado inconsistente (Schoeman et al., 2001; Penzhorn et al., 2004; Wells, 2012; Hartmann et al., 2013). Em alguns casos foi observada uma elevação moderada das transaminases hepáticas e aumento da concentração da bilirrubina total (Schoeman et al., 2001; Penzhorn

et al., 2004; Kumar et al., 2008; Wells, 2012). Outras infecções concomitantes reportadas incluem a hemobartonelose cujos sinais clínicos são muito semelhantes à babesiose felina; a infecção pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV) e pelo vírus da leucemia felina (FeLV) (Jacobson et al., 2000; Schoeman et al., 2001; Kumar et al., 2004; Shoeman & Leisewitz, 2006; Ayoob et al., 2010).

1.6 - Diagnóstico

O diagnóstico clínico não é absolutamente fiável, uma vez que nenhum dos sinais clínicos é patognomónico, muito pelo contrário, são sinais clínicos gerais, compatíveis com vários processos de diferentes etiologias. O diagnóstico clínico deve sempre ser associado ao diagnóstico epidemiológico e laboratorial para chegar a um diagnóstico assertivo e fiável (Navarrete & Nieto, 1999). Deve suspeitar-se de babesiose num paciente com febre de origem desconhecida que viveu ou viajou para locais endémicos, especialmente quando há história de parasitismo por carraça. O método mais rápido de diagnóstico passa pelo esfregaço sanguíneo e identificação do agente nos eritrócitos (Boustani & Gelfand, 1996; Irwin, 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011). O diagnóstico laboratorial inclui a observação de esfregaços sanguíneos corados, testes serológicos e métodos moleculares (Kumar et al., 2008; Ayoob et al., 2010; Hartmann et al., 2013).

1.6.1 – Detecção do parasita em esfregaço de sangue corado

O diagnóstico é baseado na identificação do parasita num esfregaço de sangue. *B. felis* (0,9 x 0,7 µm) tem cerca de um terço do tamanho de *B. canis* (2,7 x 1,7 µm) e os parasitas são redondos ou irregularmente circulares. Cruzes de Malta (células-filhas individuais dispostas em forma de cruz) são ocasionalmente observadas. A maioria dos eritrócitos contém apenas um parasita mas em infecções graves podem estar presentes dois e em diferentes fases de desenvolvimento (Vilhena et al., 2013). A deteção de *Babesia* spp. em esfregaços sanguíneos corados tem sido a técnica de diagnóstico padrão durante muitos anos. Este método é fiável quando há presença de parasitemia moderada ou alta mas quando esta é baixa ou no caso de portadores crónicos, este método é pouco sensível e não recomendado. É aconselhada a avaliação rotineira de esfregaços de sangue em gatos sem sinais clínicos oriundos de zonas endémicas tendo sempre em conta a limitação deste teste devido à incapacidade de identificação de géneros ou espécies uma vez que a morfologia dos parasitas é muito semelhante (Ayoob et al., 2010; Solano-Gallego & Baneth, 2011). Esfregaços realizados a partir de sangue capilar (ponta da orelha) podem ser benéficos na exibição das formas grandes de *Babesia* e normalmente contém maior número de parasitas

versus esfregaços realizados a partir de sangue de veia central. Um esfregaço fresco é recomendado para um diagnóstico preciso de infecção (Ramsey, Gunn-Moore & Shaw, 2001; Solano-Gallego & Baneth, 2011). Tanto *Haemobartonella* como os parasitas *Babesia* são melhor identificados com uma coloração de Romanovski (Jacobson et al., 2000; Kumar et al., 2008; Hartmann et al., 2013).

1.6.2 – Métodos moleculares

Os métodos moleculares incluem a reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction* – PCR). É uma técnica de diagnóstico sensível e específica que deteta a presença do DNA/RNA do parasita. Esta detecção é possível em sangue e outros tecidos orgânicos, quer no hospedeiro vertebrado quer no invertebrado (Ayoob et al., 2010). É particularmente útil na detecção da infecção em cães e gatos com parasitêmia baixa e para a determinação de espécies de parasitas (Shaw et al., 2001; Ayoob et al., 2010; Solano-Gallego & Baneth, 2011).

1.6.3 – Métodos serológicos

A serologia pode indicar uma infecção persistente atual ou antiga. O teste de imunofluorescência indireta é o teste mais comumente usado para a babesiose canina (Solano-Gallego & Baneth, 2011), no entanto, reação cruzada com diferentes tipos de *Babesia* pode ocorrer assim como com outros tipos de parasitas protozoários. Resultados falsos negativos são possíveis em animais muito jovens, pacientes imunodeprimidos ou em casos de infecção agudas muito recentes, aonde ainda não houve tempo para o desenvolvimento da resposta imunitária (Ayoob et al., 2010). Resultados positivos em áreas endêmicas devem ser interpretados com alguma precaução pois pode ocorrer um nível alto de anticorpos em portadores sem sinais clínicos, assim como em animais previamente expostos e tratados (Ayoob et al., 2010).

1.7 - Tratamento

No que diz respeito ao tratamento da babesiose, o objetivo é a cura clínica e resolução da anemia, em conjunto com a redução da parasitêmia, uma vez que a esterilização de infecção não é realista (Ayoob et al., 2010). Gatos sem sinais clínicos com parasitêmia devem ser monitorizados clínica e hematologicamente a intervalos regulares, não sendo necessário tratamento na ausência de sinais clínicos ou de anemia. O único fármaco fidedigno e consistentemente efetivo contra *B. felis* é o antimalárico fosfato de primaquina. A dose de

0,5 mg/kg via oral, uma a três vezes com intervalos de 7 dias ou injeções únicas de 0,5 a 1 mg/kg resultam numa redução drástica da parasitemia e aumento do hematócrito em 3 dias (Shoeman & Leisewitz, 2006). Causa frequentemente vômitos quando é administrado oralmente e é letal em doses que excedam 1mg/kg (Potgieter, 1981, citado por Penzhorn et al., 2004; Ayoob et al., 2010). Alguns clínicos usaram esfregaços de sangue para determinar a duração do tratamento. Todas as babesias pequenas (*B. felis* em particular) são relativamente refratárias à terapêutica e o tratamento repetido pode ser necessário para controlar as infecções. O fosfato de primaquina não esteriliza a infecção e o estado de portador pode persistir por anos (Kumar et al., 2008; Ayoob et al., 2010; Hartmann et al., 2013). Muitos clínicos referiram que o uso de fosfato de primaquina durante períodos prolongados não demonstrou efeitos adversos mas na realidade o tratamento deve ser baseado nas alterações clínicas e hematológicas em vez de na presença única de parasitas (Ayoob et al., 2010). A doxiciclina é um adjuvante útil para o fosfato de primaquina uma vez que as tetraciclinas são efetivas contra babesias pequenas em algumas circunstâncias, são bastante seguras e têm um espectro antibacteriano largo para combater outras infecções concomitantes. Como terapia de suporte destacam-se suplementos vitaminas/minerais, fluidoterapia, corticoterapia, suporte hepático e transfusões de sangue (Jacobson et al., 2000; Ayoob et al., 2010). As formas grandes de *Babesia* são comumente tratadas com dipropionato de imidocarb com boa resposta clínica (Solano-Gallego & Baneth, 2011).

1.8 - Profilaxia

A prevenção da babesiose assenta maioritariamente nos tratamentos acaricidas tópicos e ambientais no intuito de reduzir a exposição à carraça vetora e transmissão patogénica para o gato. Os ectoparasiticidas tópicos ou repelem carraças e previnem a sua fixação ou matam as carraças entre 24-48 horas após aplicação. A diminuição da carga parasitária ambiental pode ser conseguida através do uso de formulações acaricidas de libertação lenta convencionais aplicadas por *spray* ou pó (Kumar et al., 2008; Solano-Gallego & Baneth, 2011). Uma vez que os gatos não toleram a permetrina, é necessário usar outro tipo de fármacos (fipronil, por exemplo). A vacina contra a babesiose tem sido utilizada nos bovinos e caninos com graus variáveis de sucesso mas não existem até à data vacinas para felinos (Hartmann et al., 2013). Dado que as espécies de *Babesia* são transmitidas por transfusões de sangue, é altamente recomendado a testagem dos dadores de sangue de uma forma regular (Taboada & Merchant, 1995; Kumar et al., 2008; Solano-Gallego & Baneth, 2011).

1.9 – Importância em saúde pública

A primeira epidemia de babesiose conhecida ocorreu provavelmente em tempos bíblicos e é referida como uma praga divina que infetou o gado do faraó Ramsés II (Êxodo 9:3). A babesiose humana causada por várias espécies de *Babesia* é uma zoonose importante emergente (Homer et al., 2000). A manifestação das infeções varia de assintomática até risco de vida dependendo do estado imunológico do hospedeiro. Em pacientes esplenectomizados ou de qualquer modo imunocomprometidos, assim como em recém-nascidos ou geriátricos, as infeções agudas podem originar complicações que envolvem hemólise grave, instabilidade hemodinâmica, dispneia aguda, disfunção multiorgânica e podem levar à morte (Schnittger et al., 2012). Apesar de várias espécies de *Babesia* terem sido implicadas em infeções humanas em todo o mundo, a situação de saúde pública mais complicada passa-se na América do Norte e é devida a *B. microti* (Homer et al., 2000). Recentemente, o primeiro caso autóctone confirmado de babesiose humana por *B. microti* foi confirmado na Europa (Solano-Gallego & Baneth, 2011). As razões para o aumento da babesiose humana são complexas envolvendo provavelmente alterações ecológicas, aumento do conhecimento da doença, aumento do número de indivíduos suscetíveis tais como aqueles infetados com HIV ou imunodeprimidos e a transmissão do parasita *Babesia* spp. por transfusão sanguínea. Até agora, infeções humanas causadas por espécies de *Babesia* que infetam cães e gatos ainda não foram reportadas. Um estudo realizado em Itália identificou seis amostras de sangue recolhidas de donos de gatos que foram positivas para *Babesia microti*, colocando a hipótese de os gatos poderem ser reservatórios para este parasita (Spada et al., 2014). Os cães e os gatos são nossos companheiros próximos e servem como fonte de carraças infetadas para os humanos e roedores (Solano-Gallego & Baneth, 2011). A prevenção passa por evitar regiões endémicas, principalmente no caso de pessoas imunodeprimidas ou esplenectomizadas. Roupas apropriadas, repelentes e exame corporal diário são também importantes para evitar a doença (Boustani & Gelfand, 1996).

2 – HEPATIZONOSE FELINA

Este parasita foi identificado pela primeira vez no sangue de um gato doméstico na Índia por Patton em 1908 e denominado *Leucocytozoon felis domesticus*. A infeção por *Hepatozoon* spp. é frequentemente identificada em cães mas não em gatos (Vilhena et al., 2013; Baneth, 2011). Há 46 espécies diferentes de *Hepatozoon* descritas em mamíferos, muitas vezes baseadas no registo de um novo hospedeiro. É possível que haja várias espécies ou estirpes geograficamente distintas de *hepatozoon* que são similares em morfologia e podem infetar cães e gatos (Baneth, Aroch, Tal & Harrus, 1998; Baneth et al., 2013).

2.1 - Etiologia

Hepatozoon spp. pertencem ao filo Apicomplexa, família Hepatozoidae e são filogeneticamente relacionadas com os piroplasmas e hemosporinideos (Mathew et al., 2000; Baneth & Shkap, 2003; Baneth, 2011). O género *Hepatozoon* foi denominado após a detecção de merontes no fígado de ratos de laboratório (Miller, 1908 citado por Baneth, 2011). Inicialmente denominado *Leucocytozoon felis domestici*, este parasita felino foi depois transferido para o género *Hepatozoon* e foi colocada a hipótese de os parasitas *Hepatozoon* spp. dos gatos, chacais e hienas serem indistinguíveis de *Hepatozoon canis*, que infeta cães, devido à semelhança morfológica (Wenyon, 1926, citado por Baneth et al., 2013). A classificação de *Hepatozoon* spp. encontrada nos gatos domésticos não é rigorosa e muitos estudos referem-se com cautela a parasitas semelhantes a *Hepatozoon* ou *Hepatozoon* spp. sem se comprometerem com espécies definidas (Klopfer, Nobel & Neuman, 1973; Baneth et al., 1998; Rubini, Paduan, Perez, Ribolla & O'Dwyer, 2005; Bortoli, André, Braga & Machado, 2011). Os gamontes têm forma oval, medem cerca de 4,8 µm por 9,9 µm e o seu tamanho é ligeiramente mais pequeno do que no cão (5 µm por 10 µm) (Salakij, Salakij, Narkkong, Sirinarumitr & Pattanarangsarn, 2008). Com a técnica molecular de PCR foi feita a amplificação de DNA deste parasita a partir de sangue felino e estas sequências foram designadas como *H. felis* e depositadas no GenBank (Criado-Fornelio et al., 2006; Ortuño, Castellà, Criado-Fornelio, Buling & Barba-Carretero, 2008; Baneth et al., 2013). *Hepatozoon americanum* é encontrado no Sul dos Estados Unidos e é transmitido por *Amblyomma maculatum* (Irwin, 2002). A identificação precisa das espécies de *Hepatozoon* baseada somente na morfologia ou patogenicidade é difícil (Kubo, Miyoshi & Yasuda, 2006)

2.2 – Ciclo de vida

As espécies do género *Hepatozoon* são parasitas com um artrópode hematófago como hospedeiro definitivo e um vertebrado como hospedeiro intermediário estando principalmente presentes nas regiões onde a infeção canina por este parasita também existe (Baneth, 2011; Baneth et al., 2013). Ao contrário de outras doenças transmitidas por carrças, a infeção por *Hepatozoon* em cães ocorre pela ingestão de *Rhipicephalus sanguineus* infetados (os parasitas não estão localizados nas partes bucais da carrça) e presume-se que o mesmo aconteça com os gatos (Shaw et al., 2001; Holman & Snowden, 2009; Baneth et al., 2013). Um estudo efetuado por Baneth et al. (2013), indicou que a infeção felina é primariamente causada por uma espécie morfológica e geneticamente distinta, *Hepatozoon felis* e tem predileção para infetar tecidos musculares (Kubo et al., 2006). A reprodução sexuada do parasita ocorre no invertebrado hematófago e a

multiplicação assexuada, com merogonia seguida de gametogonia, tem lugar no hospedeiro vertebrado (Holman & Snowden, 2009; Baneth, 2011). Os hospedeiros definitivos ficam infectados com gamontes de *Hepatozoon* contidos nos leucócitos infectados do hospedeiro vertebrado. Em cerca de 6 semanas várias centenas de esporozoítos infectantes desenvolvem-se em esporocistos dentro dos oocistos no hospedeiro definitivo à medida que este vai atingindo o estado adulto. Depois da ingestão do invertebrado, os esporozoítos dos oocistos são libertados no trato gastro-intestinal do carnívoro, entram na circulação e são transportados para o músculo estriado onde o parasita se desenvolve nas células fagocíticas hospedeiras entre os miócitos. Os parasitas formam esquizontes cuja aparência de “cebola” é causada pelas camadas de mucopolissacarídeos à volta do organismo. Os parasitas multiplicam-se assexuadamente por merogonia e os merozoítos são libertados nos tecidos circundantes desencadeando uma reação inflamatória grave. Em cerca de 4 semanas, os leucócitos infectados com os parasitas, principalmente neutrófilos, podem ser detetados no sangue periférico (Holman & Snowden, 2009; Baneth, 2011). O ciclo de vida do *H. canis* pode ficar completo em 81 dias (Baneth, 2011).

2.3 – Distribuição geográfica e epidemiologia

A sua distribuição geográfica alargada pode ser devida à transmissão através de alguns vetores ubiquitários tais como pulgas, carraças e ácaros ou por outras vias de transmissão bem sucedidas tal como a transmissão transplacentária (Baneth, 2011; Baneth et al., 2013). Os hospedeiros definitivos para *Hepatozoon* spp. são invertebrados sugadores de sangue, incluindo carraças, pulgas, mosca tsé-tsé, mosquitos, piolhos, entre outros (os vetores da hepatozoonose felina não são conhecidos). Como hospedeiros intermediários já foram identificados anfíbios, répteis, pássaros, marsupiais e mamíferos com registo de 139 espécies registadas só em cobras e apenas 39 em mamíferos (Baneth, 2011). Embora a transmissão por ingestão do hospedeiro definitivo contendo oocistos maduros pelo vertebrado intermediário seja a forma de infeção mais comum, outros modos de transmissão são possíveis permitindo a estes parasitas a sua disseminação em habitats naturais por diversas vias. Foi demonstrado que algumas espécies de *Hepatozoon* são transmitidas pela predação de um vertebrado por outro hospedeiro vertebrado infectado (ingestão de cistozoítos, cistos monozóicos ou dizóicos) (Smith, 1996; Baneth, 2011).

2.4 - Patogenia

No caso de *H. canis*, quando há ingestão do vetor, os esporozoítos são libertados no intestino e penetram na parede intestinal. Os esporozoítos invadem as células

mononucleares e disseminam-se através do sangue ou linfa para órgãos alvo que incluem a medula óssea, baço, linfonodos e outros órgãos incluindo o fígado, rins e pulmões (Baneth, 2011). A infecção pode ser associada a patologia do músculo esquelético ou miocárdio cuja lesão é caracterizada histologicamente por grande número de neutrófilos, assim como de macrófagos nos granulomas que se desenvolvem tipicamente em um mês após a infecção (Baneth et al., 1998). Foram encontradas formas parasitárias (deteção por PCR do DNA do parasita) noutros locais tais como baço, medula óssea, linfonodos, fígado, pâncreas, rim, pulmões fetais e líquido amniótico (Baneth et al., 2013). O nível de parasitemia é normalmente baixo nos gatos, com menos de 1% dos neutrófilos e monócitos a conterem gamontes (Baneth et al., 1998). Alterações laboratoriais incluem neutrofilia intensa, monocitose, anemia, azotemia e aumento da enzima muscular creatinina quinase (Baneth et al., 1998). A colonização do parasita pode induzir inflamação piogranulomatosa tecidual originando doença clínica (Lappin, 2003). Regra geral, a resposta inflamatória provocada pelos merontes no tecido muscular não é exuberante (Klopfer et al., 1973; Baneth et al., 2013).

2.5 – Sinais clínicos e alterações analíticas

A hepatozoonose felina parece ser subclínica na maior parte dos casos (Baneth et al, 2013). Uma grande variedade de sinais clínicos foram encontrados em gatos com infecção por *Hepatozoon* spp., tais como letargia, anorexia, estomatite, gengivite, pirexia, perda de peso, corrimento ocular nasal e icterícia (Baneth et al., 1998, Rubini et al., 2005). *Hepatozoon americanum*, mais patogénico, pode causar ataxia, fraqueza, atrofia muscular e doença sistémica em cães. O curso da doença é variável com alguns cães a responderem ao tratamento e outros a desenvolverem complicações fatais (Irwin, 2002).

2.6 - Diagnóstico

O diagnóstico, tal como em outras infeções transmitidas por artrópodes realiza-se pela demonstração do organismo intra-leucocitário com morfologia característica no sangue periférico ou em esfregaço de medula óssea (Shaw et al., 2001; Baneth, 2011). Os gamontes são encontrados no citoplasma de neutrófilos e monócitos e têm uma forma elítica (Baneth, 2011). Leucocitose neutrofílica com desvio à esquerda é a observação hematológica mais frequente. A trombocitopenia não é comum a menos que haja co-infecção com *Ehrlichia* spp. Pode haver presença de anemia não regenerativa, normocrômica, normocítica (Lappin, 2003). O teste de IFI e o teste de ELISA constituem ferramentas de diagnóstico de infecção por *Hepatozoon* spp. (Baneth, 2011). O teste PCR para *H. canis* no

sangue parece ser uma técnica de diagnóstico sensível (Baneth, 2011) e o PCR quantitativo (qPCR) permite a estimativa da concentração inicial do DNA alvo, o que é importante para estimar o estado de portador (Criado-Fornelio et al., 2007).

2.7 - Tratamento

Nos gatos é recomendada a terapia com doxiciclina (5mg/kg) durante 14-21 dias (Shaw et al., 2001).

2.8 – Profilaxia

O controlo das carraças é a melhor forma de prevenção (Lappin, 2003).

2.9 – Importância em saúde pública

Não há evidência de transferência zoonótica deste parasita de animais infetados para pessoas.

3 - LEISHMANIOSE FELINA

O primeiro caso de leishmaniose felina em Portugal foi descrito por Costa-Durão, Rebelo, Peleteiro, Correia & Simões (1994). Entre 1977 e 2014 foram publicados 46 casos clínicos nos quais a leishmaniose foi confirmada em gatos por métodos serológicos e/ou parasitológicos (Ozon et al., 1998; Navarro et al., 2010; Pennisi, 2014). A maioria dos casos ocorreram em zonas endémicas e com maior frequência no Brasil, Portugal, Espanha, França, Suíça, Itália, Alemanha, Israel e Irão (Poli et al., 2002; Maia, Nunes, & Campino, 2008; Colado & Pérez, 2010; Gramiccia, 2011). O primeiro caso de leishmaniose felina foi descrito em 1912 na Argélia, numa habitação onde um cão e uma criança também estavam infetados (Sergent et al., 1912 citado por Maia et al., 2008).

3.1 - Etiologia

Leishmania spp. é um protozoário flagelado pertencente ao género *Leishmania* (ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae) (Ready, 2014) que causa doenças cutâneas, mucocutâneas e viscerais nos cães, humanos e outros mamíferos (Colado & Pérez, 2010; Gramiccia, 2011). As espécies de *Leishmania* definem-se como protozoários heteroxenos com fase promastigota (forma fusiforme, extracelular com um flagelo livre na extremidade

anterior, 14-25 x 1,5-3 μm) no inseto vetor e fase amastigota (forma oval, intracelular, 2,5-5 x 1,5-2 μm) no macrófago (e por vezes também em monócitos e neutrófilos) do hospedeiro vertebrado (Moreno, Nieto & Rodriguez, 1999; Gramiccia, 2011; Pereira da Fonseca, Saraiva-Marques, Basso & Garrido, 2013). A diferença de espécies no género *Leishmania* tem constituído um problema pois a morfologia do parasita não é um critério útil para a especiação. Atualmente já se identificaram entidades taxonómicas distintas (subespécies, complexos, zimodemes) e utilizam-se várias nomenclaturas. O modelo taxonómico mais amplamente aceite é aquele baseado na identificação de isoenzimas. A mobilidade eletroforética de um grupo determinado de isoenzimas permite individualizar um zimodeme que é considerado como a entidade taxonómica básica para a classificação atual do género *Leishmania* (Moreno et al., 1999; Campino et al., 2006). O zimodeme MON-1 é o mais frequentemente reportado e é responsável pela leishmaniose zoonótica afetando humanos, caninos, felinos e outros hospedeiros. A maioria dos casos clínicos de leishmaniose felina reportados na Europa incluem-se neste zimodeme (Cardoso, Lopes, Sherry, Schallig & Solano-Galego, 2010; Maia et al., 2010; Gramiccia, 2011).

3.2 – Ciclo biológico

O ciclo biológico de *Leishmania infantum* tem lugar em dois tipos de hospedeiro, um vertebrado e outro invertebrado (Baneth, Day, Roura & Shaw, 2005; Corrales & Moreno, 2006; Pennisi et al., 2013). Os vetores naturais de leishmania são insetos da subfamília *Phlebotominae*, família Psychodidae da qual se conhecem mais de seiscentas espécies distribuídas por todas as zonas geográficas do mundo. Na Europa, os vetores de *L. infantum* são sempre do género *Phlebotomus*, sendo as espécies *P. perniciosus* e *P. ariasi* as mais importantes na transmissão (Moreno et al., 1999; Maia & Campino, 2011). Os protozoários do género *Leishmania* replicam-se por divisão binária e alguns autores descrevem a rara existência da reprodução sexual (Tomás & Romão, 2008). O parasita adquire ao longo do ciclo duas formas bem diferenciadas: uma móvel e flagelada no flebótomo, denominada promastigota e outra imóvel, intracelular, sem flagelo denominada amastigota no hospedeiro vertebrado. O ciclo completo no hospedeiro invertebrado dura cerca de vinte dias. Quando um flebótomo infetado se alimenta de um hospedeiro vertebrado, inocula formas flageladas do parasita que penetram nos macrófagos da derme, vísceras e membranas mucosas. Os promastigotas transformam-se rapidamente em amastigotas no interior de vacúolos citoplasmáticos destas células e multiplicam-se. Quando o macrófago está repleto dá-se a sua rutura e a conseqüente libertação dos amastigotas que são depois fagocitados por outros macrófagos. Estas células parasitadas com amastigotas podem ser ingeridas por outro flebótomo e convertem-se em promastigotas no tubo digestivo do artrópode, local

onde se multiplicam ativamente. Durante este processo de multiplicação os promastigotas sofrem uma série de transformações que culminam com a aparição dos promastigotas metacíclicos, as formas infetantes que o flebótomo inocula no hospedeiro vertebrado aquando da refeição sanguínea. Deste modo se encerra o ciclo biológico do parasita (Moreno et al., 1999; Corrales & Moreno, 2006; Afonso & Alves-Pires, 2008; Pennisi et al., 2013).

Os flebótomos são insetos muito pequenos com uma longitude corporal inferior a 3 mm e hábitos alimentares noturnos ou crepusculares (Afonso & Alves-Pires, 2008). Apenas as fêmeas destes insetos transmitem o parasita, uma vez que só estas efetuam refeições sanguíneas de que necessitam para desenvolver o seu ciclo gonotrófico (Moreno et al., 1999; Tomás & Romão, 2008). Nos países mediterrânicos e Ásia, estes insetos são mais ativos durante os meses quentes, desde a primavera até aos meses de Outono e na América Latina podem ter atividade durante todo o ano. Não percorrem grandes distâncias e geralmente não voam mais do que 1 quilómetro do seu local de conceção (Moreno et al., 1999; Afonso & Alves-Pires, 2008).

3.3 – Distribuição geográfica e epidemiologia

A leishmaniose visceral zoonótica (LVZ) é endémica em 88 países, incluindo Portugal (World Health Organization [WHO], 2000; Solano-Gallego et al., 2007; Chatzis et al., 2014). Em Portugal já foi descrito a presença de *Leishmania infantum* e recentemente de *Leishmania major* (Pereira da Fonseca et al., 2013). Os gatos são naturalmente infetados pelas mesmas espécies que afetam o cão e os humanos em todo o mundo: *L. infantum* na zona mediterrânica, Irão e Brasil; *L. mexicana* no Texas, EUA; *L. braziliensis* no Brasil e Guiana Francesa; *L. amazonensis* no Brasil e *L. venezuelensis* na Venezuela (Schubach et al., 2004; Souza et al., 2005; Hatam et al., 2010; Trainor, Porter, Logan, Hoffman & Snowden, 2010; Vides et al., 2011; Rougeron, Catzeflis, Hide, Meeûs & Bañuls, 2011, Gramiccia, 2011). O cão doméstico é o principal hospedeiro reservatório de *L. infantum* na Europa, Norte de África e Ásia e atualmente a leishmaniose visceral humana e a leishmaniose canina causadas por *L. infantum* são os tipos de leishmaniose com maior importância médica e veterinária na Europa (Ready, 2014). No entanto, o papel do gato como possível hospedeiro reservatório do agente da LVZ ainda não está claro (Pereira da Fonseca et al., 2013). Alguns autores consideram que o gato é um hospedeiro acidental enquanto outros sugerem que os felinos podem atuar como potenciais hospedeiros reservatórios (Ayllon et al., 2008b; Maia et al., 2008; Maia & Campino, 2011). Os dados, baseados em estudos epidemiológicos e casos reportados, que sugerem o papel de hospedeiro reservatório alternativo são (1) o facto de poderem ser infetados por *Leishmania*

e não desenvolverem a doença; (2) presença de parasitas no sangue periférico; (3) são uma fonte de sangue e conseguem transmitir parasitas a um vetor competente; (4) co-habitam com humanos e (5) gatos doentes infetados com leishmania não recuperam sem terapêutica apropriada (Gramiccia & Gradoni, 2005; Maroli et al., 2007; Maia et al., 2010; Maia & Campino, 2011). Os gatos têm comportamentos característicos que podem contribuir para a exposição ao vetor: são predadores noturnos, deslocam-se num raio de 1,5 km da residência e podem usar florestas como território de caça, constituindo elementos ideais para a ligação entre os animais silvestres e domésticos (Soares, Duarte & Sousa, 2014).

Ocasionalmente, em algumas espécies de mamíferos, a transmissão pode ser feita através de transfusões de sangue (Solano-Gallego et al., 2009), via venérea e por via congénita (Owens et al., 2001; Baneth et al., 2005; Silva et al., 2009; Quinnelli & Courtenay, 2009).

Vários fatores contribuíram para o desenvolvimento desta parasitose nos últimos anos, entre eles, as alterações climáticas, a deterioração das condições socio-económicas, as alterações no habitat natural dos hospedeiros e vetores, a presença de condições imunossupressoras dos hospedeiros vertebrados e a resistência dos parasitas e dos vetores aos fármacos profiláticos (Pereira da Fonseca et al., 2013).

3.4 - Patogenia

Após a inoculação das formas infetantes e fagocitose das mesmas pelas células do sistema macrofágico fagocítico, há rompimento dos macrófagos, as formas amastigotas libertam-se e penetram noutras células do hospedeiro disseminando-se através dos órgãos do sistema hemolinfático até à pele produzindo uma infeção generalizada (Moreno et al., 1999; Poli et al., 2002; Colado & Pérez, 2010). Alguns autores defendem que os gatos têm um certo grau de resistência natural à infeção por leishmania na ausência de outros processos imunossupressores (Poli et al., 2002; Maia et al., 2010), sendo a forma de doença cutânea mais comum, com baixa produção de anticorpos (Pereira da Fonseca et al., 2013). A leishmaniose em gatos parece envolver a resposta imune celular, com ativação dos macrófagos para a destruição das formas intracelulares amastigotas. Os títulos altos de anticorpos, usualmente presentes em cães e também em alguns gatos sintomáticos, não conferem imunidade contra a doença (Barbéri, 2006). No entanto, algumas investigações mostraram que gatos com títulos altos de anticorpos anti-*Leishmania* apresentaram positividade diminuída para a presença de DNA detetado através de PCR (realizado em amostras de sangue inteiro congelado), o qual mostrou positividade mais altas em gatos com títulos de anticorpos reduzidos (Martín-Sanches et al., 2007; Costa et al., 2010). Estes factos corroboram a hipótese de que a resposta imune dos gatos difere daquela observada em cães justificando o grande número de gatos sem sinais clínicos infetados e a

manifestação clínica variável da doença, mostrando que as lesões ocorrem antes da produção de anticorpos (Martín-Sanches et al., 2007; Soares et al., 2014). As lesões microscópicas caracterizam-se por inflamação granulomatosa difusa, com macrófagos contendo numerosos amastigotas e um número variável de linfócitos e plasmócitos (Hervás et al., 1999; Poli et al., 2002; Marcos et al., 2009; Navarro et al., 2010).

3.5 – Sinais clínicos e alterações analíticas

Os gatos geralmente não apresentam sinais clínicos (Maia & Campino, 2011), podendo existir uma resistência natural do gato à infecção (Hervás et al., 1999; Poli et al., 2002), e quando se observam sinais clínicos é mais frequente a presença de quadros de leishmaniose cutânea (Maroli et al., 2007). Os quadros de leishmaniose visceral são muito raros (Poli et al., 2002, Gramiccia, 2011). Os sinais clínicos podem traduzir-se por lesões cutâneas disseminadas, nódulos nos pavilhões auriculares e nariz, lesões proliferativas interdigitais, dermatite generalizada, alopecia e descamação (Hervás et al., 1999; Pennisi, 2002; Maroli et al., 2007; Navarro et al., 2010; Gramiccia, 2011; Pennisi et al., 2013). Os sinais de leishmaniose visceral podem ser hepato e esplenomegália, icterícia, gastro enterite linfoplasmocitária e linfadenomegália generalizada (Ozon et al., 1998; Shaw et al., 2001; Pennisi, Venza, Reale, Vitale & Giudice, 2004; Marcos et al., 2009; Costa et al., 2010). Sinais oculares como úlceras exsudativas da córnea, panuveíte e panoftalmia já foram descritos (Leiva, Lloret, Peña & Roura, 2005; Navarro et al., 2010; Richter, Schaarschmidt-Kiener & Krudewig, 2014). A insuficiência renal foi reportada em gatos com leishmaniose, no entanto não há provas da sua relação (Navarro et al., 2010).

As alterações laboratoriais podem incluir anemia, leucopénia e trombocitopénia (Leiva et al., 2005; Maroli et al., 2007; Marcos et al., 2009; Pennisi et al., 2004), aumento da ureia e creatinina séricas (Pennisi et al., 2004; Navarro et al., 2010) e hipergamaglobulinémia (Pennisi et al., 2004; Marcos et al., 2009).

3.6 - Diagnóstico

Os sinais típicos incluem úlceras ou lesões nodulares no nariz, lábios, orelhas, pálpebras e alopecia. Há pouca informação sobre o método diagnóstico ideal em gatos, logo, tudo o que se aplica nesta espécie é extrapolado dos cães (Gramiccia, 2011). As análises de sangue podem revelar hiperglobulinémia e aumento das enzimas hepáticas (Pennisi et al., 2013). Deve sempre suspeitar-se de leishmaniose felina em gatos que habitem ou viajem para zonas endémicas com apresentação clínica de linfonodos aumentados, dermatite nodular/ulcerativa/esfoliativa, uveíte, anemia, pancitopenia, hiperproteinémia e hipergamaglobulinémia (Marcos et al., 2009; Gramiccia, 2011). Os casos de leishmaniose

descritos em gatos têm sido diagnosticados mediante métodos parasitológicos, serológicos e moleculares (Colado & Pérez, 2010; Gramiccia, 2011).

3.6.1 – Métodos parasitológicos diretos

O diagnóstico definitivo implica a demonstração de formas amastigotas livres ou no interior de macrófagos em biópsias de tecidos infetados (Poli et al., 2002) ou em esfregaços aspirados de gânglios linfáticos, baço ou fígado, de pele ou medula óssea (Maia, Ramada, Cristóvão, Gonçalves & Campino, 2009; Colado & Pérez, 2010). Os linfonodos poplíteos parecem ser o órgão de eleição para a colheita de amostras, mesmo comparado com a punção da medula óssea, baço e fígado (Costa et al., 2010). Por vezes os estudos citológicos podem revelar poucos ou nenhuns parasitas em animais com sinais evidentes de doença (Colado & Pérez, 2010). As técnicas de imunohistoquímica podem ser usadas para a confirmação do exame histopatológico (Navarro et al., 2010).

3.6.2 – Métodos serológicos

As técnicas serológicas disponíveis para o diagnóstico de leishmaniose felina são a IFI, ELISA, Teste de Aglutinação Direta (DAT) e *Western Blot* (Cardoso et al., 2010; Gramiccia, 2011; Pennisi et al., 2013). Os testes de IFI e ELISA são caracterizados por baixa sensibilidade e alta especificidade para a deteção de gatos infetados, ou seja, são muito úteis quando o resultado é positivo mas não são adequados para estudos epidemiológicos de infeção felina por *L. infantum* (Chatzis et al., 2014). Nos cães com infeção natural, normalmente os anticorpos aparecem antes de se observarem os sinais clínicos. Em geral, o título de anticorpos em gatos é menor do que nos cães (Poli et al., 2002; Gramiccia & Gradoni, 2005; Maia & Campino, 2011). A falta de produção ou a produção baixa de anticorpos específicos pode ser relacionada com o fato de que a maioria dos casos clínicos de leishmaniose felina apresentam-se sob a forma cutânea e não visceral (Poli et al., 2002), não sofrendo estes animais de um desequilíbrio do sistema imunitário que origina uma sobreprodução de anticorpos, como acontece no cão (Maia & Campino, 2011). Investigações prévias não encontraram uma associação entre o estado clínico do gato (saudável ou doente) ou a presença de vários sinais clínicos e os resultados da serologia (Chatzis et al., 2014).

A IFI é considerada o “gold standard” do diagnóstico serológico de LVZ. É um teste com elevada sensibilidade (83% - 100%) e especificidade (74% - 100%) para doentes sintomáticos em casos de leishmaniose canina e humana. Contudo, apresenta desvantagens que incluem a baixa sensibilidade em pacientes sem sinais clínicos, possíveis

reações cruzadas com outros agentes patogénicos (*Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia* spp., *Rickettsia* spp. e *Toxoplasma* spp.) (OIE, 2008; Garrido,2012) e o facto da avaliação da intensidade da fluorescência ser subjetiva em títulos positivos baixos (Solano-Gallego et al., 2007; Gramiccia, 2011). Como os gatos infetados por *Leishmania* frequentemente apresentam um nível baixo de anticorpos específicos, a serologia convencional não é suficientemente fiável nesta espécie. O diagnóstico laboratorial da leishmaniose felina não se deve basear somente em métodos serológicos (Pereira da Fonseca et al., 2013).

3.6.3 – Métodos moleculares

As técnicas moleculares baseadas em PCR são amplamente utilizadas, isoladamente ou em associação com outros testes serológicos e parasitológicos (Cardoso et al., 2010; Gramiccia, 2011). A sua alta sensibilidade faz deste teste uma boa opção para a confirmação do diagnóstico e para a deteção de animais sem sinais clínicos (Gramiccia & Gradoni, 2005). A técnica de PCR pode ser aplicada a diversos materiais biológicos como medula óssea, linfonodos, baço, pele, sangue e amostras histopatológicas (Pereira da Fonseca et al., 2013) Nos casos de leishmaniose cutânea, se forem recolhidas amostras viscerais (linfonodos, medula óssea ou sangue periférico) e examinadas através de técnicas moleculares, os resultados são muitas vezes positivos, mostrando um envolvimento visceral na doença (Gramiccia, 2011).

3.7 - Tratamento

Há muito pouca informação publicada sobre o tratamento farmacológico da leishmaniose felina. Dois casos descritos na Suíça foram tratados com alopurinol a uma dose de 10 mg/kg a cada 12 horas. Num dos casos foi necessário reduzir a dose para metade devido a alterações hepáticas. A administração continuada de alopurinol normalmente tem eficácia clínica mesmo em gatos FIV positivos (Pennisi et al., 2013). Em Itália foi também instituída terapia com alopurinol num gato com sucesso clínico mas insuficiente na erradicação da doença (Pennisi et al., 2004). A terapia oral com alopurinol ou injeções subcutâneas de antimoniato meglumina já foram incluídas na terapêutica da leishmaniose felina não havendo no entanto informação farmacológica ou farmacodinâmica (Navarro et al., 2010; Pennisi, 2014). Basso et al. (2013) reportaram um caso de leishmaniose felina no qual o uso de antimoniato de N-metilglucamina em associação com alopurinol, originou a cura clínica e a diminuição da carga parasitária.

3.8 – Profilaxia

.A eficiência na prevenção do contacto entre vetor e hospedeiro é o mais importante de modo a evitar a refeição de sangue pelo vetor e assim diminuir o risco de transmissão da infeção (Brianti, 2014). Uma das medidas mais importantes consiste na redução dos habitats dos flebótomos perto do local onde o dono e o seu animal habitam, tomando especial atenção ao correto acondicionamento do lixo como forma de redução das áreas de multiplicação dos vetores (Pereira da Fonseca et al., 2013).

Manter os gatos dentro de casa durante o período de atividade dos flebótomos (desde o anoitecer ao amanhecer) pode trazer benefícios, assim como colocar redes mosquiteiras nas janelas em zonas de alto risco, utilização de inseticidas de aplicação ambiental, eletrocutores e aparelhos de ultrassons repelentes de insetos (Colado & Pérez, 2010, Pereira da Fonseca et al., 2013). Os piretróides que atuam como repelentes do vetor são tóxicos para gatos (Maia et al., 2014a).

Estudos realizados por Otranto et al. (2013) demonstraram que a coleira Seresto®, que possui uma combinação de imidaclopride (10%) e flumetrina (4,5%) confere uma proteção de longa duração contra infeção por *L. infantum* em cães, constituindo uma boa estratégia para diminuir a frequência e disseminação desta infeção. Estando esta coleira também disponível para gatos, é provável que o mesmo efeito de diminuição de infeção aconteça nos gatos, constituindo assim uma boa medida profilática, embora não haja estudos comprovando a sua eficácia em flebótomos.

3.9 – Importância em saúde pública

A leishmaniose humana é a terceira doença transmitida por vetor mais importante, depois da malária e da filariose linfática (Solano-Gallego et al., 2009; WHO, 2010). No homem distinguem-se três tipos principais de leishmaniose: cutânea, mucocutânea e visceral, presentes em diversas regiões do mundo (Tomás & Romão, 2008; Trainor et al., 2010; Esch & Petersen, 2013). Em Portugal, assim como em toda a bacia mediterrânea, a maioria dos casos são de leishmaniose visceral que adquirem mais impacto em doentes imunodeprimidos (Tomás & Romão, 2008). Um estudo realizado por Fonseca (2010), no qual foi comparada a seroprevalência de anticorpos anti- *Leishmania infantum* entre um grupo de proprietários de cães com leishmaniose e outro grupo de proprietários de cães sem leishmaniose, concluiu que a co-habitação com animais infetados não era um fator de risco.

Embora o cão seja o principal reservatório de *L.infatum* nos países da bacia mediterrânea, o aumento da prevalência de infeção por *Leishmania* em gatos verificado nos últimos anos e

frequência com que os parasitas têm sido detetados no sangue periférico aliado ao facto dos gatos constituírem uma fonte alimentar dos flebótomos sugere a importância do gato como hospedeiro alternativo aos cães em zonas endémicas de Leishmaniose, tendo um papel relevante na transmissão e disseminação da doença (Cardoso et al., 2010; Maia & Campino, 2011). Deste modo, mais estudos deverão ser realizados para que se possa esclarecer qual o verdadeiro papel do gato no ciclo biológico de *Leishmania* spp.

O impacto da leishmaniose na saúde pública foi classificado pela Organização Mundial de Saúde como uma das doenças tropicais mais negligenciadas com uma estimativa de incidência anual de 1-1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500.000 casos de leishmaniose visceral (Desjoux, 1996 citado por Gramiccia, 2011).

4 – ERLIQUIOSE FELINA

Apesar de a erliquiose ter sido primeiro reconhecida como uma doença de cães na Algeria em 1935, foi nos anos oitenta que a infeção de felinos foi bem documentada. Mais tarde apareceram investigações que elucidaram a importância desta doença em gatos e o reconhecimento da erliquiose como uma doença potencialmente fatal em humanos (Cohn, 2003). A primeira evidência da ocorrência natural da erliquiose em gatos foi apresentada em 1986 por Charpentier e Groulade em França, que observaram mórulas de *Ehrlichia* spp. num esfregaço de sangue periférico.

4.1 - Etiologia

As erliquias são cocos pleomórficos gram-negativos capazes de causar doença em humanos e em várias espécies de animais domésticos e selvagens. Estes organismos requerem transmissão através de vetores e são encontrados em vacúolos membranares dentro do citoplasma das células hospedeiras infetadas, principalmente leucócitos medindo 0,5 x 1,5 µm (Bjöersdorff, Svendenius, Owens & Massung, 1999; Harrus, Bjöersdorff & Shaw, 2005). Este tropismo não é absoluto, ou seja, a infeção pode ocorrer em mais do que um tipo de célula. Vários organismos previamente incluídos no género *Ehrlichia* foram reclassificados e colocados noutros grupos. A família Anaplasmataceae contém quatro géneros: *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia* e *Wolbachia* (Dumler et al., 2001; Cohn, 2003; Stich, Schaefer, Bremer, Needham & Jittapalapong, 2008). Já foram descritas espécies de *Ehrlichia* em gatos, baseadas em provas moleculares e serológicas em vários países (Breitschwerdt et al., 2002; Lappin et al., 2006). O aumento dos relatos de casos de infeções provocadas por estes agentes em felinos reforça a necessidade de mais estudos para definir

quais as espécies que infetam gatos e qual a participação destes na epidemiologia da erliquiose (Correa et al, 2011).

4.2 – Ciclo biológico

A erliquiose é transmitida aos mamíferos através das secreções salivares da carraça, havendo transmissão transtestual (ocorre quando o agente patogénico é adquirido numa fase imatura da carraça – larva ou ninfa – e é transmitido pelo estadio de desenvolvimento subsequente), logo é necessária uma refeição de sangue para ocorrer a transição de larva para ninfa e de ninfa para adulto (estes últimos também fazem uma refeição de sangue para completar o ciclo de vida) (Shaw et al., 2001; McQuiston, McCall & Nicholson, 2003; Harrus et al., 2005; Stich et al., 2008). As carraças imaturas têm que se alimentar em animais infetados para adquirir a bactéria e transmitir a infeção para o próximo estadio de vida (McQuiston et al., 2003). Dado que uma única carraça pode servir como vetor transmissor de mais do que um tipo de agente infeccioso, o mesmo hospedeiro pode ficar co-infetado com múltiplos agentes patogénicos (Breitschwerdt et al., 2002). A transmissão por *co-feeding* é um modo de transmissão distinto da transmissão sistémica, que ocorre quando vetores infetados e não infetados se alimentam numa proximidade espaço-temporal no mesmo hospedeiro reservatório. Durante a refeição, as carraças produzem feromonas que atraem outras carraças em fases evolutivas diferentes, dentro da mesma espécie de carraça, para mesmo local de alimentação (Randolph, 2005). Neste tipo de transmissão, o hospedeiro atua como uma ponte transitória entre carraças infetadas e não infetadas, facilitando assim a troca de agentes patogénicos (Randolph, 2011; Voordouw, 2015). A transmissão por *co-feeding* foi demonstrada em dois grupos de bactérias transmitidas por carraças: bactérias do género *Ehrlichia* e bactérias pertencentes ao complexo genoespécie *Borrelia burgdorferi* s. l. (*sensus lato*) (Voordouw, 2015).

4.3 – Distribuição geográfica e epidemiologia

Ehrlichia canis foi a primeira riquetsia reportada em animais e provavelmente a melhor estudada. Este organismo é encontrado por todo o mundo apesar da infeção ser mais prevalente nos climas mais quentes (Harrus et al., 2005). Infeções persistentes permitem que os hospedeiros vertebrados sirvam como reservatórios para as carraças. Ao contrário das infeções agudas transmitidas por artrópodes, a natureza crónica desta doença significa que não tem uma incidência sazonal grande (Cohn, 2003; Harrus et al., 2005). Esta doença é raramente reportada em gatos e é de difícil diagnóstico devido aos seus sinais clínicos vagos e variáveis. A idade dos gatos afetados varia dos 2 aos 10 anos, independentemente

da raça ou sexo (Breitschwerdt, 1995; Cohn, 2003; Lappin, 2006). Recentemente foi demonstrado por PCR que há pelo menos duas formas de erliquiose felina: uma causada por *Ehrlichia canis* com inclusões nas células mononucleares (erliquiose monocítica) e outra causada por *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum*, a qual é associada a inclusões nos neutrófilos (erliquiose granulocítica), esta última tendo possivelmente implicações zoonóticas (Cohn, 2003; Ebani & Bertelloni, 2014). A erliquiose monocítica é bastante mais reportada do que a erliquiose granulocítica (Cohn, 2003). Ainda não estão definidas as vias de transmissão da infecção natural (Shaw et al., 2001; Ebani & Bertelloni, 2014), sendo provável que a exposição a artrópodes e ingestão de roedores sejam as principais causas de contaminação dos felinos naturalmente infetados (Correa et al., 2011). A distribuição geográfica das espécies de *Ehrlichia* está intimamente relacionada com a distribuição dos seus vetores (Maia et al., 2014b). Regra geral, as carrças *Ixodes* são vetores mais prováveis para a forma granulocítica e as carrças *Rhipicephalus*, *Amblyomma* ou *Dermacentor* transmitem a forma monocítica de *Ehrlichia* spp. (Neer, Breitschwerdt, Greene & Lappin, 2002). Apesar de mórulas morfológicamente semelhantes a *E. canis* terem sido detetadas em células mononucleares de gatos, é desconhecido o fato se outro organismo deste grupo infeta gatos (Reine, 2004; Harrus et al., 2005). Sabe-se que os gatos parecem ser menos predispostos às infestações por carrças e aos parasitas transmitidos por estas do que os cães. Parece que os felinos têm uma suposta resistência inata às infeções o que pode limitar o desenvolvimento da doença ou comprometer a transmissão de agentes infecciosos entre carrças e gatos (Shaw et al., 2005).

4.4 - Patogenia

Pouco se sabe sobre a patogénese ou implicações imunopatológicas que a infeção crónica por *Ehrlichia* spp. em gatos provoca (Shaw et al., 2001). A parasitémia nesta espécie é bem menor do que em cães (Shaw et al., 2005). Algumas referências sobre infeção por *E. canis* em gatos mostraram alterações tais como hipoplasia ou displasia da medula óssea acompanhada por pancitopénia ou anemia e trombocitopénia (Breitschwerdt et al., 2002). Baseado em achados clínicos e laboratoriais a patogenia desta doença parece ser similar à Erliquiose Monocítica Canina (EMC), a qual, após infeção experimental, tem uma fase aguda que se inicia 10 dias depois (podendo ir de 8 a 20 dias) e envolve a passagem do agente para a corrente sanguínea e linfática, alojando-se no interior de macrófagos, principalmente do fígado, baço, gânglios linfáticos e medula óssea, onde se replica por divisão binária formando agregados de células característicos denominados mórulas (Harrus et al., 2005). O curso da doença normalmente divide-se em três fases: aguda, subclínica e crónica (Sykes, 2010). A fase aguda pode durar uma a quatro semanas e é normalmente

seguida de uma fase subclínica que pode durar meses a anos (Harrus et al., 2005; Stich et al., 2008; Little, 2010). Alguns animais infetados recuperam espontaneamente da infeção e outros evoluem para a forma crónica da doença (Harrus et al., 2005). Não se sabe se os gatos ficam persistentemente infetados ou desenvolvem uma reacção imunomediada como resultado da infeção crónica, como acontece com os cães (Shaw et al., 2001). Na fase aguda da erliquiose, a anemia é relacionada com a supressão da produção de eritrócitos e sua destruição acelerada. Por outro lado, na fase crónica a anemia ocorre devido à hipoplasia da medula óssea (Braga, André, Freschi, Teixeira & Machado, 2012). Os mecanismos através dos quais estes organismos induzem alterações na medula óssea, principalmente hipoplasia e mielofibrose são pouco conhecidos (Breitschwerdt et al., 2002). Um gato que tenha sido infetado por *Ehrlichia* spp. não deve ser usado como dador de sangue pois não se sabe se a infeção é completamente eliminada (Reine, 2004; Little, 2010).

4.5 – Sinais clínicos e alterações analíticas

A sua apresentação clássica é caracterizada por depressão, letargia, perda moderada de peso e anorexia (Breitschwerdt, 1995; Stubbs, Lappin, Holland & Wheeler, 1998; Bjöersdorff et al., 1999; Legendre, 2002; Cohn, 2003; Litte, 2010; Sykes, 2010). Quando presentes, as hemorragias manifestam-se através de petéquias dérmicas, equimoses ou ambas e na maior parte dos casos estão associadas com trombocitopenia e trombocitopatia (Neer et al., 2002; Little, 2010). Pode também haver presença de febre, hiperestesia, dor articular, palidez das membranas mucosas, esplenomegalia, dispneia e linfadenomegalia (Breitschwerdt, 1995; Tarello, 2002; Ebani & Bertelloni, 2014). Outras alterações inespecíficas incluem conjuntivite (Shaw et al., 2001; Little, 2010), edema da região ventral do pescoço e doença pulmonar intersticial moderada (Breitschwerdt et al., 2002). A anemia é uma alteração laboratorial comum e normalmente é não regenerativa (Neer et al., 2002) podendo estar associada a leucopenia ou neutrofilia, linfocitose, eosinofilia, monocitose e trombocitopenia intermitente. As alterações bioquímicas são raras exceto a hiperproteinemia e hiperglobulinemia que estão registadas com uma elevada frequência (Stubbs et al., 1998; Legendre, 2002; Neer et al., 2002).

4.6 - Diagnóstico

O diagnóstico de erliquiose normalmente inicia-se com a avaliação clínica de um paciente que pode apresentar febre e dor. Uma história progressiva de exposição a carraças e um hemograma que revele trombocitopenia vão ajudar a aumentar a suspeita de infeção (Little,

2010). Não há um método isolado para o diagnóstico desta doença. Em vez disso, o diagnóstico é alcançado com vários graus de certeza através da combinação de indicadores clínicos e hematológicos, evidências serológicas e confirmação molecular. A infecção por *Ehrlichia* spp. pode assemelhar-se a muitas outras infecções e condições não-infecciosas e a sua apresentação clínica é variável (Cohn, 2003). As doenças causadas por *Ehrlichia* spp. fazem sempre parte do diagnóstico diferencial de casos onde se verifica poliartropatia de início agudo ou diátese hemorrágica, no entanto, estes achados são inespecíficos e inconsistentes. Os achados laboratoriais, também inespecíficos, incluem trombocitopénias, eosinofilia, hiperproteïnemia e hiperglobulinemia, anemia não regenerativa pouco marcada e hipoalbuminemia ligeira (Breitschwerdt, 1995; Colado & Perez, 2010). A cultura destes organismos intracelulares é difícil e cara, sendo usada primariamente no campo da investigação em vez de ser uma ferramenta de auxílio no diagnóstico clínico (Cohn, 2003). Outros fatores que podem provocar trombocitopénia em gatos tais como doenças autoimunes, metástases ou tumores malignos, doenças infecciosas provocadas pelo FIV e pelo FeLV e infecções por protozoários (Leishmaniose e Babesiose) devem ser levados em conta como diagnósticos diferenciais de erliquiose felina (Braga et al., 2013). Por agora o diagnóstico assenta na exclusão de outras causas para o quadro clínico em questão em combinação com a identificação da mórula nas células sanguíneas periféricas, evidência serológica de exposição a estes agentes ou demonstração por PCR do DNA e também pela resolução dos sinais clínicos após a terapia antimicrobiana apropriada (Little, 2010).

4.6.1 – Detecção do parasita em esfregaço de sangue corado

Ocasionalmente, a observação microscópica de esfregaços de sangue revela inclusões intracitoplasmáticas (mórulas), originando um diagnóstico direto imediato da doença (Shaw et al., 2001). No entanto, as mórulas não estão presentes em grande número nas células de animais infetados mesmo na presença de doença clínica grave. O tropismo celular deste organismo condiciona o tipo de célula (mononuclear, granulocítica ou trombocítica) que irá conter a mórula (Little, 2010). O uso de técnicas de concentração tais como o exame de *buffy coat* maximizam a hipótese de identificação da mórula (Cohn, 2003). A ocorrência pouco comum de inclusões intracitoplasmáticas que formam mórulas em granulócitos ou monócitos faz com que o diagnóstico de erliquiose felina baseado na observação de esfregaços de sangue seja um método pouco sensível (Legendre, 2002) no entanto, o esfregaço de sangue é um indicador preliminar importante. Sempre que sejam visualizados formas do parasita (as mórulas têm dimensões aproximadas de 0,5 x 1,5 µm), a combinação da história progressa, exame clínico e hematologia de rotina fornecem alguma certeza para

o estabelecimento de um diagnóstico em casos de erliquiose aguda (Bjöersdorff et al., 1999; McQuiston et al., 2003).

4.6.2 – Métodos serológicos

As técnicas serológicas são as provas mais comumente usadas para confirmação do diagnóstico das doenças provocadas por *Ehrlichia* spp. Estes testes não detetam o organismo mas sim os anticorpos reativos. Um título positivo confirma a exposição ao organismo mas pode ser observado após eliminação do mesmo, durante a fase subclínica da infecção assim como durante a fase ativa da infecção. Do mesmo modo, um título negativo não descarta a doença devido ao atraso inerente na produção da resposta imunológica humoral de anticorpo face a uma infecção aguda (Cohn, 2003; Little, 2010). Sempre que possível deve-se obter duas amostras: uma na fase aguda e outra na fase de convalescença, com cerca de 3 semanas de intervalo (McQuiston et al., 2003). Deste modo, na ausência de sinais clínicos compatíveis com erliquiose, um único título positivo deve apenas ser considerado como sugestivo de uma infecção prévia (Bjöersdorff et al., 1999). As técnicas mais usadas são a IFI e ELISA.

4.6.3 – Métodos moleculares

O PCR usa *primers* ou sequências iniciadoras (pequenos segmentos de nucleótidos que encaixam em áreas do DNA do organismo) de modo a amplificar a porção do DNA desse organismo. Os *primers* usados para detetar estes organismos podem ser genéricos ou espécie-específicos. Os *primers* genéricos detetam muitos microrganismos relacionados dentro do mesmo género enquanto que os *primers* específicos só detetam uma espécie em particular. Os laboratórios comerciais normalmente usam *primers* genéricos (Cohn, 2003). Um resultado negativo neste teste pode ser difícil de interpretar e não deve ser usado para excluir presença de infecção. Os resultados negativos podem ocorrer quando os organismos em circulação estão abaixo do nível de deteção (acontece quando as infecções progridem ou depois do início da terapia antibiótica) ou podem estar sequestrados no baço (Legendre, 2002; Bettenay, Lappin & Mueller, 2007; Little, 2010). Devido ao facto de o resultado positivo depender do organismo ser encontrado no sangue periférico, as amostras de sangue devem sempre ser colhidas antes do tratamento (Little, 2010). O PCR é útil para distinguir animais tratados com títulos de IFI persistentes altos dos animais tratados sem sucesso com infecção por *E. canis* persistente. A técnica de PCR deve ser usada em conjunto com a técnica serológica e não em vez da mesma, para o diagnóstico inicial de erliquiose em animais não tratados (Neer et al., 2002). Num estudo realizado por Breitschwerdt et al. (2002) foi

confirmada a infecção com um organismo semelhante a *E. canis* em três gatos através da amplificação por PCR. Todas as três sequências eram idênticas entre si e eram 100% semelhantes à *E. canis* isolada a partir de cães. A sensibilidade do método de PCR para identificação de gatos com doença leve ou crônica é desconhecida (Legendre, 2002).

4.7 - Tratamento

Quando há uma forte suspeita de erliquiose, baseada em achados clínicos e epidemiológicos, os médicos e os veterinários não deveriam esperar pela confirmação laboratorial da infecção para instaurar a terapia pois os testes realizados numa fase precoce da infecção podem ser negativos e o adiamento do tratamento pode resultar em doença grave (McQuiston et al., 2003). O uso de tetraciclina tem sido o tratamento de escolha para infecções provocadas por *Ehrlichia* spp. durante vários anos (Bowman, 2011). A sua excelente absorção e longo intervalo entre as administrações, faz da doxiciclina ou minociclina os antibióticos preferidos. Embora não esteja estipulada a duração do tratamento, estudos recentes chegaram a um consenso no uso da doxiciclina a uma dose de 10 mg/kg uma vez por dia durante 28 dias em cães e gatos infetados (Breitschwerdt, 1995; Shaw et al., 2001; Neer et al., 2002; Lappin, 2006; Little, 2010). Já foi reportado em gatos melhoria clínica com a administração de dipropionato de imidocarb, também usado para o tratamento de babesiose. O dipropionato de imidocarb é administrado por via intramuscular na dose de 5 mg/kg, com uma segunda injeção administrada 2 semanas depois (Lappin, 2006). Uma vantagem do imidocarb é a sua atividade persistente após administração intramuscular e a pré-medicação com atropina diminui a gravidade dos efeitos secundários associados ao seu uso (Little, 2010). Pode ser necessário recorrer a tratamento de suporte que inclui glucocorticoides para atenuar a destruição imunomediada das plaquetas, administração de fluidos cristaloides ou coloides parenteral e transfusão de sangue (Little, 2010). A localização obrigatória intracelular do parasita faz com que a resposta imunológica do hospedeiro seja difícil, o que complica a terapia antimicrobiana (Cohn, 2003) e dificulta a completa erradicação da doença que é muito rara (Bjöersdorff et al., 1999; Tarello, 2005). A resolução dos sinais clínicos e a normalização das plaquetas são observadas usualmente após o início do tratamento adequado para os casos agudos e muitas vezes também para casos crônicos leves. Para os casos crônicos, se os sinais clínicos e parâmetros hematológicos não melhorarem ao fim de uma ou duas semanas após terapia, o diagnóstico deve ser reavaliado. Regra geral, se a sintomatologia e os valores hematológicos evidentes de doença desaparecerem não é necessária avaliação adicional. Se, pelo contrário, os animais tratados ainda evidenciarem doença, um resultado positivo por PCR sugere a continuação ou alteração da terapia (Cohn, 2003).

4.8 – Profilaxia

A prevenção passa por minimizar a exposição através de um controlo efetivo das carraças (Cohn, 2003). Atualmente não está disponível uma vacina para prevenção da erliquiose que possa ser usada em humanos ou animais (Neer et al., 2002; McQuiston et al., 2003). A aplicação mensal de acaricidas tópicos tais como fipronil pode ajudar na prevenção da infeção provocada por *Ehrlichia* spp. (Little, 2010). Não há nenhum acaricida inteiramente eficaz na eliminação de todas as carraças e a remoção imediata das carraças agarradas deve ser efetuada para prevenir infeção. Estratégias adicionais incluem restringir o acesso ao exterior e usar acaricidas no ambiente (Little, 2010).

4.9. – Importância em saúde pública

Várias infeções provocadas por *Ehrlichia* spp. são partilhadas pela espécie humana e pelos animais de companhia e grande parte destes vivem num ambiente doméstico com uma proximidade física muito significativa dos seus donos (Day, 2011). Os humanos podem ser infetados com *Ehrlichia* spp. e outros organismos relacionados mas não há evidência que estas infeções passem diretamente dos animais para as pessoas (Neer et al., 2002). A erliquiose monocítica humana foi reportada pela primeira vez nos Estados Unidos em 1986 (Maeda et al., 1987 citado por Cohn, 2003). Originalmente pensava-se que o agente responsável era *E. canis* provando-se posteriormente que era *E. chaffeensis*, uma espécie intimamente relacionada com a primeira, havendo uma reação cruzada de anticorpos entre as duas (Cohn, 2003; Harrus et al., 2005). Após a fixação da carraça infetada, o período de incubação da erliquiose em humanos é tipicamente cerca de uma semana (McQuiston et al., 2003). A doença manifesta-se com febre, cefaleias, mialgias e pode ser fatal se não for tratada. Embora *E. chaffeensis* seja primariamente um agente patogénico humano, já foram detetadas infeções por este organismo em cães (infeção experimental e natural), o que leva a crer que os cães possam servir como reservatório ou sentinela de infeção humana, embora este fenómeno nunca tenha sido provado (Neer et al., 2002). Há apenas um caso documentado de infeção humana por um agente semelhante a *E. canis* na literatura médica (Perez, Rikihisa & Wen, 1996). Este agente foi isolado no sangue de um adulto saudável na Venezuela que reportou um contacto estreito com um cão infetado com *E. canis* (Perez et al., 1996). A subinoculação de sangue pode resultar na transmissão da infeção pelo que está recomendado o manuseamento cuidadoso das amostras de animais potencialmente infetados (Little, 2010).

5 -DIROFILARIOSE FELINA

5.1 - Etiologia

A dirofilariose felina é causada pelo nemátode *Dirofilaria immitis* pertencente ao género *Dirofilaria*, superfamília Filarioidea, família Onchocercidae e ordem Spirurida. Foi descrito pela primeira vez por Leidy em 1856 (Bautista, Vázquez & Guerrero, 1999). Os parasitas machos adultos distinguem-se das fêmeas por serem menores (15-18 centímetros) e porque a sua extremidade posterior termina em espiral. As fêmeas adultas medem cerca de 25-30 centímetros, são ovovivíparas e eliminam as larvas (microfilárias) na circulação sanguínea (Bautista et al., 1999; Hoch & Strickland, 2008a).

5.2 – Ciclo biológico

Os parasitas adultos vivem tipicamente nas artérias pulmonares mas podem invadir o ventrículo direito, átrio direito e veia cava caudal em infeções massivas (Colado & Pérez, 2010). Após o acasalamento as fêmeas libertam microfilárias (larvas no primeiro estado larvar L1) na circulação sanguínea do hospedeiro de onde podem ser ingeridas pelos mosquitos quando estes se alimentam. No mosquito a larva evolui de L1 para L2 e de L2 para L3 durante um período de 8-17 dias, dependentes da temperatura. O estado larvar L3 (forma infetante do parasita) é transmitida a um novo hospedeiro quando o mosquito vetor se alimenta (Bautista et al., 1999; Simón et al., 2012). A L3 transita para L4 no tecido subcutâneo, adiposo ou muscular do hospedeiro cerca de 1 -12 dias após a infeção. A muda de L4 para a fase de adulto imaturo L5 ocorre cerca de 50 – 68 dias após a infeção inicial. Os adultos imaturos entram no sistema vascular e migram para o coração e artérias pulmonares onde se desenvolvem e originam parasitas adultos durante os 99 - 152 dias seguintes. O ciclo de vida do parasita dura entre 2 a 3 anos, sendo consideravelmente mais curto do que no cão (Miller, 1998; McCall, Genchi, Kramer, Guerrero & Venco, 2008; Hoch & Strickland, 2008a; Simón et al., 2012).

5.3 – Distribuição geográfica e epidemiologia

D. immitis já foi encontrada em mais de 30 espécies de mamíferos, incluindo carnívoros domésticos e selvagens, felinos domésticos e selvagens, macacos, mamíferos marinhos e roedores (McCall et al., 2008; Hoch & Strickland, 2008a). Os cães são os hospedeiros definitivos e reservatórios biológicos deste parasita. Os humanos e os gatos são hospedeiros menos específicos nos quais o desenvolvimento do parasita é modificado, comparado com o cão (Simón et al., 2012). Muitos animais selvagens podem atuar como

reservatórios para *Dirofilaria* spp., assumindo um papel importante na perpetuação deste parasita nos animais de companhia como consequência da sua interação peridoméstica (Morchón, Carretón, González-Miguel & Mellado-Hernández, 2012; Alho et al., 2014a). A sua prevalência total é cerca de 5 a 10% da prevalência existente nos cães na mesma região geográfica (Atkins, 2007; Litster & Atwell, 2008; McCall et al., 2008; Nelson, 2008, Simón, Morchón, González-Miguel, Marcos-Atxutegi & Siles-Lucas, 2009; Simón et al., 2012). *Dirofilaria immitis* é transmitida por diferentes espécies de mosquitos culicídeos, principalmente do género *Culex*, *Aedes* e *Anopheles* (McCall et al., 2008; Genchi et al., 2009; Madeira de Carvalho, Alho & Belo, 2014). Alguns dos vetores mais abundantes têm preferência alimentar pelo cão como hospedeiro e isto contribui para a menor prevalência da infeção em gatos (Kramer & Genchi, 2002; Colado & Pérez, 2010). De qualquer modo, o mosquito *Culex* spp., espécie mais frequente nas zonas urbanas, alimenta-se tanto em cães como em gatos (Colado & Pérez, 2010). Estudos revelaram que gatos infetados através de transplante subcutâneo de larvas de *D. immitis* mostraram microfilarémia 98 dias (Nogami et al., 2000) e 201 dias (Hayasaki, Okajima, Song, & Shiramizu, 2003) após o transplante sendo a periodicidade das microfilárias classificada como noturna sub-periódica e intimamente relacionada com a atividade de alimentação do vetor que atua como hospedeiro intermediário, representando uma adaptação evolutiva das microfilárias de modo a otimizar a sua passagem para mosquito (Nogami et al., 2000; Hayasaki et al., 2003).

A dirofilariose já foi reportada em todos os continentes (Carleton & Tolbert, 2004; Simón et al., 2012) e é uma doença principalmente distribuída em áreas temperadas e húmidas. Na Europa é endémica nos países mediterrâneos, embora alguns estudos tenham mostrado o seu avanço para áreas consideradas previamente livres da doença (Genchi, Rinaldi, Mortarino, Genchi, & Cringoli, 2009; Simón et al., 2012). Este parasita necessita de um clima que proporcione uma temperatura e humidade adequadas para que exista uma população viável de mosquitos e maturação das microfilárias ingeridas. São necessários cerca de 10 a 14 dias a cerca de 27°C para que a microfilária se transforme num estado larvar infetante no interior do mosquito. Este desenvolvimento não ocorre se a temperatura estiver abaixo dos 14°C (MacCall et al., 2008; Morchón et al., 2012).

5.4 - Patogenia

A importância clínica da dirofilariose em gatos está a aumentar devido ao facto de um pequeno número de filárias poder originar doença grave. Quando os sinais clínicos se tornam evidentes, normalmente desenvolvem-se em duas fases. A primeira coincide com a chegada dos parasitas adultos imaturos às artérias pulmonares cerca de 3 a 6 meses após a infeção (Prieto, Venco, Simon & Genchi, 1997; Colado & Pérez, 2010; Hoch & Strickland,

2008a). Estes parasitas imaturos provocam uma resposta eosinofílica com infiltrados eosinofílicos, causando pneumonia (Atkins, DeFrancesco, Coats, Sidley & Keene, 2000; Atkins, 2007; Hoch & Strickland, 2008a). Esta fase é fatal para alguns gatos (Litster, Atkins & Atwell, 2008). Uma importante taxa de mortalidade de larvas L5 acontece quando estas chegam aos pulmões (Colado & Pérez, 2010). Na segunda fase, a degeneração e morte dos parasitas provoca uma inflamação pulmonar (sobretudo nos lóbulos pulmonares caudais) e tromboembolismo produzindo um síndrome de *stress* respiratório agudo. Esta reação pode ocorrer como consequência de uma só filaria (Atkins, 2007; McCall et al., 2008, Colado & Pérez, 2010). A resposta do gato ao parasita é intensa e o papel da inflamação é muito importante após a morte do parasita adulto. Pensa-se que esta resposta inflamatória é devido à atividade dos macrófagos intravasculares pulmonares, um componente do sistema reticuloendotelial que os gatos possuem mas os cães não (Lee & Atkins, 2010; Simón et al., 2012). Surge edema agudo do pulmão e a insuficiência respiratória, mais do que a insuficiência cardíaca, pode-se tornar um fatal.

A proliferação das filárias no interior das artérias pulmonares periféricas e artérias lobares principais provoca uma inflamação ou hipertrofia geralmente muito localizada e mais grave do que nos cães, embora não causem uma obstrução suficiente para produzir hipertensão pulmonar clinicamente significativa (Atkins & Litster, 2006; Litster et al., 2008; Colado & Pérez, 2010). Deste modo, a hipertrofia do ventrículo direito e insuficiência cardíaca congestiva são menos comuns no gato do que no cão. Ainda que se produza um estreitamento do lúmen devido a uma trombose provocada pelos parasitas, a circulação broncopulmonar colateral é suficiente para prevenir enfarte pulmonar nos gatos (Colado & Pérez, 2010).

Os gatos são hospedeiros suscetíveis, no entanto, são mais resistentes à infeção por formas adultas de *D. immitis* do que os cães (Atkins & Litster, 2006; Colado & Pérez, 2010; Fernandez et al., 2010). Os gatos infetados têm muito menos filárias adultas do que os cães pois os parasitas maturam mais lentamente e poucas larvas infecciosas L3 conseguem chegar a adultas, no entanto, um único parasita adulto pode provocar a morte do animal (McCall et al., 2008; Venco, Genchi, Genchi, Grandi & Kramer, 2008; Colado & Pérez, 2010; Simón et al., 2012). Embora possam surgir infeções muito graves, normalmente os gatos estão infetados por um ou dois parasitas muitas vezes do mesmo sexo. Muito raramente se encontram microfíliarias circulantes nos gatos infetados e quando se desenvolve a microfilarémia, esta é mais curta do que nos cães (Miller, 1998; Colado & Pérez, 2010; Simón et al., 2012), dura cerca de 1 a 2 meses, depois dos quais o sistema imunitário do gato elimina as microfíliarias e suprime a embriogénese posterior (Nelson, 2008; Litster & Atwell, 2008). As migrações aberrantes ocorrem mais frequentemente no gato do que no cão (outro indicio de que o gato é um hospedeiro imperfeito para este parasita), tendo sido

encontradas filárias ectópicas nas cavidades corporais, artérias sistémicas, nódulos subcutâneos e sistema nervoso central (Atkins, 2007; Litster & Atwell, 2008; Colado & Pérez, 2010).

D. immitis alberga no seu interior uma bactéria gram-negativa intracelular denominada *Wolbachia pipientis*. Pensa-se que este microrganismo tem um papel essencial na biologia e funções reprodutivas dos seus hospedeiros, assim como na patogénese e resposta imunitária à infeção provocada por este parasita (Atkins, 2007; García-Guasch et al., 2013). O facto dos parasitas adultos conseguirem sobreviver durante vários anos em hospedeiros imunocompetentes é provavelmente devido à capacidade do parasita para evitar/modular a resposta imunitária (McCall et al., 2008; Lee & Atkins, 2010). Investigações clínicas e laboratoriais sugeriram que a natureza acelular da cutícula de *D. immitis* e a sua superfície trombo-resistente permitem ao parasita circundar a resposta imune do hospedeiro e garantir uma maior sobrevivência (Litster & Atwell, 2008).

5.5 – Sinais clínicos

A maioria dos gatos tolera a infeção sem sinais clínicos ou com sinais clínicos transitórios. Os sinais clínicos mais frequentes são respiratórios (devido à chegada de L5 às artérias pulmonares), gastrointestinais e ocasionalmente neurológicos e podem ser de carácter agudo ou crónico (McCall et al., 2008; Simón et al., 2012). Os sinais clínicos são mais evidentes em duas fases da infeção: quando os parasitas jovens chegam às artérias pulmonares (4-6 meses após infeção) e morrem, e numa fase mais tardia quando os parasitas adultos morrem. A doença parenquimatosa e das vias aéreas deve ser associada à primeira fase da infeção, ou seja, a chegada e morte das formas imaturas nas artérias pulmonares (McCall et al., 2008). Nesta fase os sinais respiratórios ocorrem em 50% dos gatos e consistem em taquipneia persistente, tosse intermitente (especialmente paroxística) e dispneia (Colado & Pérez, 2010). Esta fase inicial é muitas vezes mal diagnosticada como asma ou bronquite alérgica, sendo parte de um síndrome conhecido por HARD (do inglês *heartworm associated respiratory disease*) (American Heartworm Society [AHS], 2014), cujos sinais clínicos associados são anorexia, dispneia, colapso, tosse, convulsões, diarreia e cegueira (Carleton & Tolbert, 2004; McCall et al., 2008; Fernandez et al., 2010). Se esta fase aguda não for fatal, o animal pode tolerar a infeção e ficar sem sinais clínicos, ou então evoluir para infeção crónica na qual podem estar presentes sinais tais como, anorexia, dispneia, vômito esporádico, taquipneia, perda de peso e raramente sopros cardíacos (Atkins & Litster, 2006; Hoch & Strickland, 2008a; McCall et al., 2008; Simón et al., 2012). Mesmo nestes casos crónicos há sempre a possibilidade de reversão para a perigosa fase aguda, quando os parasitas adultos morrem. É frequente haver vômitos intermitentes não relacionados com a alimentação, anorexia, perda de peso e letargia (Colado & Pérez, 2010).

Sinais neurológicos por migração parasitária aberrante traduzem-se em convulsões, cegueira aparente, ataxia, marcha em círculos, midríase e hipersalivação. Nos casos raros em que os parasitas estão localizados no coração direito, pode haver sopro cardíaco sistólico e ruído de galope devido a insuficiência da válvula tricúspide (Atkins & Litster, 2006; McCall et al., 2008) sendo menos frequente no gato a hipertrofia e a insuficiência cardíaca direita (AHS, 2014). Alguns gatos infetados recuperam da infeção espontaneamente com ou sem tratamentos sintomáticos (McCall et al., 2008).

5.6 - Diagnóstico

As provas diagnósticas mais úteis são a serologia (para detetar anticorpos ou antigénios de parasitas adultos), radiografia torácica e ecocardiografia. Muitas vezes é necessário usar várias técnicas diagnósticas e algumas serão necessário repeti-las várias vezes (Lee & Atkins, 2010; Venco, Genchi, Genchi, Gatti & Kramer, 2011). Geralmente, as análises hematológicas e bioquímicas de rotina não mostram grandes alterações. Em termos laboratoriais poderá ocorrer uma eosinofilia durante a infeção (Atkins et al., 2000), apesar de apenas cerca de 33% a 43% gatos infetados possuírem eosinofilia periférica nas análises sanguíneas efetuadas (Ware, 2003).

5.6.1 – Métodos serológicos

Há dois tipos de testes serológicos: teste de deteção de antigénios e teste de deteção de anticorpos. Nos testes de deteção de antigénio, a especificidade para detetar infeção é alta mas a sensibilidade depende do sexo, idade (deteta melhor fêmeas adultas) e quantidade de parasitas infetantes (Snyder et al., 2000; Colado & Pérez, 2010). Os testes de antigénio detetam um antigénio produzido maioritariamente no sistema reprodutivo das fêmeas adultas (Snyder et al., 2000; Lee & Atkins, 2010). É a técnica de eleição para o diagnóstico de dirofilariose em cães mas devido ao facto de os gatos terem uma carga parasitária baixa, poderem estar infetados com parasitas de um só sexo (parasitas machos) e muitas vezes as infeções sintomáticas serem provocadas por parasitas imaturos (Atkins, 2007) (parte do processo infeccioso é a morte dos parasitas juvenis 3 a 4 meses após infeção, o que os testes de antigénio não conseguem detetar), nenhum dos testes de antigénio disponíveis são fiáveis para descartar a dirofilariose em gatos (Snyder et al., 2000; Nelson, 2008; Colado & Pérez, 2010). Nos gatos os antigénios são detetáveis a partir dos 5,5-8 meses pós-infeção e os seus resultados devem ser registados como positivos ou como nenhum antigénio detetado e não registados como negativos (AHS, 2014). Se o teste de antigénio é positivo indica infeção ativa pelo parasita adulto (McCall et al., 2008). Se o teste de antigénio

é negativo podem ocorrer duas situações: o animal não está infetado ou é um falso negativo, ou seja, o gato pode estar infetado com filárias imaturas ou apenas por parasitas machos. Os resultados falsos negativos são mais prováveis em gatos do que em cães devido às baixas cargas parasitárias que possuem e por requererem um tempo mais prolongado para originar um resultado positivo (Miller, 1998; Simón et al., 2012).

O teste de deteção de anticorpos deteta a exposição tanto a parasitas adultos como a larvas e os anticorpos são detetáveis a partir dos 2 meses pós-infeção (Miller, 1998; Snyder et al., 2000; Colado & Pérez, 2010). O teste de anticorpos pode ser positivo em gatos com infeção prévia devido a *Dirofilaria immitis* e o tempo necessário para o teste de anticorpos se tornar negativo após o gato eliminar a infeção é desconhecido (Snyder et al., 2000). Se o teste de anticorpos é positivo aumenta o índice de suspeita de infeção por filária mas esta deve ser confirmada por outras técnicas diagnósticas. Um teste de anticorpo negativo sugere três possibilidades: o animal não está infetado com dirofilárias; o gato tem infeção há menos de 50-60 dias ou a quantidade de anticorpos é insuficiente para ser detetada. Em gatos, as infeções parasitárias gastro-intestinais não têm reações cruzadas (ou são mínimas) com os testes de deteção de anticorpos para dirofilária (Snyder et al., 2000).

Quando ambos os testes estão negativos, o índice de suspeita de infeção por dirofilariose é baixo, no entanto, pode estar na fase inicial da infeção (McCall et al., 2008).

5.6.2 – Diagnóstico imagiológico

Independentemente dos resultados das provas serológicas, as radiografias são úteis para avaliar a gravidade da doença (alterações do parênquima pulmonar e cardíacas) e para monitorizar a progressão ou regressão da mesma (Hoch & Strickland, 2008a; Colado & Pérez, 2010). As observações radiográficas mais frequentes são o aumento subtil das artérias lobares principais e as artérias pulmonares periféricas apresentam-se dilatadas e mais tortuosas (principalmente nos lobos caudais), associado com fraca definição das suas margens (melhor visualizado numa posição ventrodorsal); aumento do tamanho do ventrículo direito; padrão pulmonar broncointersticial focal ou multifocal que pode desaparecer espontaneamente em alguns meses (Atkins & Litster, 2006; McCall et al., 2008; Nelson, 2008; Venco et al., 2008). Cerca de 50% dos gatos suspeitos de dirofilariose apresentam alguma alteração radiográfica e 50% dos gatos que apresentam dilatação das artérias pulmonares são positivos para o teste de anticorpos (Colado & Pérez, 2010). As alterações nas estruturas visíveis à radiografia torácica ocorrem com menos frequência nos gatos com dirofilariose do que nos cães infetados com dirofilariose e a ausência de alterações radiográficas não exclui o diagnóstico de dirofilariose em gatos (Shafer & Barry, 1995, citados por Litster & Atwell, 2008).

5.6.3 – Diagnóstico ecocardiográfico

Esta técnica é uma ferramenta de diagnóstico muito útil, com alta sensibilidade (considerado por alguns o teste mais sensível) (Hoch & Strickland, 2008a), no entanto depende bastante da experiência do técnico que efetua o procedimento (McCall et al., 2008). Em mais de 50% dos gatos com dirofilariose foi possível observar os parasitas mediante ecocardiografia (Miller, 1998). A ecocardiografia é mais sensível em gatos do que em cães apresentando uma linha dupla (correspondente à cutícula do parasita adulto) de ecogenicidade muito evidente na artéria pulmonar principal, num dos seus ramos, no ventrículo direito e ocasionalmente na junção atrioventricular direita (Atkins & Litster, 2006; Nelson et al., 2008). A quantificação do número de parasitas é difícil devido à possibilidade de atravessar o parasita em múltiplos planos ecográficos, produzindo imagens múltiplas e por isso pode-se sobrestimar o número de parasitas (Colado & Pérez, 2010).

5.6.4 – Outros meios de diagnóstico

Os resultados obtidos pela tomografia axial computadorizada (TAC) podem mostrar doença restritiva pulmonar, caracterizada pelo aumento da densidade intersticial; diminuição do volume pulmonar total e ausência de aprisionamento de ar (Dillon et al., 2014). A necrópsia é considerada fundamental no diagnóstico pós-morte mas a dissecação do coração e pulmões é pouco sensível nos casos de infeções provocadas por formas imaturas assim como infeções ectópicas (Snyder et al., 2000). Nos casos de morte súbita a necrópsia é imperativa (McCall et al., 2008). A dirofilariose deve ser sempre incluída no diagnóstico diferencial quando um gato se apresenta com sinais respiratórios, tais como dispneia e tosse, assim como vômito não associado com a alimentação ou morte súbita (McCall et al., 2008).

5.7 - Tratamento

A terapia adulticida em gatos sem sinais clínicos não é recomendada devido a vários fatores tais como a alta prevalência de complicações graves nesta espécie, os gatos não constituírem reservatórios significativos para a transmissão desta doença a outros animais e a possibilidade de haver cura espontânea (Ware, 2003; Goodfellow & Shaw, 2005; McCall et al., 2008; Hoch et al., 2008b; Simón et al., 2012). Além disso, a terapia adulticida acarreta um risco elevado, sem benefícios claros e uma esperança média de vida curta nesta espécie (Atkins & Litster, 2006). Deve ser feita a monitorização destes casos a cada 6 ou 12 meses, repetindo o teste de antigénio, o teste de anticorpos e as radiografias torácicas (Simón et al., 2012). Nestes casos, a regressão ou desaparecimento dos sinais radiográficos

e especialmente a seroconversão de um teste de antígeno de positivo a negativo irá proporcionar uma evidência de que o período de risco já passou (McCall et al., 2008; Colado & Pérez, 2010). Se houver presença de alterações pulmonares é útil a administração de prednisolona com uma dose inicial de 2 mg/kg/dia via oral, diminuindo gradualmente até 0,5 mg/kg em dias alternados durante cerca de 2 semanas. Este tratamento pode repetir-se de forma periódica se houver recorrência dos sinais clínicos (McCall et al., 2008; Colado & Pérez, 2010). O tratamento adulticida utiliza-se como última opção em animais estáveis que continuam a ter sinais clínicos incontroláveis com corticosteróides. A ivermectina em uma dose de 24 µg/kg mensalmente administrada durante 2 anos reduz a carga parasitária em 65 % em comparação com os indivíduos não tratados (McCall et al., 2008; Simón et al., 2012). Também tem sido utilizada a tiacertasamida em combinação com a prednisolona sob supervisão muito apertada durante 2 semanas numa dose de 2,2 mg/kg cada 12 horas durante 2 dias (McCall et al., 2008; Colado & Pérez, 2010). Os gatos eliminam o fármaco mais lentamente do que os cães e foram observados efeitos secundários tais como anorexia, depressão, vômitos e edema pulmonar não cardiogénico fulminante (possivelmente relacionado com a dilatação arteriolar e efeitos tóxicos do arsénio na integridade microvascular) (Atkins & Litster, 2006). Alguns estudos demonstraram que a eliminação das larvas nas fases L3 – L4 através de medicação preventiva resulta em alterações pulmonares mínimas, enquanto que a morte natural dos parasitas imaturos pode resultar em HARD (Dunn, Levy, Colby & Michaud, 2011). Há pouca experiência clínica com o uso de melarsomina em gatos. O tratamento de suporte para gatos em estado grave inclui fluidoterapia, glucocorticóides intravenosos (dexametasona a 1 mg/kg), broncodilatadores (aminofilina a 6,6 mg/kg IM) e administração de oxigénio (Ware, 2003; Atkins & Litster, 2006; McCall et al., 2008).

A extração cirúrgica dos parasitas adultos (cateterização transjugular e remoção dos parasitas através de fórceps) é uma alternativa razoável em gatos gravemente infetados (Rawlings & Calvert, 1995; Atkins & Litster, 2006) como alternativa ao tratamento sintomático ou adulticida uma vez que minimiza o risco de tromboembolismo (Atkins & Litster, 2006; Colado & Pérez, 2010). Antes de tentar esta abordagem, os parasitas devem ter sido identificados previamente por ecografia em locais acessíveis segundo a técnica (Rawlings & Calvert, 1995; McCall et al., 2008). Este procedimento deve ser realizado com muito cuidado dado que a disseção acidental de um parasita pode levar a uma reação de choque e culminar com a morte do animal (McCall et al., 2008; Litster et al., 2008; Simón et al., 2012).

O tratamento com tetraciclina (doxiciclina) durante 30 dias pode eliminar o simbionte *Wolbachia* e nos gatos onde a terapia adulticida é contraindicada permite que estes animais convivam melhor com a doença, no entanto, não origina verdadeira cura (Taylor, Bandi,

Hoerauf & Lazdins, 2000; Meireles, Paulos & Serrão, 2014). São necessários mais estudos para determinar a utilidade clínica desta aproximação terapêutica (Atkins, 2007; Nelson et al., 2008; Colado & Pérez, 2010). Dado que a grande maioria dos gatos infetados não apresentam microfilárias, a terapia microfilaricida não é necessária nesta espécie (Atkins & Litster, 2006).

5.8 - Profilaxia

A quimioprofilaxia mensal é uma opção segura e eficaz para os gatos que vivem em áreas onde a infeção é endémica e a exposição a mosquitos é provável (McCall et al., 2008). A maioria dos felinos domésticos vive dentro de casa por isso estão mais protegidos do que os cães à infeção. Para este tipo de prevenção pode-se usar a milbemicina oxima (2 mg/kg) ou a ivermectina (24 µg/kg) por via oral ou a moxidectina (1 mg/kg) ou a selamectina (6-12 mg/kg) por via tópica (McCall et al., 2008; Hoch et al., 2008b; Colado & Pérez, 2010). Estes fármacos atuam parando o crescimento ou matando as larvas de dirofilária dentro de algumas semanas ou meses após a infeção. Deste modo fornecem um longo período de eficácia e proteção quando ocorrem lapsos na administração preventiva (Hoch et al., 2008b). Recentemente foi efetuado um estudo que demonstrou uma eficácia de 100% da eprinomectina, componente de uma combinação de um produto novo (Broadline®) (Baker et al., 2014). A prevenção deve iniciar-se às 8 semanas de idade e deve administrar-se a todos os gatos que vivam em zonas endémicas durante as estações de risco de transmissão. No entanto, a administração preventiva durante todo o ano tem as suas vantagens pois complementa a sua atividade contra vários parasitas intestinais comuns (e no caso da selamectina contra alguns ectoparasitas); consegue-se um maior empenho do dono e é mais seguro tendo efeitos retroativos se alguma dose for esquecida (McCall et al., 2008). Embora a testagem não seja absolutamente necessária, pode ajudar a determinar a prevalência local da infeção (Hoch et al., 2008b). O desenvolvimento de uma vacina ainda está em fase experimental (McCall et al., 2008). Dada a dificuldade no diagnóstico e tratamento adulticida da dirofilariose felina, a escolha mais razoável para o controlo desta doença é a administração mensal de medicação preventiva (McCall et al., 2008).

5.9 – Importância em saúde pública

Há registos de infeções ocasionais em humanos provocadas por nematodes filarídeos, incluindo *D. repens*, *D. ursi*, *D. tenuis* e *D. immitis*. A importância em saúde pública das diferentes espécies depende maioritariamente da sua distribuição geográfica (Simón et al., 2012). Os humanos são considerados hospedeiros acidentais e estas infeções acidentais

raramente se tornam patentes (McCall et al., 2008). A maioria dos casos de dirofilariose humana referem a transmissão a partir do cão mas a infeção a partir de gatos e outros animais (ursos e guaxinins) já foi relatada (Narine, Brennan, Gilfillan & Hodge, 1999). No entanto, a necessidade de um mosquito vetor para a transmissão e o facto de os gatos raramente apresentarem microfilarémia, sugere que os felinos constituem um reservatório pouco importante desta zoonose (Rosa, 2009). A dirofilariose animal, como zoonose, constitui um risco para a população humana, uma vez que *D. immitis* é o agente causador da dirofilariose pulmonar e pode produzir nódulos pulmonares benignos (Vieira et al., 2014). Humanos que vivem em zonas endémicas para a dirofilariose canina estão em risco de contacto com mosquitos infetados, os quais podem transmitir o parasita durante a sua refeição de sangue. Pensa-se que a maioria das larvas infetantes são eliminadas pelo sistema imunitário do hospedeiro humano. No entanto, alguns parasitas podem continuar a migrar e chegar aos ramos da árvore arterial pulmonar provocando vasculite (Simón et al., 2012). Estes parasitas morrem como resultado da resposta inflamatória e ao morrerem são incorporados num granuloma, reconhecido como uma lesão típica de “moeda” numa radiografia ou tomografia computadorizada (McCall et al., 2008). A Infeção humana por *D. immitis* tem sido registada em vários países (Simón et al., 2012). Foi sugerido que os casos de dirofilariose humana são subestimados pois as infeções são assintomáticas e o diagnóstico difícil. O único método seguro para proteger a saúde humana deste parasita zoonótico é a administração de medicação preventiva a animais que vivem em áreas endémicas (McCall et al., 2008; Simón et al., 2012). Em contraste com outros países europeus, não têm sido divulgados casos de infeção humana por *Dirofilaria* em Portugal, apesar da elevada prevalência registada em caninos e alta densidade de vetores eficientes (Belo, Afonso & Gonçalves, 2014).

6 – SITUAÇÃO EM PORTUGAL DE AGENTES DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR VETORES EM GATOS

6.1- Babesiose felina

Casos esporádicos de infecção por espécies de *Babesia* canina em gatos domésticos têm sido reportados em Portugal. Um estudo realizado na região norte e centro de Portugal (Vilhena et al, 2013) reportou pela primeira vez a prevalência através de PCR, de *Babesia* spp. em gatos de Portugal (9,4%). Os animais mais afetados foram os jovens (menos de 3 anos) ou os mais velhos recolocados em áreas endémicas. Outro estudo realizado por Maia et al. (2014a), detetou 6,9% de prevalência, através de PCR, numa amostra de gatos da região Sul de Portugal. Ambos os resultados obtidos nos estudos anteriores corroboram o facto de que as infeções devido a piroplasmídeos em gatos podem ocorrer e que *B. vogeli* é a espécie mais comum em felinos de Portugal (Maia et al., 2014a). Provas moleculares de infecção por *B. canis* em gatos foram encontradas num estudo de felinos oriundos de Espanha e Portugal, no qual foi identificado DNA de *B. canis* amplificado a partir de 3 gatos (Criado-Fornelio et al., 2003a).

6.2 –Hepatozoonose felina

O primeiro registo de infecção felina por *H. felis* em Portugal ocorreu em 2013 (Vilhena et al., 2013) e foi detetada uma prevalência, através de PCR, de 15,6%. De acordo com um estudo realizado na região Sul, a prevalência obtida, com a mesma técnica molecular, foi de 8,6% (Maia et al., 2014a). Recentemente ocorreu a amplificação de *H. felis* a partir de *Rhipicephalus sanguineus* colhidos de cães e gatos oriundos do centro e sul do país (Maia et al., 2014b).

6.3 – Leishmaniose felina

As prevalências de leishmaniose felina encontradas em Portugal são, de um modo geral, mais elevadas no Sul do que no Norte. No norte foram apuradas seroprevalências que variaram de 0,3% (PCR) (Vilhena et al., 2013) a 2,8% (ELISA) (Cardoso et al., 2010). Na Área Metropolitana de Lisboa os valores obtidos foram 0% (Rosa, 2009), utilizando atécnica de IFI; 1,03% (Vaz et al., 2005), (IFI); 2% (Martins, 2011), por PCR; 12,5% (Garrido, 2012); 20,3% (Maia et al., 2008); 25% (Gomes, 2015) e 30,4% (Maia et al, 2010), estas últimas através de IFI. Na zona de Vila Franca de Xira a prevalência obtida (IFI) foi de 0% por Faria (2008). No Sul do país as seroprevalências observadas por Maia et al. (2014a) e Maia et al.

(2015) foram 9,9% (por PCR) e 3,7% (deteção de anticorpos por teste de aglutinação direta) respetivamente e Ramos (2012) obteve uma prevalência de 0,5% (teste de aglutinação direta) na zona de Olhão. Estes resultados indicam que as condições climáticas na região sul podem ser favoráveis à proliferação e abundância de vetores. Apenas 4 casos clínicos de leishmaniose felina foram reportados em Portugal (Costa-Durão et al., 1994; Marcos et al., 2009; Sanches, Cardoso, Pereira & Carvalho, 2009; Basso et al., 2013). A leishmaniose canina é endémica em Portugal com uma prevalência nacional de 6,3% (Cortes et al., 2012). Na região do Algarve foram encontradas seroprevalências de 3,8% em caninos aparentemente saudáveis e 40,6% no grupo dos animais clinicamente suspeitos de terem leishmaniose (Cardoso, Mendão & Madeira de Carvalho, 2012)

6.4 – Erliquiose felina

Ehrlichia spp. foi detetada, por PCR, em 0,6% dos gatos testados na zona norte e centro de Portugal (Vilhena et al., 2013). Na região Sul do país, a seropositividade foi de 5,4%, também por PCR (Maia et al, 2014a). Num estudo realizado por Martins (2011) foi efetuada a deteção de *E. canis* (entre outros agentes) em gatos através da técnica de PCR sendo a prevalência obtida de 2%.

6.5 – Dirofilariose felina

Os valores de prevalência de dirofilariose canina têm vindo aumentar segundo o estudo de Alho et al. (2014a) que reportou valores de 24,8% para Setúbal, 13,2% para Santarém e 13,8% para Coimbra. Um trabalho realizado em 2009 numa população de 70 gatos oriundos da Área Metropolitana de Lisboa, detetou a presença de antígenos de *D. immitis* utilizando a técnica de imunocromatografia (teste rápido), apurando uma prevalência de 1,43% (Rosa, 2009). Almeida (2010), reportou 1,2% de prevalência para dirofilariose felina, utilizando técnicas de deteção de antígeno. Em 2014, anticorpos contra *D. immitis* (ELISA) foram reportados em 15% dos gatos domésticos nas regiões norte e centro do país e na mesma área geográfica a prevalência de dirofilariose canina foi de 2,1% (Vieira et al., 2014). A deteção de antígeno revelou a presença do parasita em 4,8% dos animais na região sul de Portugal (Maia, Ramos, Coimbra, Cardoso & Campino, 2015). Estudos recentes têm revelado que a distribuição de *D. immitis* alastrou a todo o País, sendo de destacar o seu desenvolvimento na zona centro do país, mostrando uma clara tendência de aumento de prevalência de Norte para Sul (Madeira de Carvalho, Alho, Meireles & Belo, 2014).

CAPITULO III – Detecção de infeção por *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., *Leishmania* spp., *Ehrlichia* spp. e *Dirofilaria immitis* em gatos (*Felis catus domesticus*), por técnicas parasitológicas diretas e serológicas no concelho de Alcochete

1. Objetivos

O trabalho experimental realizado nesta dissertação teve como objetivos:

- (1) Detecção de *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp. e *Ehrlichia* spp. através de esfregaço sanguíneo por escorregamento e de microfílaras de *Dirofilaria immitis* através de esfregaço sanguíneo por escorregamento e gota a fresco. Se forem visualizadas outras formas parasitárias não incluídas neste estudo, irão ser assinaladas a título de informação mas não discutidas no presente estudo;
- (2) pesquisa de anticorpos anti-*Babesia* spp., anti-*Leishmania* spp., anti-*Ehrlichia* spp. e anti-*Dirofilaria immitis* por imunofluorescência indireta (IFI) nos casos de *Babesia* spp., *Leishmania* spp. e *Ehrlichia* spp. e ELISA no caso de *Dirofilaria immitis*, no concelho de Alcochete para obter informação sobre a sua prevalência;
- (3) relacionar a presença de infeção com alterações de hemograma e com possíveis sinais clínicos;
- (4) nos casos em que tal seja possível, nos resultados positivos, fazer o acompanhamento e avaliação do curso da doença e resposta ao tratamento instituído;
- (5) determinar a influência nos resultados positivos de diversos fatores, entre eles, idade, sexo, raça, pelagem, alimentação, condição corporal, habitat, exame físico, co-habitação com animais ou pessoas doentes, contacto com outros animais, presença de ectoparasitas, desparasitações, vacinação, presença em gatil, férias e ausência do país.

2. Materiais e Métodos

2.1 Caracterização geográfica e climática da área do estudo

O concelho de Alcochete, do Distrito de Setúbal, ocupa uma área de 133 km². Localiza-se na região de Lisboa (NUT II) e Península de Setúbal (NUT III) encontrando-se delimitado a sudoeste pelo rio Tejo. Possui um clima mediterrânico, com um período seco de cerca de 80 a 100 dias, durante o verão, em que a temperatura média ronda os 29 °C. No inverno as temperaturas são moderadas. A sua morfologia é bastante plana e as terras deste concelho fazem parte da Reserva Natural do Estuário do Sado, possuindo uma grande riqueza de

vida animal e várias atividades económicas tradicionais tais como a pesca, atividade salineira, resinosa e corticeira. A Reserva Natural do Estuário do Sado abrange uma grande área de zona húmida, que inclui o rio, zonas de lodo e sapais. A agricultura ocupa uma superfície agrícola de 55% da área concelhia, predominando os cultivos de cereais, batata, pousio, culturas hortícolas intensivas, prados e pastagens permanentes (Infopédia, 2013).



Figura 2- Imagem de Alcochete (adaptado de <https://www.google.pt/search?q=fotos+de+alcochete>)

2.2. Caracterização da população em estudo

A população em estudo foi constituída por uma amostra de 40 gatos residentes no concelho de Alcochete que se apresentaram na clínica veterinária Vet Alcochete para consulta, cirurgias ou exames complementares de diagnóstico entre os meses de Maio e Dezembro de 2014. A escolha dos animais foi efetuada independentemente do sexo, raça, idade e estado clínico. Os donos dos gatos foram informados sobre os objetivos deste trabalho e deram o seu consentimento por escrito (Anexo I) antes da inclusão dos gatos no presente estudo.

Para a determinação dos grupos etários consideraram-se quatro categorias: “> 0 e <4”; “≥4 e <7”; “≥7 e <9” e ≥9 anos. Para classificação da condição corporal os critérios usados foram: normal (costelas palpáveis sem cobertura adiposa excessiva; vista de cima, a cintura é observada atrás das costelas e abdómen retraído quando visto de lado), magro (costelas facilmente visíveis em gatos de pelo curto, ausência de gordura corporal perceptível, reentrância abdominal acentuada, vértebras lombares e asas ilíacas facilmente palpáveis) e obeso (impossível palpar as costelas sob a cobertura adiposa muito densa, cintura

inexistente, evidente abaulamento do abdómen com bolsa de gordura abdominal proeminente e presença de depósitos de gordura na região lombar).

Em relação ao habitat, os animais foram classificados em gatos de interior (animais que vivem no interior das habitações sem qualquer acesso ao exterior), gatos de exterior (animais que vivem permanentemente no exterior) e mistos (gatos que vivem dentro de casa mas têm acesso ao exterior).

Relativamente ao exame físico, os animais foram classificados como suspeitos de doença ou como tendo um exame físico normal (sem sinais exteriores de doença).

No que diz respeito a desparasitações externas, internas e vacinação, os animais foram classificados como sujeitos a desparasitações e vacinação regulares (a regularidade foi aceite como mensal para desparasitação externa, mensal, trimestral ou quadrimestral para desparasitação interna e anual para a vacinação) ou irregulares (intervalos de tempo superiores aos aceitáveis ou ausência de desparasitações ou vacinações).

Quanto ao hemograma, os animais foram classificados como tendo alterações no hemograma ou como tendo hemograma normal. Quanto à avaliação dos restantes fatores (esterilização, co-habitação com outros animais, co-habitação com animais doentes, co-habitação com pessoas doentes, doenças anteriores, presença de ectoparasitas, presença em gatil, férias e ausências do país) as respostas dividiam-se em afirmativas ou negativas.

2.2.1. – Exame clínico e recolha de informação através de Inquéritos

O exame físico, que incluiu medição de temperatura corporal, auscultação cardíaca e pulmonar, inspeção da mucosa bucal, palpação do abdómen e gânglios linfáticos submandibulares, axilares e poplíteos, foi acompanhado do preenchimento de um inquérito (Anexo II) onde foram recolhidos dados sobre cada animal, de modo a caracterizar a população em estudo através da avaliação dos parâmetros referidos no ponto anterior.

2.3 – Colheita de amostras e processamento

A recolha de amostras decorreu nas instalações da VetAlcochete – Clínica Veterinária de Alcochete entre os dias 6 de Maio e 20 de Dezembro de 2014. A cada animal foram colhidos 2 ml de sangue da veia safena ou jugular e depois distribuídos 1 ml para um tubo com EDTA e 1 ml para um tubo seco. No final da distribuição do sangue, uma gota foi colocada numa lâmina, coberta com uma lamela e imediatamente observada ao microscópio ótico (objetiva x4 e x10 e ocular x10) para avaliar a presença de microfilárias numa gota a fresco. A partir do tubo com EDTA foram realizados dois esfregaços de sangue e um hemograma por cada

animal, sendo depois a amostra congelada. A amostra contida no tubo seco foi centrifugada a 1500 rpm durante 10 minutos, de acordo com o protocolo aceite no Laboratório de Doenças Parasitárias, da FMV, ULisboa, com o objetivo de recolher o soro. O soro foi posteriormente colocado em tubos *ependorf*, identificado e armazenado a -20°C para posterior realização da técnica de imunofluorescência indireta e ELISA, para pesquisa de anticorpos contra vários parasitas.

2.4 – Esfregaços sanguíneos

A partir do tubo com EDTA foram efetuados dois esfregaços de sangue. Os esfregaços foram realizados nas instalações da Vetelcochete, de acordo com a seguinte técnica:

1. colocou-se uma gota de sangue fresco (retirado do tubo com EDTA) numa lâmina identificada com o nome do respetivo animal e com o número correspondente ao questionário;
2. com a ajuda de uma lamela, estendeu-se a gota de sangue sobre a lâmina de modo a formar uma película muito fina de sangue, deixando a lâmina a secar à temperatura ambiente.
3. depois de secas, as lâminas foram acondicionadas em papel absorvente e transportadas para o Laboratório de Doenças Parasitárias, da FMV, ULISBOA, onde se procedeu à sua fixação e coloração.
4. A fixação foi realizada com metanol durante 1 minuto e posterior adição do corante Giemsa puro com um tempo de espera de 1 minuto. Seguidamente as lâminas foram passadas por água corrente para remover o excesso de corante, secas ao ar e armazenadas à temperatura ambiente para posterior observação em microscópio ótico (objetiva x40 e x100, com óleo de imersão e ocular x10).

A observação microscópica de cada esfregaço sanguíneo foi realizada com as ampliações de 400x e 1000x, com início na periferia do esfregaço. Em cada lâmina foram observados aproximadamente 100 campos aleatórios (objetivas de x40 e x100) para a pesquisa dos agentes em estudo, de modo a garantir o mesmo rigor e aproximadamente a mesma área de observação em todos os esfregaços.

2.5 – Hemograma

O hemograma foi realizado nas instalações da clínica Vetelcochete, cerca de 15 minutos após cada colheita num contador automático de células (impedância) da marca Abacus Junior B (Modelo Ec 12 Vet, Kemia Científica). O tubo de sangue com EDTA foi colocado no

local da amostra, da qual foi recolhida por aspiração a quantidade de sangue necessária para fazer a contagem automática das células.

2.6 – Testes serológicos

2.6.1 – Pesquisa de anticorpos anti-*Babesia* spp. e anti -*Ehrlichia* spp. pela técnica de IFI (Megacor®)

A pesquisa de anticorpos contra *Babesia* spp. e *Ehrlichia* spp. foi realizada por IFI no Laboratório de Doenças Parasitárias, da FMV, ULISBOA, utilizando testes comerciais fabricados pelo laboratório Megacor® e segundo as instruções do fabricante (Anexo III). Foram utilizados *kits* comerciais indicados para cão embora se tenha substituído o conjugado anti-cão por conjugado anti-gato. De acordo com a informação do fabricante, os *kits* para diagnóstico de babesia e de erliquia não permitem distinguir entre espécies, pelo que foram utilizados para pesquisa de géneros. A razão pela qual foram utilizados testes indicados para cão, deve-se ao fato de, até à data de início deste estudo, não estarem disponíveis no mercado testes para pesquisa destes hemoparasitas específicos para gatos.

As lâminas de substrato dos diferentes testes consistiam em:

(1) para *Babesia* spp. em lâminas contendo eritrócitos caninos infetados com o parasita fixados, na forma dos característicos merozoítos citoplasmáticos;

(2) para *Ehrlichia* spp., em lâminas contendo macrófagos caninos em que 20 – 30 % estavam infetados com o parasita, contendo as características mórulas citoplasmáticas.

As amostras de soro felino foram diluídas em tampão e incubadas nos poços individuais para permitir a reação dos anticorpos do animal com os antígenos de *Babesia* spp. e *Ehrlichia* spp. As lâminas foram lavadas com PBS (*phosphate buffered saline*) para remover as proteínas séricas não reativas, adicionando-se posteriormente o conjugado respetivo (anticorpo imunoglobulina G anti-felino ligado ao corante fluorescente). Após 30 minutos de contacto entre conjugado e complexo antígeno-anticorpo, as lâminas foram novamente lavadas com PBS para remover o conjugado não reativo. No final foram adicionadas duas gotas de meio de montagem à lâmina que foi coberta por uma lamela e observada de seguida.

Interpretação dos resultados:

As reações resultantes puderam ser observadas através da microscopia de fluorescência em que a reação positiva (controlo positivo) foi visualizada:

(1) no caso de *Babesia* spp., como merozoítos de fluorescência verde bem delineada, dentro do citoplasma dos eritrócitos infetados;

(2) no caso de *Ehrlichia* spp. como uma mórula de fluorescência verde-maçã bem definida no interior do citoplasma de 20-30% das células em cada campo.

Uma reação negativa era observada em todos os testes, ou como células coradas de vermelho, ou por ausência de fluorescência/fluorescência diferente daquela observada no poço do controlo positivo. A quantidade de anticorpos da amostra é determinada pela diluição limite em que existe positividade. Esta positividade é determinada pelo operador, que avalia a presença de fluorescência. No caso dos testes do laboratório Megacor® os limiares de positividade eram fornecidos: *Babesia* spp. 1:20 e *Ehrlichia* spp. 1:40.

Para diminuir a margem de erro, todas as lâminas forma observadas pelo mesmo operador e o resultado positivo, ou negativo de cada amostra foi avaliado em comparação com os controlos positivo e negativo da respetiva lâmina, já incluídos no *Test-kit*.

2.6.2 – Pesquisa através de imunofluorescência indireta de anticorpos para *Leishmania* spp. (*Leishmania* Spot IF, BioMérieux®)

A pesquisa de anticorpos contra *Leishmania* spp. foi realizada por IFI no Laboratório de Doenças Parasitárias, da FMV, ULISBOA. Foi usado como controlo positivo soro de gato da seroteca do Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV, ULISBOA, previamente analisado, com títulos altos de anticorpos anti-*Leishmania*. Como controlo negativo foi utilizado tampão fosfato-salino (PBS). Utilizou-se o *kit Leishmania-Spot IF* (Laboratório bioMérieux, França), de acordo com as seguintes instruções do fabricante (Anexo III):

1. Retirar as lâminas com antigénio do frigorífico e colocá-las à temperatura ambiente durante 15 minutos;
2. Preparar o PBS (BioMérieux, França), diluindo-o em 1 litro de água destilada;
3. Preparar o PBS-Tween 80, através da junção de 1 mililitro de Tween 80 (Merck, Alemanha) a um litro do preparado anterior;
4. Numa microplaca, depositar 195 µL de PBS nos poços, correspondendo o número de poços ao número de soros que se pretende testar;
5. Adicionar 5 µL de soro a cada poço que contém PBS;
6. Incubar durante 30 minutos a 37°C, em câmara húmida;
7. Lavar as lâminas do seguinte modo:
 - a. 1ª lavagem: rápida com PBS/Tween 80;
 - b. 2ª lavagem: 5 minutos mergulhadas num recipiente contendo PBS/Tween 80;
 - c. 3ª lavagem: 5 minutos mergulhadas noutra recipiente contendo PBS/Tween 80;

- d. Lavar as lâminas com água destilada;
- e. Deixar secar bem as lâminas ao ar.
8. Depositar 10 μ L do conjugado MegaSceen FLOU VET (MegaCor Diagnostik GmbH; anticorpos anti-igG total de gato) em cada poço, incluindo os controles;
9. Incubar durante 30 minutos a 37°C em câmara húmida;
10. Lavagem igual ao passo 7;
11. Depois de secar muito bem as lâminas fazer a montagem definitiva colocando uma gota de glicerina tamponada (1:10) Fluoprep (BioMérieux, França) em cada poço e cobrir com uma lamela de 50x24 mm.
12. Efetuar a leitura em microscópio de fluorescência (Olympus DP10, Modelo BX50F), com comprimento de onda de 425 nm.



Figura 3- Material usado na técnica de IFI

Interpretação de Resultados:

Consideraram-se como positivas as amostras contidas em poços que apresentaram formas promastigotas bem definidas com uma coloração verde fluorescente. O controlo negativo era constituído por formas promastigotas de coloração vermelha, sem qualquer tipo de fluorescência.

Tendo em conta a inexistência de um protocolo universalmente aceite para a deteção de anticorpos anti-*Leishmania* pela técnica de IFI em gatos, considerou-se como limiar de positividade 1:40 (Rosa, 2009).

2.6.3 – Pesquisa de anticorpos contra *D. immitis* (HESKA® Solo Step® FH)

Para esta pesquisa foi utilizado um teste específico para gatos baseado no método de ELISA que deteta anticorpos (os gatos desenvolvem uma forte resposta de imunoglobulina G à infeção) sendo por isso mais fiável do que os testes de deteção de antigénio (Prieto et

al., 1997). Para realizar a pesquisa de anticorpos para *D. immitis* foram seguidas as seguintes instruções (Anexo IV):

1. Abrir o invólucro do teste e colocá-lo numa superfície plana;
2. Usando uma pipeta (pipeta de Pasteur fornecida com o *kit*) recolher a amostra de soro do paciente;
3. Dispensar 90 µL da amostra no pocilho redondo do teste;
4. Permitir que a amostra flua através da janela de resultados durante 10-15 minutos
5. Ler os resultados na janela retangular aos 15 minutos. É necessário que apareça uma linha azul (Linha de controlo do procedimento) em todas as amostras e uma linha vermelha (Linha teste) pode aparecer ou não.

Foram feitas duas alterações ao protocolo do fabricante:

(1) a leitura dos testes não foi realizada passados cinco minutos da reação pois nesta altura ainda não tinha ocorrido a total migração da amostra (em nenhuma amostra apareceu a linha azul do controle dentro dos cinco minutos recomendados pelo fabricante), sendo a leitura dos testes efetuada aos quinze minutos;

(2) foram adicionadas algumas gotas de solução PBS para permitir a total migração da amostra através das janelas retangulares de resultados (a grande maioria das amostras não tinha volume suficiente para permitir a migração, embora a quantidade de amostra utilizada tenha sido a indicada pelo fabricante).

Dados exatos sobre a especificidade e sensibilidade deste teste não estão disponíveis, no entanto o fabricante reporta que o teste é altamente sensível e específico (Fernandez et al., 2010).



Figura 4- Material usado na deteção de anticorpos anti-*Dirofilaria immitis*



Figura 5- Teste Heska® Solo Step Feline Heartworm negativo

Interpretação dos resultados:

Os resultados só podem ser considerados válidos se aparecer uma linha azul de controlo na janela de resultados. Se esta linha não surgir, o teste é inválido e deve ser repetido. A presença de uma linha vermelha na janela de resultados (abaixo da linha de controlo) indica a positividade do teste, ou seja, há presença de anticorpos para *D. immitis*, o que pode significar uma ou mais das seguintes hipóteses:

- (a) presença de parasitas adultos no coração e/ou artérias pulmonares;
- (b) o gato está infetado com parasitas adultos ou larvas em fase L4;
- (c) a infeção por *D. immitis* já não está ativa mas ainda há presença de anticorpos circulantes;
- (d) presença de dirofilárias ectópicas.

A ausência de linha vermelha na janela de resultados indica um resultado negativo, ou seja, pode acontecer uma das duas situações: o animal não está infetado com *D. immitis* ou o animal está infetado há menos de 60 dias da colheita da amostra.

2.7. Análise Estatística

Os dados obtidos foram armazenados através do programa *Microsoft Office Excel 2013* e a sua análise estatística foi efetuada recorrendo ao programa *Statistical Package for Social Sciences (SPSS®; IBM®, Chicago)*, versão 22. Foram elaboradas tabelas de contingência e o Teste Exato de Fisher foi o teste escolhido para relacionar as variáveis em estudo (idade, sexo, esterilização, raça, pelagem, alimentação, condição corporal, habitat, exame físico, co-habitação com animais ou pessoas doentes, contacto com outros animais, doenças anteriores, presença de ectoparasitas, desparasitações, vacinação, presença em gatil, férias e ausência do país) com a positividade a *Babesia spp.*, *Hepatozoon spp.*, *Leishmania spp.*, *Ehrlichia spp.* e *Dirofilaria immitis*. A escolha do teste foi devido à pequena dimensão da amostra (n=40), usando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Não foi possível utilizar o teste do qui-quadrado de Pearson pois, nas tabelas de contingência 2 x 2, os valores esperados menores que 5 e amostras pequenas, podem afetar a aproximação da distribuição deste teste.

3 – Resultados

3.1 – Caracterização da População

A amostra foi constituída por 14 machos (35%) e 26 fêmeas (65%) (Gráfico 1). Dois dos machos eram esterilizados e doze eram inteiros. Dezanove fêmeas eram esterilizadas e sete eram inteiras (Gráfico 1).

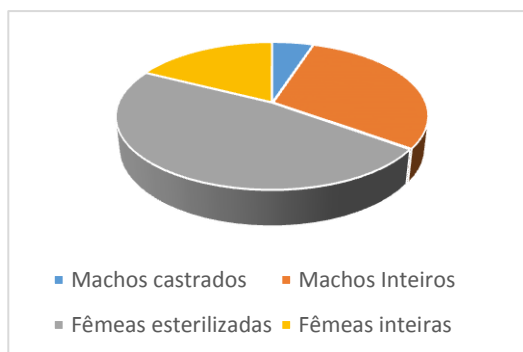


Gráfico 2 - Distribuição de sexos na amostra (N=40)

De forma a facilitar o tratamento de dados, os animais foram agrupados por grupos etários, consoante a Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição dos gatos em estudo por grupos etários (N=40)

Idade (anos)	Frequência absoluta	Frequência Relativa (%)
>0 A <4	17	42,5
≥4 A <7	11	27,5
≥7 A <9	3	7,5
≥9	9	22,5

Quanto à raça, 100% (n=40) dos felinos que integraram o estudo pertenciam à raça Europeu Comum, tinham pelo curto e a alimentação era à base de ração seca. Em termos de condição corporal, 77,5% (n=31) eram normais, 20% (n=8) eram magros e 2,5% (n=1) era obeso (Tabela 2).

Tabela 2 – Distribuição da população em estudo consoante a condição corporal (N=40)

Condição corporal	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)
Magro	8	20
Normal	31	77,5
Obeso	1	2,5

Quanto à habitação, 77,5% (n=31) eram gatos de interior, 15% (n=6) eram gatos de exterior e 7,5% (n=3) eram mistos (Gráfico 2).

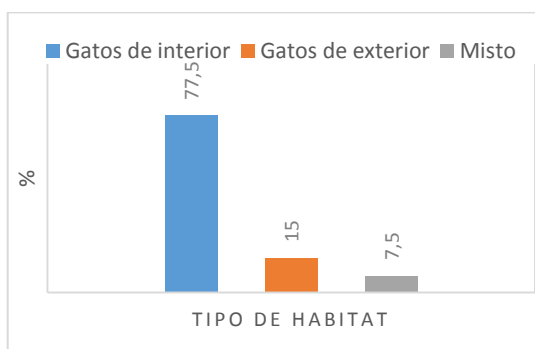


Gráfico 3 - Distribuição da população consoante o tipo de habitat

Quanto à co-habitação, 65% (n=26) dos gatos co-habitava com outros animais sendo estes cães (n=16), gatos (n=22) e ratazanas (n=1); 5% (n=2) co-habitava com animais doentes (em ambos os casos o animal doente era um cão cardíaco) e apenas 1 animal (2,5%) co-habitava com uma pessoa doente tratando-se de uma mulher com cancro de mama (Tabela 3).

Tabela 3 – Co-habitação dos gatos em estudo com outros animais, animais doentes e pessoas doentes

Co-habitação		Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Outros animais	Sim	26	65
		16	40
		22	55
Ratazana		1	2,5
	Não	14	35
Animais doentes	Sim	2	5
	Não	38	95
Pessoas doentes	Sim	1	2,5

	Não	39	97,5
--	-----	----	------

No que diz respeito ao exame físico, 67,5% (n=27) foram considerados como apresentando um exame físico normal e 32,5% (n=13) foram considerados suspeitos de doença. Presença de doença anterior foi registada em 17,5% (n=7) dos animais traduzindo-se por infeção por *Mycoplasma* spp. (n=2); insuficiência renal crónica (n=4); criptosporidiose (n=1) e obstrução urinária (n=1). Em 27,5% (n=11) dos animais foi observada presença de ectoparasitas. Relativamente a desparasitações, 65% (n=26) dos animais eram sujeitos a desparasitações internas irregulares e 35% (n=14) recebiam desparasitações regulares; 70 % (n=28) eram sujeitos a desparasitações externa irregulares e 30% (n=12) regulares. A vacinação era regular em 32,5% (13) dos animais (Tabela 4).

Tabela 4 – Frequência absoluta e relativa (%) da desparasitação interna, externa e vacinação da população em estudo (N=40)

	Classificação	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Desparasitação interna			
Mensal	Regular (35%)	1	2,5
Trimestral		9	22,5
Quadrimestral		4	10
Semestral	Irregular (65%)	9	22,5
Anual		10	25
Não faz		7	17,5
Desparasitação externa			
Mensal	Regular (30%)	12	30
Trimestral		6	15
Quadrimestral		1	2,5
Semestral	Irregular (70%)	13	32,5
Anual		1	2,5
Não faz		7	17,5
Vacinação			
	Regular (32,5%)	13	32,5
Não faz	Irregular (67,5%)	27	67,5

Nenhum dos animais (0%) que integraram este estudo tinha ido de férias com os donos e apenas um animal (2,5%) se tinha ausentado do país com destino a Espanha (todos estes dados estão registados no Anexo V).

3.2 - Resultados obtidos no exame físico e hemograma

Ao exame físico foram detetados sinais e/ou sinais clínicos de doença em 13 gatos (32,5%). Os sinais de doença encontrados foram: febre (n=2), prostração (n=5), anorexia (n=4), vómitos (n=1), mucosas pálidas (n=2), tumor mamário (n=1), desidratação (n=2), obstrução urinária (n=1), perda de peso (n=2), uveíte (n=1), fístula infra-orbitária (n=1) e dispneia (n=1) (Tabela 5). O exame físico foi normal em 67,5% (n=27) dos gatos.

Tabela 5 – Sinais clínicos apresentados pelos animais em estudo (N=40)

Sinais clínicos	Nº de Casos
Febre	2
Prostração	5
Anorexia	4
Vómitos	1
Mucosas pálidas	2
Tumor mamário	1
Desidratação	2
Obstrução urinária	1
Perda de peso	2
Uveíte	1
Fístula infra-orbitária	1
Dispneia	1

Os resultados obtidos revelaram que 40% (n=16) dos animais tinham alterações no hemograma. As alterações encontradas no hemograma traduziram-se por anemia (n=4) e trombocitopenia (n=14) (Tabela 6).

Tabela 6 – Alterações no hemograma registadas na população em estudo (N=40)

Hemograma	Nº de Casos
Com Alteração	16
Anemia	4
Trombocitopénia	14
Normal	24

3.3 – Resultados obtidos na pesquisa de hemoparasitas

3.3.1 - Detecção de hemoparasitas em esfregaços de sangue e gota a fresco

Foram observadas formas parasitárias de *Mycoplasma* spp. em 12,5% (5/40) das lâminas observadas.

No que diz respeito aos parasitas contemplados neste estudo, não se observaram formas de parasitas nos esfregaços realizados nem no exame de gota a fresco.

3.3.2 – Detecção de anticorpos anti-*Babesia* spp. por IFI

A técnica de IFI efetuada para a deteção de anticorpos anti-*Babesia* spp. na diluição de 1:20 apresentou dois resultados positivos. A prevalência de infeção por *Babesia* spp. obtida através desta técnica para esta população de gatos foi de 5% (2/40 gatos) (Tabela 13). Dos dois gatos seropositivos, um deles (50%) apresentava sinais que se traduziram por prostração, anorexia e dispneia.

Os dois animais que mostraram resultados positivos apresentaram alterações no hemograma, ambos (100%) tinham trombocitopénia e um deles (50%) tinha anemia associada (Tabela 7).

Tabela 7 – Alterações do hemograma apresentadas pelos animais seropositivos para *Babesia* spp. (N=2)

Hemograma	Animais positivos para <i>Babesia</i> spp.
Anemia	1

A descrição em pormenor dos animais que mostraram resultados positivos para *Babesia* spp. e respetivos quadros clínicos (quando presentes) é feita no ponto 3.4 e na tabela 8 estão resumidas algumas características desses animais.

Tabela 8 – Características físicas, habitat, anamnese, história clínica, presença de ectoparasitas e programas de desparasitação dos dois animais positivos para *Babesia* spp.

Nº	Sexo	ID	CC	Habitat	Co-hab 1	Co-hab 2	Exame físico	DA	Co-hab 3	Ect	Desp. int	Desp. ext	Hemograma
36	F	4	N	E	Não	Não	Normal	Não	Não	Sim	Não	Não	Anem/ Trom
40	F	1	N	I	Não	Não	A, Pros, Dis	Não	Não	Não	Trim	Men	Trom

ID=Idade (anos) /CC=Condição Corporal/Co-hab 1=Co-habitação com pessoas doentes/Co-hab 2=Co-habitação com animais doentes/ DA=Doenças Anteriores/ Co-hab 3=co-habitação com outros animais/ Ect=Presença de ectoparasitas/ Desp. Int=Desparasitação interna/ Desp.Ext=Desparasitação externa/ F=Fêmea/ M=Macho/N=Normal/E=Gatos de exterior/I=Gatos de interior/ Des=Desidratação/ A=Anorexia/ Pro=Prostração/ Men=Mensal /Tri=Trimestral / Anem= Anemia / Trom= Trombocitopénia

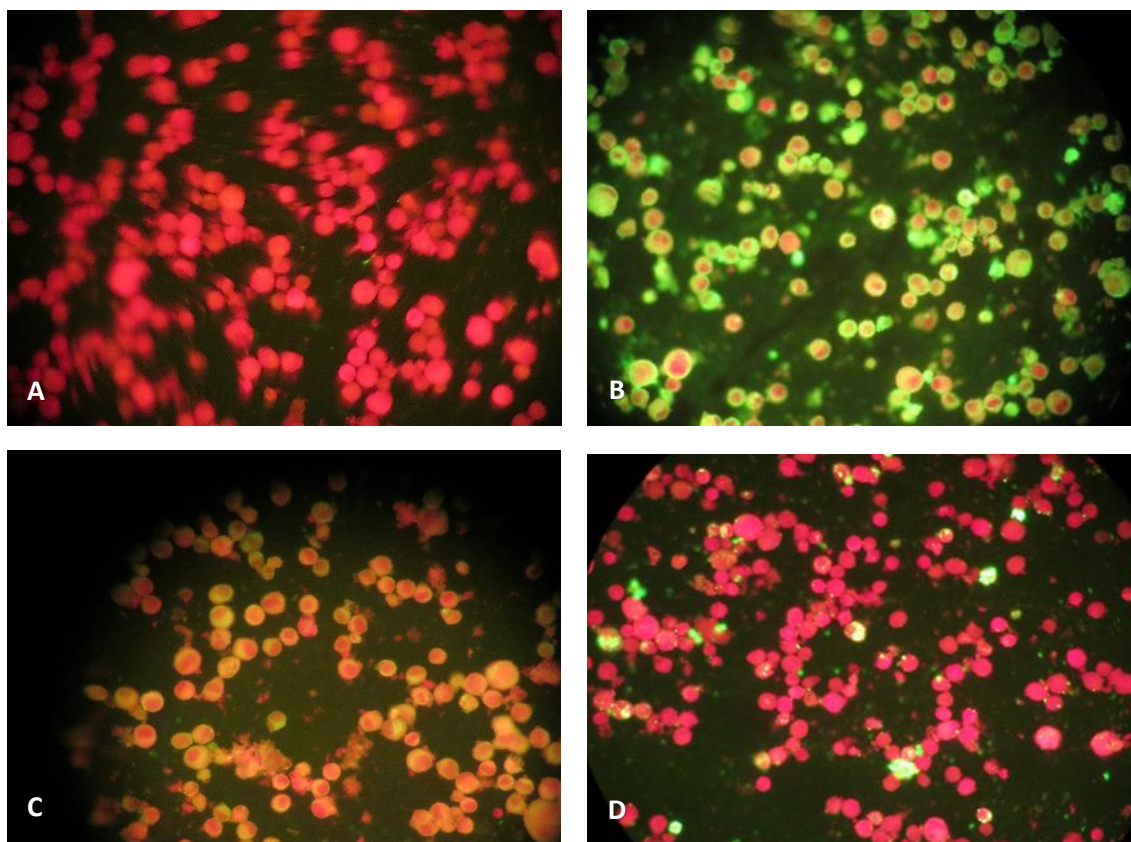
3.3.3 - Detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. por IFI

A técnica de IFI efetuada para a deteção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. na diluição de 1:40 apresentou resultados negativos. Dado a ausência de resultados positivos, não se procedeu a mais diluições. A prevalência de infeção por *Leishmania* spp. obtida através desta técnica para esta população de gatos foi de 0% (0/40 gatos) (Tabela 12).

3.3.4 - Detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia* spp. por IFI

Através da técnica de IFI foram observados 8 resultados positivos na diluição de 1:40. A prevalência de infeção por *Ehrlichia* spp. obtida através desta técnica para esta população de gatos foi de 20% (8/40 gatos) (Tabela 12). O aspeto dos resultados positivos e negativos estão ilustrados na figura 6.

Figura 6: Resultados da pesquisa de anticorpos anti-*Ehrlichia* spp. obtidos por IFI, evidenciando o aspeto do controlo negativo (A), do controlo positivo (B), de uma amostra negativa (C) e de uma amostra positiva (D)



Dos oito gatos seropositivos para *Ehrlichia* spp. 50% (n=4) apresentava sinais clínicos: febre (n=1); prostração (n=2), anorexia (n=3); mucosas pálidas (n=1); desidratação (n=1); perda de peso (n=2); uveíte (n=1); fístula infra-orbitária (n=1) e dispneia (n=1) (Tabela 9).

Tabela 9 – Sinais clínicos exibidos pelos animais positivos para *Ehrlichia* spp. (N=8)

Sinais clínicos	Nº Positivos para <i>Ehrlichia</i> spp.
Febre	1
Prostração	2
Anorexia	3
Vómitos	
Mucosas pálidas	1
Tumor mamário	
Desidratação	1
Obstrução urinária	
Perda de peso	2
Uveíte	1
Fístula infra-orbitária	1

Dispneia	1
----------	---

Todos (100%) os animais que revelaram resultados positivos para infecção por *Ehrlichia* spp. apresentaram alterações no hemograma: 100 % mostraram trombocitopénia (n=8) e 25% mostraram anemia (n=2).

Tabela 10- Alterações do hemograma apresentadas pelos animais seropositivos para *Ehrlichia* spp (N=8).

Hemograma	Nº Positivos para <i>Ehrlichia</i> spp.
Anemia	2
Trombocitopénia	8

A descrição em pormenor dos animais que mostraram resultados positivos para *Ehrlichia* spp. e respetivos quadros clínicos (quando presentes) é feita no ponto 3.4 e na tabela 11 estão resumidas algumas características desses animais.

Tabela 11 – Características físicas, habitat, anamnese, história clínica, presença de ectoparasitas e programas de desparasitação dos animais positivos para *Ehrlichia* spp.

Nº	Sexo	ID	CC	Hab	Co-hab 1	Co-hab 2	Exame físico	DA	Co-hab 3	Ect	Desp Int	Desp ext	Hemo
21	F	2	N	E	Não	Não	Normal	Não	4 cães 17 gatos	Sim	Anual	Sem	T
23	F	4	N	E	Não	Não	Normal	Não	19 gatos	Não	Não	Sem	T
27	F	0,5	N	M	Não	Não	Uveíte	Não	Não	Não	Men	Men	T
34	M	1	N	I	Não	Não	Normal	Não	Não	Não	Trim	Men	T
36	F	4	N	E	Não	Não	Normal	Não	Não	Sim	Não	Não	Ane/T
37	F	12	Magro	I	Não	Não	Des, A, PP, Pro, MC	sim	Não	Não	Quad	Quad	T
39	M	10	Magro	I	Não	Não	A, PP, F, MP, FIO	Não	Não	Sim	Trim	Men	Ane/T
40	F	1	N	I	Não	Não	A, Pros, Dis	Não	Não	Não	Trim	Men	T

ID=Idade/CC=Condição Corporal/Co-hab 1=Co-habitação com pessoas doentes/Co-hab 2=Co-habitação com animais doentes/DA=Doenças Anteriores/Co-hab 3=co-habitação com outros animais/ Ect=Ectoparasitas/ Desp. Int=Desparasitação interna/ Desp.Ext=Desparasitação externa/ F=Fêmea/ M=Macho/N=Normal/E=Gatos de exterior/M=Misto/I=Gatos de interior/ Des=Desidratação/ A=Anorexia/PP=Perda de peso/ Pro=Prostração/ MP=Mucosas pálidas/F=Febre/FIO=Fístula infra-orbitária/ Men=Mensal /Tri=Trimestral/ Quad=Quadrimestral/ Sem=semestral /Hemo= Hemograma / Ane = Anemia / T = Trombocitopénia

3.3.5 - Detecção de anticorpos anti-*Dirofilaria immitis* através do método de ELISA

A detecção de anticorpos anti-*Dirofilaria immitis* por ELISA revelou-se negativa nas 40 amostras. A prevalência de infecção por *Dirofilaria immitis* obtida através desta técnica para esta população de gatos foi de 0% (0/40 gatos) (Tabela 12).

Tabela 12 - Frequência absoluta e frequência relativa (%) dos agentes testados na amostra populacional (N=40).

Agente	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)
<i>Babesia</i> spp.	2	5
<i>Ehrlichia</i> spp.	8	20
<i>Hepatozoon</i> spp.	0	0
<i>Dirofilaria immitis</i>	0	0
<i>Leishmania</i> spp.	0	0

Os resultados positivos obtidos estão esquematizados no gráfico 3.

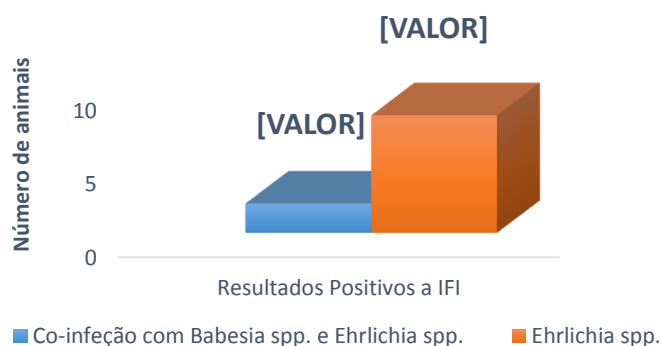


Gráfico 4 - Número de animais positivos a *Ehrlichia* spp. e número de animais co-infetados com *Ehrlichia* spp. e *Babesia* spp.

3.4 – Apresentação dos casos clínicos

Dado o número reduzido de resultados positivos, estes irão ser abordados separadamente.

3.4.1. Gatos co-infetados por *Babesia* spp. e *Ehrlichia* spp.

- O animal com o número 36 pertencia ao sexo feminino, não esterilizada, com 4 anos de idade, pelo curto, condição corporal normal, tinha uma alimentação à base de

ração seca e era um animal exclusivamente de exterior. Não tinha contacto com outros animais nem com pessoas doentes e não tinha história de doenças anteriores. Não apresentava sinais de doença ao exame físico, tendo sido detetada a presença de ectoparasitas no mesmo e não fazia qualquer tipo de desparasitação ou vacinação. As alterações registadas no hemograma foram anemia (eritrócitos=4,5 M/ μ L, valores de referência: 5-10 M/ μ L) e trombocitopénia (plaquetas=147x10³, valores de referência: 300-800x10³)

- O animal com o número 40 era fêmea, esterilizada, com 1 ano de idade, pelo curto, condição corporal normal, tinha uma alimentação à base de ração seca e era um animal exclusivamente de interior. Não tinha contacto com outros animais nem com pessoas doentes e não tinha história de doenças anteriores. O animal apresentava dispneia, anorexia e prostração ao exame físico. Não tinha ectoparasitas e fazia desparasitações internas e externas regulares mas nunca tinha sido vacinada. A alteração registada no hemograma foi trombocitopénia (plaquetas=120x10³). O tratamento instituído foi doxiciclina oral, 5 mg/kg BID durante 30 dias e prednisolona oral 1 mg/kg BID durante 1 semana. O animal foi reavaliado 1 semana após o início do tratamento apresentando melhorias significativas: já não tinha dificuldades respiratórias, estava a comer bem e tinha ganho algum peso.

3.4.2. Gatos positivos para infeção por *Ehrlichia* spp.

- O animal com o número 21 era uma fêmea, esterilizada, com 2 anos de idade, pelo curto, condição corporal normal, tinha uma alimentação à base de ração seca e era um animal exclusivamente de exterior. Vivia em contacto com 17 gatos e 4 cães. Não contactava com pessoas doentes e não tinha história de doenças anteriores. Não apresentava sinais de doença ao exame físico, tendo sido detetada a presença de ectoparasitas. Fazia desparasitação interna anual e externa semestral. Não estava vacinada. A alteração registada no hemograma foi trombocitopénia (plaquetas=108x10³).
- O animal com o número 23 era fêmea, esterilizada, com 4 anos de idade, pelo curto, condição corporal normal, tinha uma alimentação à base de ração seca e era um animal exclusivamente de exterior. Vivia em contacto com 17 gatos e 3 cães. Não contactava com pessoas doentes e não tinha história de doenças anteriores. Não apresentava sinais de doença ao exame físico, tendo sido detetada a presença de ectoparasitas. Nunca fez desparasitação interna e faz desparasitação externa

semestralmente. Não estava vacinada. A alteração registada no hemograma foi trombocitopénia (plaquetas= 94×10^3).

- O animal com o número 27 era fêmea, esterilizada, com 6 meses de idade, pelo curto, condição corporal normal, tinha uma alimentação à base de ração seca e era um animal que vivia dentro de casa mas tinha livre acesso ao exterior (misto) que era um terraço num prédio. Não tinha contacto com outros animais nem com pessoas doentes e não tinha história de doenças anteriores. A única alteração observada no exame físico foi a presença de uveíte no olho esquerdo. Não tinha ectoparasitas e fazia desparasitações internas e externas regulares. As vacinas estavam atualizadas. A alteração registada no hemograma foi trombocitopénia (plaquetas= 86×10^3). O tratamento realizado foi um colírio à base de cloranfenicol e doxiciclina oral, 5 mg/kg BID durante 30 dias. O animal foi reavaliado no final do tratamento não havendo sinais de uveíte nesta altura. Nesta altura foi recolhida uma nova amostra de sangue que foi enviada para o laboratório DNAtech para fazer a identificação do agente através de PCR. Esta revelou-se negativa.

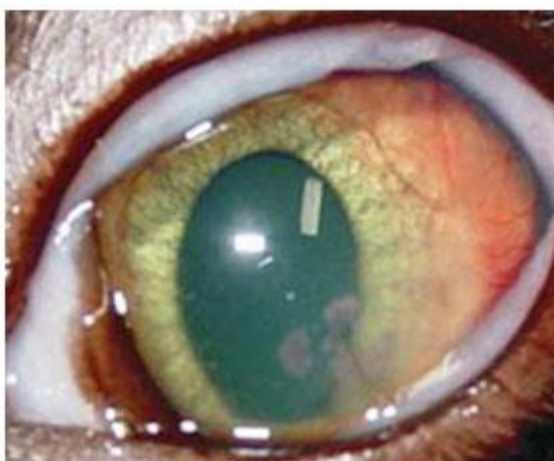


Figura 7- Imagem de uveíte num gato (adaptado de <http://anaturezadosgatos.blogspot.pt/2013/03/uveite-felina.html>)

- O animal com o número 34 era macho, castrado, com 1 ano de idade, pelo curto, condição corporal normal, tinha uma alimentação à base de ração seca e era um animal exclusivamente de interior. Não tinha contacto com outros animais nem com pessoas doentes e não tinha história de doenças anteriores. O exame físico não mostrou alterações. Não tinha ectoparasitas e fazia desparasitações internas e externas regulares. As vacinas estavam atualizadas. A alteração registada no hemograma foi trombocitopénia (plaquetas= 100×10^3).

- O animal com o número 37 era fêmea, esterilizada, com 12 anos de idade, pelo curto, magra, com uma alimentação à base de ração seca e era um animal exclusivamente de interior. Não tinha contacto com outros animais nem com pessoas doentes e tinha tido infeção por *Mycoplasma* spp. (análise feita no laboratório DNAtech por IFI) cerca de 6 meses antes, com sintomatologia associada (anorexia, perda de peso e anemia). O exame físico revelou palidez da mucosa oral, desidratação, anorexia e perda de peso. Não tinha ectoparasitas e fazia desparasitações internas e externas regulares. As vacinas estavam atualizadas. A alteração registada no hemograma foi trombocitopénia. O tratamento instituído foi fluidoterapia, vitaminas, corticosteroides (prednisolona 1 mg/kg IM) e doxiciclina oral, 5 mg/kg BID durante 30 dias. O animal não apresentou nenhum tipo de evolução positiva do quadro clínico havendo agravamento dos sinais clínicos iniciais. Este animal foi testado, para além das análises efetuadas neste estudo, para *Mycoplasma* spp., *Toxoplasma*, FIV e Felv sendo negativo para todos eles exceto *Ehrlichia* spp. Foram realizados hemogramas seriados que foram revelando um agravamento da anemia e trombocitopénia (primeiro hemograma: eritrócitos=5,03 M/ μ L e plaquetas= 150×10^3 ; último hemograma realizado três dias após o primeiro: eritrócitos= 1.23 M/ μ L e plaquetas= 18×10^3). Quando o hematócrito desceu abaixo dos 15% foram efetuadas três transfusões de sangue (sangue fornecido pelo Banco de Sangue Animal) e tratamento de suporte (fluidoterapia e corticosteroides). O animal morreu passados 3 dias.
- O animal com o número 39 era macho, castrado, com dez anos de idade, pelo curto, magro, com uma alimentação à base de ração seca e era um animal que vivia exclusivamente dentro de casa. Não tinha contacto com outros animais nem com pessoas doentes e não tinha história de doenças anteriores. O exame físico revelou anorexia, perda de peso, febre, mucosas pálidas e uma fístula infra-orbitária purulenta devido a abcesso do dente carniceiro (molar nº 4 superior). O tratamento consistiu numa injeção subcutânea de cefovecina (Convenia®) pois era muito agressivo pelo que a medicação por via oral ficou eliminada. O animal foi reavaliado passados quinze dias apresentado melhorias do quadro clínico.
- Os animais com os números 36 e 40 já foram descritos no ponto 3.4.1. e apresentaram também resultados positivos para infeção por *Ehrlichia* spp.

3.5 – Associação estatística

Foi aplicado o teste exato de Fisher nos dados obtidos na tentativa de encontrar alguma associação estatística entre positividade de infecção e os fatores avaliados.

Tabela 13 – Associação estatística entre a infecção por *Babesia* spp. e *Ehrlichia* spp. e as características físicas, habitat, anamnese, história clínica, presença de ectoparasitas, programas de desparasitação e vacinação alteração no hemograma dos animais seropositivos para *Babesia* spp e *Ehrlichia* spp.

Variáveis	Infeção por <i>Babesia</i> spp.	Infeção por <i>Ehrlichia</i> spp.
Sexo	p= 0,693	p= 0,591
Castração	p= 0,121	p= 0,377
Idade	p= 0,685	p= 0,813
Raça	-	-
Pelo	-	-
Condição corporal	p= 0,294	p= 0,593
Exame Físico	p= 0,242	p= 0,304
Alimentação	-	-
Habitat	p= 0,09	p= 0,000
Co-habitação com animais doentes	p= 1,000	p= 1,000
Co-habitação com pessoas doentes	p= 1,000	p= 1,000
Doenças anteriores	p= 1,000	p= 1,000
Contacto com outros animais	p= 0,037	p= 0,015
Presença de ectoparasitas	p= 0,630	p= 0,827
Desparasitação interna	p= 1,000	p= 0,173
Desparasitação externa	p= 0,668	p= 0,693
Vacinação	p= 0,692	p= 0,460
Presença em gatil	-	-
Férias	-	-
Ausência do país	p= 1,000	p= 1,000
Hemograma	p= 0,057	p= 0,000

Como se observa na tabela 13, a positividade a *Ehrlichia* spp. foi influenciada pelo habitat, contacto com outros animais e hemograma e a positividade a *Babesia* spp. foi influenciada apenas pelo contacto com outros animais, apresentando valores de p inferiores a 0,05.

Os fatores raça, pelo, alimentação, presença em gatil e férias foram constantes para a população de felinos em estudo, não sendo assim possível fazer inferências nesta população sobre a sua influência na positividade aos agentes.

Os fatores sexo, castração, idade, condição corporal, exame físico, co-habitação com animais ou pessoas doentes, doenças anteriores, presença de ectoparasitas, desparasitação interna e externa e ausência do país não obtiveram significado estatístico ($p > 0,05$), não estando os resultados positivos associados a nenhuma destas variáveis (tabela 14).

A análise do habitat na tabela 14 permitiu verificar que o tipo de habitat com maior percentagem de indivíduos positivos a *Ehrlichia* spp. foi o de gatos de interior, representando 50% dos animais infetados.

Tabela 14 – Associação entre infeção por *Ehrlichia* spp. e tipo de habitat (Gatos de interior, Gatos de exterior e Misto).

Habitat	Animais positivos para <i>Ehrlichia</i> spp.	
	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)
Gatos de interior	4	50
Misto	1	12,5
Gatos de exterior	3	37,5

Relativamente ao contacto com outros animais, a maior percentagem de animais seropositivos para *Ehrlichia* spp. pertenceu ao grupo que não tinha contacto com outros animais, como se pode observar na tabela 15.

Tabela 15 – Associação entre infeção por *Ehrlichia* spp. e contacto com outros animais

Contacto com outros animais	Animais positivos para <i>Ehrlichia</i> spp.	
	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)
Sim	2	25
Não	6	75

Através da análise da tabela 16 podemos observar que 100% dos animais positivos para *Ehrlichia* spp. tinham alterações no hemograma.

Tabela 16 - Associação entre infecção por *Ehrlichia* spp. e resultados do hemograma

Hemograma	Animais positivos para <i>Ehrlichia</i> spp.	
	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)
Normal	0	0
Com alterações	8	100

O contacto com outros animais também exerceu influência sobre a positividade a *Babesia* spp. sendo que 100% dos animais seropositivos não tinham contacto com outros animais, como se pode concluir da observação da tabela 17.

Tabela 17 - Associação entre infecção por *Babesia* spp. e contacto com outros animais

Contacto com outros animais	Animais positivos para <i>Babesia</i> spp.	
	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)
Sim	2	100
Não	0	0

3.6 – Limitações do estudo

O presente estudo foi efetuado numa população de 40 gatos do concelho de Alcochete, o que representa uma amostra de pequena dimensão, não se podendo, deste modo, retirar conclusões absolutas sobre a influência dos fatores analisados sobre esta população.

4. Discussão

4.1 - Detecção de hemoparasitas por esfregaço sanguíneo e gota a fresco

No presente trabalho não foram identificadas formas parasitárias de *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., *Leishmania* spp., *Ehrlichia* spp. e microfírias de *Dirofilaria immitis* através da observação de esfregaços sanguíneos. Foram no entanto, observadas formas parasitárias de *Mycoplasma* spp em 5 esfregaços. A infecção por *Mycoplasma* spp. não foi abordada no presente trabalho devido à existência de outras teses de Mestrado da FMV, ULisboa, que abordam este tema.

Os esfregaços de sangue são um método de diagnóstico pouco dispendioso e rápido mas a deteção de hemoparasitas por esta técnica pode originar falsos negativos, principalmente devido à baixa parasitemia normalmente associada a doenças transmitidas por vetores nos gatos e devido à difícil identificação dos parasitas intracelulares (Irwin, 2009; Solano-Galego & Baneth, 2011; Caeiros, 2012).

O diagnóstico “clássico” de babesiose felina assenta principalmente na identificação microscópica dos piroplasmas nos eritrócitos, no entanto este procedimento não é muito sensível particularmente em animais portadores (Criado-Fornelio et al., 2003a). No presente estudo não foi possível identificar esfregaços de sangue com presença de formas parasitárias de *Babesia* spp., à semelhança de um estudo realizado em Espanha, o qual revelou 3 gatos positivos para babésia num total de 16 gatos examinados através de PCR, no entanto, tal como neste estudo, a observação microscópica dos esfregaços sanguíneos não revelou qualquer parasita (Criado-Fornelio et al., 2003b). Estes resultados não estão de acordo com os resultados publicados por Simking, Wongnakphet, Stich & Jittapalapong (2010) que identificaram formas de *Babesia* spp. através de exame microscópico na Tailândia; nem com os dados de Würth & Zahler-Rinder (2004) que encontraram uma concordância entre o número de casos positivos detetados por esfregaço de sangue (32,2%) e pela técnica de PCR (35,3%) na África do Sul. Esta diferença de resultados pode ser devida ao local onde ocorreram os estudos, sendo que há poucos casos de babesiose felina reportados na Europa e a África do Sul é a zona onde a sua prevalência é mais elevada.

Não foram observadas formas parasitárias de *Hepatozoon* spp. nos esfregaços realizados no presente estudo. Este resultado foi semelhante ao encontrado por Ortuño et al. (2008), que analisaram esfregaços de sangue de 25 gatos e não visualizaram nenhuma forma parasitária. Ainda neste grupo de gatos, foi realizada testagem por PCR que revelou 16% de seroprevalência (4/25). Baneth et al. (1998) também encontrou um valor muito baixo (0,57%)

de esfregaços contendo formas parasitárias de *Hepatozoon* spp., num grupo de 1229 gatos (só foram visualizadas formas parasitárias em 7 gatos). Um estudo efetuado na Tailândia, por Jittapalapong, Rungphisutthipongse, Maruyama, Schaefer & Stich (2006) revelou igualmente um valor muito baixo dado que só se observaram gamontes em 0,7% dos esfregaços de sangue analisados por microscopia numa população de 300 gatos. Esta população apresentou uma seroprevalência de 32,3% quando testada através de PCR.

Foi efetuado o isolamento do organismo por meios moleculares em estudos realizados em Espanha (Ortuño et al., 2008; Tabar et al., 2008; Criado-Fornelio et al., 2003a; Criado-Fornelio et al., 2007), Israel (Baneth et al., 1998), Brasil (Bortoli et al., 2011); França (Criado-Fornelio, 2009) e Tailândia (Jittapalapong et al., 2006). Miceli et al. (2013) reportaram que nenhum dos animais testados (0/178) mostrou presença de DNA de *Hepatozoon* nas suas amostras de sangue. Num estudo efetuado por Baneth et al. (2013), foi feita a identificação de *H. felis* por PCR. Foi encontrada uma associação positiva entre as taxas de infeção de cães e gatos no mesmo distrito e as sequências de DNA de cães e gatos foram muito próximas de *H. canis*.

No estudo realizado por Baneth et al. (1998) observou-se que a maioria dos gatos infetados eram jovens machos e que havia uma sobre-representação de gatos com doenças retrovirais (FIV e FeLV) podendo ser justificado pelo comportamento territorial dos machos que faz com que estes se envolvam mais em lutas e deste modo têm mais tendência a ficar infetados com FIV e FeLV que por sua vez os torna mais suscetíveis à infeção por *Hepatozoon* spp. Nos sete casos descritos de hepatozoonose felina neste estudo, os gatos apresentavam sinais clínicos relacionados com outras infeções tais como FIV, FeLV e micoplasmose. A associação significativa encontrada entre a infeção e o acesso ao exterior sugere a possibilidade de transmissão através de vetores artrópodes tais como pulgas, carraças e ácaros, que são ectoparasitas comuns dos gatos; ou por carnivorismo como descrito para várias espécies de *Hepatozoon* (Baneth et al., 2013).

As infeções provocadas por *Hepatozoon* spp. são tipicamente assintomáticas embora possam ser patogénicas em certas circunstâncias tais como hospedeiros acidentais, stress devido a cativeiro, degradação do habitat, variações climáticas ou imunossupressão (Williams et al., 2014). A infeção por *Hepatozoon* em felinos domésticos já foi reportada em vários países incluindo Índia (Patton, 1908, citado por Baneth, 2011), África (Van Amstel, 1979, citado por Baneth, 2011), Estados Unidos (Ewing, 1977, citado por Baneth, 2011), Israel (Klopfer et al., 1973) e Espanha (Tabar et al., 2008).

Não foram identificadas mórulas de *Ehrlichia* spp. neste estudo, não estando de acordo com os resultados reportados por Bjöersdorff et al. (1999); Tarello (2002) e Tarello (2005), que identificaram inclusões intracitoplasmáticas morfológicamente iguais às mórulas de *Ehrlichia*

spp. A ausência de resultados positivos neste trabalho pode prender-se com o facto de os animais analisados não estarem numa fase aguda da infeção, sendo esta a melhor fase para fazer a identificação da mórula através de microscopia ótica (as mórulas são mais facilmente observadas nas infeções granulocíticas, as quais têm tendência a ser agudas) (Cohn, 2003). A utilização da técnica de *buffy-coat* maximiza a hipótese de identificação da mórula, no entanto, esta técnica não foi empregue no presente estudo devido ao volume insuficiente das amostras.

Estudos efetuados por Baneth et al. (1998) e Kubo, Miyoshi e Yasuda (2006), à semelhança do presente estudo, não encontraram gametócitos de *Hepatozoon* nos esfregaços sanguíneos. Isto pode ser associado ao facto de que poucos gametócitos são encontrados na infeção por *Hepatozoon* em gatos domésticos (Klopper et al, 1973; Baneth et al, 1998).

Todos os exames por gota a fresco foram negativos não tendo sido visualizada qualquer microfilária. Este resultado está de acordo com o resultado obtido por Rosa (2009) e Almeida (2010) que também não visualizaram microfilárias no exame de gota a fresco. Estes resultados não estão de acordo com o estudo realizado por Kramer & Genchi (2002), onde foram detetadas microfilárias no exame de gota a fresco em 4% dos gatos que tinham um teste de anticorpo positivo nem com o estudo feito por Wongkamchai et al. (2014) no qual as microfilárias foram detetadas em 5,7% das amostras. Na península da Malásia, as microfilárias foram detetadas em 20,6% dos gatos, no entanto, a visualização destes parasitas em amostras de sangue periférico no Sudeste Asiático constitui um desafio de diagnóstico para o clínico uma vez que as microfilárias podem representar as formas imaturas de várias espécies de filarídeos (*B. malayai*, *B. pahangi*, *Dipetalonema reconditum* e *D. immitis*) (Irwin & Jefferies, 2004). Os resultados negativos obtidos eram esperados pois a microfilarémia nos felinos é transitória e de curta duração (Miller, 1998; Ware, 2003; Meireles et al., 2014), sendo encontrada em menos de 20% dos gatos infetados (Miller, 1998). Além disso, a natureza transitória ou ausência de microfilárias no gato pode ser devido à remoção das microfilárias nos pulmões por mecanismos imunitários (Nogami et al., 2000). Quando existente, a microfilarémia não excede a duração de dois meses e as concentrações de microfilárias são baixas no sangue (Miller, 1998; Nogami et al., 2000). Foi proposto por Miller (1998) o aumento do volume da amostra de sangue a observar (5 ml em vez de 1 ml) e a repetição deste teste de modo a aumentar a sensibilidade da prova. Não foi possível seguir estas recomendações neste estudo devido à dificuldade de recolha das amostras. A técnica de Knott não foi utilizada neste estudo pois não se trata de um trabalho exclusivo de dirofilariose felina no qual seria interessante a comparação de diferentes técnicas de diagnóstico, não se justificando a mesma no presente estudo. Além disso, a

realização deste teste é raramente vantajoso devido à curta duração da microfilarémia nos gatos (Lee & Atkins, 2010; Meireles et al., 2014).

4.2 – Detecção de anticorpos anti-*Babesia* spp. por IFI

A pesquisa de anticorpos contra *Babesia* spp. por IFI revelou uma seroprevalência de 5%. Valores de prevalência mais altos foram encontrados na África do Sul, onde a infecção é maioritariamente devido a *B. felis*, com valores de 39,3% obtidos através da técnica de IFI (Würth & Zahler-Rinder, 2004). Um estudo realizado por Jacobson et al. (2000), integrou a resposta a um questionário feito a médicos veterinários na região de África do Sul, no qual se perguntava se os clínicos já tinham visto algum caso de babesiose felina. Cinquenta e cinco por cento dos questionados responderam afirmativamente. Um estudo realizado por Trotz-Williams & Trees (2003) cujo objetivo era fornecer mapas da distribuição geográfica das principais infecções parasitárias transmitidas por vetores em cães e gatos na Europa, não obteve nenhum resultado quanto a infecção por *Babesia* spp. em gatos (apenas nove estudos de prevalência foram identificados para babesiose canina, mostrando claramente a necessidade de mais informação na distribuição e incidência desta doença). Apesar de haver casos reportados de babesiose felina em África, a infecção por *Babesia* spp. ainda é pouco reportada, o que pode indicar uma baixa prevalência da doença em todo o mundo (exceto em África) ou pode-se tratar de uma entidade subdiagnosticada que necessita de mais estudos epidemiológicos de prevalência para tentar perceber a sua real ocorrência (Irwin & Jefferies, 2004). Tabar et al. (2008) não obtiveram evidência molecular de infecção por *Babesia* spp. numa população de felinos, testados através de PCR, em Barcelona (Espanha). No norte de Itália foi identificado DNA de *B. microti* em 0,8% da população em estudo (Spada et al., 2014) e em Bangkok, Tailândia, pelo método de PCR foi determinada uma prevalência de 1,4% de *B. vogeli* numa população felina (Simking et al., 2010).

Os dois animais nos quais foi detetada a presença de anticorpos anti-*Babesia* spp. apresentavam co-infecção com *Ehrlichia* spp. Tentando relacionar positividade com quadro clínico, um dos casos não apresentava sinais clínicos (animal nº 36) e o outro apresentava sinais clínicos pouco específicos, tais como anorexia, prostração e dispneia (animal número 40) não sendo assim possível relacionar positividade com quadro clínico típico de babesiose felina. Não foi possível fazer um painel analítico completo destes casos (proteinograma, ionograma, bioquímicas entre outros) mas a literatura consultada refere que foram observadas várias combinações anormais de concentração de α , β e γ globulinas em animais positivos para *Babesia* spp., não sendo no entanto identificado qualquer padrão. A elevação de α -globulina pode ser indicação de resposta de fase-aguda à infecção por *Babesia* pois o aumento destas proteínas está relacionado com o aumento das proteínas de

fase-aguda em resposta a dano ou infecção tecidual. As concentrações elevadas de β e γ globulinas normalmente são indicativas de aumento da produção de imunoglobulinas (proteínas de fase-crônica) e pode ser descrito como resposta do sistema reticuloendotelial do paciente aos antígenos de *Babesia* (Boustani & Gelfand, 1996). Em ambos os animais foi registada trombocitopénia mas em nenhum dos casos foi observada anemia, a qual é muito comum neste tipo de infeções. Em termos de infeções concomitantes é de salientar a importância da micoplasmose felina uma vez que os seus sinais clínicos são muito semelhantes à babesiose felina e pode ser difícil de reconhecer num esfregaço sanguíneo. Outras infeções concomitantes reportadas incluem o vírus da imunodeficiência felina (FIV) e o vírus da leucemia felina (FeLV) (Baneth et al., 2004). Devido a razões económicas, os animais positivos não foram testados para *Mycoplasma* spp., FIV e FeLV. Posteriormente, a amostra referente ao gato número 40 foi testada utilizando o *kit* Babesia ELISA Dog, do fabricante AFOSA GmbH, originando resultados abaixo de zero (tanto com o conjugado anti-cão como com o conjugado anti-gato), tratando-se de resultados definitivamente negativos. Juntando o quadro clínico de sinais clínicos pouco típicos de babesiose, é provável que os sinais clínicos apresentados pelo gato nº 40 não sejam consequência da infeção por *Babesia* spp.

Os resultados positivos na técnica de IFI devem ser interpretados com precaução uma vez que estes testes não detetam organismos mas sim os anticorpos reativos, além de que pode ser difícil a interpretação de um título positivo em áreas endémicas (Solano-Gallego & Baneth, 2011) pois um animal pode permanecer seropositivo após exposição e eliminação de organismo; durante a fase subclínica da infeção ou mesmo após um tratamento bem sucedido da infeção (Cohn, 2003). Por outro lado, pode haver resultados negativos em infeções agudas devido ao atraso no desenvolvimento da resposta imunitária, havendo já infeção mas não anticorpos circulantes (Neer et al., 2002). A impossibilidade de amplificação de DNA por PCR nos gatos seropositivos pode ser relacionada com a possibilidade de reações cruzadas entre agentes etiológicos similares que é provável que aconteça na técnica de IFI (Vita, Santorini, Aguzzi, Petrotta & Luciani, 2005; Tarello, 2005; Ayllón et al., 2009). Os ensaios serológicos têm um papel importante nos estudos de prevalências mas os ensaios com PCR conseguem detetar infeção ativa e caracterizar o agente infeccioso mais especificamente (Shaw et al., 2005; Ebani & Bertelloni, 2014).

Fazer o diagnóstico de doenças infecciosas em gatos pode ser desafiante uma vez que algumas infeções podem ocorrer em gatos saudáveis e quando há presença de sinais clínicos, estes são, na maioria dos casos, inespecíficos. A maior parte dos agentes estão muitas vezes presentes em números muito baixos no sangue periférico, são difíceis para cultivar *in vitro*, desencadeiam respostas específicas de anticorpos inconsistentes e existe reação sorológica cruzada entre alguns organismos (Vilhena et al., 2013).

4.3 – Detecção de anticorpos anti-*Leishmania spp.* por IFI

A seroprevalência obtida para infecção por *Leishmania spp.* em gatos através da técnica de IFI neste estudo foi de 0% (0/40 gatos). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Rosa (2009), que testou 70 gatos na área metropolitana de Lisboa e nenhum originou um resultado positivo e com Duarte et al. (2010) que testou 180 gatos e obteve 1 resultado positivo (0,6% de seroprevalência). Na mesma zona, Garrido (2012) obteve uma seroprevalência de 12,5% (4/20 gatos domésticos e 1/20 gatos errantes) que pode ser justificada pelo facto de que apesar da maioria dos gatos positivos da amostra serem gatos domésticos, tinham acesso ao exterior e a média de idade era 8 anos, o que favorece uma maior exposição aos flebótomos infetados. Em contrapartida, a maioria dos gatos incluídos no presente estudo eram gatos sem acesso ao exterior e a maioria jovens (apenas cerca de 30% tinha idade igual ou superior a 8 anos). Em Itália, Vita et al., (2005) obtiveram uma seroprevalência de 16,3%. Todos os estudos atrás mencionados utilizaram a técnica de IFI com um limiar de positividade de 1:40.

Utilizando a técnica de IFI mas diferentes limiares de positividade, foram obtidos os seguintes resultados: para limiar de positividade de 1:64, Maia et al. (2010) obteve 1,3% (1/76 gatos) de seroprevalência e na Albânia, os valores foram de 0,7% (Silaghi et al., 2014); para limiar de positividade de 1:80, Faria (2008), testou 75 gatos na zona de Vila Franca de Xira, obtendo 0% de seroprevalência; Vaz et al. (2005) obtiveram uma seroprevalência de 1,03% (1/97 gatos) e Gomes (2015) apurou 0% de seroprevalência na Área Metropolitana de Lisboa; por fim, para limiar de positividade de 1:100, Ayllón et al. (2008b) e Miró et al. (2014) obtiveram valores de seroprevalência de 4,29% (3/233 gatos) e 3,2% (11/346) respetivamente, em Madrid. Valores de seroprevalência baixos podem ser explicados pela falta de registos, por uma resistência natural do gato a esta infecção (Vita et al., 2005; Solano-Gallego et al., 2007) ou como consequência da resposta imunitária predominantemente celular que pode mesmo originar seronegatividade (Marcos et al., 2009; Maia et al., 2010). A presença de gatos sem sinais clínicos com uma resposta de anticorpo anti-*Leishmania* baixa pode levar a uma subestimação do número real de animais afetados (Maia et al., 2008).

Através de pesquisa de anticorpos por teste de aglutinação direta, Maia et al. (2015) obtiveram 3,7% de prevalência para a região sul de Portugal e 2,8% para a região Norte (Cardoso et al., 2010). Ramos (2012) obteve 4,2% de prevalência usando esta técnica na região de Olhão, Algarve e Nemati et al. (2015) obtiveram 6% de prevalência em gatos provenientes de Ahar, Azerbaijão e Irão.

Uma das mais importantes técnicas serológicas de diagnóstico é a IFI, que avalia a resposta imunitária humoral do hospedeiro à infecção por *Leishmania*. O uso das formas promastigotas como antígenos proporciona especificidade ao método pois estas são as formas infecciosas para o gato induzindo fagocitose pelos macrófagos pela união específica das suas membranas moleculares (Tomás & Romão, 2008). No entanto, a IFI tem sensibilidade diminuída no diagnóstico de leishmaniose felina uma vez que o título de anticorpos anti-*Leishmania* permanecem baixos. Assim, apesar da IFI ser considerada a técnica de referência no diagnóstico de leishmaniose canina, o seu uso no diagnóstico de leishmaniose felina não é consensual (Longoni et al., 2012 citado por Soares et al., 2014).

A importância da leishmaniose na Europa está a crescer, parcialmente devido às alterações climáticas que têm um impacto direto na abundância, distribuição geográfica e capacidade vetorial dos flebótomos vetores mas também devido ao aumento da mobilidade humana e animal que vai promover a circulação e troca de vetores e agentes infecciosos (Pennisi, 2014). Os flebótomos são mais importantes, do ponto de vista médico e veterinário, no Sul da Europa, África e Sudoeste Asiático – onde os vetores são espécies *Phlebotomus* – assim como na América Latina, onde o vetor é do género *Lutzomyia* (Ready, 2014). O aquecimento climático pode alterar associações ecológicas entre os vetores e os seus hospedeiros mamíferos, ou seja, o calor pode fazer com que mais pessoas, cães e gatos durmam fora de casa, aumentando o contacto com o flebótomo (Ready, 2014).

Um estudo realizado por Maroli et al. (2007), demonstrou pela primeira vez que um gato naturalmente infetado, com um padrão crónico de leishmaniose, pode ser infeccioso para um vetor competente de *L. infantum*. Foi recentemente reportado um caso clínico (Migliazzo et al., 2015) no qual a carga parasitária registada foi bastante mais alta do que o registado em estudos prévios (Pennisi et al., 2012) e adicionando o facto de que há evidência de aumento global de infecção de gatos com *Leishmania* (Baneth, Koutinas, Solano-Gallego, Bordeau & Ferrer, 2008), coloca-se a hipótese de os gatos poderem ser hospedeiros reservatórios, em vez de hospedeiros acidentais.

Em estudos efetuados por Pennisi (2002), Cardoso et al. (2010), Garrido (2012), Maia et al. (2014a) e Maia et al. (2015), a seropositividade foi maior em animais com mais de 2 anos que pode ser explicado pela exposição cumulativa dos animais mais velhos ao parasita. No entanto, outros estudos não demonstraram esta tendência (Ayllón et al., 2008b; Miró et al., 2014) reportando não haver associação estatística entre idade e infecção por leishmania. Em relação ao sexo, Garrido (2012), Ramos (2012), Maia et al. (2014a) e Maia et al. (2015) encontraram prevalências superiores nas fêmeas do que nos machos ao contrário de Cardoso et al. (2010) os quais encontraram maiores prevalências nos machos. Pennisi et al. (2013) e Miró et al. (2014) referem não haver preferência por nenhum dos géneros.

Inicialmente, a leishmaniose felina era associada à infecção pelos vírus da imunodeficiência felina (FIV) e da leucemia felina (FeLV), atuando os vírus como fatores predisponentes através da manutenção da imunossupressão (Hervás et al., 1999; Pennisi et al., 2002; Pennisi et al., 2004; Leiva et al., 2005; Gramiccia & Gradoni, 2005; Maroli et al., 2007; Costa et al., 2010; Ayllón et al., 2012), No entanto, a presença única destes vírus não é o suficiente para demonstrar estado de imunodeficiência (Poli et al., 2002) e o resultado de alguns estudos verificaram que não houve associação entre a presença de *Leishmania* e infecção por FIV ou FeLV (Vita et al., 2005; Maroli et al., 2007; Martín-Sánchez et al., 2007; Solano-Gallego et al., 2007; Ayllón et al., 2008b; Marcos et al., 2009; Maia et al., 2010; Ayllón et al., 2012; Garrido, 2012; Maia et al., 2014a; Miró et al., 2014).

Em estudos efetuado por Cardoso et al. (2010) e Maia et al. (2015) foram encontradas prevalências mais altas em animais que viviam no exterior que podem ser justificadas pelo aumento do tempo de contacto com o vetor. Mesmo quando os donos administram regularmente ectoparasiticidas aos gatos não se consegue fazer uma prevenção eficaz da infecção pois os piretroides (que são os mais eficazes na repelência dos flebótomos) são tóxicos para gatos (Maia et al., 2014a).

O sangue não é um material sensível para a pesquisa de DNA do parasita devido à baixa parasitémia associada à Leishmaniose felina, sendo que as formas amastigotas raramente são observadas na circulação sanguínea (Maia et al., 2010; Maia & Campino, 2011; Ayllón et al., 2012; Vilhena et al., 2013), havendo outros órgãos ou tecidos (lesões cutâneas, baço, linfonodos ou medula óssea) nos quais é mais provável a observação direta dos parasitas *Leishmania* spp. (Costa et al., 2010). Recentemente, um estudo realizado por Gomes (2015) demonstrou que material colhido através de zaragatoa conjuntival permitiu detetar um maior número de gatos com presença de DNA de *L. infantum* comparativamente ao sangue, salientando o facto da recolha ser pouco invasiva, constituindo uma boa alternativa para estudos futuros.

Baseada em estudos prévios, a seroprevalência em gatos é menor do que aquela encontrada em cães da mesma área (Poli et al., 2002; Maia et al., 2010). Uma explicação para a diferença de seroprevalências entre cães e gatos seria a resistência particular dos gatos às doenças de transmissão vetorial, preferência de hospedeiro pelos vetores particulares (Tabar et al., 2008), ausência de reagentes e valores de *cut-off* específicos para gatos e o tempo da recolha da amostra (muitos gatos seroconvertem algum tempo depois da recolha da primeira amostra) (Maroli et al., 2007; Pennisi, 2014). Num estudo realizado por Simões-Mattos et al. (2005) verificou-se que a seroconversão dos títulos de anticorpos ocorreu quando as lesões já estavam na fase de resolução e que o pico de produção de anticorpos registou-se vinte semanas pós-infecção. No entanto, alguns autores (Maroli et al.,

2007; Soares et al., 2014) referem que a prevalência da leishmaniose felina está a aumentar na Europa do Sul e a seroprevalência da infeção nos gatos, embora baixa, está a aproximar-se da seroprevalência reportada em cães em áreas endémicas.

A resistência natural dos gatos à leishmaniose é largamente sugerida pela cura espontânea das lesões que são muitas vezes caracterizadas por alterações patológicas mínimas (Navarro et al., 2010). Vários sinais clínicos associados a leishmaniose felina foram reportados ao longo dos anos que incluem lesões cutâneas ulcerosas (Ozon et al., 1998; Trainor et al., 2010; Navarro et al., 2010; Gramiccia, 2011); alopecia (Hervás et al., 1998; Pennisi et al., 2004; Trainor et al., 2010; Navarro et al., 2010), depressão, anorexia, perda de peso (Pennisi et al., 2004); palidez das membranas mucosas, desidratação, linfadenomegalia (Hervás et al., 1998; Pennisi et al., 2004; Maroli et al., 2007), icterícia, vômitos (Hervás et al., 1998; Goodfellow & Shaw, 2005) e lesões oculares (Pennisi et al., 2004; Leiva et al., 2005; Navarro et al., 2010). O pequeno número de casos reportados torna difícil a associação entre a infeção e os sinais clínicos (Goodfellow & Shaw, 2005).

O uso de ectoparasiticidas em cães tem sido eficaz na redução da Leishmaniose canina e da Leishmaniose humana. De momento não existem produtos testados para gatos eficazes na prevenção do contacto com o inseto vetor, no entanto, recentemente surgiu a coleira Seresto®, havendo estudos que comprovam a que esta confere uma proteção de longa duração contra infeção por *L. infantum* em cães (Otranto et al., 2013). Serão necessários estudos para avaliar a sua eficácia repelente contra mosquitos e flebótomos em gatos.

4.4 – Detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia* spp. por IFI

A seroprevalência obtida no presente estudo para *Ehrlichia* spp. foi de 20% pela técnica de IFI com diluição de 1:40, resultado igual ao obtido num estudo efetuado por Stubbs et al., (1998) nos Estados Unidos e ligeiramente superior aos valores obtidos nos estudos realizados em Espanha, os quais detetaram 9,9% (Ayllon et al., 2012); 10,6% (Aguirre, Tesouro, Amusatogui, Rodríguez-Franco & Sainz, 2004); 11% (Ayllon et al., 2008a); 11,3% (Solano-Gallego, Hegarty, Espada, Llull & Breitschwerdt, 2006) e 17,9% (Ortuño, Gauss, Garcia & Gutierrez, 2005) de seroprevalência para *Ehrlichia* spp. Ayllón et al. (2009) deparou-se com uma prevalência mais reduzida de 3,8% para a zona central de Espanha, possivelmente devido à ausência de sero reatividade a *Ehrlichia* spp. em gatos sem sinais clínicos (nenhum dos gatos deste grupo revelou resultados positivos). Estes resultados obtidos em Espanha foram o resultado de estudos baseados na técnica de IFI para obter seroprevalências, com um limiar de positividade de 1:40, técnica semelhante ao presente trabalho. Em nenhum destes estudos foi possível a amplificação do DNA do agente através da técnica de PCR. Em Itália foram obtidas seroprevalências de 6,4% (Ebani & Bertelloni,

2014) e 12,5% (Vita et al.,2005). A seroprevalência mais alta foi encontrada no Brasil com valores de 45,1% (Braga et al., 2013) e de 41,5% (Braga et al., 2014) com técnica de diagnóstico e limiar de positividade semelhantes às do presente estudo.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a prevalência de infecção foi maior em fêmeas (75%) do que em machos (25%). Os estudos realizados por Ebani & Bertelloni (2014) e Braga et al. (2014) não obtiveram resultados semelhantes, não havendo predominância de nenhum gênero, minimizando o efeito do comportamento social na epidemiologia da infecção, no qual os machos têm mais tendência a passar mais horas no exterior devido ao comportamento territorial, ficando assim mais expostos aos vetores.

No presente estudo metade dos animais (4/8) seropositivos pertenciam à faixa etária com menos de 4 anos, 25% estava na faixa etária entre os 4 e os 7 anos (2/4) e 25% tinha mais de 9 anos (2/4). Esta tendência não se verificou nos estudos efetuados em Madrid (Ayllón et al., 2012) e Itália (Ebani & Bertelloni, 2014), que demonstraram que havia uma maior seroprevalência em gatos mais velhos que pode ser devido ao aumento da oportunidade de exposição ao vetor e ao parasita, além disso, a seropositividade em gatos adultos pode ser relacionada com formas crônicas da doença que se podem desenvolver meses a anos após a infecção inicial (Ebani & Bertelloni, 2014). A maior frequência de infecção em animais mais jovens obtida no presente trabalho pode indicar alguma imaturidade do sistema imunitário ou presença de infecções cruzadas.

O presente estudo, revelou associação estatística entre positividade à infecção e o habitat, sendo que o habitat gatos de interior foi o tipo de habitat com maior percentagem de gatos positivos, estando de acordo com o estudo efetuado em Madrid por Ayllón et al. (2012) que detetou maior seroprevalência de *Ehrlichia* spp. no grupo de gatos de interior, o que sugere que uma grande parte da população de gatos domésticos deste estudo não recebeu aplicações rotineiras de acaricidas. Ebani & Bertelloni (2014) e Ortuño et al. (2005) verificaram não haver diferença na seroprevalência de animais de interior ou exterior. Braga et al. (2014) obtiveram um resultado diferente, ou seja, animais com maior exposição ao exterior apresentaram maior frequência de anticorpos anti-*Ehrlichia* spp., o que implica que estes animais estiveram mais expostos ao agente, possivelmente pelo contacto direto com a carraça ou cães infetados. O contacto com outros animais influenciou os resultados do presente estudo de um modo distinto do estudo efetuado por Braga et al. (2014) mostrando associação estatística entre infecção e a ausência de contacto com outros animais. Este resultado pode ser justificado pelo facto de os proprietários que tenham vários animais (nomeadamente cães, que têm acesso ao exterior várias vezes ao dia) estarem mais recetivos a fazer desparasitações regulares aos seus animais de estimação, em oposição

dos proprietários que só possuem um gato, que por norma não tem acesso ao exterior, e não necessita de desparasitações regulares, na opinião dos mesmos.

Foi verificada associação estatística entre positividade para infeção e alteração no hemograma, sendo que todos os animais seropositivos apresentavam trombocitopenia o que está de acordo com a maioria da bibliografia consultada (Bjöersdorff et al., 1999; Stubbs et al., 1998; Shaw et al., 2001; Legendre, 2002; Goodfellow & Shaw, 2005; Tarello, 2005; Ebani et al., 2014). Outros autores referem também a presença de hiperglobulinemia, anemia (Breitschwerdt et al., 2002; Legendre, 2002; Aguirre et al., 2004; Ishak, Radecki & Lappin, 2007) e aumento das transaminases hepáticas (Stubbs et al., 1998).

O contacto com os parasitas transmitidos por vetores varia com a estação do ano e depende da atividade e abundancia dos vetores, ou seja, as seropositividades têm tendência a ser maiores durante o Outono (Solano-Gallego et al., 2006; Ayllón et al., 2012). No presente estudo não foi possível avaliar esta tendência pois as amostras foram recolhidas num curto período (de Maio a Dezembro de 2014).

Nos Estados Unidos da América, em três estudos efetuados (Lappin et al., 2006; Hackett et al., 2006; Ishak et al., 2007), nenhuma das amostras de sangue que foram avaliadas através de ensaios com PCR foram positivas. A impossibilidade de amplificação do DNA de *Ehrlichia* a partir de amostras de tecido referida em vários estudos, pode ter várias interpretações: não haver presença do agente nos tecidos; limitações técnicas associadas com as pequenas quantidades do microrganismo nas amostras sanguíneas dos gatos e a eliminação imunológica após infeção (Aguirre et al., 2004; Betteney et al., 2007; Little, 2010; Ayllón et al., 2012; Ebani & Bertelloni, 2014). Tradicionalmente a IFI é o teste serológico de escolha para o diagnóstico da infeção por *Ehrlichia* (Ortuño et al., 2005; Little, 2010; Ebani & Bertelloni, 2014). Espécies pertencentes ao mesmo género possuem uma maior capacidade de reação cruzada (Cohn, 2003). As reações cruzadas entre várias *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp são muito comuns (McQuiston et al., 2003; Ebani & Bertelloni, 2014). O título de anticorpos detetado na maior parte dos estudos realizados em gatos (Aguirre et al., 2004; Ayllón et al., 2008a; Ayllón et al., 2009; Braga et al., 2012; Ebani & Bertelloni, 2014; Braga et al., 2014) foi baixo, o que pode ser explicado por uma resposta humoral não relevante contra *Ehrlichia* spp. ou reações cruzadas com outras espécies de *Ehrlichia* (Ortuño et al., 2005). Pode-se obter falsos negativos com a IFI durante a fase inicial da infeção enquanto que os falsos positivos podem ser relacionados com reações cruzadas com outros agentes (Ebani & Bertelloni, 2014). A obtenção de um resultado positivo em ambos os testes (IFI e PCR) em animais sem sinais clínicos pode significar que eles estão na fase aguda ou assintomática da infeção, correspondendo ao período de seroconversão. Outra hipótese seria que estes animais estariam a atravessar um período de recorrência

como resultado de imunossupressão (Braga et al., 2014). Tal como nos cães, a infeção por *E. canis* pode originar infeções subclínicas arrastadas e apesar dos gatos permanecerem aparentemente saudáveis por vários meses ou anos, podem servir como reservatórios para outros hospedeiros incluindo humanos (Maia et al., 2014a).

Em termos de casos clínicos observados no presente trabalho, o animal nº 27 apresentava como único sinal uveíte no olho esquerdo, provavelmente devido à erliquiose. O animal respondeu positivamente ao tratamento instituído (5 mg/kg BID durante 30 dias) e o fato da análise por PCR ser negativa após o tratamento pode significar que o agente foi eliminado com eficácia. Sinais de corrimento ocular, uveíte e poliartrite são muito comuns em gatos com serologia positiva para *Ehrlichia* spp. (Shaw et al., 2001). O animal nº 37 foi o único que não mostrou uma evolução positiva do quadro clínico e morreu passados 3 dias. Este desfecho não está de acordo com outros casos reportados (Bjöersdorff et al., 1999; Tarello, 2002; Breitschwerdt et al., 2002) de felinos infetados com *Ehrlichia* spp., os quais tiveram um resultado positivo ao tratamento com doxiciclina. Este animal apresentou história de doença anterior, ou seja, infeção por *Mycoplasma* spp. cerca de 6 meses antes. Na altura o animal foi tratado com doxiciclina (5 mg/kg BID durante 30 dias) tendo tido sucesso no tratamento, no sentido da resolução dos sinais clínicos. Neste caso podemos colocar a hipótese de a infeção por *Mycoplasma* spp. não ter ficado completamente resolvida e devido ao estado de imunossupressão que se manifestou devido à infeção por *Ehrlichia* spp., ter havido recorrência dos sinais clínicos mais agravados que culminaram na morte do animal. O animal nº 39 apresentava uma fístula infra-orbitária purulenta associada a anorexia, perda de peso, febre e mucosas pálidas, sinais clínicos que podem ser relacionados com a própria fístula. Este animal não fez tratamento com doxiciclina devido à impossibilidade de administração oral de qualquer medicação (agressividade marcada) optando-se pela administração de cevofecina (Convenia®) subcutânea. O animal foi reavaliado cerca de duas semanas depois com melhorias muito significativas. Neste caso, os sinais clínicos apresentados podem ser justificados com a infeção infra-orbitária, não havendo possivelmente relação entre a positividade para *Ehrlichia* e o quadro clínico. Esta positividade pode ser devida a uma infeção antiga que nunca provocou sintomatologia.

Os sinais clínicos mais frequentemente observados foram a anorexia, a prostração e a perda de peso, sinais também relatados por outros autores (Bjöersdorff et al., 1999; Shaw et al., 2001; Breitschwerdt et al., 2002; Tarello, 2005; Goodfellow & Shaw, 2005; Ebani & Bertelloni, 2014). Além destes sinais clínicos a literatura consultada refere sinais tais como poliartrite, linfadenopatia, febre (Stubbs et al., 1998; Bjöersdorff et al., 1999; Legendre, 2002; Breitschwerdt et al., 2002; Aguirre et al., 2004; Ebani & Bertelloni, 2014), desidratação (Bjöersdorff et al., 1999), vômitos e diarreias (Stubbs et al., 1998; Aguirre et al., 2004).

No presente trabalho foram também avaliados vários fatores considerados de risco para o aparecimento da infecção, tais como contacto com pessoas e animais doentes no agregado familiar, presença de doenças concomitantes, doenças anteriores, hábitos de saída para férias ou gatis e realização de profilaxia para parasitas internos, externos e vacinação. Após análise estatística, nenhum destes fatores apresentou valores significativos ($p > 0,05$) não se podendo aferir nenhuma associação estatística.

A erliquiose felina tem vindo a ter um aumento de reconhecimento mundial (Neer et al, 2002; Stich et al., 2008; Ayllón et al., 2009). Não se sabe se a baixa prevalência em gatos de infecção/doença em áreas endémicas é devido ao subdiagnóstico; ao facto de os gatos terem um elevado grau de resistência natural ou devido à rápida remoção das carraças pelos felinos, não havendo tempo necessário para a transmissão dos agentes infecciosos (Breitschwerdt et al., 2002; Vita et al., 2005; Lappin et al., 2006; Braga et al., 2013; Ebani & Bertelloni, 2014). O aumento dos relatos de casos de infeções provocadas por estes agentes em felinos reforça a necessidade de mais estudos para definir quais as espécies que infetam gatos e qual a participação destes na epidemiologia da erliquiose (Correa et al, 2011).

4.5 - Deteção de anticorpos anti-*Dirofilaria immitis* por ELISA

A seroprevalência encontrada no presente estudo para infecção por *Dirofilaria immitis* em gatos foi de 0% usando o método de ELISA para deteção de anticorpos. O mesmo resultado foi obtido com este tipo de técnica dirigida para pesquisa de anticorpos por Lickey, Kennedy, Patton & Ramsay (2005) na Guatemala. Estes resultados estão de acordo com outros estudos nos quais prevalências baixas de dirofilariose felina também foram obtidas: na Georgia, Estados Unidos da América a prevalência foi de 2,1% (4/184 gatos) (Carleton & Tolbert, 2004); em Itália foi de 4,7% (10/212 gatos) (Venco et al., 2011) e na zona das Caraíbas, em Grenada o valor foi de 8% (11/137 gatos) (Fernandez et al., 2010). Prevalências um pouco mais altas, de 11,6% (64/553 gatos) foram obtidas por Luria et al. (2004) no Norte da Flórida (EUA) e por Kramer & Genchi (2002) que reportaram 16% (157/1045 gatos) de prevalência na zona norte da Itália (país considerado endémico para dirofilariose). Outro estudo reportou valores de prevalência bastante altos, de 33% (180/547 gatos) numa área considerada hiperendémica (Ilhas Canárias) na qual o valor apurado de prevalência para a dirofilariose canina foi de 19%. Isto pode ser devido ao facto de os gatos não serem sujeitos a profilaxia para dirofilariose, ao contrário dos cães (Montoya-Alonso et al., 2011). Todos os estudos atrás mencionados usaram o método de ELISA para deteção de anticorpos, semelhante ao método de diagnóstico utilizado neste estudo.

Através da técnica serológica para deteção de antigénio, Rosa (2009), reportou 1,43% de prevalência para dirofilariose felina, tendo sido o primeiro registo de infeção por *D. immitis* em gatos na área metropolitana de Lisboa e Almeida (2010) reportou 1,2% de prevalência na mesma área geográfica onde se realizou o presente trabalho. Valores semelhantes foram obtidos por Liu et al. (2005) que apuraram 2,6% (4/155) de prevalência na República da Coreia do Sul. Genchi, Venco, Ferrari, Mortarino & Genchi (2008) reportaram valores mais altos de 18,5% de prevalência em Itália.

A dirofilariose tem vindo a receber interesse crescente nos últimos anos da parte da comunidade científica devido à sua rápida disseminação (Alho, Meireles, Belo & Madeira de Carvalho, 2014b), ao desenvolvimento das técnicas de diagnóstico, aumento da perceção da doença por parte dos veterinários e proprietários e disponibilidade de fármacos preventivos seguros e eficazes (Atkins & Litster, 2006). A análise dos estudos epidemiológicos efetuados até 2001 e entre 2002 e 2011 mostraram uma alteração no padrão de distribuição da doença, com disseminação em direção ao norte e este europeu, havendo vários fatores que contribuem para esta disseminação: (1) presença e movimento de reservatórios microfilarémicos; (2) aumento do número de animais que viajam para férias; (3) comércio de animais oriundos de zonas endémicas e (4) presença de mosquitos capazes de atuar como vetores assim como de condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento (Genchi et al., 2009; Morchón et al., 2012). Não há dados publicados em Portugal sobre as tendências de transmissão sazonal da dirofilariose (Alho et al., 2014a). Na área metropolitana de Lisboa, zona Sul (local onde decorreu o presente estudo), o principal transmissor da dirofilariose canina é o vetor *Culex pipiens*, seguido de *Culiseta longiareolata*, de acordo com Barreiro (1993, citado por Clemente, 1996). Estudos mais recentes (Mixão et al., 2014) identificaram mais espécies envolvidas na transmissão de dirofilariose no nosso país: *Aedes caspius*, *Aedes detritus* s.l., *Anopheles maculipennis* s.l. e *Culex theileri*. É provável que estes insetos sejam também os principais vetores de dirofilariose felina nesta região (Rosa, 2009).

O diagnóstico de dirofilariose em gatos é difícil pois os sinais clínicos são diferentes da sintomatologia canina, a incidência desta doença é baixa pelo que o índice de suspeita é menor, a carga parasitária é leve, por vezes estão parasitados só com parasitas machos, a eosinofilia é transitória ou ausente, as alterações eletrocardiográficas são mínimas e a maioria dos gatos não apresentam microfilarémia (Atkins & Litster, 2006; Hoch et al., 2008a; Little et al., 2014). A American Heartworm Society (2014) recomenda repetir os testes de diagnóstico a intervalos de seis a doze meses todos os gatos infetados para monitorização da infeção, mesmo que não haja sinais clínicos. Sobre isto há que ter em conta que a prevalência da dirofilariose aproxima-se ou excede aquela da infeção por FIV e FeLV em

populações comparáveis e é relativamente comum a testagem de gatos para FIV e FeLV (Lorentzen & Caola, 2008).

Baseado num estudo feito por Venco et al. (2011), a prevalência da dirofilariose felina pode ser estimada como cerca de 10% do valor conhecido para a prevalência da infeção em cães. Esta informação pode ser útil uma vez que o diagnóstico em gatos está associado com vários problemas que não permitem grandes estudos epidemiológicos nesta espécie. Nem sempre a alta prevalência de infeção no cão está relacionada com um alto risco de infeção no gato (Montoya-Alonso et al., 2011), como se demonstrou num estudo feito nos Estados Unidos, o qual revelou uma prevalência alta em gatos numa zona onde a dirofilariose canina não estava disseminada (Kramer & Genchi, 2002). É de maior importância saber a prevalência estimada de dirofilariose para os felinos em áreas endémicas pois esta doença pode estar associada com patologias respiratórias e cardíacas graves que podem culminar na morte súbita (Kramer & Genchi, 2002; Fernandez et al., 2010), no entanto, um estudo feito em Itália mostrou resultados que sugerem que mesmo quando a infeção é diagnosticada precocemente, é impossível prever o seu desfecho pois cada gato reage à infeção de um modo distinto (Genchi et al., 2008). A verdadeira prevalência da dirofilariose felina está provavelmente subestimada devido às limitações no diagnóstico ou por uma maior tendência dos gatos não apresentarem sinais clínicos ou mostrarem apenas sinais clínicos transitórios ou morrerem antes de se confirmar a infeção (Venco et al., 2008; Colado & Pérez, 2010). É agora aceite que a dirofilariose pode ocorrer em gatos em qualquer área na qual os cães estejam infetados mas a frequência e o nível de infeção são menos previsíveis do que nos cães (Venco et al., 2011).

Um estudo retrospectivo de 50 casos de gatos infetados naturalmente com *Dirofilaria immitis* realizado por Atkins et al. (2000) revelou não haver predisposição de infeção em machos; o facto de serem animais exclusivos de interior não evitava a infeção; os sinais clínicos mais comuns eram de natureza respiratória e em 28% dos gatos a dirofilariose foi um achado accidental. Liu et al. (2005); Genchi et al. (2008) e Fernandez et al. (2010), através de estudos baseados na pesquisa de antigénio, reportaram igualmente que machos e fêmeas estão em igual risco de exposição ao parasita e ausência de associação significativa entre idade e prevalência de infeção. Estes dois trabalhos não estão de acordo com os estudos de Kramer & Genchi (2002) que demonstraram diferença estatística significativa entre machos e fêmeas sendo a prevalência superior em machos. Kramer & Genchi (2002) observou também aumento do risco de infeção nos animais com acesso ao exterior, em comparação com aqueles exclusivamente de interior.

Os testes serológicos foram as provas de diagnóstico mais sensíveis detetando 86% dos casos, seguidas da radiografia torácica que detetou 76% de casos e da ecocardiografia que

detetou 42% de casos (Atkins et al., 2000). Foram registadas especificidades em testes de deteção de antigénios de 78% a 99% e sensibilidades de 68% a 86% em gatos com infeções adquiridas naturalmente (McCall et al., 2008). No entanto, estes testes são positivos em apenas 35% dos gatos sem sinais clínicos e em 70% dos gatos com sinais clínicos, sendo de uso limitado na determinação da distribuição do parasita numa população felina (Kramer & Genchi, 2002). A eliminação espontânea ou mediante o tratamento adulticida dos parasitas em gatos positivos ao teste de antigénio ocorre em cerca de 4 a 5 meses, depois dos quais o antigénio não será detetável, no entanto, a seroconversão dos títulos de anticorpos pode ser mais demorada (Colado & Pérez, 2010).

Os resultados de um estudo prévio indicaram que os testes de imunodiagnóstico baseados no método de ELISA podem discriminar entre indivíduos infetados e não infetados a partir dos 2 meses pós infeção (Prieto, Simón, Genchi, McCall & Venco, 1999). A alteração ao protocolo efetuada no presente estudo com os testes HESKA® Solo Step® FH no sentido de aumentar a duração da incubação da amostra foi também documentado num estudo realizado por Snyder et al. (2000) que permitiu a incubação da amostra durante 20 minutos em vez dos cinco recomendados pelo fabricante, tendo sido obtido deste modo um aumento na especificidade do teste. Todos os testes para deteção de anticorpos comercialmente disponíveis provaram ter uma grande sensibilidade e especificidade, principalmente em gatos com infeções induzidas experimentalmente. É importante ter em conta que infeções interrompidas naturalmente ou devido a quimioprofilaxia são capazes de estimular uma resposta de anticorpo persistente, mesmo na ausência de parasitas adultos (McCall et al., 2008; Venco et al., 2011; Simón et al., 2012). A presença de anticorpos confirma unicamente a exposição a adultos ou larvas (com desenvolvimento pelo menos até à fase L4) do parasita mas não confirma que estejam a provocar doença ou a presença de parasitas adultos (Ware, 2003; Colado & Pérez, 2010; Lee & Atkins, 2010). Por outro lado, um resultado negativo ao teste de anticorpos não exclui a infeção embora reduza bastante as probabilidades pois a maioria dos gatos com infeção por adultos originam um resultado positivo (Lee & Atkins, 2010).

A fiabilidade do diagnóstico é aumentada pelo uso concomitante dos testes de antigénio e anticorpo e esta combinação é agora recomendada pela American Heartworm Society (McCall et al., 2008; Lee & Atkins, 2010; AHS, 2014). Ter em atenção que alguns gatos que habitem zonas endémicas, sujeitos a grande pressão parasitária, podem desenvolver anticorpos anti-*D. immitis* apesar de fazerem profilaxia apropriada (Kramer & Genchi, 2002).

Levanta-se uma questão sobre a real necessidade de fazer profilaxia a gatos para a dirofilariose, uma vez que eles não são hospedeiros naturais e a incidência da infeção é relativamente baixa. Um estudo efetuado por Genchi et al. (2008) verificou que 79% dos

gatos sobreviveram à infecção e tiveram uma cura espontânea, ao contrário do estudo realizado por Atkins et al. (2000) (estudo retrospectivo de 50 casos de dirofilariose felina) no qual apenas 18% foram considerados como sobreviventes à infecção por *D. immitis*. As consequências da dirofilariose felina podem ser desastrosas (morte do animal) e sem soluções terapêuticas eficazes (Colado & Pérez, 2010). Além disso, o aquecimento global verificado nos últimos anos tende a prolongar a época de risco da infecção, uma vez que oferece maior número de dias com temperaturas favoráveis à sobrevivência e aumento da população de vetores. É de extrema importância ter este aspeto em consideração para a implementação da profilaxia da dirofilariose, uma vez que esta deve assegurar a proteção contra a infecção durante todo o período de transmissão (Genchi et al., 2009). Com base nestes factos, é atualmente aconselhada uma profilaxia anual, sem interrupções, principalmente em zonas endémicas (Tuzio et al., 2005; Atkins & Litster, 2006).

O efeito da infecção por *D. immitis* na sobrevivência foi comparado com o efeito de outras doenças cardiovasculares e concluiu-se que o prognóstico para gatos com dirofilariose é comparável com aquele para cardiomiopatia hipertrófica sendo esta considerada a doença mais benigna das doenças cardíacas felinas primárias (Atkins & Litster, 2006; Genchi et al., 2008).

5 – Considerações finais

Este estudo realizado numa população de gatos do concelho de Alcochete evidenciou a presença de dois dos agentes estudados nesta amostra, nomeadamente *Babesia* spp. e *Ehrlichia* spp. É necessário ter em atenção que a deteção de anticorpos apenas indica exposição algures no tempo ao agente e pode não estar relacionada com a sintomatologia ou presença de doença, principalmente em áreas endémicas de DTV.

Os valores de prevalência para *Babesia* spp. e *Ehrlichia* spp. em gatos apurados no presente trabalho, não são comparáveis com outros estudos efetuados em Portugal pois os métodos de deteção foram distintos (IFI para esta dissertação e PCR para a maioria dos estudos nacionais publicados até à data). O facto de se ter obtido resultados positivos numa amostra de pequena dimensão é importante, podendo significar que estes agentes estão na verdade subdiagnosticados. Seria interessante confirmar a presença de *Babesia* spp. e *Ehrlichia* spp. por técnicas moleculares e tentar fazer a identificação das suas espécies através da sequenciação de DNA.

A técnica de IFI não permitiu a deteção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. Contudo, vários estudos fazem referência à fraca resposta imunitária humoral dos gatos infetados, havendo assim vantagens em associar técnicas moleculares ao diagnóstico de leishmaniose felina.

Nenhum dos gatos apresentou anticorpos anti-*Dirofilaria immitis* pela técnica de ELISA. Embora esta seja a técnica de escolha para diagnóstico de dirofilariose felina, é importante referir que gatos infetados com *Dirofilaria immitis* nem sempre mantêm um nível de anticorpos detetável à medida que os parasitas se desenvolvem. A associação de testes de deteção de antigénio pode ajudar a chegar a um diagnóstico definitivo.

O papel do gato na epidemiologia das doenças aqui descritas é ainda pouco conhecido, sendo necessários mais estudos para que esse papel possa ser clarificado e assim desenvolver estratégias eficazes na sua prevenção.

O conhecimento da prevalência felina das infeções provocadas pelos parasitas abordados neste trabalho no nosso país é de extrema importância e interesse e esta pode ser conseguida através da utilização de testes de deteção de anticorpos.

Conclui-se então que os felinos do concelho de Alcochete estão em risco de ficar infetados com agentes patogénicos transmitidos por vetores, alguns dos quais com importância zoonótica. É importante a consciencialização e sensibilização dos colegas veterinários para estas doenças e a implementação de medidas profiláticas no sentido de evitar a interação vetor-gato são fundamentais de modo a prevenir a infeção e evitar a disseminação destes agentes patogénicos entre a população felina e para outros hospedeiros vertebrados, incluindo a espécie humana. As ações de profilaxia deveriam incluir decisões políticas de modo a implementar o controlo de populações de animais de rua e aumentar os programas de controlo de vetores nos canis e gatis municipais. É igualmente importante a informar os proprietários e comunidade em geral da ocorrência destas infeções, o que pode ser feito através de panfletos informativos da doença, melhor esclarecimento dos proprietários por parte dos veterinários, reuniões técnico científicas entre outros.

BIBLIOGRAFIA

- Afonso, M. & Alves-Pires, C. (2008). Capítulo II: Bioecologia dos vectores. In G. Santos-Gomes & I. Pereira da Fonseca, *Leishmaniose Canina*. (pp. 27-40). Lisboa: Chaves Ferreira Publicações, S.A.
- Aguirre, E., Tesouro, M. A., Amusatogui, I., Rodríguez-Franco, F. & Sainz, A. (2004). Assessment of feline ehrlichiosis in central Spain using serology and polymerase chain reaction technique. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1026, 103-105.
- Alho, A. M., Landum, M., Ferreira, C., Meireles, J., Gonçalves, L., Carvalho, L. M., & Belo, S. (2014a). Prevalence and seasonal variations of canine dirofilariosis in Portugal. *Veterinary Parasitology*, 206(1-2), 99-105.
- Alho, A. M., Meireles, J., Belo, S. & Madeira de Carvalho, L. (2014b). Dirofilariose e potenciais co-infeções. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 20(1/2), 107.
- Almeida, C. (2010). *Prevalência de dirofilariose felina na região do Sado*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.
- Amella, M. J. M. (2006). *Atlas de hemocitologia veterinária*. Espanha: Servet, Virbac. ISBN: 84-934736-2-6.
- American Heartworm Society. (2014). Prevention, diagnosis, and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) Infection in Cats.
- Atkins, C.E., DeFrancesco, T.C., Coats, J.R., Sidley, J.A., & Keene, B.W. (2000). Heartworm infection in cats: 50 cases (1985-1997). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 217(3), 355-358.
- Atkins, C. E. & Litster, A. L. (2006). Heartworm disease. In August, J.R., (Ed). *Consultations in feline internal medicine*. (5ª Ed) (pp. 323-330). Philadelphia, Elsevier.
- Atkins, C. E. (2007). Feline Heartworm Disease: What's new? In *Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association, Sidney, Australia*, pp. 145-148.
- Ayllón, T., Diniz, P.P.V.P., Sainz, A., Villaescusa, A., Breitschwerdt, E. B. (2008a). Molecular and serological prevalences of vector-borne diseases in cats from Madrid [abstract]. *Research Abstract Program of the 26th Annual ACVIM Forum San*

Antonio, TX, June 4- June 7, 2008. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(3), 784.

Ayllón, T., Tesouro, M.A., Amusatogui, I., Villaescusa, A., Rodriguez-Franco, F., and Sainz, Á. (2008b). Serologic and Molecular Evaluation of *Leishmania infantum* in Cats from Central Spain. *Annals of The New York Academy of Sciences*, 1149, 361-364.

Ayllón, T., Villaescusa, A., Tesouro, M. A. & Sainz, Á.(2009). Serology, PCR and culture of *Ehrlichia/Anaplasma* species in asymptomatic and symptomatic cats from central Spain. *Clinical Microbiology and Infection*, 15 (2), 4-5.

Ayllón, T., Diniz, P. P. V. P., Breitschwerdt, E. B., Villaescusa, A., Rodriguez-Franco, F. & Sainz, A. (2012). Vector-Borne diseases in client-owned and stray cats from Madrid, Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(2), 143-150

Ayoob, A.L., Prittie, J. & Hackner, S.G., (2010). Feline Babesiosis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 20(1), 90-97.

Baker, C. F., Tielemans, E., Pollmeier, M. G., McCall, J. W., McCall, S. D., Irwin, J., Chester, S. T., Carithers, D. S. & Rosentel, J.K. (2014). Efficacy of a single dose of a novel combination product containing eprinomectin to prevent heartworm infection in cats. *Veterinary Parasitology*, 202(1-2), 49-53.

Baneth, G., Aroch, I., Tal, N. & Harrus, S. (1998). *Hepatozoon* species infection in domestic cats: A Retrospective study. *Veterinary Parasitology*, 79(2), 123- 133.

Baneth, G. & Shkap, V. (2003). Monozoic cysts of *Hepatozoon canis*. *The Journal of Parasitology*, 89(2), 379-381

Baneth, G., Kenny, M.J., Tasker, S., Anug, Y., Shkap, V., Levy, A. & Shaw, S.E. (2004). Infection with a Proposed New Subspecies of *Babesia canis*, *Babesia canis* subsp. *presentii*, in Domestic Cats. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1), 99-105.

Baneth, G., Day, M., Roura, X. & Shaw, S. (2005). Leishmaniosis. In S. E. Shaw & M. J. Day, *Arthropod-Borne Infectious Diseases of the Dog and Cat*. London: Manson Publishing. ISBN: 1-84076-057-5.

Baneth, G., Koutinas, A. F., Solano-Gallego, L., Bordeau, P. & Ferrer, L. (2008). Canine Leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends on Parasitology*, 24(7), 324-330.

Baneth, G. (2011), Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. *Veterinary Parasitology*, 181(1), 3-11.

- Baneth, G., Bourdeau, P., Bourdoiseau, G., Bowman, D., Breitschwerdt, E., Capelli, G., Cardoso, L., Dantas-Torres, F., Day, M., Dedet, J. P., Dobler, G., Ferrer, L., Irwin, P., Kempf, V., Kohn, B., Lappin, M., Little, S., Maggi, R., Miró, G., Naucke, T., Oliva, G., Otranto, D., Penzhorn, B., Pfeffer, M., Roura, X., Sainz, A., Shaw, S., Shin, S., Solano-Gallego, L., Straubinger, R., Traub, R., Trees, A., Truyen, U., Démonceau, T., Fitzgerald, R., Gatti, D., Hostetler, J., Kilmer, B., Krieger, K., Mencke, N., Mendão, C., Mottier, L., Pachnicke, S., Rees, B., Siebert, S., Stanneck, D., Mingote, M. T., von Simson, C. & Weston, S. (2012). Vector-borne diseases – constant challenge for practicing veterinarians: recommendations from the CVBD World Forum. *Parasites & Vectors*, 5:55
- Baneth, G., Sheiner, A., Eyal, O., Hahn, S., Beaufils, J.P., Anug, Y. & Talmi-Frank, D. (2013). Redescription of *Hepatozoon felis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) based on phylogenetic analysis, tissue and blood form morphology, and possible transplacental transmission. *Parasites & Vectors*, 6(102).
- Barbiéri, C. L. (2006). Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite immunology*, 28(7), 329-337.
- Basso, M. A., Marques, C. S., Duarte, A., Pissarra, H., Carreira, L. M., Valério Bolas, A., Santos-Gomes, G., Tavares, L. & Pereira da Fonseca, I. (2013). The forgotten disease of cats: a case of feline leishmaniose [Abstract]. 5th World Leish Congress, 13th to 17th May, Porto de Galinhas, PE, Brazil. P772, pp. 836.
- Bautista, M. G., Vázquez, F. A. R. & Guerrero, J. (1999). Filariasis. In M. C. del Campillo & F. A. R. Vázquez. *Parasitología Veterinaria: Parasitosis Sistémicas*. (pp. 679-693). Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. ISBN: 84-486-0236-6.
- Belo, S., Afonso, A. & Gonçalves, L. (2014). Dirofilariose humana em Portugal: parasitose desconhecida ou negligenciada? *Acta Parasitológica Portuguesa*, 20(1-2), 103.
- Bettenay, S. V., Lappin, M. R. & Mueller, R. S. (2007). An Immunohistochemical and Polymerase Chain Reaction Evaluation of Feline Plasmacytic Pododermatitis. *Veterinary Pathology*, 44(1), 80-83.
- Beugnet, F. & Marié, J. L. (2009). Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Veterinary Parasitology*, 163(4), 298-305.
- Bjöersdorff, A., Svendenius, L., Owens, J.H. & Massung, R.F. (1999). Feline granulocytic ehrlichiosis – a report of a new clinical entity and characterisation of the infectious agent. *Journal of Small Animal Practice*, 40(1), 20-24.
- Bosman, A. M., Venter, E. H. & Penzhorn, B. L. (2007). Occurrence of *Babesia felis* and *Babesia leo* in various wild felid species and domestic cats in Southern Africa, based on reverse line blot analysis. *Veterinary Parasitology*, 144(1-2), 33-38.

- Bosman, A., Oosthuizen, M. C., Venter, E. H., Steyl, J. C. A., Gous, T. A. & Penzhorn, B.L. (2013). *Babesia lengau* associated with cerebral and haemolytic babesiosis in two domestic cats. *Parasites & vectors*, 6(128).
- Bortoli C. P., André M. R., Braga M do S. & Machado R. Z. (2011). Molecular characterization of *Hepatozoon* sp. in cats from São Luís Island, Maranhão, Northeastern Brazil. *Parasitology Research*, 109(4), 1189-1192. Acedido em Fev. 27, 2015 em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21607692>.
- Boustani, M. R. & Gelfand, A. (1996). Babesiosis. *Clinical Infectious Diseases*, 22(4), 611-615.
- Bowman, D. D. (2011). Introduction to the Alpha-proteobacteria: *Wolbachia* and *Bartonella*, *Rickettsia*, *Brucella*, *Ehrlichia* and *Anaplasma*. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26(4), 173-177.
- Braga, M. S. C. O., André, M. R., Freschi, C. R., Teixeira, M. C. A. & Machado, R. Z. (2012). Molecular and serological detection of *Ehrlichia* spp. in cats on São Luís Island, Maranhão, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21(1), 37-41.
- Braga, I. A., Santos, L. G. F., Melo, A. L. T., Jaune, F. W., Ziliani, T. F., Girardi, A. F. & Aguiar, D. M. (2013). Hematological values associated to the serological and molecular diagnostic in cats suspected of *Ehrlichia canis* infection. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 22(4), 470-474.
- Braga, I. A., Santos L. G. F., Ramos, D. G. S., Melo. L. T., Mestre., G. L. C. & Aguiar. D. M. (2014). Detection of *Ehrlichia canis* in domestic cats in the central-western region of Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2), 641-645.
- Breitschwerdt, E.B. (1995). The Rickettsiosis. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine: Infectious Diseases*, (4^a ed). (pp.376- 383). Philadelphia: Saunders. ISBN 0-7216-6796-1.
- Breitschwerdt, E. B., Abrams-Ogg, A. C. G., Lappin, R., Bienzle, D., Hancock, S. I., Cowan, S. M., Clooten, J. K., Hegarty, B. C. & Hawkins, E. C. (2002). Molecular evidence supporting *Ehrlichia canis*-like infection in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16(6), 642-649.
- Brianti, E. (2014). Prevention, monitoring and control of vector-borne diseases in the 21st century. In *Proceedings of the 11th Merial Symposium on Parasitosis & Arthropod-Borne Diseases*. Palermo, 21st- 24th October, pp. 64-69.
- Caeiros, A. P. S. (2012). *Detecção de Babesia spp. e de outros hemoparasitas em cães, por técnicas morfológicas, serológicas e moleculares, no distrito de Lisboa, Portugal*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.

- Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, J. A., Santos-Gomes, G., Alves-Pires, C., Cortes, S., Ramada, J., Cristovão, J. M., Afonso, M. E. & Dedet, J. P. (2006). Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Tropical Medicine & International Health*, 11(11), 1708-1714.
- Cardoso, L., Lopes, A. P., Sherry, K., Schallig, H. & Solano-Gallego, L. (2010). Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. *Veterinary Parasitology*, 174(1-2), 37-42.
- Cardoso, L., Mendão, C., & Carvalho, L. M. de. (2012). Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma spp.* and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal – a national serological study. *Parasites & Vectors*, 5:62.
- Carleton, R. E. & Tolbert, M. K. (2004). Prevalence of *Dirofilaria immitis* and gastrointestinal helminths in cats euthanized at animal control agencies in northwest Georgia. *Veterinary Parasitology*, 119(4), 319-326.
- Charpentier F. & Groulade, P. (1986). Un cas d'ehrlichiose probable chez le chat. *Bulletin de l'Academie Veterinaire de France*, 59, 287-290.
- Chatzis, M. K., Leontides, L., Athanasiou, L. V., Papadopoulos, E., Kasabalis, D., Mylonakis, M., Rallis, T., Koutinas, A. F., Andreadou, M., Ikonomopoulos, J. & Saridomichelakis, M. N. (2014). Evaluation of indirect immunofluorescence antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of infection by *Leishmania infantum* in clinically normal and sick cats. *Experimental Parasitology*, 147, 54-59.
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O. & Malandrin, L. (2009). *Babesia* and its hosts: Adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary Research*, 40(2), 37.
- Clemente, M. (1996). Prevalence of *Dirofilaria* in dogs in Madeira Island. Examination and identification of microfilaria. *Veterinaria Técnica*. Agosto 1996, pp. 34-37.
- Cohn, L. A. (2003). Ehrlichiosis and related infections. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 33(4), 963-884.
- Colado, M. L. P & Pérez, V. C. (2010). *Enfermedades infecciosas felinas*. Servet editorial. ISBN: 978-84-92569-38-0.
- Corrales, G. M. & Moreno, R. M. (2006). *Leishmaniosis canina: Manejo clínico Y situación actual en España* (pp. 9-23). Quimica Farmacêutica Bayer, S.A.

- Correa, E. S., Paludo, G. R., Scalon M. C., Machado, J. A., Lima, A. C. Q. & Pinto, A. T. B., Thiebaut, J. T. L. & Albernaz, A.P. (2011). Investigação molecular de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma platys* em felinos domésticos: altera es clínicas, hematológicas e bioquímicas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31(10), 899-909.
- Cortes, S., Vaz, Y., Neves, R., Maia, C., Cardoso, L. & Campino, L. (2012). Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Veterinary Parasitology*, 189 (1-2), 189-196.
- Costa-Durão, J. F., Rebelo, E., Peleteiro, M. C., Correia, J. J. & Simões, G. (1994). Primeiro caso de leishmaniose em gato doméstico (*Felis catus domesticus*) detectado em Portugal (Concelho de Sesimbra): nota preliminar. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 89(551), 140-144.
- Costa, T. A., Rossi, C. N., Laurenti, M. D., Gomes, D., Vides, J. P., Sobrinho, L. S.V. & Marcondes, M. (2010). Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endémica para leishmaniose visceral. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 47(3), 213-217.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Sara a, A. & Barba-Carretero, J.C. (2003a). Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in Southern Europe Part II. Phylogenetic analysis and evolution history. *Veterinary Parasitology*, 114(3), 173-194.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Sara a, A. & Barba-Carretero, J.C. (2003b). Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from Southern Europe: a molecular study. *Veterinary Microbiology*, 93(4), 307-317.
- Criado-Fornelio, A., Ruas, J. L., Casado, N., Farias, N. A., Soares, M. P., M ller, G., Brunt, J. G., Berne, M. E., Buling-Sara a, A. & Barba-Carretero, J. C. (2006). New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. *The Journal of Parasitology*, 92(1), 93-99.
- Criado-Fornelio, A., Buling, A., Cunha-Filho, N. A., Ruas, J. L., Farias, N. A. R., Rey-Valeiron, C., Pingret, J. L., Etievant, M. & Barba-Carretero, J. C. (2007). Development and evaluation of a quantitative PCR assay for detection of *Hepatozoon* sp. *Veterinary Parasitology*, 150(4), 352-356.
- Criado-Fornelio A., Buling A., Pingret J. L., Etievant M., Boucraut-Baralon C., Alongi A., Agnone A. & Torina A. (2009). Hemoprotozoa of domestic animals in France: prevalence and molecular characterization. *Veterinary Parasitology*, 159(1), 73-76.
- Day, M. J. (2011). One Health: the importance of companion animal vector-borne diseases. *Parasites & vectors*, 4: 49

- Desjeux, P. (2004). Leishmaniosis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 27(5), 305-318.
- Dillon, A. R., Tillson, D. M., Wooldridge, A., Cattley, R., Hatchcock, J., Brawner, W. R., Cole, R., Welles, B., Christopherson, P. W., Lee-Fowler, T., Bordelon, S., Barney, S., Sermershein, M., Garbarino, R., Wells, S. Z., Diffie, E. B. & Schachner, E.R. (2014). Effect of pre-cardiac and adult stages of *Dirofilaria immitis* in pulmonary disease of cats: CBC, bronchial lavage cytology, serology, radiographs, CT images, bronchial reactivity, and histopathology. *Veterinary Parasitology*, 206(1-2), 24-37.
- Duarte, A., Castro, I., Fonseca, I.M., Almeida, V., Carvalho, L.M., Meireles, J., 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(6), 441-444.
- Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., Rikihisa, Y. & Rurangirwa, F. R. (2001). Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(Pt6), 2145–2165.
- Dunn, K. F., Levy, J. K., Colby, K. N. & Michaud, R. I. (2011). Diagnostic, treatment, and prevention protocols for feline heartworm infection in animal sheltering agencies. *Veterinary Parasitology*, 176(4), 342-349.
- Ebani, V. V. & Bertelloni, F. (2014). Serological evidence of exposure to *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in Central Italian healthy domestic cats. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 5(6), 668-671.
- Esh, K. J. & Petersen, C. A. (2013). Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1), 58-85.
- Faria, T. C. P. (2008). *Estudo sero-epidemiológico da infecção por Leishmania infantum em cães e gatos do município de Vila Franca de Xira (Ribatejo, Portugal) utilizando o teste de imunofluorescência indirecta*. Dissertação de Mestrado. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa.
- Fernandez, C., Chikweto, A., Mofya, S., Lanum, L., Flynn, P., Burnett, J. P., Doherty, D. & Sharma, R. N. (2010). A serological study of *Dirofilaria immitis* in feral cats in Grenada, West Indies. *Journal of Helminthology*, 84(4), 390-393
- Fonseca, M. J. D. (2010). *Estudo da prevalência de anticorpos anti-Leishmania spp. numa população que coabita com canídeos com leishmaniose*. Dissertação de Mestrado em Doenças Infecciosas Emergentes. Lisboa. Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa

- García-Guash, L., Caro-Vadillo, A., Manubens-Grau, J., Carretón, E., Morchón, R., Simón, F., Kramer, L. H. & Montoya-Alonso, J. A. (2013). Is *Wolbachia* participating in the bronchial reactivity of cats with heartworm associated respiratory disease? *Veterinary Parasitology*, 196(1-2), 130-135.
- Garrido, J. M. C. B. G. (2012). *Contribuição para o estudo da prevalência da infeção por Leishmania infantum em gatos domésticos e errantes nos distritos de Lisboa e Viseu*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.
- Genchi, C., Venco, L., Ferrari, N., Mortarino, M. & Genchi, M. (2008). Feline heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection: A statistical elaboration of the duration of the infection and life expectancy in asymptomatic cats. *Veterinary Parasitology*, 158(3), 177-182.
- Genchi, C., Rinaldi, L., Mortarino, M., Genchi, M. & Cringoli, G. (2009). Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Veterinary Parasitology*, 163(4), 286-292.
- Gomes, P. I. S. (2015). *Deteção da infeção por Leishmania spp. em gatos da Área Metropolitana de Lisboa, através de técnicas de diagnóstico serológico (IFI e ELISA) e de uma técnica molecular (qPCR) aplicada a células conjuntivais e a sangue*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.
- Goodfellow, M. & Shaw, S (2005). Exotic diseases of dogs and cats at risk of importation to Ireland. *Irish Veterinary Journal*, 58(5), 271-277.
- Gramiccia, M. & Gradoni, L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, 35(11-12), 1169-1180.
- Gramiccia, M. (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*, 181(1), 23-30.
- Hackett, T. B., Jensen, W. A., Lehman, T. L., Hohenhaus, A. E., Crawford, P. C., Giger, U., & Lappin, M. R. (2006). Prevalence of DNA of *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', *Anaplasma phagocytophilum*, and species of *Bartonella*, *Neorickettsia*, and *Ehrlichia* in cats used as blood donors in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 229(5), 700-705.
- Harrus, S., Waner, T., Bjöersdorff, A. & Shaw, S. (2005). Ehrlichiosis and anaplasmosis. In S. E. Shaw, & M. J. Day, *Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat* (pp. 120-133). London: Manson Publishing Ltd. ISBN: 978-1-84076.
- Hartmann, K., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hosie, Margaret J., Lioret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Mösti, K.,

- Pennisi, M. G., Radford, A. D., Thiry, E., Truyen, U. & Horzinek, M. C. (2013). Babesiosis in Cats – ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15(7), 643-646.
- Hatam, G. R., Adnani, S. J., Asgari, Q., Fallah E., Motazedian, M. H., Sadjjadi S. M. & Sarkari, B. (2010). First report of natural infection in cats with *Leishmania infantum* in Iran. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 10(3), 313-316.
- Hayasaki, M., Okajima, J., Song, K. & Shiramizu, K. (2003). Diurnal variation in microfilaremia in a cat experimentally infected with larvae of *Dirofilaria immitis*. *Veterinary Parasitology*, 111(2-3), 267-271.
- Hervás, J., Lara, F. C. M., Sánchez-Isarria, M. A., Pellicer, S., Carrasco, L., Castillo, J. A. & Gómez-Villamandod, J.C. (1999). Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniosis in Spain. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 1(2), 101-105.
- Hoch, H. & Strickland, K. (2008a). Canine and feline dirofilariosis: life cycle, pathophysiology and diagnosis. *Compendium*, 30(3), 133-141.
- Hoch, H. & Strickland, K. (2008b). Canine and Feline Dirofilariosis: prophylaxis, treatment, and complications of treatment. *Compendium*, 30(3), 146-151.
- Homer, M. J., Aguilar-Delfin, I., Telford III, S.R., Krause P. J. & Persing, D.H. (2000). Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(3), 451-469.
- Holman, P. J. & Snowden, K. F. (2009). Canine Hepatozoonosis and Babesiosis, and Feline Cytauxzoonosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 39(6), 1035-1053.
- Infopédia. Porto Editora, 2003-2015.(consult. 2015-01-13 14:54:23). Disponível em: [http://www.infopedia.pt/\\$alcochete,2](http://www.infopedia.pt/$alcochete,2)
- Irwin, P. J. (2002). Companion animal parasitology: a clinical perspective. *International Journal for Parasitology*, 32(5), 581-593.
- Irwin, P. J. & Jefferies, R. (2004). Arthropod-transmitted diseases of companion animals in Southeast Asia. *Trends in Parasitology*, 20(1), 27-34.
- Irwin, P.J. (2009). Canine Babesiosis: From molecular taxonomy to control. *Parasites & Vectors*, 2(1): S4.
- Ishak, A. M., Radecki, S. & Lappin, M.R. (2007). Prevalence of *Mycoplasma haemofelis*, 'Candidate *Mycoplasma haemominutum*', *Bartonella* species, *Ehrlichia* species

- and *Anaplasma phagocytophilum* DNA in the blood of cats with anemia. *Journal of feline Medicine and Surgery*, 9(1), 1-7.
- Jacobson, L. S., Schoeman, T. & Lobetti, R. G. (2000). A survey of feline babesiosis in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*. 71(4), 222-228.
- Jittapalapong S, Rungphisutthipongse O., Maruyama S., Schaefer J.J. & Stich R.W. (2006). Detection of *Hepatozoon canis* in stray dogs and cats in Bangkok, Thailand. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1081, 479-488. Acedido em Feb. 27, 2015 em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17135555>
- Klopfer, U., Nobel, T.A. & Neumann, F. (1973). Hepatozoon-Like Parasite (Schizonts) in the Myocardium of the Domestic Cat. *Veterinary Pathology*, 10(3), 185-190.
- Kramer, L. & Genchi, C. (2002). Feline Heartworm infection: serological survey of asymptomatic cats living in northern Italy. *Veterinary Parasitology*, 104(1), 43-50.
- Kubo, M., Miyoshi, N. & Yasuda, N. (2006). Hepatozoonosis in Two Species of Japanese Wild Cat. *Parasitology*, 68(8), 833-837.
- Kumar, M., Shekhar, P., Haque, S. & Mahto, D. (2008). Feline Babesiosis. *Veterinary World*, 1(4), 120-121.
- Lappin, M. R. (2003). Infectious diseases: Polysystemic Protozoal Infections. In R.W. Nelson, C. G. Couto (Eds.), *Small Animal Internal Medicine* (3rd ed). (pp. 1296-1304). Mosby. ISBN: 0-323-01724-X
- Lappin, M. R. (2006). The anemic cat. In Jacquie Rand (Ed), *Problem-based Feline Medicine: Cat with abnormal laboratory data*. (pp. 526-551). Saunders, Elsevier. ISBN: 0-7020-2488-0.
- Lappin, M. R., Griffin, B., Brunt, D., Hawley, J., Brewer, M. M. & Jensen, W. A. (2006). Prevalence of *Bartonella* species, haemoplasma species, *Ehrlichia* species, *Anaplasma phagocytophilum* and *Neorickettsia risticii* DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 8(2), 85-90.
- Lee, C. Y., & Atkins, C.E. (2010). Understanding Feline Heartworm Infection: Disease, Diagnosis and Treatment. *Topics in Companion Animal Medicine*, 25(4), 224-230.
- Legendre, A. M. (2002). Editorial: Ehrlichiosis in Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16(6), 641.
- Leiva, M., Lloret, A., Peña, T. & Roura, X. (2005). Therapy of ocular and visceral leishmaniasis in a cat. *Veterinary Ophthalmology*, 8(1), 71-75.

- Lickey, A. L. A., Kennedy, M., Patton, S. & Ramsay, E. C. (2005). Serologic survey of domestic felids in the Petén region of Guatemala. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 36(1), 121-123.
- Litster, A. L., Atkins, C. & Atwell, R. (2008). Acute death in heartworm-infected cats: unraveling the puzzle. *Veterinary Parasitology*, 158(3), 196-203.
- Litster, A. L. & Atwell, R. B. (2008). Feline heartworm disease: a clinical review. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10(2), 137-144.
- Little, S. E. (2010). Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 40(6), 1121-1140.
- Little, S. E., Raymond, M. R., Thomas, J. E., Gruntmeir, J., Hosteler, J. A., Meinkoth, J. H. & Blagburn, B. L. (2014). Heat treatment prior to testing allows detection of antigen of *Dirofilaria immitis* in feline serum. *Parasites & Vectors*, 7:1.
- Liu, J., Song, K. H., Lee, S. E., Lee, J. Y., Hayasaki, M., You, M. J. & Kim, D. H. (2005). Serological and molecular survey of *Dirofilaria immitis* infection in stray cats in Gyunggi province, South Korea. *Veterinary Parasitology*, 130(1-2), 125-129.
- Lorentzen, L. & Caola, A. E. (2008). Incidence of positive heartworm antibody and antigen tests at IDEXX Laboratories: trends and potential impact on feline heartworm awareness and prevention. *Veterinary Parasitology*, 158(3), 183-190.
- Luria, B. J., Levy, J. K., Lappin, M. R., Breitschwerdt, E. B., Legendre, A. M., Hernandez, J. A., Gorman, S. P. & Lee, I. T. (2004). Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 6(5), 287-296.
- Madeira de Carvalho, L. M., Alho, A. M., Meireles, J., Belo, S. (2014). Perfil epidemiológico da dirofilariose animal em Portugal. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 20 (1/2), 103.
- Maia, C., & Campino, L. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 158(4), 274-287.
- Maia, C., Nunes, M., & Campino, L. (2008). Importance of Cats in Zoonotic Leishmaniasis in Portugal. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 8(4), 555-559.
- Maia, C., Ramada, J., Cristovão, J., Gonçalves, L. & Campino, L. (2009). Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *The Veterinary Journal*, 179(1), 142-144.

- Maia, C., Gomes, J., Cristóvão, J., Nunes, M., Martins, A., Rebêlo, E., & Campino, L. (2010). Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Veterinary Parasitology*, 174(3-4), 336-340.
- Maia, C., & Campino, L. (2011). Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends in Parasitology*, 27(8), 341-344.
- Maia, C., Ramos, C., Coimbra, M., Bastos, F., Martins, A., Pinto, P., Nunes, M., Vieira, M. L., Cardoso, L. & Campino, L. (2014a). Bacterial and protozoal agents of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from Southern Portugal. *Parasites & Vectors*, 7:115
- Maia C.; Ferreira A.; Nunes M.; Vieira M. L.; Campino L. & Cardoso L. (2014b). Molecular detection of bacterial and parasitic pathogens in hard ticks from Portugal. *Ticks and tick-borne diseases*, 5(4), 409-414. Acedido em Fev. 28, 2015 em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24745731>.
- Maia, C., Ramos, C., Coimbra, M., Cardoso, L. & Campino, L. (2015). Prevalence of *Dirofilaria immitis* antigen and antibodies do *Leishmania infantum* in cats from southern Portugal. *Parasitology International*, 64(2), 154-156.
- Marcos, R., Santos, M., Malhão, F., Pereira, R., Fernandes, A.C., Montenegro, L., & Roccabianca, P. (2009). Pancytopenia in a cat with visceral leishmaniasis. *Veterinary Clinical Pathology*, 38(2), 201-205.
- Maroli, M., Pennisi, M. G., Muccio, T. D., Khoury, C., Gradoni, L. & Gramiccia, M. (2007). Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*, 145(3-4), 357-360.
- Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Munoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O. & Morillas-Márquez, F. (2007). Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. *Veterinary Parasitology*, 145, 267–273.
- Martins, T. S. O (2011). *Detecção Ehrlichia spp./Anaplasma spp., Rickettsia spp. Mycoplasma haemofelis e Leishmania infantum em felinos errantes e sua relação com a presença de retrovírus e com a sintomatologia manifestada*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.
- Mathew, J. S., Van Den Bussche, R. A., Ewing, S. A., Malayer, J. R., Latha, B. R. & Panciera, R. J. (2000). Phylogenetic relationships of *Hepatoozon* (Apicomplexa: adeleorina) based on molecular, morphologic and life-cycle characters. *The Journal of Parasitology*, 86(2), 366-372.
- McCall, J.W., Genchi, C., Kramer, L.H., Guerrero, J. & Venco, L. (2008). Heartworm disease in Animals and Humans. *Advances in Parasitology*, 66, 193-285.

- McQuiston, J. H., McCall C. L. & Nicholson, W. L. (2003). Ehrlichiosis and related infections. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223(12), 1750-1756.
- Meireles, J., Paulos, F., Serrão, I. (2014). Dirofilariose canina e felina. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 109, 70-78.
- Miceli, N. G., Gavioli, F. A., Gonçalves, L. R., André, M. R., Sousa, V. R., Sousa, K. C. M., & Machado, R. Z. (2013). Molecular detection of feline arthropod-borne pathogens in cats in Cuiabá, state of Mato Grosso, central-western region of Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22(3), 385-390.
- Migliazzo, A., Vitale, F., Calderone, S., Puleio, R., Binanti, D. & Abramo, F. (2015). Feline Leishmaniosis: a case with a high parasitic burden. *Veterinary Dermatology*, 26(1), 69-70.
- Miller, W. M. (1998). Feline dirofilárisis. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 13(2), 99-108.
- Miró, G., Rupérez, C., Checa, R., Gálvez, R., hernández, L., García, M., Canorea, I., Marino, V. & Montoya, A. (2014). Current status of *L. infantum* infection in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniosis? *Parasites & Vectors*, 7(1129), 1-7.
- Mixão, V., Ferreira, C., Calado, M., Belo, S., Almeida, A., Gouveia, P. & Novo, T. (2014). Potenciais vetores de dirofilariose canina nos distritos de Coimbra, Santarém e Setúbal, 2011-2013. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 20(1/2), 146.
- Montoya-Alonso, J. A., Carréton, E., Corbera, J. A., Juste, M. C., Mellado, I., Morchón, R. & Simón, F. (2011). Current prevalence of *Dirofilaria Immitis* in dogs, cats and humans from the Island of Gran Canaria, Spain. *Veterinary Parasitology*, 176(4), 291-294.
- Morchón, R., Carretón, E., González-Miguel, J. & Mellado-Hernández, I. (2012). Heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) and their vectors in Europe – new distribution trends. *Frontiers in physiology*, 3(196), 1-7.
- Moreno, A. M., Nieto, C. G. & Rodriguez, S. H. (1999). Leishmaniosis Canina. In M. C. del Campillo & F. A. R. Vázquez. *Parasitología Veterinaria: Parasitosis Sistémicas*. (pp.652-671). Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. ISBN: 84-486-0236-6.
- Narine, K., Brennan, B., Gilfillan, I. & Hodge, A. (1999). Pulmonary presentation of *Dirofilaria immitis* (canine heartworm) in man. *European Journal of CardioThoracic Surgery*, 16(4), 475-477.

- Navarrete, I. & Nieto, L. C. G. (1999). Babesiosis. Hepatozoonosis. Citauxzoonosis Felina. In M. C. del Campillo & F. A. R. Vázquez. *Parasitología Veterinaria: Parasitosis Sistémicas*.(pp. 672-678). Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. ISBN: 84-486-0236-6.
- Navarro, J. A., Sánchez, J., Peñafiel-Verdú, C., Buendía, A. J., Altimira, J. & Vilafranca, M. (2010). Histopathological Lesions in 15 cats with Leishmaniosis. *Journal of Comparative Pathology*, 143(4), 297-302.
- Neer, T. M., Breitschwerdt, E. B., Greene, R. T. & Lappin, M. R. (2002). Consensus Statement on Ehrlichial Disease of Small Animals from the Infectious Disease Study Group of the ACVIM. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16(3), 309-315.
- Nelson, C. T. (2008). *Dirofilaria immitis* in Cats: Diagnosis and Management. *Compendium*, 30(7), 393-399.
- Nemati, T., Khanmohammadi, M., Bazmani, A., Mirsamadi, N., Koshki, M. H. K., Mohebali, M., Fatollahzadeh, M., & Fallah, E. (2015). Study on Leishmania infection in cats from Ahar, East Azerbaijan Province and North West Iran by parasitological, serological and molecular methods. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(1), 40-43.
- Nogami, S., Murasugi, E., Shimazaki, K., Maeda, R., Harasawa, R. & Nakagaki, K. (2000). Quantitative analysis of microfilarial periodicity of *Dirofilaria immitis* in cats. *Veterinary Parasitology*, 92(3), 227-232.
- OIE (2008). Leishmaniosis. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* [versão eletrónica]. Acedido em Mar 16, 2015, disponível em: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
- Ortuño, A., Gauss, C. B. L., García, F., & Gutierrez, J. F. (2005). Serological evidence of *Ehrlichia* spp. exposure in cats from Northeastern Spain. *Journal of Veterinary Medicine, Series B. Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 52(5), 246-248.
- Ortuño A, Castellà J., Criado-Fornelio A., Buling A. & Barba-Carretero J.C. (2008). Molecular detection of a *Hepatozoon* species in stray cats from a feline colony in North-eastern Spain. *Veterinary Journal*, 177(1), 134-135. Acedido em Fev. 27, 2015 em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17555996>
- Otranto, D., & Dantas-Torres, F. (2010). Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives. *Parasites & Vectors*, 3:2.

- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Caprariis, D., Paola, G., Tarallo, V., Latrofa, M., Lia, R., Annoscia, G., Breitshwerdt, E., Cantacessi, C., Capelli, G. & Stanneck, D. (2013). Prevention of canine leishmaniosis in a hyper-endemic area using a combination of 10% Imidacloprid/4.5% Flumethrin. *PLoS One*,8(2), 1-8.
- Ozon, C., Marty, P., Pratlong, F., Breton, C., Blein, M., Lelièvre, A. & Haas, P. (1998). Disseminated feline leishmaniose due to *Leishmania infantum* in Southern France. *Veterinary Parasitology*, 75(2-3),273-277.
- Owens, S. D., Oakley, D. A., Marrayott, K., Hatchett, W., Walton, R., Nolan, T.J., Newton, A., Steurer, F., Schantz, P. & Giger, U. (2001). Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English Foxhounds to anemic dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 219(8), 1076-1083.
- Pennisi, M. G. (2002). A high prevalence of feline leishmaniosis in Southern Italy. In *Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, pp. 40–49.*
- Pennisi, M.G., Venza, M., Reale, S., Vitale, F. & Giudice, S.L. (2004). Case report of leishmaniasis in four cats. *Veterinary Research Communications*, 28, 363-366.
- Pennisi, M. G., Lupo, T., Malara, D., Masucci, M., Migliazzo A. & Lombardo, G. (2012). Serological and molecular prevalence of *Leishmania infantum* in cats from Southern Italy [abstract]. In *Clinical/research abstracts accepted for presentation at ISFM Congress 2012, Budapest, Hungary, June 13-17. Journal of Feline Medicine and Surgery*, 14(9),656-657.
- Pennisi, M. G., Hartman, K., Lloret, A., Addie, D., Sándor, B., Boucraut-Baralon, C., Herman, E., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hosie, M. J., Lutz, H., Marsilio, F., Möstl, K., Radford, A. D., Thiry, E., Truyen, U. & Horzinec, M.C. (2013). Leishmaniosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15(7), 638-642.
- Pennisi, M. G. (2014). Leishmaniosis of companion animals in Europe: An update. *Veterinary Parasitology*, 208(1-2), 35-47.
- Penzhorn, B.L., Schoeman, T. & Jacobson, L. (2004). Feline Babesiosis in South Africa A Review. *Annals of The New York Academy of Sciences*, 1026, 186-186.
- Pereira da Fonseca, I., Saraiva-Marques, C., Basso, A., Garrido, J. (2013). Leishmaniose Felina. *Medicina Veterinária - RAEFMV*, 67, 15-25
- Perez, M., Rikihisa, Y. & Wen, B. (1996). *Ehrlichia canis*-Like Agent Isolated from a Man in Venezuela: Antigenic and Genetic Characterization. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(9), 2133-2139.

- Poli, A., Abramo F., Barsotti, P., Leva, S., Gramiccia, M., Ludivisi, A., & Mancianti, F. (2002). Feline leishmaniose due to *Leishmania infantum* in Italy. *Veterinary Parasitology*, 106(3), 181-191.
- Prieto, C., Venco, L., Simon, F. & Genchi, C. (1997). Feline heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection: detection of specific IgG for the diagnosis of occult infections. *Veterinary Parasitology*, 70(4), 209-217.
- Prieto, G., Simón, F., Genchi, C., McCall, J. W. & Venco, L. (1999). Utility of adult antigens of *Dirofilaria immitis* for the early detection of dirofilariosis and for the evaluation of chemoprophylactic treatment in experimentally infected cats. *Veterinary Parasitology*, 86(1), 5-13.
- Quinnelli R. J. & Courtenay O. (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 136(14)1915-1934
- Ramos, C. P. G. (2012). *A importância da infeção por Leishmania spp. e Dirofilaria immitis em gatos na região de Olhão*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Ramsey, I., Gunn-Moore, D. & Shaw, S. (2001). The haemopoietic and lymphoreticular systems. In I. Ramsey & B. Tennant (Eds.), *Manual of Canine and Feline Infectious Diseases*.(pp. 65-88). England: BSAVA. ISBN: 0-905214-53-6.
- Randolph, S. E. (2005). Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors [Abstract]. *Parasitology*, 129(S1), S37-S65. Acedido Mai 20, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Tick+ecology%3A+processes+and+patterns+behind+the+epidemiological+risk+posed+by+ixodid+ticks+as+vectors>
- Randolph, S. E. (2011). Transmission of tick-borne pathogens between co-feeding ticks: Milan Labuda's enduring paradigm. [Abstract]. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 2(4), 179-182. Acedido Mai 20, 2015, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Transmission+of+tick-borne+pathogens+between+co-feeding+ticks%3A+Milan+Labuda's+enduring+paradigm>.
- Rawlings, C. A. & Calvert C. A. (1995). Heartworm Disease. In S.J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.). *Textbook of Veterinary Internal Medicine: The Cardiovascular System*, (4^a ed). (pp.1061-1067). Philadelphia: Saunders. ISBN 0-7216-6796-1.
- Ready, P. (2014). The spread of phlebotomine sandflies in Europe and the emergence of leishmaniosis. In *Proceedings of the 11th Merial Symposium on Parasitosis & Arthropod-Borne Diseases. Palermo, 21st- 24th October*, pp. 6-10.

- Reine, N. J. (2004). Infection and Blood Transfusion: A Guide to Donor Screening. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 19(2), 68-74.
- Richter, Schaarschmidt-Kiener & Krudewig. (2014). Ocular signs, diagnosis and long-term treatment with allopurinol in a cat with leishmaniasis [abstract]. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 156(6), 289-294.
- Rosa, N. J. G. C. (2009). *Rastreo de dirofilariose e de leishmaniose em gatos da área metropolitana de Lisboa*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.
- Rougeron, V., Catzeflis, F., Hide, M., De Meeûs, T. & Bañuls, A. L. (2011). First clinical case of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, 181(2-4), 325-328.
- Rubini, A. S., Paduan, K. S., Perez, R. R., Ribolla, P. E. M. & O'Dwyer, L. H. (2005). Molecular characterization of feline *Hepatozoon* species from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 137(1-2), 168-171.
- Salakij, C., Salakij, J., Narkkong, N. A., Sirinarumitr, T. & Pattanarangsarn R. (2008). Hematologic, cytochemical, ultrastructural, and molecular findings of *Hepatozoon*-infected flat-headed cats (*Prionailurus planiceps*). *Veterinary Clinical Pathology*, 37(1), 31-41.
- Sanches, A., Cardoso, C., Pereira, A. & Carvalho, J. (2009). Um caso de leishmaniose felina. In *Proceedings of the 18th APMVEAC Congress, Lisbon, Portugal*.
- Schnittger, L., Rodriguez, Anabel E., Florin-Christensen, Monica & Morrison, David, A. (2012). *Babesia*: A world emerging. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(8), 1788-1809.
- Schoeman, T., Lobetti, R. G., Jacobson, L. S. & Penzhorn, B. L. (2001). Feline Babesiosis: signalment, clinical pathology and concurrent infections. *Journal of the South African Veterinary Association*, 72(1), 4-11.
- Schoeman, T. & Leisewitz, A. (2006). Disease risks for the travelling pet: Babesiosis. *In Practice*, 28(7), 384-391.
- Schubach, T. M., Figueiredo, S. B., Pereira, S. A., Madeira, M. F., Santos I. B. & Andrade, M. V. (2004). American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: First report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* [Abstract]. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(3), 165-167. Acedido em Mar. 20, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=american+cutaneous+leishmaniasis+in+two+cats+from+Rio+de+Janeiro>

- Shaw, S.E., Birtles, R.J. & Day, M.J. (2001). Arthropod-transmitted infectious diseases of cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 3(4), 193-209.
- Shaw, E. E., Binns, S. H., Birtles, R. J., Day, M. J., Smithson, R. & Kenny, M. J. (2005). Molecular evidence of tick-transmitted infections in dogs and cats in the United Kingdom. *Veterinary Record*, 157(21), 645-648.
- Silaghi, C., Knaus, M., Rapti, D., Kusi, I., Shukllari, E., Hamel, D., Pfister, K. & Rehbein, S. (2014). Survey of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*, haematropic mycoplasmas and other arthropod-borne pathogens in cats from Albania. *Parasites & Vectors*, 7, 62.
- Silva, F. L., Oliveira, R. G., Silva, T. M., Xaviera, M. N., Nascimento, E. F. & Santos, R. L. (2009). Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 160, 55–59.
- Simking, P., Wongnakphet, S., Stich, R. W., Jittapalapong, S. (2010). Detection of *Babesia vogeli* in stray cats of metropolitan Bangkok, Thailand. *Veterinary Parasitology*, 173(1-2), 70-75.
- Simões-Mattos, L., Mattos, M. R. F., Teixeira, M. J., Oliveira-Lima, J. W., Bevilaqua, C. M. L., Prata-Júnior, R. C., Holanda, C. M., Rondon, F. C. M., Bastos, K. M. S., Coelho, Z. C. B., Coelho, I. C. B. Barral, A. & Pompeu, M. M. L. (2005). The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, 127(3-4), 199– 208.
- Simón, F., Morchón, R., González-Miguel, J., Marcos-Atxutegi, C. & Siles-Lucas, M. (2009). What is new about animal and human dirofilariosis? *Trends in Parasitology*, 25(9), 404-409.
- Simón, F., Siles-Lucas, M., Morchón, R., González-Miguel, J., Mellado, I., Carretón, E. & Montoya-Alonso, J. A. (2012). Human and animal dirofilariosis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(3), 507-544.
- Smith, T. G. (1996). The genus Hepatozoon (Apicomplexa: Adeleina). *The Journal of Parasitology*, 82(4), 565-585
- Snyder, P. S., Levy, J. K., Salute, M. E., Gorman, S. P., Kubilis, P. S., Smail, P. W., & George, L. L. (2000). Performance of serological tests used to detect heartworm infections in cats. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 216(5), 693-700.
- Soares, C. S. A., Duarte, S. C., Sousa, S. R. (2014). The cat as an integrating host in the epidemiology of *Leishmania infantum*. *Acta Parasitológica portuguesa*, 20(1/2), 41-46.

- Solano-Gallego, L., Hegarty, B., Espada, Y., Llull, J. & Breitschwerdt, E. (2006). Serological and molecular evidence of exposure to arthropod-borne organisms in cats from northeastern Spain. *Veterinary Microbiology*, 118(3-4), 274-277.
- Solano-Gallego, L., Rodríguez-Cortéz, A., Iniesta, L., Quintana, J., Pastor, J., Espada, Y., Portús, M. & Alberola, J. (2007). Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the northwestern mediterranean. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(4), 676-680.
- Solano-Gallego, L., Koutinas A., Miró, G., Cardoso L., Pennisi M., Ferrer L., Bourdeau, P., Oliva, G. & Baneth G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165(1-2), 1-18.
- Solano-Gallego, L. & Baneth, G. (2011). Babesiosis in dogs and cats – Expanding parasitological and clinical spectra. *Veterinary Parasitology*, 181(1), 48-60.
- Souza, A. I., Barros, E. M., Ishikawa, E., Iliha, I. M., Marin, G. R. & Nunes, V. L. (2005). Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 128(1-2), 41-45.
- Spada, E., Proverbio, D., Galluzzo, P., Perego, R., Giorgi, G.B.D., Roggero, N. & Caracappa, S. (2014). Frequency of piroplasma *Babesia microti* and *Cytauxzoon felis* in stray cats from northern Italy. *BioMed Research International*, 2014, 1-5.
- Stich, R. W., Schaefer, J. J., Bremer, W. H., Needham, G. R. & Jittapalapong, S. (2008). Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. *Veterinary Parasitology*, 158(4), 256-273.
- Stubbs, C. J., Lappin, M. R., Holland, C. J. & Wheeler, S. L. (1998). Feline Ehrlichiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 12(3), 230.
- Sykes, J. E. (2010). Immunodeficiencies caused by infectious diseases. *The Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice*, 40(3), 409-423.
- Tabar, M. D., Altet, L., Francino, O., Sánchez, A., Ferrer, L. & Roura, X. (2008). Vector-borne infections in cats: Molecular study in Barcelona area (Spain). *Veterinary Parasitology*, 151(2-4), 332-336.
- Taboada, J. & Merchant, S. (1995). Protozoal and Miscellaneous Infections. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine: Infectious Diseases*, (4^a ed). (pp.384-397). Philadelphia: Saunders. ISBN 0-7216-6796-1.

- Tarello, W. (2002). Granulocytic *Ehrlichia*-like bodies in a cat with chronic oral disease: case report. *Revue Médecine Vétérinaire*, 153(6), 401-406.
- Tarello, W. (2005). Microscopic and clinical evidence for *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum* infection in Italian cats. *Veterinary Record*, 156(24), 772-774.
- Taylor, M. J., Bandi, C., Hoerauf, A. M. & Lazdins, J. (2000). Wolbachia bacteria of filarial nematodes: a target for control? *Parasitology Today*, 16(5), 179-180.
- Taylor, M. J., Makunde, W. H., McGarry, H. F., Turner, J. D., Mand, S. & Hoerauf, A. (2005). Macrofilaricidal activity after doxycycline treatment of *Wuchereria bancrofti*: a doubleblind, randomised placebo-controlled trial. *The Lancet*, 365(9477), 2116 – 2121.
- Tomás, A. M. & Romão, S. F. (2008). Biologia do Parasita. In G. Santos-Gomes & I.P.D. Fonseca (Eds.), *Leishmaniose Canina*.(pp.7-26). Merial: Chaves Ferreira – Publicações, S.A.
- Trainor, K. E., Porter, B. F., Logan., K. S., Hoffman, R. J., & Snowden., K.F. (2010). Eight Cases of Feline Cutaneous Leishmaniasis in Texas. *Veterinary Pathology*, 47(6), 1076-1081.
- Trotz-Williams, L. A. & Trees, A. J. (2003). Systematic review of the distribution of the major vector-borne parasitic infections in dogs and cats in Europe. *Veterinary Record*, 152(4), 97-105.
- Tuzio, H., Edwards, D., Elston, T., Jarboe, L., Kudrak, S., Richards, J. & Rodan, I. (2005). Feline zoonoses guidelines from the American Association of Feline Practitioners. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 7(4), 243-274.
- Uilenberg, G. (2006). *Babesia* – A historical overview. *Veterinary Parasitology*, 138(1-2), 3-10.
- Vaz, Y., Almeida, V., Pereira da Fonseca, I., Duarte, A., Madeira de Carvalho, L., Meireles, J. & Fazendeiro, M. (2005). Estudo de doenças transmissíveis em populações de gatos errantes. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. Ano 33º. SUPL. 129130, Jan-Jun. 2005: pp. 9-10.
- Venco, L., Genchi, C., Genchi, M., Grandi, G. & Kramer, L.H. (2008). Clinical evolution and radiographic findings of feline heartworm infection in asymptomatic cats. *Veterinary Parasitology*, 158(3), 232-237.
- Venco, L., Genchi, M., Genchi, C., Gatti, D. & Kramer, L. (2011). Can heartworm prevalence in dogs be used as a provisional data for assessing the prevalence of the infection in cats? *Veterinary Parasitology*, 176(4), 300-303.

- Vides, J. P., Schwardt, T. F., Sobrinho, L. S., Marinho, M., Laurenti, M. D., Biondo, A. W., Leutenegger, C. & Marcondes M. (2011), *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from na endemic área of visceral leishmaniosis in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 178(1-2), 22-28.
- Vieira, L., Silvestre-Ferreira, A. C., Fontes-Sousa, A. P., Balreira, A. C., Morchón, R., Carretón, E., Vilhena, H., Simón, F. & Montoya-Alonso, J.A. (2014). Seroprevalence of heartworm (*Dirofilaria immitis*) in feline and canine hosts from central and northern Portugal. *Journal of Helminthology*, 14, 1-5.
- Vilhena, H., Martinez-Diaz, Veronica L., Cardoso, L., Vieira, L., Altet, L., Francino, O., Pastor, J., Silvestre-Ferreira & Ana C. (2013). Feline vector-borne pathogens in the north and centre of Portugal. *Parasites & Vectors*, 6(99).
- Vita, S., Santorini, D., Aguzzi, I., Petrotta, E. & Luciani, A. (2005). Feline Leishmaniasis and Ehrlichiosis: Serological Investigation in Abruzzo Region. *Veterinary Research Communications*, 29(2), 319-321.
- Voordouw, M., J. (2015). Co-feeding transmission in Lyme disease pathogens. *Parasitology*, 142(2), 290-302.
- Ware, W. A. (2003). Cardiovascular system disorders: heartworm disease. In R.W. Nelson & C.G. Couto (Eds.), *Small Animal Internal Medicine* (3rd ed). (pp. 169-184). Mosby. ISBN: 0-323-01724-X.
- Wells, R. (2012). Babesiosis in a recently imported cat. *Veterinary Record*, 171(25), 654.
- Williams, B.M., Berentsen, A., Shock, B.C., Teixeira, M., Dunbar, M.R., Becker, M.S., & Yabsley, M.J. (2014). Prevalence and diversity of *Babesia*, *Hepatozoon*, *Ehrlichia* and *Bartonella* in wild and domestic carnivores from Zambia, Africa. *Parasitology Research*, 113(3), 911-918.
- Wong, S. S. Y., Poon, R. W. S., Hui, J. J. Y. & Yuen, K. Y. (2012). Detection of *Babesia hongkongensis* sp. nov. in a Free-Roaming *Felis catus* Cat in Hong Kong. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(8), 2799-2803.
- Wongkamchai, S., Nochote, H., Foongladda, S., Dekumyoy, P., Thammapalo, S., Boitano, J. J., Choochote, W. (2014). A high resolution melting real time PCR for mapping of filaria infection in domestic cats living in brugian filarioses-endemic areas. *Veterinary Parasitology*, 201(1-2), 120-127.
- World Health Organization (2000). *WHO, Leishmania/HIV co-infections – Southwestern Europe 1990-1998*. WHO/LEISH/200.42. Geneva, 12 pp.

World Health Organization (2010). *WHO, Control of the leishmaniasis. report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. In: Technical Report Series 949.2010. WHO, Geneva (22-26 March).*

Würth, S. & Zahler-Rinder, M. (2004). Babesia in domestic cats – an epidemiological study in south Africa. *International Journal of Medical Microbiology*, 293(38), 60-61.



ANEXOS

ANEXO I

Termo de Responsabilidade

Proprietário

Nome: _____
Morada: _____
BI /Cartão de Cidadão/Passaport/Outro(_____) Nº: _____
Contacto telefónico: _____ e-mail: _____

Animal

Nome: _____ Espécie: _____ Raça: _____
Idade: _____ Sexo: _____

Intervenção

Recolha de dois mililitros de sangue da veia jugular ou safena.

Declaração

Eu, abaixo assinado, declaro que autorizo o(a) Médico Veterinário(a)

_____, a realizar as

intervenções descritas, no animal acima identificado, para fins de investigação na área de diagnóstico de Leishmaniose/outras hemoparasitoses em gatos. Os dados obtidos destinam-se à elaboração de Tese de Mestrado em Medicina Veterinária.

Fui informado(a) e esclarecido(a) sobre o âmbito deste estudo.

Lisboa, ____ de _____ de 20__

Ass. _____



ANEXO II

Inquérito realizados aos proprietários da população felina amostrada

1. Número_____
2. Sexo_____
3. Raça_____
4. Idade_____
5. Pelo_____
6. Condição corporal_____
7. Alimentação_____
- 8 Gatos de interior/Gatos de exterior/Misto_____
8. Co-habita com outros animais? Se sim, quais?_____
9. Co-habita com animais doentes?_____
10. Co-habita com pessoas doentes?_____
11. Sinais exteriores de doença?_____
12. Doenças anteriores?_____
13. Presença de ectoparasitas?_____
14. Desparasitação interna? Com que frequência?_____
15. Desparasitação externa? Com que frequência?_____
16. Vacinação? Com que frequência? _____
17. Já esteve num gatil?_____
18. Vai de férias com os donos? Destino_____
19. Já se ausentou do país? Destino_____

ANEXO III

Pesquisa de anticorpos por Imunofluorescência Indirecta

1. MegaScreen FLUOBABESIA canis

Kit para a Detecção de Anticorpos anti-*Babesia canis* em Soro ou Plasma

Procedimento:

Retirar os componentes do kit e deixá-los à temperatura ambiente (20-25°C) antes de abrir os frascos ou os invólucros das lâminas. O conjugado tem sempre de ser armazenado no escuro.

1. Remover cuidadosamente a lâmina do invólucro e identificá-la com o nome ou número dos pacientes.
2. Preparar diluições iniciais de 1:20 (5 µL de amostra + 95 µL de PBS) para todos os soros não testados.
3. Os controlos Positivo e Negativo estão prontos a usar.
4. Aplicar 10 µL de cada diluição no poço associado e identificar a sua localização para referência posterior. A aplicação das amostras deve ser feita a partir da periferia dos poços.
5. Colocar a lâmina numa câmara húmida e incubar durante 30 minutos a 37°C.
6. Remover a câmara húmida da incubadora. Lavar os poços com PBS (se for utilizada uma garrafa de lavagem, aplicar uma corrente suave no centro da lâmina e não diretamente nos poços). Eliminar as gotas remanescentes sacudindo a lâmina e repetir a lavagem em PBS mais duas vezes, cinco minutos cada. Não permitir que os poços sequem entre os passos de lavagem. Retirar as lâminas e, apoiando a aresta maior da lâmina sobre papel de filtro, bater com precaução.
7. Adicionar imediatamente 1 gota de Conjugado anti-Gato-IgG-FITC em cada poço. A aplicação de soro ou conjugado deve ser feita a partir da periferia dos poços. Colocar as lâminas na câmara húmida a incubar por mais 30 minutos a 37°C. A incubação deve ser feita no escuro para proteger o conjugado fotossensível.
8. Lavar as lâminas como no passo 6.
9. Adicionar 2 gotas de meio de montagem na lamela e colocar a lâmina cuidadosamente sobre a lamela, comprimindo-a de modo a remover as bolhas de ar aprisionadas.
10. Observar as lâminas coradas numa ampliação de 400x, comparando cada poço com a intensidade visual e aparência do padrão de fluorescência visualizado nos poços de controlo Positivo e Negativo.

11. As lâminas podem ser armazenadas no escuro, entre 2-8°C, até 24 horas

2. MegaScreen FLUOEHRlichia canis

Kit para a detecção de Anticorpos anti-*Ehrlichia canis* em Soro ou Plasma

Procedimento:

Retirar os componentes do kit e deixá-los à temperatura ambiente (20-25°C) antes de abrir os frascos ou os invólucros das lâminas. O conjugado tem sempre de ser armazenado no escuro.

1. Remover cuidadosamente a lâmina do invólucro e identificá-la com o nome ou número dos pacientes.
2. Preparar diluições iniciais de 1:40 (5 µL de amostra + 195 µL de PBS) para todos os soros não testados.
3. Os controlos Positivo e Negativo estão prontos a usar.
4. Aplicar 10 µL de cada diluição no poço associado e identificar a sua localização para referência posterior. A aplicação das amostras deve ser feita a partir da periferia dos poços.
5. Colocar a lâmina numa câmara húmida e incubar durante 30 minutos a 37°C.
6. Remover a câmara húmida da incubadora. Lavar os poços com PBS (se for utilizada uma garrafa de lavagem, aplicar uma corrente suave no centro da lâmina e não diretamente nos poços). Eliminar as gotas remanescentes sacudindo a lâmina e repetir a lavagem em PBS mais duas vezes, cinco minutos cada. Não permitir que os poços sequem entre os passos de lavagem. Retirar as lâminas e, apoiando a aresta maior da lâmina sobre papel de filtro, bater com precaução.
7. Adicionar imediatamente 1 gota de Conjugado anti-Gato-IgG-FITC em cada poço. A aplicação de soro ou conjugado deve ser feita a partir da periferia dos poços. Colocar as lâminas na câmara húmida a incubar por mais 30 minutos a 37°C. A incubação deve ser feita no escuro para proteger o conjugado fotossensível.
8. Lavar as lâminas como no passo 6.
9. Adicionar 2 gotas de meio de montagem na lamela e colocar a lâmina cuidadosamente sobre a lamela, comprimindo-a de modo a remover as bolhas de ar aprisionadas.
10. Observar as lâminas coradas numa ampliação de 400x, comparando cada poço com a intensidade visual e aparência do padrão de fluorescência visualizado nos poços de controlo Positivo e Negativo.

11. As lâminas podem ser armazenadas no escuro, entre 2-8°C, até 24 horas.

3. LeishmaniaSpot IF

Kit para a detecção de Anticorpos anti-*Leishmania infantum* em Soro ou Plasma

1. Retirar as lâminas com antigénio do frigorífico e colocá-las à temperatura ambiente durante 15 minutos.
2. Numa microplaca, depositar 195 µL de PBS no número de poços correspondente ao número de soros que se pretende testar.
3. Adicionar 5 µL de soro a cada poço que contém PBS
4. Incubar durante 30 minutos a 37 °C, em câmara húmida.
5. Lavar as lâminas:
 - a. 1.^a lavagem: rápida com PBS/Tween 80;
 - b. 2.^a lavagem: 5 minutos mergulhadas num recipiente contendo PBS/Tween 80;
 - c. 3.^a lavagem: 5 minutos mergulhadas noutra recipiente contendo PBS/Tween 80;
 - d. Lavar as lâminas com água destilada;
 - e. Deixar secar bem as lâminas ao ar.
6. Depositar 10 µL do conjugado em cada poço, incluindo no dos controlos.
7. Incubar durante 30 minutos a 37 °C em câmara húmida;
8. Lavagem igual ao passo 5.
9. Depois de secar muito bem as lâminas fazer a montagem definitiva colocando uma gota de Fluoprep em cada poço e cobrir com uma lamela de 50x24 mm.
10. Efetuar de imediato a leitura em microscópio de fluorescência.

ANEXO IV

Heartworm in Cats

Feline heartworm infection (*Dirofilaria immitis*) is seen wherever canine heartworm infection is present. Heartworm infections in cats are frequently characterized by single-sex infections (approximately 1/3 of infections) with small numbers of worms (1 – 3 worms per cat on average). For these reasons, antigen tests commonly used for heartworm diagnosis in dogs will not detect a large percentage of heartworm infections in cats.

Heartworms live approximately 1 – 2 years in cats and ectopic infections are not uncommon. Clinical signs of feline heartworm disease include, among others, vomiting, coughing, respiratory distress, central nervous system abnormalities and acute death.

Product Description

HESKA® Solo Step® FH is a one-step, lateral flow immunoassay for the detection of antibodies to *D. immitis* in feline serum or plasma. This test is highly specific and sensitive, and is the first single-step test kit designed specifically for the diagnosis of feline heartworm infection. The test is very simple to use, and results are read within 5 minutes.

Diagnosis of the infection is based on the detection of circulating IgG antibodies to a specific heartworm antigen. The antigen, which is expressed by a single *D. immitis* gene isolated and cloned by Heska's scientists, is present in male and female heartworms. Antibodies to the antigen are first detected in some cats at 50 – 60 days post-infection (corresponding to the late fourth larval stage (L4) to early adult stage of *D. immitis* development). HESKA® Solo Step® FH was developed to detect these antibodies and will detect antibodies resulting from heartworm infections commonly seen in cats, including immature worms, adult male and female heartworms, and single-sex male or female heartworm infections.

Indications

HESKA® Solo Step® FH is a diagnostic tool developed specifically to assist veterinarians in detecting *D. immitis* infections in cats. This test will also aid in determining prevalence rates of *D. immitis* infection in the cat population.

Directions for Use

The test cassette is for use in detecting IgG antibodies against *D. immitis* in serum or plasma from cats.

Required Materials

1. A sample of feline serum or plasma
2. Test cassette (provided)
3. Pipette (provided)
4. Timer or clock

Procedure

1. Open the foil package and place the test cassette on a flat solid surface (Figure 1).
2. Using the pipette, draw up the patient sample into the stem portion of the pipette. Do not fill the bulb (Figure 2).
3. Holding the pipette vertically, dispense 3 drops of the sample into the round sample well of the test cassette (Figure 3).
4. Allow the test cassette to sit undisturbed for 5 minutes (Figure 4).
5. Read the results in the rectangular Results Window 5 minutes after applying plasma or serum. A blue line (Procedural Control Line) **must** appear on all samples, and a red line (Test Line) may or may not appear (Figure 5).

Interpretation of Test Results

Procedural Control Line (C): You **must** see a blue line within 5 minutes of adding serum or plasma for the test to be valid. This blue procedural control line indicates proper flow of the sample through the test cassette. **If the blue line does not develop, the test is invalid and should be repeated.** Discard the test cassette, and repeat the test with a new test cassette.

Feline Heartworm Antibody Test Kit – Heska® Solo Step® FH

Test Line (T): Any visible red line within 5 minutes of adding serum or plasma indicates a positive result. Antibodies to *D. immitis* are present. This means one or more of the following:

- Adult heartworms are present in the heart and/or pulmonary arteries.
- The cat is infected with late L4 or adult worm(s).
- Heartworm infection has been cleared, but antibodies are still present.
- Ectopic heartworm infection may be present.

In the presence of suggestive clinical signs and other supportive diagnostic data (e.g., radiographic findings, echocardiographic findings, etc.), a positive result will help confirm cardiovascular heartworm disease.

No red line within 5 minutes of adding serum or plasma indicates a negative test result. There are no antibodies to *D. immitis* present. This means one of the following:

- The cat is not infected with *D. immitis*.
- The cat was infected less than 60 days prior to collection of the sample.

If a negative result is obtained and clinical signs are present, a retest within 2 – 3 months is recommended. Additional diagnostic tests should be employed to rule out other causes of the clinical signs.

Sample Collection and Storage

Plasma: Collect an anticoagulated blood sample using standard clinical laboratory procedures. Separate plasma by centrifugation. Plasma samples may be stored refrigerated (2° – 7° C) for up to 72 hours; for longer storage, freeze at or below -20° C in vials with air-tight seals.

Serum: Collect and prepare serum samples using standard clinical laboratory procedures. Serum samples may be stored refrigerated (2° – 7° C) for up to 72 hours; for longer storage, freeze at or below -20° C in vials with air-tight seals.

Precautions

1. Do not expose the test cassette to direct sunlight.
2. Do not use to test species other than cats.
3. After 10 minutes, a very faint red line may appear in the Results Window with samples from some cats which are negative for heartworm infection.
4. Do not use the test cassette more than once.
5. Use the test cassette immediately after opening the foil pouch.

Storage and Stability

1. Store at room temperature (15° – 30° C [59° – 86° F]).
2. See package for expiration date.

For technical assistance, call Heska at 1-800-GO HESKA (1-800-464-3752).



www.heska.com

Heska Corporation, 3760 Rocky Mountain Avenue, Loveland, CO 80538

U.S. Vet Lic. No. 213

©2005 Heska Corporation. All rights reserved. HESKA and Solo Step are registered trademarks of Heska Corporation in the U.S. and/or other countries. US 6,391,569 B1; US 6,103,484; US 4,943,522; EP 0 296 724 B1; Patents Pending.

02213-3

ANEXO V

Numero	Sexo (F = Fêmea/M = Macho)	Castro (S = Sim/ N = Não)	Idade (Anos)	Raça	Pelo	Condição Corporal (N = Normal)	Alimentação	(I) Indoor/(O) Outdoor/(M) Misto	Co-habitação com animais doentes	Co-habitação com pessoas doentes	Exame físico	Doenças Anteriores	Contato com outros Animais (cão/gat = gato/ rat = ratas)	Presença de Ectoparasitas	Deparasitação Interna	Deparasitação externa	Vacinação	Presença em Gatil	Férias	Ausência do País	Gota a fresco (Neg= Negativa)	Hemograma(Ane= Anemia/ Tromb= Tromboctopênia)	Babesia (- Negativo/+Positivo)	Ehrlichia (-Negativo/+Positivo)	Hepatozoon (-Negativo)	Dirofilaria immitis (-Negativo)	Leishmania infantum (-Negativo)
1	M	S	10	Europ.comum	Curto	N	Ração	I	Não	Não	Normal	Não	1 cão	Não	Trimestral	Mensal	Sim	Não	Não	Neg	Normal	-	-	-	-	-	
2	M	S	4	Europ.comum	Curto	N	Ração	I	Não	Não	Febre, Prostração	Mycop	Não	Não	Semestral	Mensal	Sim	Não	Não	Neg	Ane/Tromb	-	-	-	-	-	
3	F	S	2	Europ.comum	Curto	N	Ração	I	Não	Não	Normal	Não	Não	Não	Trimestral	Mensal	Sim	Não	Não	Neg	Normal	-	-	-	-	-	
4	M	S	13	Europ.comum	Curto	N	Ração	I	Não	Não	Anemia, vômitos, prostração	IRC	2 gatos	Não	Quadrimestral	Mensal	Sim	Não	Não	Neg	Normal	-	-	-	-	-	
5	F	S	6	Europ.comum	Curto	N	Ração	I	Não	Não	Normal	Não	2 gatos	Não	Quadrimestral	Mensal	Sim	Não	Não	Neg	Normal	-	-	-	-	-	
6	M	S	3	Europ.comum	Curto	Magro	Ração	O	Não	Não	Prostração, mucosas palidas	Não	Gato rua	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Neg	Anemia	-	-	-	-	-	
7	F	S	3	Europ.comum	Curto	N	Ração	I	Não	Não	Normal	Não	7 cães	Não	Semestral	Trimestral	Não	Não	Não	Neg	Normal	-	-	-	-	-	
8	F	S	5	Europ.comum	Curto	N	Ração	I	Sim	Não	Normal	Não	1 c e 2 rat	Não	Quadrimestral	Trimestral	Não	Não	Não	Neg	Normal	-	-	-	-	-	
9	F	S	11	Europ.comum	Curto	N	Ração	I	Não	Não	Tumor mamário	Não	1 gato	Não	Anual	Semestral	Não	Não	Não	Neg	Tromb	-	-	-	-	-	
10	M	S	1	Europ.comum	Curto	N	Ração	I	Não	Não	Normal	Não	1 c 3 gat	Sim	Anual	Semestral	Não	Não	Não	Neg	Normal	-	-	-	-	-	
11	F	N	1	Europ.comum	Curto	N	Ração	I	Não	Não	Normal	Não	3 c 14 gat	Sim	Anual	Semestral	Não	Não	Não	Neg	Normal	-	-	-	-	-	
12	F	N	1	Europ.comum	Curto	N	Ração	I	Não	Não	Normal	Não	3 c 14 gat	Sim	Anual	Semestral	Não	Não	Não	Neg	Normal	-	-	-	-	-	
13	F	N	10	Europ.comum	Curto	N	Ração	I	Não	Não	Normal	Não	3 c 14 gat	Sim	Anual	Semestral	Não	Não	Não	Neg	Normal	-	-	-	-	-	
14	M	S	3	Europ.comum	Curto	N	Ração	I	Não	Não	Normal	Não	3 c 14 gat	Sim	Anual	Semestral	Não	Não	Não	Neg	Normal	-	-	-	-	-	
15	F	S	10	Europ.comum	Curto	Magro	Ração	I	Não	Não	Normal	Criptosp	1 c 3 gat	Não	Semestral	Semestral	Não	Não	Não	Neg	Normal	-	-	-	-	-	
16	F	S	5	Europ.comum	Curto	N	Ração	M	Não	Não	Normal	Não	4 c 17 gat	Sim	Anual	Semestral	Não	Não	Não	Neg	Tromb	-	-	-	-	-	
17	M	S	20	Europ.comum	Curto	Magro	Ração	I	Não	Não	Desidratação, anorexia, prostração	IRC	2 c 1 gat	Não	Semestral	Trimestral	Não	Não	Não	Neg	Tromb	-	-	-	-	-	
18	M	N	1	Europ.comum	Curto	N	Ração	I	Não	Não	Febre, Prostração	Não	Não	Não	Trimestral	Trimestral	Não	Não	Não	Neg	Tromb	-	-	-	-	-	
19	M	N	4	Europ.comum	Curto	N	Ração	I	Sim	Sim	Obstrução urinária	obst uri	2 c 1 gat	Não	Anual	Anual	Não	Não	Não	Neg	Normal	-	-	-	-	-	
20	F	S	2	Europ.comum	Curto	N	Ração	O	Não	Não	Normal	Não	4 c 17 gat	Sim	Anual	Semestral	Não	Não	Não	Neg	Normal	-	-	-	-	-	
21	F	S	2	Europ.comum	Curto	N	Ração	O	Não	Não	Normal	Não	4 c 17 gat	Sim	Anual	Semestral	Não	Não	Não	Neg	Tromb	-	-	-	-	-	
22	F	N	4	Europ.comum	Curto	N	Ração	O	Não	Não	Normal	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Neg	Normal	-	-	-	-	-	
23	F	N	4	Europ.comum	Curto	N	Ração	O	Não	Não	Normal	Não	19 gatos	Não	Não	Semestral	Não	Não	Não	Neg	Tromb	-	-	-	-	-	
24	F	S	6	Europ.comum	Curto	Obesa	Ração	I	Não	Não	Normal	Não	3 gatos	Não	Semestral	Quadrimestral	Sim	Não	Não	Neg	Normal	-	-	-	-	-	
25	F	S	9	Europ.comum	Curto	N	Ração	I	Não	Não	Normal	Não	Não	Não	Trimestral	Mensal	Sim	Não	Não	Neg	Normal	-	-	-	-	-	
26	F	N	11	Europ.comum	Curto	Magro	Ração	M	Não	Não	Perda de peso	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Neg	Tromb	-	-	-	-	-	
27	F	S	1	Europ.comum	Curto	N	Ração	M	Não	Não	Uvêite	Não	Não	Não	Mensal	Mensal	Sim	Não	Não	Neg	Tromb	-	-	-	-	-	
28	F	S	2	Europ.comum	Curto	N	Ração	I	Não	Não	Normal	Não	1 c 3 gat	Não	Semestral	Semestral	Não	Não	Não	Neg	Normal	-	-	-	-	-	
29	F	S	3	Europ.comum	Curto	N	Ração	I	Não	Não	Normal	Não	1 c 3 gat	Não	Trimestral	Mensal	Não	Não	Não	Neg	Normal	-	-	-	-	-	
30	F	N	9	Europ.comum	Curto	N	Ração	I	Não	Não	Normal	Não	4 gatos	Sim	Semestral	Semestral	Não	Não	Não	Neg	Normal	-	-	-	-	-	
31	M	S	4	Europ.comum	Curto	N	Ração	I	Não	Não	Normal	Não	2 gatos	Não	Trimestral	Mensal	Não	Não	Não	Neg	Normal	-	-	-	-	-	
32	M	S	1	Europ.comum	Curto	N	Ração	I	Não	Não	Normal	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Neg	Normal	-	-	-	-	-	
33	F	S	9	Europ.comum	Curto	Magro	Ração	I	Não	Não	Normal	Não	4 gatos	Não	Semestral	Trimestral	Sim	Não	Não	Neg	Normal	-	-	-	-	-	
34	M	S	1	Europ.comum	Curto	N	Ração	I	Não	Não	Normal	Não	Não	Não	Trimestral	Mensal	Sim	Não	Não	Neg	Tromb	-	-	-	-	-	
35	F	S	2	Europ.comum	Curto	N	Ração	I	Não	Não	Normal	Não	3 cães	Não	Semestral	Trimestral	Sim	Não	Não	Neg	Normal	-	-	-	-	-	
36	F	N	4	Europ.comum	Curto	N	Ração	O	Não	Não	Normal	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Neg	Ane/tromb	-	-	-	-	-	
37	F	N	12	Europ.comum	Curto	Magro	Ração	I	Não	Não	Desidratação, Anorexia, perda peso, pros, mucosa palida	Não	Não	Não	Quadrimestral	Quadrimestral	Sim	Não	Não	Neg	Tromb	-	-	-	-	-	
38	M	S	6	Europ.comum	Curto	Magro	Ração	I	Não	Não	Desidratação, anorexia, prostração	IRC	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Neg	Anemia	-	-	-	-	-	
39	M	S	10	Europ.comum	Curto	Magro	Ração	I	Não	Não	Anorexia, fistula infra-orbitária, perda peso, febre	IRC	Não	Não	Trimestral	Mensal	Sim	Não	Não	Neg	Ane/tromb	-	-	-	-	-	
40	F	S	1	Europ.comum	Curto	N	Ração	I	Não	Não	Anorexia, Prostração, Dispneia	Não	Não	Não	Trimestral	Mensal	Não	Não	Não	Neg	Tromb	-	-	-	-	-	

Mycop= infecção por Micoplasmas/ Criptos= Criptosporidiose/ obs ura= obstrução urinária/ IRC= insuficiência Renal Crônica/ Pro= prostração