



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

DETECÇÃO DE *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

Telma Simone Oliveira Martins

CONSTITUIÇÃO DO JURI

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da Fonseca

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Doutora Berta Fernandes Ferreira São Braz

Dr<sup>a</sup> Ana Clotilde Alves Fernandes

ORIENTADOR

Dr<sup>a</sup> Ana Clotilde Alves Fernandes

CO-ORIENTADOR

Doutora Berta Fernandes Ferreira São Braz

2011

LISBOA

---









UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

DETECÇÃO DE *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

Telma Simone Oliveira Martins

Dissertação De Mestrado Integrado Em Medicina Veterinária

CONSTITUIÇÃO DO JURI

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da Fonseca  
Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte  
Doutora Berta Fernandes Ferreira São Braz  
Dr<sup>a</sup> Ana Clotilde Alves Fernandes

ORIENTADOR

Dr<sup>a</sup> Ana Clotilde Alves Fernandes

CO-ORIENTADOR

Doutora Berta Fernandes Ferreira São Braz

2011

LISBOA

---

## AGRADECIMENTOS

A toda a equipa do Hospital Veterinário SosVet por todos os conhecimentos prontamente transmitidos, em particular à Dr<sup>a</sup> Ana Clotilde Alves Fernandes, minha orientadora, e à Dr<sup>a</sup> Susana Bатуca pela ajuda na realização deste trabalho.

À Professora Doutora Berta São Braz, minha co-orientadora, por toda a disponibilidade, apoio e simpatia desde o primeiro dia.

À Professora Doutora Ana Duarte (sem a qual este trabalho não seria possível), pelo carinho e paciência com que recebeu e colaborou neste projecto.

Ao Professor Doutor Telmo Nunes, pela ajuda na parte estatística da presente dissertação.

À Dr<sup>a</sup> Ana Sanches e equipa da clínica veterinária SolVet, pelas fotografias gentilmente cedidas.

À Associação dos Amigos dos Animais Abandonados da Moita, em particular à sua presidente, Isabel Lopes, e à voluntária Ana Santos, pela ajuda e amabilidade com que se prontificaram a participar neste trabalho.

A todos os gatinhos que fizeram parte deste estudo.

À Virbac Portugal e ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal da Faculdade de Medicina Veterinária (CIISA-FMV), pelo apoio financeiro.

À Cláudia Rodrigues, minha “sócia” ao longo de todos estes anos e também durante a realização deste trabalho.

A todas as pessoas com quem partilhei bons momentos ao longo destes anos, mas principalmente aos amigos fiz e que vão ficar para a vida.

Aos meus amigos de sempre, por me acompanharem também nesta caminhada.

Aos meus pais, por tudo!

## RESUMO

### **Detecção de *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**

A prevalência de doenças infecciosas em gatos está relacionada com a densidade e tamanho da população que neles habita. Com o presente trabalho pretendeu-se determinar a prevalência do Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV), Vírus da Leucemia Felina (FeLV), *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Mycoplasma haemofelis* e *Leishmania infantum* na população de felinos de uma associação particular, a Associação dos Amigos dos Animais Abandonados da Moita, relacionar a sua presença com os sinais clínicos apresentados e perceber como esses agentes se relacionam entre si. As prevalências obtidas, nos testes serológicos, para FIV e FeLV foram de 22% e 10%, respectivamente. A pesquisa de *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp. e *Rickettsia* spp. foi efectuada utilizando PCR convencional, tendo sido obtidas bandas positivas para *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp. em 2% dos animais e bandas compatíveis com a presença de *Rickettsia* spp. em 16% dos animais. A detecção de *M. haemofelis* e *L. infantum* foi realizada através de *real-time* PCR, e as prevalências obtidas foram de 4% e 2%, respectivamente. A única associação com significado estatístico ( $p < 0,05$ ) entre a presença dos agentes pesquisados e a sintomatologia apresentada pelos animais foi o desenvolvimento de estomatite em animais infectados por FIV ou FeLV.

O animal com *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp., apresentava uma ligeira desidratação, ruídos respiratórios superiores e inferiores, policitemia e linfocitose ligeiras. Nos oito animais suspeitos de positividade para *Rickettsia* spp. as alterações mais comuns foram gengivite ligeira, corrimento ocular e conjuntivite. Dos dois animais com *M. haemofelis*, um apresentava apenas conjuntivite e corrimento ocular bilateral, e o outro aumento dos linfonodos poplíteos e estomatite grave, mas ambos sem alterações no hemograma. O animal no qual foi encontrado ADN de *L. infantum* não apresentava qualquer sinal cutâneo, ocular ou sistémico da infecção e a única alteração de hemograma foi uma linfocitose ligeira. Do total dos animais da amostra 56% não estavam infectados com nenhum dos agentes pesquisados. Foi encontrada associação estatística apenas entre a presença de FIV e a presença de *M. haemofelis*.

Uma vez que não se conhece ainda o papel dos felinos na epidemiologia de parte das doenças zoonóticas aqui descritas, a realização de mais estudos, com amostras de maiores dimensões serão necessários para que esse papel possa ser esclarecido e eventualmente estabelecido.

**Palavras-chave:** *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *M. haemofelis*, *L. infantum*, FIV, FeLV, vectores artrópodes.

## ABSTRACT

### **Detection of *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Mycoplasma haemofelis* and *Leishmania infantum* in stray cats, and its relation to the presence of retroviruses and the symptoms manifested**

The prevalence of infectious diseases on cats is related with the density and the size of the population indwells. The objective of this work was to determinate the prevalence of the feline immunodeficiency virus (FIV), feline leukemia virus (FeLV), *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Mycoplasma haemofelis* and *Leishmania infantum* on a feline population of a private association in Moita, to relate its presence with the clinical signs and understand how they relate between them.

Within the 50 cats, 22% were FIV positive and 10% FeLV positive in serological tests (Speed<sup>®</sup> Duo FeLV/FIV, Virbac, Portugal). The search of *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp. e *Rickettsia* spp. was performed using conventional polymerase chain reaction (PCR) and reveled positive bands for *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp. in 2% of the animals and bands compatibles with the presence of *Rickettsia* spp. on 16% of them. The search for *M. haemofelis*. e *L. infantum* was performed with *real-time* PCR witch the prevalence was 4% and 2%, respectively.

The only association with statistic meaning ( $p < 0,05$ ) between the searched agents and the animals' symptoms was the presence of stomatitis on the FIV or FeLV infected animals.

The animal with *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp., had a mild dehydration, superiors and inferiors breath sounds, polycythemia and mild lymphocytosis. No cases of felines infected by *Rickettsia* spp. have been reported, however in the eight suspicious animals the more common alteration were mild gingivitis, ocular discharge and conjunctivitis. Of the two animals with *M. haemofelis*, one presented bilateral ocular discharge and conjunctivitis and the other had increased popliteal lymphnodes and a severe stomatitis. None of them had alterations on the blood count. The animal with *L. infantum* DNA showed no cutaneous, ocular or systemic signs of infection and the only alteration on blood count was mild lymphocytosis.

Of the whole sample, 56% of the animals were not infected with none of the searched agents. It was only found a statistic association between the presence of FIV and the presence of *M. haemofelis*.

Felines' role on the epidemiology on some of the zoonotic diseases discussed isn't yet clear, therefore more studies and with bigger samples are required.

**Keywords:** *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *M. haemofelis*, *L. infantum*, FIV, FeLV, arthropods vectors.

## LISTA DE COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS

Os resultados que serviram de base à realização da presente dissertação de mestrado, são parte de um estudo mais alargado realizado, cuja informação obtida foi submetida ao V Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias, que decorreu entre 13 e 15 de Outubro de 2011, nas instalações do IRNB – EZN, Vale de Santarém, Portugal.

- Martins, T., Rodrigues, C.B., Duarte, A., Alves, A.C., Braz, B.S., Tavares, L.. *Ehrlichia spp., Anaplasma spp., Rickettsia spp., Leishmania spp. e Mycoplasma haemofelis em gatos errantes, Moita, Setúbal, Portugal* (ANEXO I).

- Rodrigues, C.B., Martins, T., Duarte, A., Alves, A.C., Braz, B.S., Tavares, L. *Infecção viral e informação clínica em gatos errantes, Moita, Setúbal, Portugal*. Comunicação oral (ANEXO II).

- Rodrigues C.B., Martins T., Martins M., Duarte A., Braz, B.S., Alves, A.C., Tavares L. *Detecção de leveduras na cavidade oral de gatos errantes, Setúbal, Portugal*. Comunicação em painel (ANEXO III e IV):

## ÍNDICE GERAL

|  |     |
|--|-----|
| Agradecimentos.....  | i   |
| Resumo .....   | ii  |
| Abstract .....   | iii |
| Lista de Comunicações Científicas .....  | iv  |
| Índice Geral .....   | v   |
| Índice de Figuras .....  | ix  |
| Índice de Gráficos.....  | ix  |
| Índice de Tabelas .....  | x   |
| Lista de Abreviaturas .....  | xi  |
| Capítulo I – Actividades Desenvolvidas .....   | 1   |
| 1. Actividades desenvolvidas durante o estágio curricular.....   | 1   |
| 2. Actividades desenvolvidas no âmbito da componente prática da presente dissertação de mestrado ..... | 3   |
| 3. Comunicação científica dos resultados obtidos no estudo experimental .....                          | 3   |
| Capítulo II- Revisão Bibliográfica .....   | 4   |
| 1. Introdução .....  | 4   |
| 2. Vírus da Leucemia Felina e Vírus da Imunodeficiência Felina.....                                    | 4   |
| 2.1. Etiologia.....  | 4   |
| 2.2. Epidemiologia .....   | 7   |
| 2.2.1. Prevalência .....   | 7   |
| 2.2.2. Vias de transmissão .....   | 8   |
| 2.2.3. Factores de risco.....  | 9   |
| 2.3. Patogenia .....   | 10  |
| 2.3.1. FeLV .....  | 10  |
| 2.3.2. FIV .....   | 11  |
| 2.4. Sinais clínicos .....   | 13  |
| 2.4.1. Sinais Clínicos associados ao FeLV .....  | 13  |
| 2.4.2. Sinais Clínicos associados ao FIV.....  | 14  |
| 2.5. Diagnóstico .....   | 16  |
| 2.5.1. Métodos serológicos.....  | 16  |
| 2.5.1.1. <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> (ELISA) .....                                       | 17  |
| 2.5.1.2. Imunofluorescência Indirecta (IFI).....   | 17  |
| 2.5.1.3. <i>Western Blot</i> .....   | 17  |
| 2.5.1.4. Falsos positivos e falsos negativos em testes serológicos .....                               | 18  |
| 2.5.2. Métodos moleculares .....   | 19  |
| 2.5.3. Métodos de isolamento viral .....   | 20  |
| 2.5.4. Outros métodos auxiliares de diagnóstico .....  | 20  |
| 2.6. Tratamento .....  | 21  |
| 2.6.1. Terapia antiviral.....  | 21  |
| 2.6.1.1. Zidovudina, AZT (3'-azido-2', 3'-didesoxitimidina) .....                                      | 21  |
| 2.6.1.2. Lamivudina, 3TC.....  | 22  |
| 2.6.1.3. Outros antivirais.....  | 22  |
| 2.6.2. Terapia imunomoduladora.....  | 22  |

|  |    |
|--|----|
| 2.6.2.1. Acemannan.....  | 22 |
| 2.6.2.2. Proteína A de <i>Staphylococcus</i> (SPA).....                          | 23 |
| 2.6.2.3. Interferões.....  | 23 |
| 2.6.3. Tratamento de Suporte.....  | 24 |
| 2.6.3.1. Eritropoietina recombinante humana (Rh-EPO) .....                       | 25 |
| 2.6.3.2. Factor recombinante humano estimulante das colónias de macrófagos e. 25 |    |
| 2.7. Maneio e Prevenção .....  | 25 |
| 2.8. Vacinação .....   | 27 |
| 2.8.1. Vacinação Geral.....  | 27 |
| 2.8.2. Vacinação FeLV .....  | 27 |
| 2.8.3. Vacinação FIV .....   | 28 |
| 2.9. Prognóstico.....  | 29 |
| 3. <i>Ehrlichia</i> spp. e <i>Anaplasma</i> spp.....                             | 29 |
| 3.1. Etiologia, Epidemiologia e Ciclo de Vida .....                              | 29 |
| 3.3. Patogenia.....  | 31 |
| 3.3.1. Patogenia de <i>Ehrlichia canis</i> .....                                 | 32 |
| 3.3.2. Patogenia de <i>A. phagocytophilum</i> .....                              | 33 |
| 3.4. Sinais clínicos .....   | 33 |
| 3.5. Diagnóstico .....   | 34 |
| 3.5.1. Serológico .....  | 34 |
| 3.5.2. Molecular.....  | 35 |
| 3.5.3. Métodos de exame directo .....  | 35 |
| 3.5.4. Cultura celular .....   | 36 |
| 3.5.5. Alterações hematológicas e bioquímicas.....                               | 36 |
| 3.6. Tratamento .....  | 36 |
| 3.7. Importância em Saúde Pública .....  | 37 |
| 4. <i>Rickettsia</i> spp.....  | 38 |
| 4.1. Etiologia.....  | 38 |
| 4.2. Epidemiologia .....   | 38 |
| 4.3. Patogenia e Ciclo de Vida.....  | 40 |
| 4.4. Sinais clínicos .....   | 41 |
| 4.5. Diagnóstico .....   | 41 |
| 4.6. Tratamento .....  | 42 |
| 4.7. Importância em Saúde Pública .....  | 42 |
| 5. <i>Mycoplasma haemofelis</i> .....  | 43 |
| 5.1. Etiologia.....  | 43 |
| 5.2. Epidemiologia .....   | 43 |
| 5.3. Transmissão .....   | 44 |
| 5.4. Patogenia.....  | 44 |
| 5.5. Sinais Clínicos .....   | 45 |
| 5.6. Factores de risco para a infecção por <i>M. haemofelis</i> .....            | 46 |

|  |    |
|--|----|
| 5.7. Diagnóstico .....   | 46 |
| 5.7.1. Observação do parasita em esfregaço sanguíneo .....         | 46 |
| 5.7.2. Molecular.....  | 47 |
| 5.7.3. Outros métodos de diagnóstico: .....                        | 47 |
| 5.7.3.1. Teste de <i>Coomb's</i> .....                             | 47 |
| 5.7.3.2. Teste de retrovírus.....                                  | 48 |
| 5.7.3.3. Alterações hematológicas e bioquímicas .....              | 48 |
| 5.8. Tratamento .....  | 48 |
| 5.8.1. Antibióticos.....   | 48 |
| 5.8.2. Glucocorticóides.....                                       | 49 |
| 6. Leishmaniose Felina .....                                       | 50 |
| 6.1. Etiologia.....  | 50 |
| 6.2. Epidemiologia .....   | 50 |
| 6.3. Zimodemes de <i>Leishmania</i> .....                          | 51 |
| 6.4. Ciclo de vida .....   | 52 |
| 6.5. Outras formas de transmissão .....                            | 53 |
| 6.6. Patogenia .....   | 53 |
| 6.7. Factores de risco em felinos/Susceptibilidade à infecção..... | 54 |
| 6.8. Sinais Clínicos .....   | 55 |
| 6.9. Diagnóstico .....   | 55 |
| 6.9.1. Métodos parasitológicos.....                                | 55 |
| 6.9.2. Métodos serológicos.....                                    | 56 |
| 6.9.3. Métodos moleculares .....                                   | 57 |
| 6.9.4. Alterações laboratoriais .....                              | 58 |
| 6.10. Tratamento.....  | 58 |
| 6.11. Importância em Saúde Pública.....                            | 58 |
| 7. Controlo de Doenças Transmitidas por Vectores.....              | 59 |
| 7.1. Controlo de infecção por pulgas.....                          | 60 |
| 7.2. Controlo de infecção por ixodídeos .....                      | 61 |
| 7.3. Falhas no controlo de pulgas e ixodídeos: .....               | 62 |
| 7.4. Controlo de picada de flebótomos.....                         | 62 |
| Capítulo III- Estudo Experimental:.....                            | 63 |
| 1. Desenho Experimental .....                                      | 63 |
| 1.1. Objectivos .....  | 63 |
| 1.2. Material e Métodos .....                                      | 63 |
| 1.2.1. População em estudo e instalações .....                     | 63 |
| 1.2.2. Caracterização da amostra populacional.....                 | 64 |
| 1.2.2.1. Sexo .....  | 64 |
| 1.2.2.2. Idade.....  | 65 |
| 1.2.2.3. Origem.....   | 65 |
| 1.2.2.4. Raça .....  | 65 |

|   |    |
|---|----|
| 1.2.3. Exame clínico e Colheita de Amostras .....   | 65 |
| 1.2.4. Processamento das amostras .....   | 66 |
| 1.2.5. Hemograma.....   | 66 |
| 1.2.6. Métodos serológicos.....   | 66 |
| 1.2.7. Métodos moleculares (PCRc e <i>real-time</i> PCR).....   | 66 |
| 1.2.8. Análise estatística.....   | 67 |
| 2. Resultados .....   | 68 |
| 2.1. Frequência absoluta, prevalência aparente e prevalência real dos agentes testados na amostra populacional..... | 68 |
| 2.2. Caracterização dos indivíduos quanto aos agentes pesquisados .....   | 70 |
| 2.2.1. FIV e FeLV .....   | 70 |
| 2.2.1.1. Alterações clínicas .....  | 70 |
| 2.2.1.2. Alterações hematológicas .....   | 72 |
| 2.2.1.3. Influência dos factores: idade e sexo .....  | 72 |
| 2.2.1.4. Associação entre a presença de FIV ou FeLV e a presença de hemoparasitas .....                             | 73 |
| 2.2.2. <i>Ehrlichia</i> spp. e <i>Anaplasma</i> spp.....  | 74 |
| 2.2.3. <i>Rickettsia</i> spp. ....  | 74 |
| 2.2.3.2. Alterações hematológicas .....   | 75 |
| 2.2.4. <i>M. haemofelis</i> .....   | 75 |
| 2.2.4.1. Alterações clínicas .....  | 75 |
| 2.2.4.2. Alterações hematológicas .....   | 75 |
| 2.2.5. <i>L. infantum</i> .....   | 76 |
| 2.2.5.1. Alterações clínicas .....  | 76 |
| 2.2.5.2. Alterações hematológicas .....   | 76 |
| 3. Discussão dos resultados.....  | 77 |
| 3.1. FIV e FeLV.....  | 77 |
| 3.1.1. Prevalências obtidas .....   | 77 |
| 3.1.2. Alterações clínicas e hematológicas .....  | 79 |
| 3.1.3. Influência dos factores: idade e sexo.....   | 81 |
| 3.1.4. Associação com outros agentes .....  | 82 |
| 3.2. <i>Ehrlichia</i> spp./ <i>Anaplasma</i> spp. ....  | 82 |
| 3.2.1. Prevalências obtidas .....   | 82 |
| 3.2.2. Factores de risco .....  | 83 |
| 3.2.3. Alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas .....   | 83 |
| 3.3. <i>Rickettsia</i> spp.....   | 84 |
| 3.3.1. Prevalências obtidas .....   | 84 |
| 3.3.2. Alterações clínicas e hematológicas .....  | 85 |
| 3.4. <i>M. haemofelis</i> .....   | 86 |
| 3.4.1. Prevalências obtidas .....   | 86 |
| 3.4.2. Associação com outros agentes .....  | 87 |

|  |     |
|--|-----|
| 3.4.3. Alterações clínicas e hematológicas.....  | 87  |
| 3.5. <i>L. infantum</i> .....                    | 88  |
| 3.5.1. Prevalências.....                         | 88  |
| 3.5.2. Alterações clínicas e laboratoriais ..... | 90  |
| 4. Considerações finais .....                    | 92  |
| Bibliografia.....                                | 95  |
| Anexos .....                                     | 114 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> Desenho esquemático de um virião de retrovírus, mostrando a localização das várias estruturas e proteínas que o constituem.....       | 5  |
| <b>Figura 2</b> Instalações de um dos três gatis da AAAAMoita (Original).....   | 63 |
| <b>Figura 3</b> Canis em que estão alojados os canídeos da AAAAMoita (Original).....  | 64 |
| <b>Figura 4</b> Teste rápido Speed® Duo FeLV/FIV da Virbac com resultado positivo para FIV (Original).....  | 68 |
| <b>Figura 5</b> Resultados do PCRC de <i>Rickettsia</i> spp. (original). .....  | 69 |
| <b>Figura 6</b> Resultados do <i>real time</i> PCR de <i>M. haemofelis</i> (Original).....  | 69 |
| <b>Figura 7</b> Resultados do <i>real time</i> PCR de <i>L. infantum</i> (Original). .....  | 70 |
| <b>Figura 8 e Figura 9</b> Exemplos de animais FIV positivos com estomatite grave (Original)...   | 80 |
| <b>Figura 10</b> Felino diagnosticado com leishmaniose, manifestando sinais clínicos .....  | 91 |
| <b>Figura 11</b> Felino da AAAAMoita em que houve amplificação de ADN de <i>L. infantum</i> , não manifestando qualquer sinal clínico (Original)..... | 91 |

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

|  |    |
|--|----|
| <b>Gráfico 1</b> Frequência relativa das consultas assistidas em cada especialidade.....                               | 1  |
| <b>Gráfico 2</b> Frequência relativa das cirurgias assistidas em cada especialidade cirúrgica. ....                    | 2  |
| <b>Gráfico 3</b> Distribuição dos animais da amostra por sexo.....   | 64 |
| <b>Gráfico 4</b> Distribuição dos animais FIV e FeLV positivos pelas idades.....                                       | 72 |
| <b>Gráfico 5</b> Distribuição dos animais FIV e FeLV positivos pelos sexos.....  | 73 |
| <b>Gráfico 6</b> Distribuição por idades dos animais positivos/negativos a pelo menos um dos agentes pesquisados. .... | 76 |

## ÍNDICE DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1</b> Infecções e neoplasias reportadas em animais com infecção persistente por FeLV. (Tabela adaptada de Hartmann, 2004 & Lutz et al., 2009). ..... | 14 |
| <b>Tabela 2</b> Lista de produtos antiparasitários externos com acção em pulgas e ixodídeos disponíveis em Portugal.....                                       | 60 |
| <b>Tabela 3</b> Distribuição dos animais da amostra por idades. ....   | 65 |
| <b>Tabela 4</b> Frequência absoluta, prevalência aparente e prevalência real dos agentes testados na amostra populacional. ....                                | 68 |
| <b>Tabela 5</b> Associação entre infecção por FIV e FeLV e os sinais clínicos mais comuns (frequência absoluta). ....  | 70 |
| <b>Tabela 6</b> Associação entre infecção por FIV e FeLV e os sinais clínicos mais comuns (frequência relativa, %). ....                                       | 71 |
| <b>Tabela 7</b> Alterações de hemograma apresentadas pelos animais FeLV positivos. ....  | 72 |
| <b>Tabela 8</b> Associação entre a presença de FIV/FeLV e os hemoparasitas pesquisados (frequência absoluta). ....   | 73 |
| <b>Tabela 9</b> Alterações de hemograma apresentadas pelo animal positivo a <i>Ehrlichia</i> spp. e <i>Anaplasma</i> spp. ....                                 | 74 |
| <b>Tabela 10</b> Alterações clínicas apresentadas pelos animais suspeitos de infecção por <i>Rickettsia</i> spp.. ....   | 74 |
| <b>Tabela 11</b> Alterações de hemograma apresentadas pelos animais suspeitos de infecção por <i>Rickettsia</i> spp.. ....                                     | 75 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg - Micrograma  
µL - Microlitro  
µm - Micrómetro  
3TC - Lamivudina  
AAAAMoita - Associação dos Amigos dos Animais Abandonados da Moita  
ADN - Ácido desoxirribonucleico  
ALP - Fosfatase alcalina  
ALT - Alanina transaminase  
AML - Área Metropolitana de Lisboa  
ARN- Ácido ribonucleico  
AZT - Zidovudina  
BHI - Meio de cultura agár de Infusão de Cérebro e Coração  
BID - Do latim *bis in die* (administração a cada 12 horas)  
CEL - Programa de captura-esterilização-libertação  
CIISA - Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal  
DAT - Teste de Aglutinação Directa  
DEB-ELISA - *Definitive Epitope-Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*  
DU - Proteína dUTPase  
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético  
ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*  
EMTM - Meio de cultura Tobie Modificado com Solução de Evan  
EPO - Eritropoietina  
EUA - Estados Unidos da América  
FeLV - Vírus da Leucemia Felina  
FIV - Vírus da Imunodeficiência Felina  
FMV- Faculdade de Medicina Veterinária  
GGT- Gama-glutamil transferase  
GM-CSF - factor estimulante das colónias de macrófagos e granulócitos  
HCT - Hematócrito  
HGM - Hemoglobina globular média  
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana  
IC - Intervalo de confiança  
IFI - Imunofluorescência Indirecta  
IFN-α-hu - Interferão-α humano  
IgG - Imunoglobulina G  
IL - interleucina  
IM - Via intramuscular

IN - Integrase  
INF - Interferão  
IP - Via intraperitoneal  
IRC - Insuficiência renal crónica  
IV - Via endovenosa  
Kg - Quilograma  
*L. infantum* - *Leishmania infantum*  
LCan - Leishmaniose canina  
LFel- Leishmaniose felina  
LTRs - *Long terminal repeats*  
LVH- Leishmaniose visceral humana  
*M. haemofelis* - *Mycoplasma haemofelis*  
MCHC - Concentração de hemoglobina corpuscular média  
Mg - Miligrama  
MSF - *Mediterranean spotted fever*  
PAAF - Punção aspirativa de agulha fina  
PCR - *Polymerase Chain Reaction*  
PCRC - PCR convencional  
Pg – picograma  
PGE-2 - prostaglandina E2  
PIF - Peritonite infecciosa felina  
PO - Via oral  
PR - Protease  
Rh-EPO - Eritropoietina recombinante humana  
rh-GM-CSF -Factor recombinante humano estimulante das colónias de macrófagos e granulócitos  
SC - Via subcutânea  
SID - Do latim *od omnie die* (administração de 24 em 24 horas)  
SIDA - Síndrome de Imunodeficiência Adquirida  
SNC - Sistema Nervoso Central  
SPA - Proteína A do *Staphylococcus*  
TID - Do latim *ter in die* (administração a cada oito horas)  
TNF- $\alpha$  - factor de necrose tumoral alfa  
TR - transcriptase reversa  
UI - Unidade internacional  
UTL - Universidade Técnica de Lisboa  
VCM - Volume corpuscular médio

## CAPÍTULO I – ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS

### 1. Actividades desenvolvidas durante o estágio curricular

O estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária foi realizado no Hospital Veterinário SosVet, entre o dia 27 de Setembro de 2010 e o dia 31 de Março de 2011, sob a orientação da Dr<sup>a</sup> Ana Clotilde Alves e co-orientação da Doutora Berta São Braz.

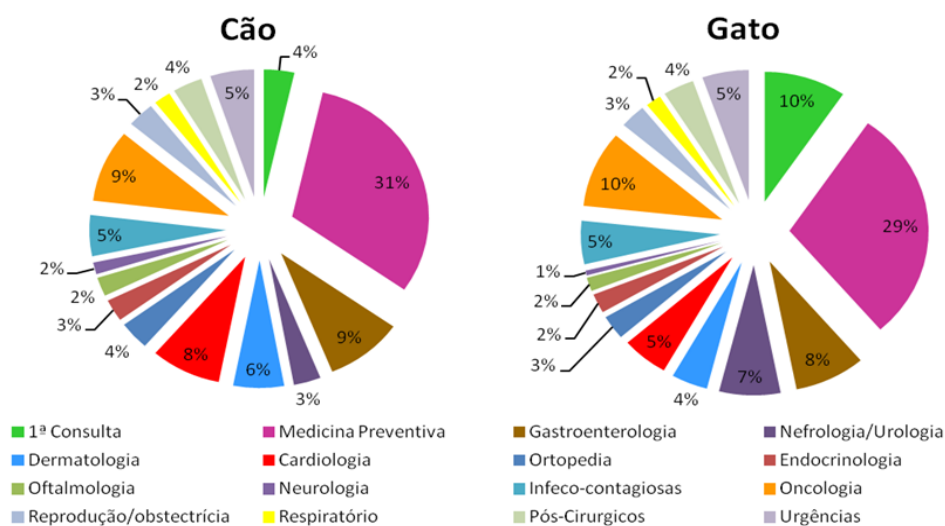
O hospital está localizado na Cova da Piedade, concelho de Almada e está em funcionamento 24h por dia. No período diurno (período em que foi realizado o estágio curricular), o corpo clínico é constituído por duas enfermeiras veterinárias e cinco médicos veterinários fixos, e por três médicos veterinários que realizam consultas e cirurgias de referência, segundo marcação, nas áreas de oftalmologia, ortopedia e medicina de animais exóticos. O horário realizado obedeceu a um plano de rotatividade semanal entre o turno das 9h às 17h e o turno das 15h às 23h, de forma a que os fins-de-semana e feriados fossem também feitos de forma rotativa (10h às 22h).

O estágio foi desenvolvido essencialmente na área de clínica e cirurgia de animais de companhia, com o objectivo de aplicar e desenvolver os conhecimentos teóricos e práticos adquiridos ao longo do MIMV. Durante o período de estágio foram realizadas actividades nas diversas áreas da clínica de animais de companhia, mas também de animais exóticos: Medicina Interna, Internamento, Cirurgia e Imagiologia e Laboratório.

Durante as consultas foi permitido acompanhar/auxiliar ou realizar a anamnese, história clínica, contenção, exame físico, colheita de material biológico (recolha de sangue, cistocentese, raspagens cutâneas, recolha de pêlos para cultura, punção aspirativa de agulha fina (PAAF), entre outros) e realização de testes rápidos (FIV, FeLV e *Leishmania*).

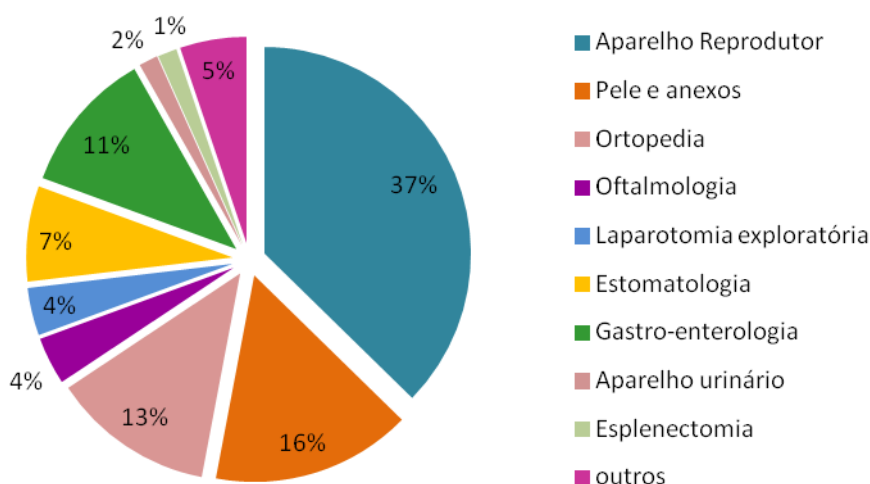
Foi ainda possível alargar o contacto com os proprietários dos animais permitindo desenvolver a capacidade de comunicação com os mesmos. As espécies canina e felina foram as espécies mais atendidas (Gráfico 1).

**Gráfico 1** Frequência relativa das consultas assistidas em cada especialidade.



Em cirurgia foi possível participar na preparação pré-cirúrgica do animal (preparação e administração da pré-medicação e anestesia, tricotomia, lavagem e desinfecção do animal) e preparação do material a utilizar. Durante a cirurgia foram desenvolvidas funções de monitorização anestésica, e ajudante de cirurgião em diversas cirurgias (Gráfico 2). Foi ainda possível praticar diferentes suturas e realizar como cirurgiã principal algumas cirurgias nomeadamente ovariectomias e orquiectomias electivas em felinos e orquiectomias electivas em canídeos.

**Gráfico 2** Frequência relativa das cirurgias assistidas em cada especialidade cirúrgica.



O Internamento tornou-se talvez a área mais enriquecedora no sentido prático, pois foi onde foram adquiridos conhecimentos preciosos na realização de diversos procedimentos (alguns deles básicos mas muito importantes): limpeza, alimentação, contenção e monitorização dos animais internados, administração de medicação pelas diferentes vias (oral, intra-muscular (IM), endovenosa (IV) e subcutânea (SC)), colheita de sangue, colocação de cateteres endovenosos, subcutâneos e intra-ósseos, colocação de tubo naso-gástrico e esofágico, medição de pressão arterial, oxigenoterapia, fisioterapia, realização de drenagens de derrames (torácicos, pericárdicos e abdominais), transfusões sanguíneas, curvas de glicémia, inseminação artificial, pensos, enemas, algiações e cistocenteses.

Na área da Imagiologia foram alargados os conhecimentos principalmente nas áreas de radiologia, ecografia e endoscopia. No que respeita à radiologia, foi permitido auxiliar e realizar radiografias de tecidos moles (torácicas e abdominais) e de tecido ósseo (esqueleto axial e apendicular), melhorando os conhecimentos acerca do correcto posicionamento do animal, constantes radiográficas e utilidade deste meio de diagnóstico. Através do ecógrafo, foram observadas diversas ecocardiografias e ecografias abdominais, bem como diversos procedimentos ecoguiados: punção aspirativa de estruturas internas, cistocentese, toracocentese, abdominocentese e pericardiocentese. Foi ainda permitido praticar a técnica ecográfica em alguns animais. A nível de endoscopia foram assistidas várias endoscopias

gástricas e traqueais, e ainda a uma rinoscopia e artroscopia. Outros métodos imagiológicos foram utilizados em menor escala como o electrocardiograma simples e *Holter*. A área do laboratório do hospital está equipada com aparelhos sofisticados que permitem a realização em pouco tempo de hemograma, bioquímicas sanguíneas e ionograma. Outros exames complementares disponíveis são urianálise, coprologia, cultura de fungos, exame citológico após coloração, esfregaço sanguíneo e de medula óssea, electrocardiograma simples e *Holter*. Ao longo do estágio foram ainda realizadas algumas eutanásias e efectuadas algumas necrópsias.

O facto de o hospital ser constituído por uma equipa grande, com enfermeiras e médicos veterinários com diferentes áreas de interesse e diferentes métodos de trabalho, tornou este estágio bastante enriquecedor no contexto pessoal, e acima de tudo profissional. Permitiu adquirir conhecimentos teóricos e práticos essenciais à prática clínica como futura médica veterinária de animais de companhia.

## **2. Actividades desenvolvidas no âmbito da componente prática da presente dissertação de mestrado**

A colheita das amostras para a realização do presente trabalho decorreu após a conclusão do estágio curricular com a ajuda de uma colega estagiária, e por vezes, de alguns elementos da equipa do Hospital Veterinário SosVet. O processamento das amostras e a realização das técnicas de diagnóstico laboratoriais utilizadas, nomeadamente a *polymerase chain reaction* (PCR) e o *real time* PCR, decorreram no Laboratório de Virologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa, com o acompanhamento da Professora Doutora Ana Duarte.

Esta componente prática permitiu não só desenvolver as capacidades de maneo, contenção e colheita de sangue em felinos, mas também aprofundar os conhecimentos no que respeita a trabalho laboratorial.

## **3. Comunicação científica dos resultados obtidos no estudo experimental**

Os resultados obtidos no presente estudo experimental foram apresentados em comunicação oral e em painel no V Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias, que decorreu entre 13 e 15 de Outubro de 2011, nas instalações do IRNB – EZN, Vale de Santarém, Portugal (ANEXO I).

## CAPÍTULO II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. Introdução

É sabido que em gatis, e alojamentos de grupo, a prevalência dos agentes infecciosos está associada à densidade da população que neles habita (Foley, 2006), sendo, muitas vezes, a propagação daqueles agentes inevitável, dado o seu carácter ubiqüitário e a sua capacidade de sobrevivência fora do hospedeiro.

As chamadas “doenças transmitidas por vectores” são doenças provocadas por parasitas, bactérias ou vírus que afectam hospedeiros vertebrados, através da picada de vectores artrópodes hematófagos, principalmente ixodídeos, pulgas e mosquitos (Beugnet & Marie, 2009; Little 2011). Parte destas doenças, apesar de pontualmente descritas em felinos, não estão tão estudadas como em canídeos no que respeita à sua prevalência e à sintomatologia que determinam.

Assim, no presente trabalho pretende-se determinar a prevalência de agentes como *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Leishmania infantum* e *Mycoplasma haemofelis*, bem como a incidência de retrovírus como o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e o Vírus da Leucemia Felina (FeLV), em felinos de uma associação particular (Associação dos Amigos dos Animais Abandonados da Moita - AAAAMoita). Pretende-se ainda observar de que forma e com que frequência os referidos hemoparasitas afectam os felinos, e qual a influência da presença de FIV e FeLV, conhecidos pela imunossupressão que induzem, na manifestação clínica dessas infecções.

Este estudo ambiciona ainda a sensibilização dos colaboradores voluntários da associação para a importância de boas práticas de manejo neste tipo de ambientes, no sentido de controlar a disseminação de agentes infecciosos.

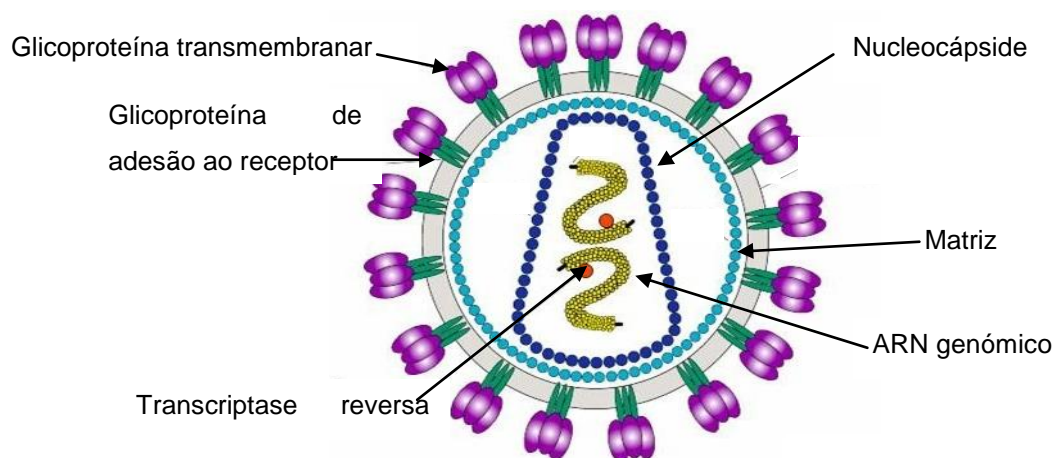
Para enquadramento do problema será inicialmente apresentada uma revisão bibliográfica à qual se seguirá a apresentação do desenvolvimento experimental e considerações finais.

### 2. Vírus da Leucemia Felina e Vírus da Imunodeficiência Felina

#### 2.1. Etiologia

O Vírus da Leucemia Felina (FeLV) e o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) são vírus de ácido ribonucleico (ARN) de cadeia simples, sem envelope que pertencem à família *Retroviridae* (Figura 1) (Donovan, 1999; Hosie et al., 2009; Lutz et al., 2009).

**Figura 1** Desenho esquemático de um virião de retrovírus, mostrando a localização das várias estruturas e proteínas que o constituem. Adaptado de: <http://www.stanford.edu/group/virus/retro/2005gongishmail/HIV.html>



A replicação destes vírus, designados de retrovírus depende da presença de uma enzima, a transcriptase reversa (TR), que transcreve reversamente as cadeias ARN virais em cadeias de ácido desoxirribonucleico (ADN), que passam a designar-se de provírus e são incorporados no genoma das células do hospedeiro (Donovan, 1999; Lutz et al., 2009). A presença dos retrovírus não é letal para a célula hospedeira, no entanto o provírus incorporado é passado às células filhas durante o processo de replicação celular para toda a vida do animal (Bendinelli et al., 1995; Lutz et al., 2009). É esta capacidade de se tornarem parte integrante do ADN do hospedeiro que torna a infecção por estes agentes impossível de reverter, uma vez que todas as células do hospedeiro teriam de ser reconhecidas e destruídas para que a infecção fosse eliminada (Hartmann, 2006).

O FeLV, descrito pela primeira vez em 1964 (Cohn, 2007) numa casa onde vários gatos sofriam de leucemia (de Mari, Maynard, Sanquer, Lebreux, & Eun, 2004), é um retrovírus da sub-família *Oncornavirinae*, e género *Gammaretroviridae* (de Mari et al., 2004; Torres, Mathiason, & Hoover, 2005; Hofmann-Lehmann et al., 2006; Costa & Norsworthy, 2011).

O FIV pertencente ao género *Lentivirus* (em latim, *lenti* significa lento) (Donovan, 1999) foi descoberto em 1986 e descrito pela primeira vez em 1987 na Califórnia, num gatil onde vários animais apresentavam sintomas semelhantes aos descritos na infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) em humanos (Bendinelli et al., 1995; Cohn, 2007; Grace, 2011). Por possuir estrutura, ciclo de vida e patogenia semelhante aos restantes lentivírus, é visto como o modelo animal na investigação de tratamento da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) humana (Hartmann, 1998; Hosie et al., 2009).

Os retrovírus são constituídos por três genes principais: *gag*, *pol* e *env* (Hartmann, 2006; Lutz et al., 2009; Hosie et al., 2009). O gene *gag* (*group-associated antigen*) codifica proteínas estruturais internas, incluindo a p27 no caso do FeLV e a p25 no caso do FIV, importantes para o diagnóstico (Hosie et al., 2009; Lutz et al., 2009). Nos animais infectados

com FeLV, a p27 é produzida em quantidades excessivas, estando presente em grandes quantidades no citoplasma de células infectadas, assim como no soro, saliva e lágrimas dos animais (Hartmann, 2006). O gene *pol* (*polymerase*) codifica várias proteínas com ações enzimáticas importantes para a replicação viral, nomeadamente a TR, responsável pela transcrição das cadeias de ARN dos vírus em cadeias ADN, a protease (PR), determinante na maturação do vírus e a integrase (IN) que une de forma covalente o ADN do retrovírus (provírus) ao ADN da célula hospedeira. O gene *pol* do FIV, codifica ainda uma proteína adicional, a dUTPase (DU), característica das lentiviruses de não-primatas (Elder et al., 1992; Hartmann, 2006; Hosie et al., 2009; Lutz et al., 2009). Finalmente, o gene *env* (*envelope*) codifica proteínas transmembranárias e do envelope. No caso do FeLV, codifica a glicoproteína gp70 e a proteína transmembranária p15. A gp70 define o subgrupo viral e parece ter importância na indução de imunidade, sendo importante na resistência natural ao vírus e um alvo para a produção de vacinas (Hartmann, 2006). Pensa-se que a p15 interfere na imunidade celular do hospedeiro, facilitando a persistência viral (Hartmann, 2006). No caso do FIV, o gene *env* codifica a glicoproteína gp120 e a proteína transmembranária gp41, principais determinantes da diversidade viral entre os isolados (Olmsted, Hirsch, Purcell & Johnson, 1989).

Os genes *gag*, *pol* e *env* são flanqueados de ambos os lados por *long terminal repeats* (LTRs), que são sequências repetidas com função reguladora da expressão e replicação viral (Hartmann, 2006).

Os retrovírus, tal como a maioria dos vírus ARN estão sujeitos a um elevado grau de variação genética sendo a que se encontra no FeLV inferior à do FIV (Dunham & Graham, 2008).

Existem três principais subgrupos virais de FeLV com base nas diferentes sequências da glicoproteína do envelope gp70 do gene *env*: FeLV-A, FeLV-B e FeLV-C (Nakata et al., 2003; Tandon et al., 2005; Arjona et al., 2007; Hofmann-Lehmann et al., 2007). O FeLV-A é o subtipo mais contagioso, menos patogénico dos subtipos e o único que pode ser transmitido por via horizontal de gato para gato na natureza (Hartmann, 2006; Hofmann-Lehmann et al., 2007). Este subtipo é ubiqüitário e está presente em todas as infecções isoladamente ou em combinação com os subtipos B e C (Nakata et al. 2003; Tandon, et al., 2005; Arjona et al., 2007; Hofmann-Lehmann et al., 2007; Lutz et al., 2009). O subtipo B é originado a partir de uma recombinação do FeLV-A com sequências retrovirais endógenas existentes no ADN normal dos felinos (Nakata et al, 2003; Hartmann, 2006; Arjona et al., 2007; Hofmann-Lehmann, et al., 2007; Lutz et al., 2009) e o subtipo C resulta de mutações no gene *env*, em animais infectados com FeLV-A e FeLV-B (Nakata et al., 2003; Arjona et al., 2007; Hofmann-Lehmann et al., 2007; Lutz et al., 2009). Os subgrupos B e C são mais raros (principalmente o subgrupo C), estando o FeLV-B presente em cerca de 50% dos animais com FeLV e o FeLV-C em apenas 1% dos animais infectados (Tandon et al., 2005).

Os animais com FeLV-B têm tendência para desenvolver alterações malignas de origem linfóide (como linfoma e leucemia), enquanto os animais com FeLV-C estão mais associados ao desenvolvimento de anemias aplásicas (Hofmann-Lehmann et al., 2007; Costa & Norsworthy, 2011). Mais recentemente foi ainda descrito um quarto subgrupo denominado de FeLV T-linfotrópico (FeLV-T) (Hofmann-Lehmann et al., 2007), que tem origem no subgrupo A a partir de mutações e inserções no gene da glicoproteína de superfície (Hofmann-Lehmann et al., 2007). Este novo subgrupo inclui os vírus citopáticos com tropismo para as células T e causa depleção linfóide e imunodeficiência graves em gatos por ele infectados (Hofmann-Lehmann et al., 2007; Costa & Norsworthy, 2011).

No FIV, estão descritos cinco subtipos virais (A-E) (Sodora et al., 1994; Kakinuma et al., 1995; Pecoraro et al., 1996) de acordo com as diferenças (que podem ir até 30%) encontradas na região hipervariável do gene *env* (Pancino, Castelot, & Sonigo, 1995; Dunham, 2006). A frequência dos diferentes subtipos varia consoante a região geográfica (Dunham & Graham, 2008), mas os mais descritos em todo o mundo, nomeadamente na Europa, são o A e o B. O subtipo C é pouco frequente (Hosie et al., 2009) mas foi já encontrado nos Estados Unidos da América (EUA), Europa e Japão. O subtipo D foi apenas encontrado no Japão (Kakinuma et al., 1995) e o subtipo E na Argentina (Kakinuma et al., 1995; Pecorato et al., 1996). Recentemente, foi descrita a existência de dois novos subtipos virais, o subtipo F, encontrado nos EUA e Canadá e o subtipo U, encontrado na Nova Zelândia (Hayward, Taylor, & Rodrigo, 2007; Grace, 2011).

## **2.2. Epidemiologia**

### **2.2.1. Prevalência**

Os retrovírus afectam felinos domésticos e esporadicamente selvagens em todo o mundo (Lee, Levy, Gorman, Crawford, & Slater, 2002; Hosie et al., 2009; de Mari et al., 2004; Hartmann, 2006; Hofmann-Lehmann et al., 2006; Arjona et al., 2007) e são importantes causas de morbilidade e mortalidade em felinos domésticos (Dunham, 2006). A incidência do FeLV varia com a densidade populacional, estando descritos valores de prevalência que variam entre 1% a 8% em animais que não exibem sinais clínicos, e de 21% em animais clinicamente doentes (Hartmann, 2006). A prevalência deste vírus tem decrescido nas últimas décadas um pouco por todo o mundo, em principalmente devido à implementação de programas de testagem e isolamento dos animais positivos, mas também devido ao desenvolvimento de vacinas eficazes na prevenção da infecção (Levy, Scott, Lachtara, & Crawford, 2006; Sellon & Hartmann, 2006; Levy et al., 2008; Ford, 2008).

No caso do FIV, a prevalência não têm reduzido ao longo dos anos (Grace, 2011), são normalmente superiores às do FeLV, e mais variáveis consoante as zonas geográficas,

podendo ser de 1 a 14% em animais sem sinais clínicos e 44% em animais doentes (Hartmann, 1998; Grace, 2011).

Animais infectados com FIV têm uma probabilidade quatro vezes superior de vir a desenvolver infecção por FeLV, e animais infectados com ambos os vírus tendem a manifestar sinais clínicos mais exuberantes do que numa infecção única (Arjona et al., 2007).

### **2.2.2. Vias de transmissão**

O FeLV é um vírus cuja transmissão está dependente do contacto íntimo entre gatos infectados e gatos susceptíveis (Hartmann, 2006). A concentração do vírus na saliva é superior à do plasma, pelo que esta é o principal veículo de infecção (Vobis, D'Haese, Mehlhorn & Mencke, 2003; Vobis, D'Haese, Mehlhorn & Mencke, 2003b; Hartmann, 2006). Assim, comportamentos sociais (como higiene mútua, partilha de comedouros, bebedouros e camas ou utilização comum das liteiras) são a forma mais eficaz de transmissão (Vobis et al., 2003, 2003b; Colitz, 2005; Hartmann, 2006; Costa & Norsworthy, 2011). Outros fluidos corporais (como sangue, lágrimas, secreções nasais, fezes e urina) e mordidas podem também ser vias de transmissão (Hardy et al., 1976; Pacitti, Jarrett, & Hay, 1986; Vobis et al., 2003, 2003b). As pulgas foram também já consideradas potenciais fontes de transmissão *in vitro* e possivelmente *in vivo*, quer através das fezes, quer através de picadas, apesar de não existirem ainda estudos que comprovem que o vírus mantém a sua infecciosidade nestes vectores (Vobis et al., 2003, 2003b).

A via de transmissão natural do FIV mais comum é a parenteral, principalmente através de mordidas ou arranhões, por inoculação do próprio vírus ou de células infectadas, provenientes de saliva ou sangue de gatos com infecção activa (Dunham, 2006; Sellon & Hartmann, 2006; Hosie et al., 2009). A transmissão entre animais que habitem em conjunto mas cuja hierarquia está bem definida é pouco frequente, uma vez que raramente ocorrem conflitos entre eles (Hosie et al., 2009).

Experimentalmente este vírus pode também ser transmitido pelas vias endovenosa (IV), subcutânea (SC), intramuscular (IM) ou intraperitoneal (IP) (Sellon & Hartmann, 2006). A inoculação através das mucosas oral, rectal e vaginal foi também conseguida experimentalmente, no entanto a quantidade de vírus necessária para provocar infecção é muito superior à necessária para as vias parenterais, pelo que esta não é considerada de grande importância na transmissão natural do agente (Dunham, 2006; Sellon & Hartmann, 2006). A transmissão por via sexual, o principal modo de transmissão do HIV em humanos, parece ser pouco frequente no caso do FIV, apesar de o sêmen de animais infectados possuir com frequência partículas virais (Jordan et al., 1998).

Em ambos os retrovírus, pode ocorrer transmissão vertical, apesar de esta via não desempenhar um papel epidemiológico muito importante (Cohn, 2007). A transmissão pode

ocorrer via transplacentária, após o parto quando a mãe cuida e lambe as crias (principalmente no caso do FeLV) (Hartmann, 2006; Cohn, 2007; Levy et al., 2008), ou através do leite (Hardy et al., 1976; Vobis et al., 2003, 2003b; Colitz, 2005).

Isto pode acontecer em fêmeas infectadas aguda ou cronicamente e pode ocorrer que apenas parte da prole se torne infectada (Cohn, 2007). No FeLV, no caso da infecção ser *in utero*, é comum observar-se falha reprodutiva, reabsorção ou morte neonatal (Hartmann, 2006; Costa & Norsworthy, 2011), no entanto, cerca de 20% dos gatinhos infectados verticalmente, sobrevivem a este período e tornam-se adultos persistentemente infectados (Hartmann, 2006). Por tudo isto, caso exista uma fêmea com crias em que ela ou uma das crias seja positiva a um dos retrovírus, toda a família deve ser considerada infectada e mantida longe do contacto com outros felinos (Hartmann, 2006; Sellon & Hartmann, 2006). Nenhum destes retrovírus sobrevive mais do que poucos segundos fora do hospedeiro e ambos são facilmente destruídos por desinfectantes comuns, calor e desidratação (Hartmann, 2006), no entanto, a transmissão iatrogénica (agulhas contaminadas, fomites ou transfusão sanguínea) apesar de pouco comum pode também ocorrer (Cohn, 2007; Hosie et al., 2009; Lutz et al., 2009; Costa & Norsworthy, 2011).

### **2.2.3. Factores de risco**

Os grupos de risco para a infecção por FIV e por FeLV são diferentes (Hartmann, 2006). A infecção por FeLV está associada a contactos sociais “amigáveis”, enquanto a infecção por FIV está mais associada a comportamentos agressivos, principalmente mordidas (Hartmann, 2006). A proporção de animais com FeLV está distribuída mais ou menos equitativamente por ambos os sexos (Lee et al., 2002; Cohn, 2007), com ligeira superioridade do sexo masculino, provavelmente pelo facto de os machos desenvolverem mais o comportamento do deambular no exterior.

Apesar da infecção por FeLV estar reportada em animais de todas as idades, a susceptibilidade à infecção é superior em animais mais jovens do que em animais adultos (Hartmann, 2006; Cohn L. A., 2007; Ford, 2008), o que aparentemente pode ser explicado pelo facto de os receptores necessários para que o FeLV-A infecte as células alvo diminuam em gatos mais velhos, tornando a infecção nestes menos provável (Hartmann, 2006). Esta resistência pode também estar relacionada com a maturação da função dos macrófagos em gatos mais velhos (Hartmann, 2006). De referir que a resistência à infecção em animais mais velhos não é absoluta e depende da pressão de infecção (Hartmann, 2006). Outros factores de risco para a infecção por FeLV incluem a elevada densidade populacional e falta de higiene (Lutz et al., 2009).

O FIV é mais comum em animais adultos, machos, não esterilizados e com acesso ao exterior, presumivelmente por ser esse grupo de animais que desenvolvem comportamentos

mais agressivos associados a conflitos territoriais (Lee et al., 2002; Little, 2005; Dunham, 2006; Levy et al., 2006; Cohn, 2007; Grace, 2011).

Não existe predisposição por raças para a infecção por FeLV ou FIV, no entanto esta infecção é menos comum em animais de raça pura pois estes normalmente não têm acesso ao exterior (Hartmann, 2006; Sellon & Hartmann, 2006).

## **2.3. Patogenia**

### **2.3.1. FeLV**

A susceptibilidade à infecção por FeLV depende do sistema imunitário e idade do animal, bem como da patogenicidade do vírus, pressão de infecção e concentração viral com que o animal é infectado (Hartmann, 2006).

A entrada do vírus nas células-alvo está dependente da presença de um receptor de superfície, específico para cada subtipo viral, constituído por uma proteína transportadora de baixo peso molecular (Cheng, Anderson, & Overbaugh, 2007). Após a infecção inicial, que ocorre normalmente por via oronasal, o vírus replica-se no tecido linfóide local (área orofaríngea) (Hartmann, 2006; Hofmann-Lehmann et al., 2006; Collado et al., 2007; Levy et al., 2008). Alguns animais conseguem desenvolver uma resposta imunitária celular capaz de travar a replicação viral e eliminar completamente o vírus do organismo, ficando imunes a futuras re-infecções (Hartmann, 2006; Pinches et al., 2007). Nestes animais, não há replicação viral sistémica e não é possível identificar infecção por detecção de antigénio, sendo esta infecção denominada de infecção regressiva (Hartmann, 2006).

Nos animais incapazes de desenvolver uma resposta imunitária adequada, o vírus espalha-se sistemicamente através das células mononucleares (linfócitos e monócitos) e surge então a fase de virémia inicial da infecção progressiva (Hartmann, 2006; Rojko et al., 1979 citado por Levy et al., 2008). Nesta fase, que dura na maioria dos casos três a seis semanas (16 no máximo), a proteína p27 é detectável no plasma, o vírus espalha-se pelos tecidos alvo (timo, baço, linfonodos e glândulas salivares), e o animal é capaz de excretar o agente e de o transmitir a outros (Hartmann, 2006). Ainda nesta altura, alguns animais são capazes de eliminar a virémia antes do envolvimento da medula óssea, conseguindo eliminar o agente por completo do organismo, e desenvolvendo imunidade bastante eficiente contra uma re-infecção (Vobis et al., 2003, 2003b; Gomes-Keller, et al., 2006; Hartmann, 2006; Pinches et al., 2007). Caso isso não aconteça, após cerca de três semanas de virémia, ocorre o envolvimento da medula óssea e os precursores hematopoiéticos são afectados, e começam a ser produzidos granulócitos e megacariócitos infectados pelo agente. O período de virémia termina, dando-se início à fase de infecção latente, em que as partículas virais estão sequestradas nas células da medula óssea (Cohn, 2007) e a partir deste momento o animal já não consegue eliminar o agente (Torres et al., 2005; Hartmann, 2006). Como

nesta fase, apenas o ADN do provírus persiste, e não existe a produção activa de vírus (Cohn, 2007; Hofmann-Lehmann et al., 2007), as técnicas de diagnóstico serológico que detectem antigénio não identificam infecção (Hartmann, 2006), podendo o diagnóstico de doença apenas ser realizado por cultura de medula óssea ou PCR. A infecção latente pode ser reactivada espontaneamente por resposta a uma imunossupressão provocada por doença, gravidez, stress ou administração de glucocorticóides e os animais tornam-se novamente virémicos (Gomes-Keller et al., 2006; Hartmann, 2006). Nesta altura, se o animal não desenvolve uma resposta imune adequada e permanece virémico por mais de 16 semanas, existe elevada probabilidade de se tornar persistentemente virémico, e excretar o vírus pelo resto da vida (condição designada de virémia persistente) (Hartmann, 2006). Nestes animais os níveis de anticorpos neutralizantes são baixos e existe replicação viral persistente na medula óssea, baço, linfonodos e glândulas salivares. Embora estes animais possam permanecer sãos durante longos períodos de tempo, grande parte tende a desenvolver patologias associadas ao FeLV pouco tempo após infecção e a maioria morre em cerca de um (Cohn, 2007b) a quatro anos (Vobis et al., 2003) após infecção. Os animais virémicos podem viver e disseminar o vírus durante muitos anos (Gomes-Keller et al., 2006; Pinches et al., 2007), tendo os animais mais jovens, imunodeprimidos ou que habitem em ambientes de elevada densidade populacional, maior risco de vir a desenvolver virémia persistente (de Mari et al., 2004; Hartmann, 2006; Cohn, 2007).

Em animais afectados, a linfopénia está presente com frequência (por diminuição dos CD4+, mas mais frequentemente por diminuição tanto dos CD4+ como dos CD8+) e neutropénia, sendo que os neutrófilos presentes vão perdendo a sua função quimiotáctica e fagocítica, estando a função imunitária destes animais diminuída (Hartmann, 2011).

Apenas cerca de 30% dos animais expostos ao vírus desenvolvem infecção progressiva, e cerca de 60% desenvolvem infecção regressiva (Torres et al., 2005).

### **2.3.2. FIV**

A forma como a infecção pelo FIV se desenvolve depende de diversos factores como a idade do animal (animais mais jovens desenvolvem sinais clínicos mais rapidamente), as propriedades do isolado viral e a via de infecção (Sellon & Hartmann, 2006). Este vírus apresenta tropismo para os linfócitos B e T (tanto CD4+ como CD8+), macrófagos (Bienzle et al., 2004; Johnson, 2005), monócitos (Bienzle et al., 2004) e células do sistema nervoso central (SNC) (Johnson, 2005), no entanto os principais alvos da infecção são os linfócitos-T CD4+ (Hosie, et al., 2009). A entrada nas células do hospedeiro é feita através de um receptor, o CD134 (que é uma glicoproteína expressa principalmente por células T CD4+ activadas), e de um co-receptor, o CXCR4 (que é um receptor da quimiocina CXCL12, que é expresso por um conjunto de células hematolinfóides como as células progenitoras hematopoiéticas, linfócitos T, linfócitos B e células dendríticas) (Freed & Ross, 2004;

Johnson, 2005; Dunham, 2006). A glicoproteína gp120 do envelope do FIV liga-se ao receptor CD134 das células, e sofre uma alteração conformacional que permite a sua posterior ligação, e ao co-receptor CXCR4, tornando possível a entrada do vírus nas células, a sua multiplicação e a formação de sincícios (Johnson, 2005; Hosie et al., 2009).

Uma vez que o FIV tenha sido transmitido a um hospedeiro susceptível, o vírus persiste tanto no sangue como nos tecidos linfáticos, mesmo na presença de uma resposta imune antiviral intensa (Kolenda-Roberts et al., 2007). O curso da doença é caracterizado pela transição gradual através de três fases clínicas: fase de infecção aguda, fase de infecção assintomática e a fase terminal de doença (ou SIDA felina). A classificação nas diferentes fases é feita com base nos sinais clínicos apresentados, no grau de virémia, na eficácia da resposta imunitária desenvolvida e rácio linfócitos-T CD4+/ linfócitos-T citotóxicos (CD4:CD8) no sangue periférico. A fase de infecção aguda ocorre normalmente durante os três primeiros meses após a exposição viral (Dunham, 2006; Kolenda-Roberts et al., 2007). Este período está associado a um pico inicial de virémia, existindo replicação e disseminação viral através dos múltiplos órgãos linfóides, incluindo timo, baço, linfonodos, tecido linfóide intestinal e medula óssea, e de tecidos não-linfóides como o SNC (Dunham, 2006; Kolenda-Roberts et al., 2007). Durante esta fase inicial de virémia, tanto os linfócitos-T CD4+ como os linfócitos-T CD8+ sofrem um declínio (Yamamoto et al., 2007 citado por Levy et al., 2008). Por volta da terceira semana de virémia o vírus é já detectado em todos os órgãos linfóides, tecidos linfóides associados à mucosa, e em várias secreções corporais nomeadamente saliva, leite/colostró e secreções vaginais (Kolenda-Roberts et al., 2007). A resposta imunológica à virémia inicial caracteriza-se pela produção de anticorpos neutralizantes cerca 3-4 semanas pós-infecção, e por uma resposta mediada por células entre a segunda e a sétima semana (Kolenda-Roberts et al., 2007). Os anticorpos formados persistem durante toda a infecção, à excepção da fase terminal da doença em que podem não estar presentes por o organismo ser incapaz de desenvolver uma resposta imunitária adequada (Sellon & Hartmann, 2006). À medida que o organismo vai desenvolvendo uma resposta imunitária adequada, a virémia vai diminuindo, definindo o final da fase aguda e o início da fase assintomática de infecção (Dunham, 2006; Kolenda-Roberts et al., 2007), que pode prolongar-se durante anos ou durar o resto da vida do animal (Hosie et al., 2009).

A duração da fase assintomática é muito variável e está relacionada com a estirpe viral infectante, com estado imunológico do hospedeiro (Dunham, 2006; Kolenda-Roberts et al., 2007), com a exposição a agentes secundários e com a idade do animal na altura da infecção (Hartmann, 2011). Durante esta fase, as cargas virais plasmáticas mantêm-se em níveis muito baixos e os animais permanecem aparentemente saudáveis ou com sintomatologia ligeira por muitos anos (Dunham, 2006; Kolenda-Roberts et al., 2007). Contudo, apesar da ausência de sinais clínicos, na fase assintomática continua a haver um declínio progressivo do sistema imunitário, sendo a imunidade mediada por células mais

afectada que a imunidade humoral. Existe uma diminuição progressiva do número de linfócitos-T CD4+ (e conseqüentemente do rácio CD4:CD8) e das respostas proliferativas/proliferação por células-T (Dunham, 2006; Kolenda-Roberts et al., 2007; Levy et al., 2008; Bienzle et al., 2004).

A terceira fase de infecção, classicamente definida como SIDA felina, pode ocorrer muitos anos depois e é marcada por um aumento da carga viral plasmática e pela emergência de múltiplas doenças degenerativas, neoplasias e infecções secundárias que podem conduzir à morte do animal (Bienzle et al., 2004; Dunham, 2006; Kolenda-Roberts et al., 2007). Esta fase coincide com re-ocorrência de virémia, com a diminuição do número de linfócitos CD8+ e com a deficiência persistente de linfócitos CD4+ (Kolenda-Roberts et al., 2007).

## **2.4. Sinais clínicos**

Tanto no FIV como no FeLV, os sinais clínicos apresentados variam largamente (Cohn, 2007). Em termos gerais, o FeLV está relacionado com alterações clínicas mais significativas que o FIV, sendo considerada a causa de morte de origem infecciosa mais comum em felinos (Ford, 2008).

### **2.4.1. Sinais Clínicos associados ao FeLV**

Os animais FeLV positivos podem apresentar múltiplos sinais clínicos que variam em parte com o subgrupo infectante (por exemplo, o subgrupo B está mais associado a doenças neoplásicas e o subgrupo C a anemia não regenerativa) mas também com características intrínsecas do hospedeiro (como resposta imunitária desenvolvida) (Hartmann, 2006; Cohn, 2007). Até agora não são conhecidos quais os mecanismos exactos pelos quais se geram as diferentes respostas clínicas em gatos persistentemente infectados (Hartmann, 2004).

Pode observar-se doença moderada logo após a infecção, no entanto, normalmente os animais recuperam e mantêm-se saudáveis durante um período variável de tempo (Hartmann, 2004; Cohn, 2007). As manifestações clínicas mais importantes ocorrem nos gatos com virémia persistente meses a anos após a infecção (Hartmann, 2004). Os sinais clínicos associadas ao FeLV estão tipicamente divididos em doenças proliferativas neoplásicas e doenças degenerativas não neoplásicas (Hartmann, 2004; Arjona et al., 2007; Cohn, 2007).

Os animais com infecção persistente acabam por desenvolver imunossupressão (Hartmann, 2004; Cohn, 2007; Collado et al., 2007); mielossupressão (Hartmann, 2004; de Mari et al., 2004; Cohn, 2007; Collado et al., 2007); doenças imunomediadas (Hartmann, 2004), ou doenças neoplásicas (Hartmann, 2004; Cohn, 2007), conforme representado na Tabela 1, e desenvolvendo sinais clínicos de acordo com a doença desenvolvida.

**Tabela 1** Infecções e neoplasias reportadas em animais com infecção persistente por FeLV. (Tabela adaptada de Hartmann, 2004 & Lutz et al., 2009).

|   |   |  |  |
|---|---|--|--|
| <b>Síndromes Neoplásicas</b>                  | <b>Neoplasias Linfoproliferativas:</b><br>- Linfoma maligno (tímico, intestinal, multicêntrico)<br>- Leucemia linfática   | <b>Neoplasias mieloproliferativas:</b><br>- Leucemia eritróide<br>- Leucemia granulocítica<br>- Leucemia linfóide<br>- Leucemia mielóide | <b>Outros tumores (menos comuns):</b><br>- Fibrossarcomas<br>- Osteocondromas<br>- Neuroblastoma olfatório |
| <b>Síndromes de Supressão da Medula Óssea</b> | <b>Citopénia de uma ou mais linhas celulares:</b><br>- Anemia não regenerativa<br>- Trombocitopénia<br>- Neutropénia<br>- Pancitopénia  |  |  |
| <b>Imunossupressão</b>                        | <b>Infecções víricas, bacterianas e parasitárias secundárias:</b><br>- PIF<br>- <i>Mycoplasma haemofelis</i> ,<br><i>Cryptococcus</i><br>- toxoplasmose,<br>- estomatite/doença periodontal<br>- feridas/abscessos crónicos<br>- infecções crónicas do tracto respiratório superior |  |  |
| <b>Doenças Imunomediadas</b>                  | - Anemia hemolítica<br>- Glomerulonefrite   | - Uveíte<br>- Poliartrite  |  |
| <b>Outras Síndromes</b>                       | - Neuropatias   | - Alterações reprodutivas (aborto, infertilidade)  |  |

De uma forma geral, os sinais clínicos mais relatados em infecções por FeLV incluem a dispneia, letargia, anorexia, perda de peso, febre, gengivite/estomatite e abscessos (Costa & Norsworthy, 2011). No exame físico encontram-se com frequência mucosas pálidas, alterações oculares e cutâneas e ainda massas intra-abdominais e organomegália (linfonodos, baço, fígado, rins) (Costa & Norsworthy, 2011).

Em felinos a mortalidade por doenças imunossupressoras associadas ao FeLV é superior do que por doenças proliferativas como o linfoma e a leucemia (Arjona et al., 2007). Num estudo, realizado no North American Veterinary Teaching Hospitals, em 8642 animais FeLV positivos, verificou-se que 15% dos animais demonstrava a presença de co-infecções (incluindo FIV, FIP, infecções do trato respiratório superior, micoplasmas hemotrópicos e estomatite), 6% linfoma, 5% leucopénia ou trombocitopénia e 4% leucemia ou doença mieloproliferativa (Hartmann, 2011). As doenças imunomediadas podem estar presentes por desenvolvimento de respostas imunitárias exageradas ou desreguladas (Hartmann, 2011).

#### 2.4.2. Sinais Clínicos associados ao FIV

A maior parte dos sinais clínicos exibidos pelos animais afectados, não estão directamente relacionados com a presença do vírus, mas sim com a condição imunossupressora que ele induz, que predispõe ao aparecimento de infecções secundárias, neoplasias, alterações neurológicas ou ainda doenças imunomediadas (Hosie et al., 2009; Hartmann, 2011).

A fase de doença aguda pode ser clinicamente silenciosa ou manifestar-se através de sinais clínicos ligeiros e inespecíficos que podem passar despercebidos (Bendinelli et al., 1995; Sellon & Hartmann, 2006) e que englobam normalmente a depressão, anorexia,

linfadenopatia generalizada e febre ligeira (Callanan et al., 1992; Bendinelli et al. 1995; Dunham, 2006; Cohn, 2007; Levy et al., 2008; Yamamoto, 2008). Em animais mais gravemente afectados pode ainda ocorrer diarreia aguda, alterações oculares, dermatite e sinais respiratórios superiores ligeiros (Bendinelli et al. 1995; Hartmann, 2006).

Na fase de doença assintomática os sinais são normalmente mínimos, mas podem incluir linfadenopatia generalizada, gengivite/estomatite e neutropénia (Kolenda et al., 2007). Este período pode prolongar-se por vários anos, no entanto em alguns animais prolonga-se pelo resto da vida (Hosie et al., 2009).

A fase terminal de doença caracteriza-se pela presença de alterações neurológicas e infecções secundárias múltiplas e persistentes, resistentes à terapêutica convencional (Arai, Earl & Yamamoto, 2002). Os achados clínicos mais comuns são a perda de peso, linfadenopatia generalizada, febre recorrente, gengivite, estomatite e periodontite, rinite crónica, traqueobronquite, abscessos e glomerulonefrite imunomediada (Cohn, 2007; Kolenda et al., 2007; Hosie et al., 2009). Podem estar presentes infecções crónicas, não responsivas ou recidivantes, da pele ou do ouvido externo provocadas por *Demodex*, *Notoedres* (Hosie et al., 2009), *Staphylococcus* sp. ou outras bactérias, bem como dermatofitoses de difícil resolução (Bendinelli et al., 1995). A nível ocular, as alterações mais frequentes são a uveíte anterior, ligeira a moderada e caracterizada por inflamação linfoplasmocítica, o glaucoma, a luxação do cristalino e a conjuntivite, que podem ser provocadas directamente pela acção viral sobre os tecidos oculares, pela imunossupressão secundária ou ainda pela ocorrência de infecções oculares secundárias (Colitz, 2005; La Croix, 2005). Infecções secundárias dos tractos respiratório, gastrointestinal ou urinário são também frequentes (Cohn, 2007; Hartmann, 2011). As neoplasias mais comuns são o linfoma, leucemias (Grace, 2011; Hartmann, 2011) e carcinoma cutâneo das células escamosas (Hartmann, 2011).

Por vezes, as manifestações neurológicas de FIV estão presentes, mesmo na ausência de outras infecções ou neoplasias do sistema nervoso (Cohn, 2007). Foram já descritas alterações neurológicas em animais natural e experimentalmente infectados com FIV: cerca de 5% dos animais infectados tem alterações neurológicas como sinais clínicos predominantes (Grace, 2011; Hartmann, 2011). As alterações neurológicas observadas tendem a ser mais comportamentais do que motoras e incluem: movimentos espásmicos da face e língua, demência, perda de controlo da bexiga e esfíncter anal e alterações do sono. Outros sinais observados foram nistagmus, ataxia, convulsões e tremores musculares (Hartmann, 2011).

A condição clínica mais frequente é a presença de estomatite crónica ulcero-proliferativa, encontrada em cerca de 50% dos animais (Hartmann, 2011; Grace, 2011a). Esta condição origina-se normalmente na área faríngea e espalha-se rostralmente, especialmente ao longo dos dentes maxilares (Hartmann, 2011). Por ser uma afecção extremamente dolorosa, por

vezes com perda de dentes associada, pode levar a anorexia e emaciação do animal (Hartmann, 2011). A causa deste síndrome não é ainda conhecida, no entanto os achados histológicos sugerem que se trata de uma resposta imune à estimulação antigénica crónica ou a uma desregulação imunológica (Hartmann, 2011).

## **2.5. Diagnóstico**

Conhecer o estado retroviral de todos os animais é de extrema importância, uma vez que os retrovírus são capazes comprometer o estado de saúde do animal e condicionar as características de manejo a que é sujeito. Além disso, falhas na identificação de animais infectados podem perpetuar a exposição e transmissão destes vírus a animais não infectados (Crawford, 2007; Levy et al., 2008).

Todos os animais devem ser testados pelos meios de diagnóstico apropriados, em intervalos regulares de acordo com a sua situação de risco individual (Levy et al., 2008).

Situações em que os animais devem ser testados incluem (Cohn, 2007; Levy et al., 2008):

- Gatos e gatinhos na altura de aquisição ou de mudança de residência e 60 dias depois, mesmo que não seja de esperar que venham a conviver com outros felinos;
- Animais com acesso ao exterior sem supervisionamento, que apareçam com sinais de luta ou que tenham possibilidade de contactar com felinos positivos ou de estatuto desconhecido, 60 dias após a potencial exposição;
- Previamente à vacinação contra FeLV (ou FIV nos países em que esta vacina está licenciada);
- Felinos com alterações do estado clínico (mesmo que possuam teste negativo no passado);
- Felinos que vivam em ambientes com animais que se saibam ser portadores devem ser testados anualmente (a menos que não mantenham contacto);
- Animais dadores de sangue ou tecidos (devem ter testes serológicos negativos a FIV e FeLV e confirmação por PCR).

Uma vez que os sinais clínicos e alterações laboratoriais provocados por infecções retrovirais em felinos são bastante inespecíficos, é necessário proceder ao diagnóstico laboratorial para que a infecção seja confirmada (Arjona et al., 2007).

### **2.5.1. Métodos serológicos**

O diagnóstico de FIV e/ou FeLV é normalmente realizado por serologia, sendo no caso do FeLV feita pesquisa de antigénios (Arjona et al., 2007; Cohn, 2007), e no caso do FIV pesquisa de anticorpos produzidos (Bienzle et al., 2004; Crawford & Levy, 2007).

Em circunstâncias normais, a presença de anticorpos específicos contra FIV indicaria apenas que houve exposição do animal ao agente, e não necessariamente a presença de

infecção ou doença activa (Cohn, 2006). No entanto, uma vez que o FIV produz uma infecção persistente e da qual os animais normalmente não conseguem recuperar, com desenvolvimento de elevadas quantidades de anticorpos, a presença de anticorpos específicos em circulação é considerada sinónimo de infecção (Sellon & Hartmann, 2006). Além disso, os animais FIV positivos possuem baixas cargas virais circulantes durante a maior parte da vida (Cohn, 2006; Levy et al., 2008), pelo que é pouco provável a detecção de antígeno em circulação (Arjona et al., 2007).

Para diagnóstico serológico pode ser utilizado plasma, soro ou sangue total periférico (Arjona et al., 2007).

#### **2.5.1.1. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)**

Devido à sua simplicidade, esta é a técnica de diagnóstico mais utilizada (Crawford & Levy, 2007; Bienzle et al., 2004) para a pesquisa de antígeno FeLV (proteína viral p27 livre produzida em elevadas quantidade em animais virémicos) (Hartmann, 2004; Colitz, 2005; Arjona et al., 2007; Cohn, 2007; Levy et al., 2008; Levy et al., 2009) e anticorpos específicos contra FIV (normalmente contra a proteína viral p24 ou p15) (Bienzle et al., 2004; Cohn, 2006; Arjona et al., 2007; Crawford & Levy, 2007). O diagnóstico de FeLV pode também ser realizado em saliva ou em lágrimas, no entanto os resultados estão associados a um elevado número de falsos positivos e falsos negativos, pelo que estas amostras não traduzem resultados fiáveis (Cohn, 2006).

#### **2.5.1.2. Imunofluorescência Indirecta (IFI)**

O diagnóstico serológico pode também ser realizado por IFI (Cohn, 2006; Tandon et al., 2005), que no caso do FeLV detecta o antígeno (p27) incorporado nos glóbulos brancos e plaquetas (Hartmann, 2004; Cohn, 2006; Levy et al., 2008; Levy et al., 2009). Ao contrário da ELISA, que detecta virémia transitória ou persistente, a IFI detecta apenas virémias persistentes após o envolvimento da medula óssea (Hartmann, 2004; Cohn, 2006; Levy, et al., 2008), sendo por isso menos sensível mas mais específica que o método anterior (Cohn, 2006; Levy et al., 2008).

A IFI não é muito utilizada no diagnóstico de FIV, uma vez que os resultados obtidos são muito subjectivos e dependentes do observador (Bienzle et al., 2004; Crawford & Levy, 2007).

#### **2.5.1.3. Western Blot**

O *Western Blot* é considerado *gold standart* na pesquisa de anticorpos específicos para FIV, sendo mais sensível e mais específico que o ELISA (Crawford & Levy, 2007). Tem a vantagem de detectar anticorpos reactivos contra mais do que uma proteína viral, sendo apenas validado o resultado como positivo se houver reacção a mais de uma proteína viral e

duvidoso se reagir apenas a uma (Crawford & Levy, 2007). É no entanto tecnicamente mais exigente e dispendioso, e por isso menos utilizado (Bienzle et al., 2004; Cohn, 2006; Crawford & Levy, 2007).

#### **2.5.1.4. Falsos positivos e falsos negativos em testes serológicos**

Os resultados falsos positivos em testes serológicos podem ocorrer no caso do FIV em animais muito jovens, quando os anticorpos maternos estão ainda presentes; em caso de ocorrência de reacções cruzadas inespecíficas (Cohn, 2006, 2007; Arjona et al., 2007; Levy, et al., 2008); ou por detecção de anticorpos vacinais em países em que esteja licenciado o uso de vacinas preventivas para FIV (Cohn, 2006, 2007). De referir que existe já um teste baseado em ELISA capaz de fazer distinção entre anticorpos vacinais e infecção verdadeira por FIV, mas que para já está disponível apenas no Japão (Levy et al., 2008; Grace, 2011).

No caso do FeLV, uma vez que os testes serológicos fazem pesquisa de antígeno, a presença de anticorpos maternos ou vacinais, não interfere à partida nos resultados obtidos (Cohn, 2006; Levy et al., 2008). No entanto, quando o sangue é colhido imediatamente após a vacinação podem ser detectados antígenos FeLV vacinais, pelo que as amostras para diagnóstico devem sempre ser colhidas anteriormente à vacinação (Levy et al., 2008). O ELISA pode estar associado a falsos positivos, uma vez que pode identificar a proteína viral p27 ainda antes da incorporação do provirus no ADN do hospedeiro, em animais que consigam eliminar a infecção e reverte-la para um estatuto de negativo (Cohn, 2007).

Na infecção por FIV, os resultados falsos negativos em serologia são raros, mas podem ocorrer devido a níveis insuficientes de anticorpos na amostra testada. Isto que pode acontecer em animais em que não tenha ainda ocorrido seroconversão (ausência de anticorpos em circulação no período que varia entre 2-4 semanas até um ano após infecção) ou em fases terminais de infecção em que a resposta imunitária é fraca (Bienzle et al., 2004; Cohn, 2006; Arjona et al., 2007; Crawford & Levy, 2007; Levy et al., 2008).

No caso do FeLV, os falsos negativos, podem estar associados ao facto de o animal se encontrar em fase de infecção latente, em que não exista virémia e antigenémia em circulação, mas apenas provirus integrado nas células da medula e de outros locais (Arjona et al., 2007; Cohn, 2007).

Tanto no caso do FIV como no caso do FeLV, os resultados serológicos positivos devem ser confirmados, principalmente em animais assintomáticos que possam ter contactado com o agente (Pinches et al., 2007). Estima-se que até 20% dos resultados FIV positivos em ELISA submetidos a testes confirmatórios por *Western Blot* são falsos positivos (Bienzle et al., 2004), discrepância que é atribuída a erros de operador, mais do que a erros de laboratório (Bienzle et al., 2004). Não existe nenhum teste de detecção de anticorpos que seja claramente superior aos restantes, no entanto, resultados discordantes entre os testes requerem a realização de mais testes para que o verdadeiro estatuto do animal seja

apurado (Crawford & Levy, 2007). A confirmação pode ser feita utilizando um segundo teste serológico (preferencialmente diferente do primeiro ou de um outro fabricante), por cultura viral ou através de PCR (Levy et al., 2008). Caso se obtenham resultados discordantes entre dois testes serológicos, o estatuto do animal poderá tornar-se claro repetindo ambos os testes 60 dias depois, mas até lá os animais nesta situação devem ser considerados como potenciais fontes de infecção até que a sua situação seja esclarecida (Levy et al., 2008). Os resultados discordantes entre testes serológicos podem estar relacionados com o estadio de infecção, a variabilidade da resposta dos hospedeiros ou problemas técnicos relacionados com os testes (Levy et al., 2008).

### **2.5.2. Métodos moleculares**

O diagnóstico molecular através de PCR, tem-se mostrado uma técnica extremamente útil na detecção destes vírus, mostrando algumas vantagens relativamente às técnicas serológicas (Arjona et al., 2007). O PCR permite a detecção de ARN viral ou ADN proviral a partir de células monocíticas de sangue periférico, medula óssea ou tecidos, independentemente da presença de anticorpos ou de virémia (Sellon & Hartmann, 2006; Arjona et al., 2007; Levy et al., 2008). Teoricamente é capaz de detectar uma única molécula de ADN proviral num conjunto de  $10^5$  células (Saiki et al., 1988), contudo, vários estudos têm mostrado que a sua sensibilidade e especificidade são altamente variáveis, podendo ir de 40% a 100% (Bienzle et al., 2004; Sellon & Hartmann, 2006; Grace, 2011). Esta técnica permite o diagnóstico de infecções por FeLV em caso de infecções latentes (Arjona et al., 2007) e de FIV mesmo em animais em que a seroconversão não tenha ocorrido ou em fases tardias em que a resposta imunitária pode ser fraca, e previne ainda a ocorrência de falsos-positivos derivados da presença de anticorpos maternos (Arjona et al., 2007; Levy et al., 2008). Contudo, animais infectados por via materna podem não obter resultados positivos por semanas ou meses após o nascimento pelo que o teste deve ser repetido quando o animal tiver mais de seis meses (Levy et al., 2008).

Arjona et al. (2007) desenvolveram uma técnica de diagnóstico com elevada sensibilidade e especificidade, baseada em *nested* PCR que se mostrou eficaz na detecção conjunta de FIV e FeLV, permitindo através de um único PCR testar ambos os vírus, ter um diagnóstico seguro e reduzir os gastos em tempo e dinheiro.

O *real time* PCR demonstrou ter elevada sensibilidade e especificidade, relativamente à detecção de antigénio, isolamento viral e técnicas de imunofluorescência (Tandon, et al., 2005; Hofmann-Lehmann et al., 2008). Esta técnica permite não só a detecção, mas também a quantificação, avaliação dos isolados em questão e monitorização dos níveis de provírus em gatos infectados (Bienzle et al., 2004; Pinches et al., 2007). Quando realizada em condições óptimas, é a metodologia mais sensível no diagnóstico do FeLV, e permite ainda resolver os casos em que os testes serológicos são discordantes. O FIV é no entanto

um agente difícil de amplificar por PCR uma vez que existem variações de até 20% entre diferentes subtipos virais (Bienzle et al., 2004).

Os falsos negativos em PCR podem estar relacionados com qualidade ou quantidade de amostra insuficiente, *primers* inadequados, problemas com os reagentes (Bienzle, et al., 2004), ou não reconhecimento do subtipo viral pela técnica de PCR (Hosie, et al., 2009). Os resultados falsos positivos estão na maioria das vezes relacionados com contaminações que possam ocorrer no laboratório (Bienzle et al.; 2004).

### **2.5.3. Métodos de isolamento viral**

O isolamento viral, apesar de ser uma técnica bastante confiável, não é utilizado como rotina uma vez que é tecnicamente mais exigente, mais demorado (cerca de duas semanas), bastante mais dispendioso que os restantes métodos, para além de não estar disponível em todos os laboratórios (Bienzle et al., 2004; Crawford & Levy, 2007). Por poder ser utilizada em qualquer fase de infecção, é considerada a técnica *gold standard* para confirmação de resultados positivos ou suspeitos obtidos por outras técnicas (Hartmann, 2006; Crawford & Levy, 2007).

### **2.5.4. Outros métodos auxiliares de diagnóstico**

As alterações no hemograma, perfil bioquímico e urianálise dependem da manifestação das doenças secundárias à infecção viral, e não são específicas para a infecção por FeLV (Cohn, 2007b). As alterações hematológicas, particularmente as citopénias associadas a supressão da medula óssea são achados comuns em FeLV positivos (Hartmann, 2011). A anemia macrocítica pode ser sugestiva da presença de FeLV, no entanto a anemia pode também ser normocítica, regenerativa (cerca de 10%) ou não (Cohn, 2007; Hartmann, 2011). Linfopénia e neutropénia persistentes, transientes ou cíclicas são achados comuns, assim como alterações plaquetárias (trombocitopénia, diminuição do tempo de vida ou alterações de função) (Costa & Norsworthy, 2011; Hartmann, 2011). No perfil bioquímico podem ocorrer azotémia, aumento das enzimas hepáticas ou da bilirrubina sérica (Costa & Norsworthy, 2011).

A infecção por FIV está também associada a alterações não específicas como linfopénia, neutropénia, anemia não regenerativa e trombocitopénia, principalmente na fase aguda e terminal de infecção (Bendinelli et al., 1995; Dunham, 2006; Cohn, 2007; Grace, 2011) e tal como no FeLV as possíveis anomalias no perfil bioquímico e urinário são inespecíficas e associadas a doenças secundárias (Cohn, 2007).

Os animais FIV positivos tendem a ter hipergamaglobulinémia e hiperproteinémia, ao contrário dos animais FeLV positivos (Grace, 2011; Hartmann, 2011). A azotémia pode também estar presente, no entanto o papel do FIV como causador de doença renal não está ainda esclarecido (Grace, 2011).

## **2.6. Tratamento**

Não existe cura para o FeLV nem para o FIV (Cohn, 2007). As infecções são irreversíveis e o acompanhamento destes animais passa pela prevenção e tratamento de infecções secundárias e doenças associadas, assim com pela instituição de uma terapia imunomoduladora com o intuito de melhorar a resposta imunitária do animal (Cohn, 2007).

### **2.6.1. Terapia antiviral**

#### **2.6.1.1. Zidovudina, AZT (3'-azido-2', 3'-didesoxitimidina)**

É um análogo glicosídeo (derivado da timidina) que bloqueia a acção da transcriptase reversa dos retrovírus (Sellon & Hartmann, 2006; Collado et al., 2007; Levy et al., 2008). Esta molécula é integrada nas cadeias de ADN em desenvolvimento, inibindo a infecção de novas células, mas não a replicação viral nas células já infectadas (Sellon & Hartmann, 2006).

O objectivo da utilização do AZT é diminuir a carga viral plasmática, promover a melhoria do estado clínico e imunológico e aumentar a qualidade e esperança de vida do animal infectado (Sellon & Hartmann, 2006). Contudo, existem estudos que indicam que, apesar de promover uma melhoria transitória dos sinais clínicos (nomeadamente a estomatite) e do rácio CD4:CD8 em animais FIV positivos (Arai, Darman, Lewis, & Yamamoto, 2000), o seu uso não reduz a carga viral das células mononucleares periféricas, nem os títulos de anticorpos anti-FIV em animais cronicamente infectados (Arai et al., 2002), e que além disso não previne a disseminação viral a outros tecidos nem prolonga o tempo de vida dos animais infectados (Kolenda-Roberts et al., 2007).

Em caso de felino infectados com FeLV, a eficácia da terapêutica com AZT parece ser menos promissora que em animais infectados com FIV, e parece ter efeito apenas quando os animais iniciam o tratamento no início da infecção (Hartmann, 2006).

Um dos efeitos secundários do AZT é a indução de anemia não regenerativa, principalmente em animais FeLV positivos em que exista já supressão da medula óssea, pelo que a animais sujeitos a este tratamento deve ser feito o controlo regular através de hemograma (Hartmann, 2006; Sellon & Hartmann, 2006). Esse controlo deve ser realizado semanalmente durante o primeiro mês, e se os valores se mantiverem estáveis deve passar para avaliação mensal. Em alguns animais pode ocorrer uma diminuição do hematócrito (HCT) durante as três primeiras semanas de tratamento que resolve por si mesmo se o tratamento se mantiver. No entanto, se o HCT descer abaixo dos 20% o tratamento deve ser descontinuado, e a anemia resolve em apenas alguns dias (Hartmann, 2006). Outros efeitos secundários descritos associados ao uso desta droga em felinos são a ocorrência de neutropénia, vômitos e anorexia, que pioram o prognóstico (Hartmann, 2006).

Os efeitos secundários associados a esta terapêutica podem ser atenuados pela associação do AZT a factores de crescimento hematopoiético, como o factor estimulante das colónias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e à Eritropoietina (EPO) (Arai et al., 2000; Arai et al., 2002).

#### **2.6.1.2. Lamivudina, 3TC**

É também um análogo glicosídeo que potencia o efeito do AZT, quando usado em simultâneo (Arai et al., 2002). Ao contrário dos restantes análogos glicosídeos, o 3TC induz mutações rápidas capazes de reverter fenotipicamente as mutações causadas pelo AZT, permitindo que a actividade antiviral do AZT permaneça no hospedeiro (Arai et al., 2002). Quando utilizada em pacientes humanos com HIV, a combinação AZT/3TC reduziu a carga viral plasmática e aumentou a contagem e função das células CD4+ (Arai et al., 2002). Também em felinos, a utilização desta combinação profilaticamente pouco tempo depois da inoculação do vírus, mostrou atraso no desenvolvimento da infecção, seroconversão e multiplicação viral, actuando em conjunto com o sistema imunitário de forma a limitar a multiplicação do vírus durante a infecção primária (Arai et al., 2002). No entanto, quando usada terapêuticamente em animais cronicamente afectados, a combinação AZT/3TC não mostrou ter grandes efeitos na diminuição da carga viral (Arai et al., 2002). Provavelmente seriam necessárias doses superiores para que efeitos fossem observadas no entanto doses elevadas destes fármacos podem promover o desenvolvimento de anemia (Arai et al., 2002). Resumindo, a utilização do AZT ou AZT/3TC parece ser mais vantajosa como medida profilática do que como adjuvante no tratamento de infecções crónicas (Arai et al., 2002).

#### **2.6.1.3. Outros antivirais**

A acção de outros agentes antivíricos utilizados em medicina humana (didanosina, zalcitabina, ribavirina, foscarnet e suramina) foi já testada, no entanto a sua eficácia *in vitro* não foi reproduzível *in vivo* em animais FeLV positivos, ou demonstraram toxicidade em felinos (Hartmann, 2006; Sellon & Hartmann, 2006).

### **2.6.2. Terapia imunomoduladora**

#### **2.6.2.1. Acemannan**

É um polímero de um carbohidrato complexo de cadeia longa (mannan) derivado da planta Aloé Vera (Hartmann, 2006). É conhecido pelas suas funções imunomoduladoras, pois estimula a produção de interleucina-1 (IL-1), factor de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e prostaglandina E2 (PGE-2) por parte dos macrófagos; e pela sua função anti-viral, demonstrada *in vitro* contra o VIH, Vírus da Doença de Newcastle e Vírus Influenza (Yates

et al., 1992). Num estudo realizado em 50 felinos FeLV positivos, tratados por via IP com 2mg/Kg de 24 em 24 horas durante seis semanas, verificou-se que 70% dos animais permaneceram vivos, sem que ocorressem alterações significativas nos sinais clínicos ou parâmetros hematológicos apresentados (Sheets, Unger, Giggelman, & Tizard, 1991). Um estudo semelhante foi realizado com três grupos de felinos FIV positivos, com sinais clínicos de doença, sendo que após 12 semanas de tratamento 75% dos animais permaneciam vivos, e com melhorias dos parâmetros sanguíneos avaliados e diminuição da incidência de sépsis. Uma vez que ambos os estudos utilizaram amostras pequenas e não utilizaram grupo de controlo, torna-se difícil tirar conclusões acerca da eficácia deste composto (Hartmann, 2006)

#### **2.6.2.2. Proteína A de *Staphylococcus* (SPA)**

É uma proteína bacteriana (Hartmann, 2006; Cohn, 2007), que estimula a actividade dos linfócitos-T citotóxicos e do interferão- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) (Liu, Good, Trang, Engelman, & Day, 1984). Num estudo realizado em que foi administrado SPA (10mg/Kg duas vezes por semana durante 10 semanas) em gatos FeLV positivos com sinais clínicos, os médicos veterinários que efectuaram o exames físico após o tratamento não encontraram alterações significativas nos sinais clínicos e hematológicos dos animais, no entanto os donos diziam verificar melhorias nos sinais apresentados pelos animais (McCaw et al., 2001).

#### **2.6.2.3. Interferões**

Estes agentes possuem função imunomoduladora por estimularem o sistema imunitário, aumentando a sobrevivência dos linfócitos T CD4+ (Pedretti et al., 2006) e ainda um efeito antiviral demonstrado, induzindo a síntese de outros interferões e citocinas (Hartmann, 2004). Estes agentes parecem ajudar os animais infectados a restaurar a sua função imunitária comprometida, permitindo-lhes controlar a carga viral e recuperar do estado de doença (Hartmann, 2004).

Actualmente o único interferão de uso veterinário registado na Europa é o interferão- $\omega$  recombinante de origem felina (INF- $\omega$  felino) (Hartmann, 2004). Os interferões são específicos de cada espécie, pelo que a eficácia do INF- $\omega$  felino é claramente distinta da eficácia do IFN- $\alpha$ -hu, não só no que respeita à sua antigenicidade, mas também no que respeita à sua eficácia em células felinas (Hartmann, 2004). O INF- $\omega$  felino inibe a replicação viral do FeLV *in vitro*, e num estudo realizado por de Mari et al. (2004), foi demonstrado que um ano após o início do tratamento, a taxa de mortalidade era significativamente inferior nos animais tratados em relação aos animais do grupo de controlo. Em um estudo semelhante em animais infectados com FIV e com sinais clínicos associados, verificou-se uma melhoria significativa nos sinais clínicos apresentados pelos

animais tratados relativamente aos animais do grupo controlo (de Mari, Maynard & Lebreux, 2002 referenciado por Harmann, 2004b).

De todos os interferões humanos, é o interferão- $\alpha$  humano (IFN- $\alpha$ -hu), que possui maior efeito antiviral e que tem sido mais utilizado em animais infectados por FeLV e FIV (Hartmann, 2004, 2004b). Administrado por via parenteral produz efeito antiviral maior do que por administração oral (Schellekens, Geelen, Meritet, Maury, & Tovey, 2001), uma vez que administrado oralmente é destruído no tracto digestivo, não chegando a ser absorvido (Hartmann, 2006). A administração em baixas doses por via oral tem no entanto a vantagem de estimulação local do tecido linfóide da cavidade oral. Parenteralmente, este interferão deve ser administrado em doses elevadas durante um período máximo de seis a sete semanas, após o qual se desenvolvem anticorpos contra ele e se torna ineficaz (Hartmann, 2004).

### **2.6.3. Tratamento de Suporte**

A presença de infecções secundárias em animais infectados com retrovírus leva ao desenvolvimento de sinais clínicos e influencia a progressão da infecção viral (Sellon & Hartmann, 2006). A maioria das infecções secundárias em animais FIV ou FeLV positivos são tratadas da mesma forma que em animais FIV e FeLV negativos, no entanto os testes de diagnóstico devem ser mais abrangentes e intensivos, e pode ser necessária uma terapia mais agressiva e prolongada no tempo (por exemplo no que respeita a antibioterapia) (Hartmann, 2006; Levy et al., 2008; Hosie et al., 2009), que deve ser instituída precocemente (Hosie, et al., 2009). A utilização de glucocorticóides e outros fármacos imunossupressores em animais com retrovírus é ainda controversa devido aos seus efeitos secundários e nem todos os autores recomendam a sua utilização (Hosie et al., 2009). Segundo Levy et al. (2008), os glucocorticóides devem apenas ser administrados nos animais em que o seu uso esteja claramente indicado. No caso de gengivo-estomatite crónica, que ocorre com frequência em animais com infecção por retrovírus, deve ser preferida a extracção total dos dentes relativamente ao uso prolongado de corticosteroides (Levy et al., 2008; Sellon & Hartmann, 2006). Os glucocorticóides tópicos podem ser usados por exemplo no tratamento de uveítes anteriores (Colitz, 2005). Já a griseofulvina não deve ser usada pois provoca mielossupressão com neutropénia grave em animais FIV positivos (Shelton, Grant, Linenberger, & Abkowitz, 1990; Sellon & Hartmann, 2006; Hosie et al., 2009).

As neoplasias associadas ao FeLV devem ser tratadas com a quimioterapia adequada para o tipo de tumor (Cohn, 2007), e caso o animal apresente anemia, a infecção por *M. haemofelis* deve ser descartada, assim como a presença de anemia imunomediada. Se esta última estiver presente deve ser ponderado tratamento com supressão imunológica (Cohn, 2007) e por vezes é necessária utilização de transfusão sanguínea (Cohn, 2007).

### **2.6.3.1. Eritropoietina recombinante humana (Rh-EPO)**

É utilizada com alguma frequência em animais FIV e/ou FeLV positivos com anemia não regenerativa secundária ao próprio vírus ou ao tratamento com AZT (Arai et al., 2000; Arai et al., 2002). A maioria dos animais submetidos a esta terapêutica desenvolve anticorpos anti-rh-EPO, limitando o seu uso prolongado (Arai et al., 2000). Estão descritos efeitos secundários associados a este fármaco como vômitos, náuseas, febre e tonturas (Arai et al., 2000).

### **2.6.3.2. Factor recombinante humano estimulante das colónias de macrófagos e granulócitos (rh-GM-CSF)**

pode ser usado em animais FIV positivos com neutropénia profunda (Arai et al., 2000). Este fármaco está associado a um aumento significativo na carga viral nas células mononucleares do sangue periférico, por aumento de infecção de linfócitos ou aumento de expressão dos linfócitos infectados, devendo ser considerada a associação de um fármaco antiviral (Arai et al., 2000).

Existem dados que sugerem que a superóxido dismutase é capaz de estimular o sistema imunológico de animais FIV positivos (Grace, 2011a).

## **2.7. Maneio e Prevenção**

Em muitos animais, a presença de FIV e/ou FeLV não é a causa principal de doença grave, e com os cuidados apropriados, os animais portadores podem viver de forma saudável durante muitos anos e morrer com idade avançada por causas não relacionadas com a infecção por estes agentes (Hartmann, 2006; Sellon & Hartmann, 2006; Levy et al., 2008). Têm sido feitas inúmeras investigações no tratamento dos retrovírus felinos, nomeadamente o FIV, não só para ajudar no controlo dessa doença felina, mas como modelo de tratamento do HIV (Sellon & Hartmann, 2006).

A identificação e separação dos animais infectados são considerados os métodos mais eficazes de prevenção de novas infecções por FIV e FeLV (Levy et al., 2008).

O maneio dos animais infectados deve ser realizado de forma diferenciada dos animais não infectados (Sellon & Hartmann, 2006). Caso o animal positivo seja o único felino na casa, deve ser mantido no interior de forma a evitar a exposição dos gatos da vizinhança ao vírus e a evitar o contacto do animal infectado com agentes imunossupressores potencialmente transmitidos pelos outros animais e pelo ambiente exterior (Hartmann, 2006; Cohn, 2007; Levy et al., 2008).

Em casas em que habitem um ou mais felinos infectado por FIV e/ou FeLV, o estado de todos os animais deve ser conhecido, e o proprietário informado acerca do risco de infecção dos restantes elementos (Hartmann, 2006). Neste caso, a melhor forma de prevenir a

infecção, é o isolamento dos animais positivos em compartimentos diferentes da casa (Hartmann, 2006; Sellon & Hartmann, 2006; Levy et al., 2008). No caso do FeLV, apesar de protecção conferida pela vacina não ser de 100%, a vacinação dos animais negativos pode ser ponderada (Hartmann, 2006; Lutz et al., 2009), principalmente se os donos escolherem não fazer a separação de animais positivos e negativos (Levy et al., 2008). Caso a separação não seja possível, de modo a evitar lutas territoriais, não devem ser introduzidos novos elementos na casa (Levy et al., 2008).

Dada a elevada susceptibilidade destes animais, deve ser fornecida uma alimentação de elevada qualidade nutricional (Hartmann, 2006; Levy et al., 2008), devendo ser evitados certos produtos como carne crua e produtos lácteos de forma a eliminar o risco de infecção por bactérias e/ou parasitas potencialmente veiculados por esses alimentos (Levy et al., 2008).

Mesmo que o animal se mantenha aparentemente saudável, devem ser realizadas visitas frequentes ao veterinário (no mínimo semestralmente) para que o estado clínico do animal possa ser controlado, nomeadamente no que respeita ao estado da cavidade oral, linfonodos, condição corporal e estado da pele e do pêlo (Hartmann, 2006; Sellon & Hartmann, 2006; Levy et al., 2008; Hosie et al., 2009). O hemograma deve ser realizado em cada visita e a avaliação dos perfis bioquímico e urinário devem ser feitos anualmente (Hartmann, 2006; Levy et al., 2008; Sellon & Hartmann, 2006; Hosie et al., 2009). Os animais devem ser sujeitos a um programa de desparasitação interna e externa adequados e devem ser esterilizados de forma a reduzir o stress associado ao estro, o comportamento de acasalamento e/ou o desejo de ir para o exterior (Hartmann, 2006; Sellon & Hartmann, 2006; Levy et al., 2008). A cirurgia é normalmente bem tolerada em animais FIV e FeLV positivos, no entanto devem ser realizados um exame físico cuidado e análises pré-cirúrgicas, bem como instituída uma antibioterapia adequada ao estado de imunossupressão do animal (Hartmann, 2006; Sellon & Hartmann, 2006; Levy et al., 2008).

No caso de instituições de abrigo devem ser adoptados os mesmos princípios que em casas particulares com mais de um animal, ou seja, deve ser conhecido o estado retroviral de todos os animais. Aquando da chegada de um novo animal, este deve ser negativo a ambos os vírus em pelo menos dois testes com 60 dias de intervalo antes de ser introduzido juntamente com os restantes animais (Levy et al., 2008). Esta situação aplica-se também a gatinhos bebés dos quais não se conheça a origem ou estado retroviral da mãe, bem com aos animais que retornam ao abrigo após uma adopção falhada (Levy et al., 2008). Os animais devem ainda ser testados aquando do acto de adopção, antes de contactar com outros felinos (Levy et al., 2008).

Uma vez que tanto o FIV como o FeLV, são vírus muito frágeis que sobrevivem apenas alguns segundos fora do hospedeiro e que são susceptíveis a quase todos os desinfectantes (incluindo o sabão comum), bastam medidas básicas de higiene pessoal

(lavagem das mãos e vestuário) e de equipamentos (instrumentos cirúrgicos, comedouros, bebedouros, jaulas, etc.) para que a transmissão a outros animais não ocorra (Hartmann, 2006; Levy et al., 2008). Assim, em clínicas e hospitais veterinários, desde que alojados individualmente e sejam tomadas medidas básicas para a prevenção da transmissão da doença, os animais portadores de retrovírus hospitalizados, não devem ser mantidos na ala das doenças infecto-contagiosas de modo a evitar o contacto com outros agentes infecciosos que possam agravar o seu estado clínico (Hartmann, 2006; Levy, et al., 2008). Os animais utilizados como dadores de sangue para transfusão deverão ser devidamente testados (Levy et al., 2008).

## **2.8. Vacinação**

### **2.8.1. Vacinação Geral**

Idealmente os animais FIV e/ou FeLV positivos devem estar isolados e mantidos no interior de forma a evitar o contacto com agentes infecciosos (Day, Horzinek, & Schultz, 2010), contudo, quando necessário, as vacinas consideradas principais (calicivírus felino, herpes vírus felino tipo-1 e parvovírus felino) podem ou devem ser administradas, ao contrário das vacinas facultativas, cuja administração deve ser ponderada individualmente para cada animal (Richards et al., 2006). Os animais FeLV positivos podem não ser capazes de desenvolver uma resposta imunitária adequada à vacinação, pelo que a protecção induzida pelas vacinas pode não ser tão eficaz como a protecção induzida em animais não infectados (Richards et al., 2006). Relativamente aos animais com FIV, as opiniões dividem-se. Animais FIV positivos parecem ser capazes de desenvolver resposta imunitária aos antigénios administrados através da vacina (excepto em fases terminais de infecção), apesar de essa resposta poder ser retardada ou diminuída (Richards et al., 2006). Contudo, têm-se levantado problemas de segurança, baseados no facto de a estimulação imunitária induzida pela vacina poder levar à progressão da infecção por FIV, alterando o equilíbrio entre o sistema imunológico e o vírus (Hosie et al., 2009).

Quando utilizadas, estas vacinas devem ser inactivadas (Day et al., 2010), pois tratando-se de animais imunossuprimidos, o risco de vacinas vivas atenuadas recuperarem o seu poder patogénico deve ser eliminado (Sellon & Hartmann, 2006; Levy, et al., 2008; Hosie et al., 2009). Vacinas contra FIV e FeLV não devem ser utilizadas em animais que possuam um dos retrovírus, nem em animais clinicamente doentes (Day et al., 2010).

### **2.8.2. Vacinação FeLV**

A primeira vacina preventiva para FeLV, entrou no mercado em 1984 nos EUA (Hosie et al., 2009). Actualmente estas vacinas existem já por todo o mundo, podendo ser inactivadas ou recombinantes (Richards et al., 2006).

Uma vez que apenas o FeLV-A é transmitido horizontalmente na natureza, e que a infecção pelos subgrupos B, C e T não ocorrem isoladamente, é amplamente aceite que as vacinas direccionadas contra o FeLV-A são protectoras contra a infecção por FeLV em geral (Hofmann-Lehmann et al., 2007).

A eficácia das vacinas é variável e não parece estar relacionada com o tipo de vacina (inactivada ou recombinante) (Richards et al., 2006; Cohn, 2007). Estudos recentes que procuraram investigar os efeitos das vacinas mostraram que a eficácia das vacinas para o FeLV, conhecidas por proteger os gatos de antigenémia e das doenças associadas ao FeLV, é insuficiente para prevenir a integração do provirus e uma replicação viral mínima (Torres et al., 2005; Hofmann-Lehmann et al., 2007). A relevância da integração proviral não foi ainda clarificada, no entanto, nos animais em que isto ocorre, não há desenvolvimento de virémia persistente nem de doenças associadas ao FeLV, sobrevivendo durante mais tempo (Hofmann-Lehmann et al., 2007). O facto de a vacinação não ser um método 100% eficaz na prevenção da infecção, é importante não descurar os métodos preventivos mesmo em animais vacinados (Gomes-Keller, et al., 2006; Richards, et al., 2006; Levy et al., 2008)

A vacinação não é benéfica em animais positivos e deve ser administrada anualmente apenas em animais negativos, pelo que se o animal nunca foi testado ou o seu estatuto é desconhecido, devem ser realizados testes de diagnóstico antes da vacinação (Richards, et al., 2006; Cohn, 2007; Levy, et al., 2008; Hosie et al., 2009).

### **2.8.3. Vacinação FIV**

Está disponível desde 2002 nos Estados Unidos, desde 2003 no Canadá e desde 2004 na Austrália e na Nova Zelândia uma vacina preventiva contra o FIV, formulada a partir de vírus total inactivado (Kusuhara et al., 2005; Pu et al., 2005; Cohn, 2007; Hosie et al., 2009). Esta vacina é composta pelos subtipos A e D, mas que apresenta também eficácia contra o subtipo B (Kusuhara et al., 2005; Pu, et al., 2005; Grace, 2011).

A vacina preventiva contra o FIV, não está disponível na Europa (Hosie et al., 2009) e não está provado que conceda protecção contra os isolados virais europeus (Hosie et al., 2009). Assim, os felinos importados que estejam vacinados, podem não estar protegidos contra os isolados europeus de FIV (Hosie et al., 2009).

Por todas estas razões, não é recomendada a vacinação dos animais pertencentes a países europeus com vacinas formuladas a partir de isolados virais de outro continente (Hosie et al., 2009). Uma vez que é de esperar que animais vacinados obtenham resultados positivos em testes de diagnóstico que pesquisem anticorpos, estes animais devem ser marcados através de microchip ou tatuagem (Cohn, 2007; Levy et al., 2008).

A vacinação para FeLV e FIV não são consideradas essenciais (Levy, et al., 2008), pelo que a decisão de vacinar ou não um animal deve ser baseada no risco desse animal ser exposto aos agentes (Richards et al., 2006; Levy et al., 2008; Hosie et al., 2009; Levy et al., 2009),

devendo apenas ser vacinados animais com acesso ao exterior e que contactem com outros felinos positivos ou de estatuto desconhecido (Richards, et al., 2006; Levy, et al., 2008; Levy, et al., 2009). Estas vacinas não são de principal importância em felinos com baixo risco de exposição ao agente (Cohn, 2007) e tal como todas as vacinas, tem riscos associados (nomeadamente os sarcomas no local de inoculação no caso do FeLV), pelo que o rácio risco/benefício deve ser bem ponderado (Cohn, 2007).

## **2.9. Prognóstico**

A taxa de mortalidade em animais infectados com FeLV que desenvolvam virémia persistente é de cerca de 50% em dois anos e de 80% em três anos em locais onde habitem mais de um animal, mas inferior em caso de animais infectados que habitem sozinhos exclusivamente no interior (Hartmann, 2011). Um estudo realizado nos EUA, indica que em média um felino infectado por FeLV tem uma taxa de sobrevivência de 2,4 anos, comparado com os animais do grupo controlo em que essa taxa é de 6 anos (Levy, 2006).

Num estudo realizado em animais infectados por FIV por via natural, a progressão da doença foi muito variável, ocorrendo a morte em aproximadamente 18% dos animais nos primeiros dois anos após observação (estima-se que cerca de cinco anos após a infecção). Adicionalmente, também 18% dos animais desenvolveram doença grave, mas mais de 50% sobreviveram durante pelo menos um período de dois anos (Hartmann, 2011) a seis anos após a infecção (Grace, 2011).

Resumidamente, a maioria dos sinais clínicos associados à presença de FIV são reflexo de infecções secundárias ou neoplasias aos quais estes animais são mais susceptíveis. No entanto, com os cuidados apropriados, animais FIV positivos podem viver muitos anos e morrer por causas não relacionadas com o vírus. Embora o FeLV esteja associado a manifestações clínicas mais graves e a uma redução da esperança de vida mais marcada, animais sujeitos a terapia adequada podem viver por muito anos, com elevada qualidade de vida (Hartmann, 2011).

## **3. *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp.**

### **3.1. Etiologia, Epidemiologia e Ciclo de Vida**

A erliquiose e anaplasmose são doenças transmitidas por vectores artrópodes que estão descritas principalmente em medicina canina (Harrus et al., 2005; Vita et al., 2005).

São infecções provocadas por pequenas bactérias gram negativas, pleomórficas, mas quase sempre de forma cocóide, intracelulares obrigatórias, que se encontram em vacúolos de células eucarióticas (Harrus et al., 2005; Heikkilä, Bondarenko, Mihalkov, Pfister, & Spillmann, 2010). Desde 2001, em que foi feita uma reestruturação taxonómica estas

bactérias pertencem à ordem *Rickettsiales*, família *Anaplasmataceae*, e aos géneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*, respectivamente (Dumler et al., 2001; Harrus et al., 2005).

As espécies *Ehrlichia* spp. que infectam animais estão mundialmente distribuídas, apesar de para algumas zonas a distribuição geográfica não estar ainda totalmente esclarecida (Neer et al., 2002). Não está bem claro quais as espécies de *Ehrlichia* spp. capazes de infectar felinos em ambiente natural (Lappin & Breitschwedt, 2006). No entanto, mórulas compatíveis com infecção por este agente foram já observadas em leucócitos de felinos domésticos e selvagens seropositivos a *E. canis*, e o ADN deste agente foi já também detectado em felinos (Harrus et al., 2005; Lappin & Breitschwedt, 2006). Tudo isto leva a crer que a erliquiose monocítica felina seja causada principalmente por *E. canis*, apesar de a sua prevalência não ser conhecida.

A anaplasmoze granulocitotrópica felina é causada pela espécie *Anaplasma phagocytophilum*, anteriormente conhecida como *Ehrlichia equi*, em cavalos, *E. phagocytophila* em ruminantes e “agente da erliquiose granulocítica humana”, em humanos (Lappin & Breitschwedt, 2006). A susceptibilidade dos felinos domésticos à infecção foi documentada pela primeira vez após inoculação experimental. A presença de mórulas compatíveis com infecção por este agente e o seu ADN foram já reportados nos EUA, Suécia, Brasil, Quênia, Itália e Finlândia (Bjoersdorff, Svendenius, Owens, & Massung, 1999; Magnarelli, Bushmich, IJdo, & Fikrig, 2005; Lappin & Breitschwedt, 2006; Billeter et al., 2007; Schaarschmidt-Kiener, Graf, Von Loewenich, & Müller, 2009; Heikkilä et al., 2010).

A forma como é feita a transmissão natural de *Ehrlichia* spp. entre felinos é ainda desconhecida, no entanto, suspeita-se que seja feita de forma similar à dos canídeos, ou seja, através de vectores ixodídeos (Lappin & Breitschwedt, 2006).

Em cães, o principal vector de *E. canis* é o ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus* (Dryden & Payne, 2004; Harrus et al., 2005; Stich, Schaefer, Bremer, Needham, & Jittapalapong, 2008). Apesar de este ixodídeo raramente utilizar o gato como hospedeiro, felinos que habitem em casas onde uma população de *R. sanguineus* já esteja estabelecida, podem estar em risco de infestação por este vector e desenvolvimento de erliquiose (Dryden & Payne, 2004). O *R. sanguineus* é mais abundante no tempo quente, pelo que a maioria dos casos ocorre no Verão. Uma vez que o vector tem distribuição mundial, também a doença ocorre um pouco por todo o mundo (Ásia, Europa, África e América) (Harrus et al., 2005). O *Dermacentor variabilis*, é também um dos vectores de *E. canis* em canídeos, e o facto de se alimentar com frequência em felinos, torna-o um potencial agente transmissor de erliquiose a felídeos domésticos (Johnson, Ewing, Barker, Fox, Crow, & Kocan, 1998; Dryden & Payne, 2004; Harrus et al., 2005).

*A. phagocytophilum* é transmitido por vários ixodídeos do género *Ixodes* (Lappin & Breitschwedt, 2006), sendo que na Europa a espécie mais comum é *I. ricinus* (Harrus et al., 2005; Beugnet & Marie, 2009; Stuen, 2007).

Aparentemente, tanto a erliquiose como a anaplasmoze podem ser transmitidas de forma iatrogénica através do sangue (nomeadamente por transfusão), pelo que se devem despistar os animais dadores (Lappin & Breitschwedt, 2006).

A transmissão através de ixodídeos é realizada por *co-feeding* e transestadialmente, sendo que as formas jovens (larvas e ninfas) se infectam aquando da ingestão de sangue de um hospedeiro vertebrado infectado (Shaw, Day, Birtles & Breitschwerdt, 2001; Harrus et al., 2005; Stich et al., 2008).

Aquando da alimentação os ixodídeos portadores injectam o agente, em conjunto com as secreções salivares, no local da picada (Davoust et al., 2003).

Os principais hospedeiros vertebrados de *E. canis* são o cão doméstico e outros membros da família Canidae (Harrus et al., 2005). Contudo, o seu ADN foi também já identificado no sangue de felinos domésticos (Harrus et al., 2005).

Apesar de *A. phagocytophilum* poder afectar uma série de mamíferos (cães, cavalos, burros, gatos, cervídeos, raposas, roedores, entre outros) (Heikkilä et al., 2010), os seus hospedeiros naturais no continente Europeu são os ovinos e o corço (*Capreolus capreolus*) (Stuen, 2007; Beugnet & Marie, 2009). No entanto, várias espécies de roedores são frequentemente infectadas apesar de o seu papel como reservatórios ou como agentes de transmissão não estar ainda bem esclarecido (Lappin & Breitschwedt, 2006; Beugnet & Marie, 2009). As aves, em especial as migratórias, parecem ter também papel como reservatório do agente contribuindo para a sua distribuição e disseminação geográfica (Stuen, 2007; Heikkilä et al., 2010).

Não se sabe ainda se os felinos podem servir como hospedeiros reservatório de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. ou se são apenas hospedeiros acidentais que se tornam infectados quando picados por carraças infectadas (Little, 2010).

Um estudo de seroprevalência realizado nos Estados Unidos revela que a frequência com que os gatos são infectados por *A. phagocytophilum* não é relevante o suficiente para que possam ser considerados hospedeiros de manutenção para este agente (Billeter et al., 2007).

### **3.3. Patogenia**

Apesar de descrita em gatos, a doença causada por *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp., não é ainda bem compreendida e parece ser bastante mais rara que em canídeos (Little, 2010). Com base em evidências clínicas, laboratoriais e radiológicas, a patogenia destas infecções em felinos parece ser muito similar à da infecção por *E. canis* e *A. phagocytophilum* nos

canídeos domésticos (Lappin & Breitschwedt, 2006), pelo que vai ser descrita com base no que acontece em canídeos.

### **3.3.1. Patogenia de *Ehrlichia canis***

No caso dos elementos da espécie *E. canis*, uma vez no organismo dos canídeos, segue-se um período de incubação de 8 a 20 dias, durante o qual o agente entra nas correntes sanguínea e linfática e se aloja no interior dos macrófagos, principalmente do fígado, baço, linfonodos e medula óssea, onde replica por divisão binária, formando no interior das células agregados característicos denominados por mórulas (Harrus et al., 2005). A partir daí as células infectadas disseminam a infecção por todo o organismo (Harrus et al., 2005). As mórulas de *Ehrlichia* spp., podem também ser vistas em linfócitos e monócitos periféricos (Lappin & Breitschwedt, 2006). A forma como este agente sobrevive e se multiplica nas células infectadas, está provavelmente relacionada com a: (1) inibição da fusão entre lisossoma e fagossomas; (2) inibição da apoptose nas células hospedeiras (Harrus et al., 2005; Neer & Harrus, 2006).

Ao período de incubação seguem-se as fases aguda, subclínica e crónica da doença. A fase aguda pode durar 1-4 semanas (Harrus et al., 2005). Apesar de ainda não completamente esclarecidos, vários aspectos imunopatológicos desta fase da doença (Castro, Machado, Aquino, Alessi, & Costa, 2004), parece haver uma desregulação do sistema imunitário e desenvolvimento por parte do agente de mecanismos de evasão às defesas do hospedeiro (Castro et al., 2004). Os animais imunocompetentes eliminam o agente por completo, pelo contrário, os animais que não o conseguem fazer e que não são tratados ou são tratados de forma inadequada entram na fase de doença subclínica, tornando-se portadores persistentes da doença por meses ou anos. Tem sido proposto que a infecção persistente seja facilitada por sucessivas recombinações dos genes das proteínas de membrana externas do organismo, o que permite a evasão ao sistema imune. O baço desempenha um papel chave na patogenia e persistência da doença, havendo estudos que sugerem que é nele que é feito o sequestro das células infectadas durante a fase de portador assintomático (Harrus et al., 2005; Shaw et al., 2001).

Alguns animais persistentemente infectados recuperam espontaneamente da infecção, no entanto outros evoluem para a forma crónica e grave da doença (Harrus et al., 2005). Nem todos os animais desenvolvem esta fase e os factores que levam ao seu desenvolvimento permanece desconhecido (Harrus et al., 2005). Ao contrário das restantes fases de doença, o prognóstico desta fase é grave, podendo ocorrer a morte como consequência de hemorragia e/ou infecção secundária (Harrus et al., 2005).

### 3.3.2. Patogenia de *A. phagocytophilum*

Mesmo em canídeos a patogenia da infecção por *A. phagocytophilum*, não é bem conhecida. Após entrada no organismo, segue-se um período de incubação de uma a duas semanas (Neer & Harrus, 2006) e o agente é disseminado por via sanguínea e/ou linfática, alojando-se principalmente nos neutrófilos e eosinófilos, apesar de não estar ainda claro se os organismos infectam as células maduras ou os precursores mielóides (Harrus et al., 2005). Pensa-se que a entrada nas células é efectuada graças à p-selectina, uma molécula membranar da superfície dos neutrófilos que actua como receptor do agente (Harrus et al., 2005; Neer & Harrus, 2006). Após endocitose, esta bactéria multiplica-se por divisão binária nos fagossomas das células alvo, produzindo vinte ou mais organismos, formando as características mórulas (Harrus et al., 2005; Neer & Harrus, 2006). Graças à sua capacidade de impedir a ligação do fagossoma e lisossoma o organismo impede a sua degradação (Harrus et al., 2005; Neer & Harrus, 2006). A infecção estende-se depois ao tecidos dos órgãos do sistema mononuclear fagocitário (baço, fígado, e medula óssea) (Neer & Harrus, 2006).

Não se sabe exactamente como é que este agente provoca doença, no entanto, em gatos experimentalmente infectados, foram desenvolvidos anticorpos antinucleares e um aumento da expressão do ARNm do IFN- $\gamma$ , sugerindo que uma componente imunológica pode contribuir para os sinais clínicos manifestados (Foley, Leutenegger, Stephen-Dumler, Pedersen, & Madigan, 2003).

### 3.4. Sinais clínicos

A gravidade da doença clínica, além de variar de indivíduo para indivíduo, está também relacionada com a estirpe de *Ehrlichia* spp. ou *Anaplasma* spp. infectante, e com a presença ou não de imunodeficiência ou doenças concomitantes (nomeadamente as transmitidas por ixodídeos). A maioria dos felinos domésticos diagnosticados tem acesso ao exterior, idade superior a um ano e pelagem curta (Lappin et al., 2004; Lappin & Breitschwedt, 2006). Não se verificou predisposição de sexo ou de raça (Lappin & Breitschwedt, 2006), mas a infestação por ixodídeos parece ser um factor predisponente (Lappin, et al., 2004).

A maioria dos animais afectados tanto por *Ehrlichia* spp., como por *A. phagocytophilum*, apresentam sinais clínicos inespecíficos como febre, letargia, anorexia e perda de peso (Lappin & Breitschwedt, 2006; Sherding, 2006; Bjoersdorff, Svendenius, Owens, & Massung, 1999; Little, 2010). Nas infecções por *A. phagocytophilum*, a sintomatologia apresentada não vai muito além da atrás referida e é normalmente menos exuberante e mais fácil de reverter. Os animais em que elementos do género *Ehrlichia* são os agentes etiológicos (e mais raramente, em alguns casos de infecção por *Anaplasma* spp.), podem apresentar hiperstesia, claudicação, dores musculares, rigidez do pescoço e/ou articulares (poliartrite

neutrofílica). As alterações neuromusculares são provavelmente resultantes de meningite ou meningoencefalite, por inflamação e/ou hemorragia, enquanto as artropatias parecem estar relacionadas com hemartrose ou deposição de complexos imunes (Lappin & Breitschwedt, 2006; Billeter, Spencer, Griffin, Dykstra, & Blagburn, 2007; Heikkilä, Bondarenko, Mihalkov, Pfister, & Spillmann, 2010). Alguns animais apresentam ainda aumento da irritabilidade, vômito, diarreia, dispneia, petéquias, membranas pálidas, taquipneia e ruídos respiratórios (Lappin & Breitschwedt, 2006).

Sinais oculares, tal como acontece em canídeos, foram já descritos em gatos com erliquiose ou anaplasiose, nomeadamente conjuntivite (Little, 2010; Heikkilä, Bondarenko, Mihalkov, Pfister, & Spillmann, 2010), corrimento ocular (Billeter et al., 2007), hemorragias do vítreo (Lappin & Breitschwedt, 2006) e descolamento de retina (Heikkilä et al., 2010). Estas alterações devem-se a infiltrados inflamatórios linfocíticos, monocíticos e plasmocíticos, hemorragias e vasculite (Komnenou et al., 2007).

Ao exame físico, esplenomegália, linfademomegália, dispneia (por pneumonia intersticial), petéquias, mucosas pálidas são as anormalidades mais frequentes nas infecções por *Ehrlichia* spp., enquanto que o achado mais frequente em animais com *Anaplasma* spp. é apenas a presença de ixodídeos (Lappin & Breitschwedt, 2006; Bjoersdorff, Svendenius, Owens, & Massung, 1999; Heikkilä et al., 2010).

Alguns animais apresentam ainda sinais clínicos relacionados com doenças concomitantes, sendo as mais frequentes a infecção por *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus M. haemominutum*, *Cryptococcus neoformans*, FIV e FeLV (Lappin & Breitschwedt, 2006).

### **3.5. Diagnóstico**

O diagnóstico de erliquiose e anaplasiose felinas começa normalmente com a avaliação da anamnese (história de exposição a carrças), história clínica (presença e duração do sinais clínicos) e do perfil sanguíneo (hemograma) do paciente (Little, 2010). A confirmação laboratorial pode ser feita por serologia ou por *Polymerase Chain Reaction* (PCR), apesar de outros métodos como a observação microscópica de mórulas no esfregaço sanguíneo e a cultura celular serem também utilizados. Idealmente, de forma a maximizar a sensibilidade do diagnóstico, as técnicas serológicas e o PCR devem ser usadas em simultâneo em qualquer animal suspeito de erliquiose ou anaplasiose (Little, 2010).

#### **3.5.1. Serológico**

Os testes serológicos para a detecção de anticorpos contra espécies de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. em felinos, nomeadamente a IFI e o *Western Blot*, não estão ainda padronizados (Lappin & Breitschwedt, 2006; Neer, Breitschwerdt, Greene, & Lappin, 2002). Além disso, foi verificada a presença de reactividade serológica cruzada entre elementos que pertencem aos géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma* e *Neorickettsia*, pelo que uma serologia

positiva pode indicar a presença de um ou mais destes agentes sem que se consiga identificá-los individualmente (Neer et al., 2002; Lappin & Breitschwedt, 2006; Heikkilä, Bondarenko, Mihalkov, Pfister, & Spillmann, 2010). Aparentemente, tal como na ehrliquiose canina, também nos felinos a doença clínica pode desenvolver-se anteriormente à seroconversão, pelo que, um único resultado de anticorpos negativos num gato com doença aguda não permite excluir a infecção (Lappin & Breitschwedt, 2006).

O diagnóstico definitivo não deve ser feito baseado unicamente nos testes serológicos, devendo-se recorrer à realização de PCR, utilizando *primers* específicos para a espécie ou posterior sequenciação dos produtos obtidos (Lappin & Breitschwedt, 2006).

### **3.5.2. Molecular**

O PCR é uma técnica sensível no diagnóstico de casos agudos de ehrliquiose e anaplasmoses, uma vez que detecta o ADN do agente em circulação, mesmo em pequenas quantidades (Neer et al., 2002). Em canídeos infectados experimentalmente este método permite obter resultados positivos a partir de 4-10 dias após o contacto com o agente no caso de *E. canis* e 7-11 dias no caso de *A. phagocytophilum* (Neer et al., 2002).

Pode ser realizado a partir de sangue periférico, tecido esplénico ou medula óssea (Heikkilä et al., 2010) utilizando *primers* que amplifiquem todas as sequências de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. ou *primers* específicos para determinadas espécies (Neer et al., 2002).

As limitações do diagnóstico por PCR estão principalmente relacionados com a utilização de quantidades inadequadas de controlo podendo resultar em resultados falso-positivos e falso-negativos (Neer et al., 2002). Resultados de PCR negativos são difíceis de interpretar e, quando estão presentes sinais clínicos compatíveis com a infecção, não devem ser usados como critério único de exclusão. Podem ocorrer quando a quantidade de organismos em circulação estão abaixo do nível de detecção, em infecções crónicas, após o início do tratamento com antibiótico, ou por erros inerentes à própria técnica (Little, 2010).

### **3.5.3. Métodos de exame directo**

A observação directa das mórulas em células infectadas é indicativa de que se trate de uma infecção por *Ehrlichia* spp. ou *Anaplasma* spp. (Lappin & Breitschwedt, 2006; Little, 2010). Não existem dados em felinos, porém, em canídeos, a observação de mórulas não é muito comum, mesmo em animais em que a sintomatologia é exuberante (Little, 2010). Segundo Harrus et al. (2005), em apenas 4% dos casos de canídeos infectados com *E. canis*, é possível observar mórulas ao microscópio. Aparentemente, em felinos, a probabilidade de serem observadas células infectadas é maior se o sangue for colhido a partir de veias auriculares relativamente a vasos de maiores dimensões (Beaufils & Jumelle, 1995 citado por Lappin & Breitschwedt, 2006).

A observação directa por si só não serve então para estabelecer o diagnóstico etiológico, uma vez que está associada a elevados números de falsos positivos e negativos e que, mesmo na presença de mórulas, não é possível diferenciar os géneros e identificar as espécies (Lappin & Breitschwedt, 2006).

#### **3.5.4. Cultura celular**

A cultura de monócitos obtidos a partir de sangue total de gatos afectados, pode ser usada para confirmar a infecção por elementos do género *Ehrlichia* (Lappin & Breitschwedt, 2006), no entanto, esta técnica não está ainda bem documentada para utilização em felinos e mesmo para canídeos, por ser bastante dispendiosa, demorada, e não disponível rotineiramente. Actualmente apenas é utilizada como ferramenta na área de investigação (Neer et al., 2002).

#### **3.5.5. Alterações hematológicas e bioquímicas**

A anemia não regenerativa é a alteração mais consistente, apesar de estar descrito o caso de um animal, co-infectado com micoplasma, que apresentava anemia regenerativa (Lappin & Breitschwedt, 2006). Na linha branca podem ocorrer pancitopénia ou leucopenia/leucocitose, neutropénia/neutrofilia, linfocitose, monocitose e trombocitopénia (Lappin & Breitschwedt, 2006; Sherding, 2006). Em felinos com erliquiose que apresentem citopénias, deve ser feita avaliação da medula óssea para a linha celular afectada, pois está já descrita hipoplasia primária em animais afectados (Lappin & Breitschwedt, 2006). Raramente ocorrem alterações do perfil bioquímico, sendo a hiperglobulinémia (gamopatia mono, mas principalmente policlonal) as alterações encontradas com maior consistência (Lappin & Breitschwedt, 2006; Sherding, 2006). Em animais com erliquiose em que a história ou exame clínico é compatível com doença respiratória, observa-se radiologicamente padrão intersticial a nível pulmonar (Lappin & Breitschwedt, 2006).

#### **3.6. Tratamento**

Em canídeos, os fármacos com maior sucesso no tratamento de erliquiose são as tetraciclinas, cloranfenicol e dipropionato de imidocarb (Neer & Harrus, 2006). Em felinos, a tendência foi para utilizar os mesmos fármacos descritos para cães. A maioria dos estudos apontam o tratamento com doxiciclina (5-10 mg/Kg BID, PO, 21-28 dias) como sendo o mais eficaz contra todas as espécies de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. em felinos (Neer et al., 2002; Lappin et al., 2004; Heikkilä et al., 2010). *The Infectious Disease Study Group of the American College of Veterinary Internal Medicine* recomenda que seja utilizada doxiciclina na dose de 10 mg/Kg durante no mínimo 28 dias em animais suspeitos de doença clínica causada por erliquiose (Lappin & Breitschwedt, 2006). O tratamento da anaplasmosose por *A. phagocytophilum* deve também ser feito com doxiciclina, no entanto a duração do mesmo não está ainda bem definida. O período de tempo normalmente recomendado é de 14 dias,

mas por causa de infecções persistentes, este período é muitas vezes alargado por muitos clínicos para quatro semanas (Little, 2010). Apesar de resolver os sinais clínicos sem que haja recorrência (Lappin & Breitschwedt, 2006; Lappin et al., 2004; Bjoersdorff, Svendenius, Owens, & Massung, 1999; Heikkilä et al., 2010), este antibiótico, à semelhança do que acontece nos cães, pode não levar à seronegatividade, podendo estar presentes pelo resto da vida do animal títulos elevados e persistentes (Lappin & Breitschwedt, 2006).

A tetraciclina (22 mg/Kg, PO, TRID, 21 dias) e o dipropionato de imidocarb (2 doses de 5 Mg/Kg, IM, com suas semanas de intervalo) levam também à remissão dos sinais clínicos da erliquiose e anaplasose em gatos (Lappin & Breitschwedt, 2006; Sherding, 2006). As fluorquinolonas, incluindo a enrofloxacina não são eficazes no tratamento de *Ehrlichia* spp., mas podem ter acção contra *A. phagocytophilum* (Little, 2010).

*A. phagocytophilum* é resistente a vários antibióticos, nomeadamente os compostos betalactâmicos, macrólidos, sulfonamidas, lincosamidas e aminoglicosídeos (Branger, Rolain, & Raoult, 2004; Horowitz et al., 2001; Klein, Nelson, & Goodman, 1997; Maurin, Bakken, & Dumler, 2003), e a sensibilidade do cloranfenicol para estes é fraca (Klein et al., 1997; Horowitz et al., 2001).

Similarmente ao que acontece nas infecções por *E. canis* e por *A. phagocytophilum* em cães e humanos, também nos gatos, a duração inadequada do tempo de tratamento e a falha na escolha do antibiótico pode resultar na recorrência da doença e na incompleta resposta ao tratamento (Lappin et al., 2004).

### **3.7. Importância em Saúde Pública**

Com a excepção de *A. platys* (que afecta apenas o cão), todos os elementos pertencentes aos géneros *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. são considerados agentes zoonóticos (Nicholson et al., 2010). Em humanos, *E. chaffensis* é o agente etiológico da forma mais grave de erliquiose, provocando a chamada Erliquiose Monocítica Humana (ou EMH). No entanto, também as espécies *E. canis* e *A. phagocytophilum* são considerados agentes zoonóticos (Harrus et al., 2005; Little, 2010). Tal como nos animais domésticos, a doença em humanos é transmitida através de picada de carraças, não havendo até então evidências de que possa correr transmissão directa de espécies de erliquia de cães e gatos para pessoas (Little, 2010). Contudo, a transmissão por contacto sanguíneo directo (por feridas, etc.) entre humanos e animais infectados pode levar à transmissão da doença pelo que esse tipo de contacto deve ser evitado (Little, 2010).

#### 4. *Rickettsia* spp.

##### 4.1. Etiologia

Os elementos do género *Rickettsia*, pertencem à família *Rickettsiaceae*, ordem *Rickettsiales* (Sousa, Nóbrega, Bacellar, & Torgal, 2003; Parola, Paddock, & Raoult, 2005; Renvoisé & Raoult, 2009), e são bactérias gram negativas, pleomórficas, intracelulares obrigatórias (Greene, 2006; Hawley, Shaw, & Lappin, 2007). As espécies conhecidas dividem-se em dois grandes grupos: o grupo exantemático ou das febres enxantémicas (*spotted fever group*) e o grupo do tifo (*typhus group*) (Raoult & Roux, 1997; Hawley, Shaw & Lappin, 2007; Hsu et al., 2011). No grupo exantemático as espécies com maior importância são *R. conorii*, *R. rickettsii*, *R. japonica*, *R. akari*, e *R. felis* (Hawley, Shawn & Lappin, 2007), e no grupo do tifo as espécies *R. prowazekii* e *R. typhi* são as de maior importância (Greene 2006).

##### 4.2. Epidemiologia

Os elementos do género *Rickettsia* possuem distribuição cosmopolita (Raoult & Roux, 1997; Parola et al., 2005;) e são capazes de infectar o Homem e vários mamíferos domésticos e selvagens como canídeos, felídeos e roedores (Greene, 2006).

Estas bactérias são transmitidas por vectores artrópodes (Raoult & Roux, 1997). As pertencentes ao grupo exantemático são transmitidas por ixodídeos, com a excepção das espécies *R. akari* (transmitida por piolhos) e *R. felis* (transmitida por pulgas) (Hawley et al., 2007), enquanto as pertencentes ao grupo do tifo são transmitidas por pulgas e piolhos (Greene, 2006).

A maioria das infecções por *Rickettsia* spp. são zoonoses (Hsu et al., 2011). Nos felinos domésticos foram já detectados anticorpos reactivos contra *R. conorii* (Matthewman et al., 1997; Solano-Gallego, Hegarty, Espada, Llull, & Breitschwerdt, 2006; Alves et al., 2009), *R. typhi* (Sorvillo et al., 1993; Azad et al., 1997; Matthewman et al., 1997; Breitschwerdt et al., 2005; Case et al., 2006) e *R. felis* (Breitschwerdt et al., 2005; Case et al., 2006; Kamrani, Parreira, Greenwood, & Prescott, 2008), apesar de infecção activa não ter sido detectada em nenhum dos casos.

*R. conorii* é o agente etiológico da febre botonosa (FB) ou *Mediterranean Spotted Fever* (MSF), que é uma doença urbana e peri-urbana endémica na periferia do mar Mediterrâneo, mas que pode ocorrer também na Europa Central, África Central e América do Sul (Parola et al., 2005; Renvoisé & Raoult, 2009). O seu principal vector é o ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus*, pertencente à família *Ixodidae* (Sousa et al., 2003; Renvoisé & Raoult, 2009), que na Europa tem maior actividade na Primavera e Verão, altura em que é mais provável que a infecção por este agente se desenvolva (Parola et al., 2005). Embora *R. sanguineus* esteja bem adaptado ao ambiente urbano, o seu hospedeiro é relativamente fixo e

raramente se alimenta em felinos e humanos, a menos que o seu hospedeiro favorito (cão doméstico) não esteja disponível (Parola et al., 2005).

A MSF é uma doença endémica em Portugal (Sousa et al., 2003). Os principais hospedeiros e reservatórios são o cão e os roedores (Greene & Breitschwerdt, 2006; Parola et al., 2005). No entanto, também os felinos mostraram poder ser infectados por este agente (Matthewman et al., 1997).

*R. typhi* é o agente etiológico do tifo murino e é um dos principais agentes de riquetsiose no mundo. Os roedores são os principais hospedeiros mamíferos, apesar de ocasionalmente outros hospedeiros, como gatos que vivam ou contactem frequentemente com zonas habitadas por roedores, estarem envolvidos na infecção (Azad & Beard, 1998). O principal vector artrópode é a pulga *Xenopsylla cheopis* (Bitam et al., 2006), no entanto outras espécies de pulgas como *C. felis*, foram já descritas como podendo estar envolvidas no ciclo epidemiológico do agente (Sousa et al., 2006).

*R. typhi* está distribuída por todo o mundo, apesar de ser mais comum em zonas costeiras quentes onde grandes populações de ratos e seus ectoparasitas (pulgas da ordem *Siphonaptera*) são mais prevalentes (Azad & Beard, 1998). O facto de a infecção provocada ser normalmente ligeira e inespecífica, sugere que a sua incidência seja, provavelmente muito subestimada, principalmente em países tropicais. Esta doença é prevalente no Texas, Estados Unidos, vários países mediterrâneos (Grécia, Espanha, Portugal, Croácia, Chipre e Israel), na Ásia (Tailândia, Vietnam, Japão, Indonésia e China) e em África (Letaïef et al., 2005).

*R. felis*, antigamente designada de agente do ELB, e actualmente reconhecida como agente etiológico da febre maculosa foi detectada pela primeira vez no Texas em 1990 através de microscopia electrónica, quando tecidos de pulgas provenientes de felinos (*Ctenocephalides felis*) estavam a ser examinados como possíveis vectores de *R. typhi* (Márquez, Muniain, Pérez & Pérez, 2002; Gratz, 2006). Nesta altura, este agente foi integrado no grupo do tifo, dada a indução de anticorpos por reacção cruzada com *R. typhi* (Azad et al., 1992). Estudos realizados posteriormente, com base em sequenciação genética e técnicas bacteriológicas mostraram que na realidade este agente pertence ao grupo das febres exantemáticas (Higgins, Radulovic, Schriefer, & Azad, 1996).

A espécie *R. felis* já foi encontrada em pulgas de todos os continentes, e apesar de as da espécie *C. felis*, serem consideradas os vectores e reservatórios primários (Breitschwerdt et al., 2005; Gilles et al., 2008; Little, 2010), foi já isolada em outras espécies como *C. canis*, *Pulex irritans*, *Archeopsylla erinacei* (Bitam et al., 2006), e ainda em *Xenopsylla cheopis* (Beugnet & Marie, 2009). Uma vez que a espécie *C. felis* tem distribuição mundial e que a infestação com estas pulgas é muito comum, pode assumir-se que *R. felis* ocorre também mundialmente (Rolain, Franc, Davoust, & Raoult, 2003), inclusivé em Portugal, onde pulgas infectadas com *R. felis* foram já identificadas (Alves et al., 2009).

Uma vez que o principal vector de *R. conorii* raramente utiliza o gato doméstico como hospedeiro (Parola et al., 2005), a presente dissertação irá focar-se essencialmente nas espécies *R. felis* e *R. typhi* como agentes de riquetsioses em felinos.

### 4.3. Patogenia e Ciclo de Vida

A patogenia da infecção por *R. felis* e *R. typhi* tem ainda muitos aspectos desconhecidos (Parola et al., 2005; Breitschwerdt et al., 2005).

As células dos vectores artrópodes têm-se mostrado ideais para a multiplicação dos elementos do género *Rickettsia* (Raoult & Roux, 1997). Os vectores podem infectar-se por duas vias: transmissão das fêmeas adultas para os ovos (trasovaricamente) ou por ingestão de sangue infectado (transtestadialmente) (Azad et al., 1997; Wedincamp & Foil, 2002; Parola et al., 2005; Greene & Breitschwerdt, 2006). A transmissão vertical pode ser mantida durante 12 gerações, sem que as pulgas se alimentem de sangue de hospedeiros infectados (Wedincamp & Foil, 2002), pelo que é considerada a principal via de transmissão (McElroy, Blagburn, Breitschwerdt, Mead & McQuiston, 2010).

A infecção de *C. felis* por *R. felis* e *R. typhi* por via sanguínea parece ocorrer de forma semelhante (Azad et al., 1997). A infecção da pulga ocorre quando ao efectuar uma refeição sanguínea, as células do hospedeiro vertebrado infectado que albergam o agente são ingeridas e alojadas no intestino do vector. Estas células são rapidamente destruídas (em cerca de 6 horas), ocorrendo a libertação do agente que vai integrar e multiplicar-se exponencialmente nas células epiteliais intestinais do vector durante os dias que se seguem (Azad et al., 1997). São necessários pelo menos dez dias para que uma pulga infectada possa transmitir a infecção a outro hospedeiro através das fezes infectadas.

Nem todos os aspectos da interacção riquetsia-vector estão ainda esclarecidos (Azad et al., 1997), no entanto, pensa-se que aquando de uma nova alimentação de um vector com capacidade infectante, as riquetsias sofrem uma série alterações fisiológicas e voltam a multiplicar-se intensamente, como se estivessem a passar de um estadio latente não-virulento, para um estadio patogénico (Parola et al., 2005).

Os hospedeiros vertebrados são infectados através da picada dos vectores artrópodes, nomeadamente *C. felis* no caso de *R. felis* e *R. typhi* (Parola et al., 2005; Greene & Breitschwerdt, 2006; Renvoisé & Raoult, 2009) ou pela inoculação cutânea de saliva infectada (Azad et al., 1997; Renvoisé & Raoult, 2009). Contudo, a transmissão por inalação ou inoculação através da mucosa de fezes ou macerados dos vectores parece também ser possível (Azad et al., 1997; Sousa et al., 2003; Renvoisé & Raoult, 2009). A infecção inicia-se no local de inoculação, no entanto não são ainda conhecidas quais as células alvo na fase inicial de infecção. Após fagocitose e interiorização, os vacúolos fagocíticos são rapidamente destruídos e as riquetsias escapam à digestão fagocítica, multiplicando-se

livremente no citoplasma das células infectadas (Raoult & Roux, 1997). Posteriormente, as bactérias entram em circulação e vão ligar-se às suas células alvo (as células endoteliais do hospedeiro), seguindo-se uma vasculite, responsável pelas alterações clínicas e laboratoriais típicas da doença (Renvoisé & Raoult, 2009).

Apesar de estar descrito que os felinos desenvolvem anticorpos contra *Rickettsia* spp., a evolução clínica associada a essa infecção está pouco documentada (Azad et al., 1997; Wedincamp & Foil, 2000; Bayliss, et al., 2009).

#### **4.4. Sinais clínicos**

Apesar destes agentes (*R. felis* e *R. typhi*) serem patogénicos para humanos (Azad et al., 1997; Raoult & Roux, 1997; Parola et al., 2005), não estão descritos casos de infecção clínica provocada por *Rickettsia* spp. em felinos. Estudos realizados em felinos infectados por *R. felis* natural e experimentalmente, documentam o desenvolvimento de anticorpos, sugerindo que pelo menos ocorre uma infecção transitória (Wedincamp & Foil, 2000; Breitschwerdt et al., 2005; Case, Chomel, Nicholson & Foley, 2006; Beugnet & Marie, 2009), apesar de a bacteriémia resultante dessa infecção ser de curta duração (Wedincamp & Foil, 2000).

Num estudo realizado por Breitschwerdt et al. (2005) nos gatos seroreactivos a *Rickettsia* (93/436), os achados mais frequentes foram a linfadenopatia, história de convulsões e outras alterações neurológicas. Os animais que possuíam anticorpos contra *Rickettsia* eram também mais propensos a ter temperatura corporal baixa (<38,3°C) e laboratorialmente tinham tendência para apresentar policitémia (HCT e a concentração de hemoglobina elevados) e aumento da Gama-glutamil transferase (GGT) (Breitschwerdt et al., 2005). Neste estudo, não se encontrou relação entre a presença de FIV, FeLV e *Bartonella henselae* e a seroreactividade com *Rickettsia* (Breitschwerdt et al., 2005).

#### **4.5. Diagnóstico**

Uma vez que em felinos a infecção por riquetsias não é normalmente acompanhada de sinais clínicos ou apenas de sinais bastante inespecíficos, o seu diagnóstico ocorre habitualmente como um achado, e é mais frequente em estudos de rastreio.

O diagnóstico de riquetsioses felinas pode ser efectuado por técnicas serológicas, nomeadamente microimunofluorescência (Shaw, 2008), IFI (Breitschwerdt et al., 2005), *Western Blot* (Parola et al., 2005; Renvoisé & Raoult, 2009), ELISA e *Definitive Epitope-Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (DEB-ELISA) (Breitschwerdt et al., 2005). Apesar de a serologia não ser muito sensível e específica, continuam a ser muito utilizada em todo o mundo (Parola et al., 2005). A principal limitação dos testes serológicos é a elevada frequência de reacções cruzadas entre diferentes espécies do género *Rickettsia* (Azad et al., 1997; Shaw, 2008; Renvoisé & Raoult, 2009), pelo que os resultados obtidos

por esta técnica devem ser complementados com PCR e/ou isolamento directo a partir de cultura (Azad et al., 1997; Parola et al., 2005).

O teste com maior sensibilidade é a amplificação de ADN por PCR e eventual sequenciação (Oliveira et al., 2002; Shaw, 2008). Tem a vantagem de permitir a identificação das riquetsias ainda antes da seroconversão (Kidd et al., 2008), no entanto, pode estar associado a falsos negativos caso a quantidade de riquetsias na amostra seja muito reduzida (Breitschwerdt et al., 2005).

A cultura pode também ser realizada, mas uma vez que as riquetsias possuem pouca viabilidade para isolamento, as amostras devem ser colhidas antes da realização de qualquer tratamento com antibiótico e ser submetidas ao procedimento o mais rapidamente possível. Esta técnica tem o inconveniente de ser uma técnica demorada (cerca de 15 dias) e trabalhosa, pelo que não é usada rotineiramente (Galvão et al., 2006). Pode ser realizada a partir de sangue, biopsia de tecidos ou dos vectores (Renvoisé & Raoult, 2009).

#### **4.6. Tratamento**

Em felinos, o tratamento não é aplicado uma vez que a infecção por elementos do género *Rickettsia* não é muito frequente, e por norma, apesar do desenvolvimento de anticorpos, não provoca sinais clínicos (Bayliss et al., 2009).

#### **4.7. Importância em Saúde Pública**

*R. typhi* é uma zoonose de distribuição mundial que é transmitida aos humanos principalmente pelo contacto com as fezes dos vectores, particularmente pulgas da espécie *C. felis* (Bitam et al., 2010). A maioria dos sintomas apresentados por pessoas infectadas (febres altas, cefaleias, calafrios, mialgia, fraqueza e náuseas) são semelhantes aos de muitas outras doenças infecciosas, pelo que a confirmação da infecção tem de ser realizada laboratorialmente (Bitam et al., 2010). As erupções cutâneas são patognomónicas e podem apresentar-se como maculares (49%), macropapulares (29%), papulares (6%) e morbiliformes (3%). Aparecem normalmente no tronco, mas podem ocorrer também nas extremidades (Bitam et al., 2010). A infecção por elementos da espécie *R. felis*, apesar de também possuir distribuição mundial, é mais comum em países mais quentes e está associada a menos casos de infecção em humanos que a espécie *R. typhi* (Gratz, 2006; Bitam et al., 2010). Quando presente, os sintomas são similares aos manifestados em infecções por outras riquetsioses: febre, cefaleias e escaras no local de picada da pulga. Outros sinais presentes com frequência são fadiga, mialgias, fotofobia, conjuntivite, dor abdominal, vómitos e diarreia (Beugnet & Marie, 2009; Bitam et al., 2010).

## 5. *Mycoplasma haemofelis*

### 5.1. Etiologia

*M. haemofelis* é, juntamente com *Candidatus M. haemominutum* e *Candidatus M. turicensis*, um dos três micoplasmas hemotrópicos com maior importância em medicina felina (Harvey, 2006; Willi et al., 2007).

Originalmente os micoplasmas hemotrópicos eram classificados como riquetsias (ordem *Rickettsiales*, família *Anaplasmataceae*) e incluídos nos gêneros *Haemobartonella* e *Eperythrozoon*. Estudos recentes realizados com base na sequenciação do gene 16S do ARNr, aliados a outros factores (ausência de parasitismo intracelular, tamanho reduzido dos organismos e seu genoma, ausência de flagelo e de parede celular, resistência às penicilinas e a sensibilidade às tetraciclinas), permitiram a sua reclassificação e inclusão na classe *Mollicutes*, família *Mycoplasmataceae*, género *Mycoplasma* (Neimark et al., 2001; Messick, 2004; Willi et al., 2007). Apesar da sua relação filogenética com os membros do género *Mycoplasma*, a nomenclatura destes agentes deve incluir o prefixo *haemo-*, por se tratarem dos únicos *Mycoplasma* sp. que atacam os glóbulos vermelhos (Harvey, 2006).

A maioria dos estudos realizados referem a infecção por *Candidatus M. haemominutum* como a mundialmente mais prevalente, contudo é a infecção por *M. haemofelis* a que apresenta maior importância clínica por ser consideravelmente mais patogénico que os restantes (Willi et al., 2007a; Sykes, 2010; Tasker, 2010; Grace & Norsworthy, 2011). Por essa razão, a presente dissertação irá focar-se apenas no agente *M. haemofelis*.

*M. haemofelis* é uma bactéria, gram negativa, sem parede celular, pleomórfica. Com coloração de *Romanowsky*, apresenta-se usualmente como pequenas formas cocoides localizados epicelularmente aos eritrócitos (Harvey, 2006), individualmente ou em cadeia (Macieira et al., 2008). Trata-se de um parasita simples, que se replica por divisão binária, mas que até ao momento não se conseguiu cultivar fora do seu hospedeiro natural, o que limita o seu conhecimento mais profundo (Harvey, 2006; Willi et al., 2007; Sykes, 2010).

### 5.2. Epidemiologia

Os micoplasmas hemotrópicos, também designados de hemoplasmas provocam anemias infecciosas em numerosas espécies de mamíferos domésticos e selvagens em todo o mundo (Willi et al., 2007a; Willi et al., 2007b; Sykes, 2010).

A prevalência deste agente em felinos domésticos nos EUA varia de 7,6% a 8,3% (Luria et al., 2004; Lappin et al., 2006) e na Europa de 1,5% a 5,9% (Willy et al., 2006; Willy et al., 2007a; Gentilini et al., 2009). É comum ocorrerem co-infecções por dois ou mesmo três hemoplasmas em felinos domésticos e selvagens (Jensen et al., 2001; Luria et al., 2004; Tasker et al., 2003; Willi et al., 2007a, b). A distribuição geográfica dos micoplasmas

hemotrópicos parece estar relacionada com a distribuição dos seus vectores artrópodes (Willi et al. 2007a).

### 5.3. Transmissão

A via de infecção natural deste agente não está ainda bem determinada (Willi et al., 2007; Sykes, 2010). Em ambiente natural, pensa-se que certos vectores, principalmente pulgas (*Ctenocephalides felis*) e carraças, pela sua actividade hematófaga, possuem um papel determinante na propagação da infecção entre felinos (Woods, Brewer, Hawley, Wisniewski & Lappin, 2005; Harvey, 2006; Lappin, et al., 2006; Willi et al., 2007; Willi, et al., 2007c; Grace & Norsworthy, 2011). Esta suspeita é suportada pelo facto de o ADN de hemoplasmas ter já sido detectado em ovos e fezes de pulgas (*C. felis*) (Shaw et al., 2004; Woods et al., 2005; Lappin et al., 2006; Kamrani et al., 2008), bem como em vários ixodídeos, nomeadamente *Ixodes* sp. e *Rhipicephalus* sp. (Schabereiter-Gurtner, Lubitz, & Rölleke, 2003; Taroura et al., 2005; Willi et al., 2007c).

O facto de se verificar a transmissão do agente mesmo em regiões onde os vectores estão ausentes ou são pouco frequentes, sugere que este não é o único modo de transmissão (Jensen et al., 2001; Tasker 2010).

A transmissão horizontal através de mordidas e arranhões começa a ser considerada uma hipótese cada vez mais válida, isto porque estudos realizados permitiram já o isolamento de hemoplasmas a partir de amostras de saliva e fezes e conteúdo da base das unhas de animais infectados. O facto de esta ser uma doença mais associada a machos e a portadores de FIV vem fortalecer esta hipótese (Willi et al., 2007; Sykes, 2008, 2010; Luria et al., 2004; Tasker, 2010). Sabe-se já que a transmissão iatrogénica através de transfusão sanguínea é possível (Harvey, 2006; Willi, et al., 2006; Grace & Norsworthy, 2011), assim como a transmissão de mães para os filhos (apesar de não se saber o mecanismo exacto) (Harvey, 2006; Willi et al., 2006; Grace & Norsworthy, 2011).

### 5.4. Patogenia

Dada a falta de métodos que permitam estudar *M. Haemofelis* fora do seu hospedeiro natural (impossibilidade de cultura *in vitro*), muitos aspectos da sua patogenia não são ainda conhecidos (Willi et al., 2007a; Sykes, 2010). A infecção provocada por este agente pode resultar apenas numa anemia ligeira sem manifestações clínicas ou numa anemia grave, com depressão grave que pode levar à morte do animal (Harvey, 2006). Os animais infectados experimentalmente com *M. haemofelis* desenvolvem, uma a três semanas depois, uma infecção aguda com duração de semanas ou meses, que é caracterizada pelo aparecimento cíclico de episódios de bacteriémia (bactérias ligadas à superfície dos eritrócitos), acompanhados por declínios cíclicos do HCT (Harvey, 2006; Willi, et al., 2006). O decréscimo do HCT abaixo dos 20% (e frequentemente abaixo dos 10%) imediatamente

após um período de bacteriémia parece estar relacionado com sequestro essencialmente esplênico dos eritrócitos afectados (Harvey, 2006) contudo, mecanismos imuno-mediados parecem ser também de grande importância (Harvey, 2006; Sykes, 2010). Os episódios de bacteriémia consecutivos conduzem a danos eritrócitários pregressivos e diminuição do tempo de vida dos glóbulos vermelhos. Apesar de ocorrer uma hemólise intravascular mínima, a hemólise resultante da infecção por este hemoplasma é essencialmente extravascular, realizada pelos macrófagos no baço, fígado, pulmões e medula óssea (Harvey, 2006; Willi, et al., 2007a; Grace & Norsworthy, 2011).

Cerca de 1/3 dos gatos com infecção aguda por *M. haemofelis* não-complicada por outros agentes morrem secundariamente a anemia grave se não forem tratados adequadamente. Por outro lado, os animais que desenvolvem uma resposta imune eficaz e a actividade responsiva da medula óssea compensa a destruição eritrócitaria, recuperam da doença. Esses animais, tornam-se então portadores crónicos por um período de tempo variável que pode durar meses, anos ou prolongar-se pelo resto da vida (Tasker & Lappin, 2006; Harvey, 2006; Willi et al., 2007a). Apesar de ainda poderem ser fonte de infecção para outros felinos (Willi et al., 2007a), clinicamente não manifestam qualquer sintoma de doença e possuem um HCT com valores normais ou indicativos de anemia ligeira (Harvey, 2006; Tasker & Lappin, 2006). Estes animais não estão livres de uma possível reactivação da infecção (por exemplo em caso de *stress* ou intervenção cirúrgica), no entanto parecem estar num estado de equilíbrio imunológico em que a replicação do agente é compensada pela simultânea fagocitose e remoção de circulação de eritrócitos afectados (Jensen et al., 2001; Harvey, 2006; Tasker & Lappin, 2006; Sykes, 2010).

### **5.5. Sinais Clínicos**

A gravidade da doença é variável, havendo indivíduos que apresentam apenas anemia ligeira e ausência de sinais clínicos e outros que desenvolvem uma anemia grave com sintomatologia exuberante que pode levar à morte (Harvey, 2006; Willi, et al., 2007a). A forma como a doença evolui depende da sensibilidade do hospedeiro, da presença ou não de factores imunossupressores (Willi et al., 2007; Messik, 2004), da fase da infecção (Grace & Norsworthy, 2011), do grau da anemia e da velocidade com que esta se desenvolve (Tasker & Lappin, 2006; Grace & Norsworthy, 2011).

Os sinais mais comuns em animais doentes são depressão, anorexia, letargia, desidratação e em alguns casos perda de peso ou mesmo morte súbita (Willi et al., 2007a; Sykes, 2010). A anemia manifesta-se por fraqueza, taquipneia, taquicárdia, mucosas pálidas e, em casos mais raros síncope e alterações neurológicas (Tasker & Lappin, 2006; Sykes, 2010). Por vezes pode ocorrer icterícia devido à hemólise (Harvey, 2006; Tasker e Lappin, 2006; Grace & Norsworthy, 2011) e esplenomegália e/ou linfadenomegália como reflexo de hematopoiese extramedular (Tasker e Lappin, 2006). A temperatura rectal está

habitualmente normal, excepto na fase de doença aguda em que pode estar aumentada (Alleman et al., 1999), ou em animais cronicamente afectados em que pode haver um aumento de forma intermitente (Jensen, Lappin, Kamkar, & Reagan, 2001). Se a anemia se desenvolve gradualmente, o gato pode exibir apenas perda de peso, mas manter-se alerta e com o pelo brilhante (Messick, 2004; Grace & Norsworthy, 2011).

Os animais infectados cronicamente, podem não apresentar sinais clínicos (Harvey, 2006; Willi et al., 2007a).

## **5.6. Factores de risco para a infecção por *M. haemofelis***

Animais do sexo masculino, não vacinados, que sejam errantes ou que tenham acesso ao exterior são mais susceptíveis à infecção por *M. Haemofelis* (Grindem, Corbett & Tomkins, 1990; Jensen et al. 2001; Luria et al., 2004; Harvey, 2006; Kamrani, Parreira, Greenwood, & Prescott, 2008; Grace & Norsworthy, 2011). Isto pode ser explicado pelo facto estes estarem mais susceptíveis a infestações por pulgas e a envolvimento em lutas (Kamrani et al., 2008). Relativamente à idade, alguns autores mostraram ser os animais mais jovens os que apresentam maior risco (Grindem et al, 1990; Sykes, Terry & Lindsay, 2008) enquanto outros mostram que são os mais velhos (Tasker et al., 2003). Doenças concorrentes, esplenectomia ou presença de factores imunossupressores são também, considerados factores de risco (Messick, 2004).

Vários estudos observaram que gatos infectados com retrovírus (FIV e/ou FeLV) são mais susceptíveis à infecção por *M. haemofelis* (George et al., 2002; Harrus et al., 2002; Luria et al., 2004; Harvey, 2006; Macieira et al., 2007; Sykes et al., 2008; Grace & Norsworthy, 2011). Além disso, gatos infectados com apenas uma espécie de hemoplasma possui maior risco de co-infecção com um outro (Luria et al., 2004).

## **5.7. Diagnóstico**

### **5.7.1. Observação do parasita em esfregaço sanguíneo**

Até há algum tempo o diagnóstico de hemoplasmoses era feito apenas por avaliação dos sinais clínicos juntamente com a identificação citológica dos organismos em esfregaços sanguíneos (Woods et al., 2005; Willi, et al., 2007a).

Esta técnica mostrou no entanto ter baixas sensibilidade e especificidade. A sensibilidade foi descrita como inferior a 50% por Lappin (2006), e inferior a 20% por Tasker, Helps, Day, Gruffydd-Jones, & Harbour (2003a). A baixa sensibilidade é justificada pelo carácter cíclico da parasitemia e pelo facto de não existir consistência entre a presença de sinais clínicos e a presença de parasitemia (Lapin, 2006; Sykes 2010). Além disso, se o sangue for armazenado durante longos períodos de tempo ou em elevadas quantidades de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), pode ocorrer o desprendimento dos organismos da

superfície dos eritrócitos, aumentando o número de falsos negativos (Sykes, 2010; Grace & Norsworthy, 2011). Caso se suspeite de hemoplasmosose, a observação de várias lâminas ao longo de um ou vários dias pode aumentar a probabilidade de obter resultados positivos (Tasker & Lappin, 2002), no entanto, a ausência de organismos nos esfregaços não permite excluir a presença de infecção (Alleman et al., 1999; Tasker & Lappin, 2002).

Quanto realizada por observadores pouco experientes, a especificidade da técnica é dificultada pois inclusões eritrocitárias (como os corpos de Howell–Jolly) ou artefactos (como manchas de precipitação ou causadas por secagem/fixação inadequada), podem ser confundidos com o organismo (Tasker & Lappin 2002; Grace & Norsworthy, 2011).

Esta técnica tem ainda o inconveniente de não permitir diferenciar entre os três hemoplasmas descritos em felinos (Willi et al., 2007a).

### **5.7.2. Molecular**

O PCR é o método de eleição para o diagnóstico de *M. haemofelis* (Willi et al., 2007a; Grace & Norsworthy, 2011), uma vez que possui uma sensibilidade e especificidade bastante superiores ao exame citológico (Woods et al., 2005). Esta técnica é baseada na amplificação de uma zona específica do gene 16S do ARNr dos hemoplasmas a partir de sangue ou amostras de tecidos do animal infectado (Willi et al., 2007a). O PCR convencional (PCRc) não permite fazer a distinção entre *M. haemofelis* e *Candidatus M. turicensis* (Willi et al., 2007a), contudo, o *real-time* PCR, por utilizar uma sonda específica, permite diferenciar os três hemoplasmas felinos (Tasker et al., 2003; Willi et al., 2006) e tem ainda a vantagem de permitir a quantificação do ADN presente, dando uma ideia do estado da infecção e/ou da resposta ao tratamento (Willi et al. 2007).

De referir no entanto, que o resultado positivo do PCR não implica infecção activa, pois os animais podem permanecer portadores do agente para o resto da vida sem manifestarem alterações clínicas de infecção (Willi et al., 2007a). Assim, os resultados obtidos em cPCR ou *real-time* PCR devem ser interpretados no contexto dos sinais clínicos exibidos pelo animal (Tasker & Lappin, 2006). Esta técnica está associada a falsos negativos caso o agente se encontre abaixo do limiar de detecção ou a antibioterapia já tenha sido iniciada (Barker et al., 2010).

### **5.7.3. Outros métodos de diagnóstico:**

#### **5.7.3.1. Teste de Coomb's**

Este teste identifica anticorpos ou complementos das hemácias e é normalmente positivo em infecções por hemoplasmas. Este teste não é sensível nem específico para anemias hemolíticas imunomediadas. Contudo, as anemias hemolíticas auto-imunes (primárias) são raras em gatos, pelo que se o teste de *Coomb's* for positivo num gato com anemia

regenerativa, esta é mais provavelmente secundária a hemoplasmas do que a outra doença que afecte a superfície dos glóbulos vermelhos (FeLV, linfoma...) (Grace & Norsworthy, 2011).

### **5.7.3.2. Teste de retrovírus**

Todos os felinos com suspeita ou infecção confirmada por hemoplasmas devem ser testados para infecção por retrovírus. Nos anos 80, foi descrito que cerca de metade dos felinos com hemoplasmose, eram FeLV positivos. Esse valor é provavelmente menor agora, pois a incidência de FeLV diminuiu (Grace & Norsworthy, 2011).

### **5.7.3.3. Alterações hematológicas e bioquímicas**

A alteração hematológica mais frequente é a anemia regenerativa macrocítica e normocrômica, acompanhada de anisocitose, reticulocitose, policromasia, corpos de Howell-Jolly, e por vezes presença de glóbulos vermelhos nucleados (Willi et al., 2007a; Tasker & Lappin, 2006; Sykes, 2010). Caso ainda não tenha decorrido tempo suficiente para que se desenvolva uma resposta regenerativa ou por exemplo co-infecção por FeLV, pode também ocorrer anemia não regenerativa (Willi et al., 2007a; Grace & Norsworthy, 2011). No esfregaço sanguíneo pode ser notada auto-aglutinação e a contagem de reticulócitos e eritrócitos nucleados é significativamente maior em gatos positivos para *M. haemofelis* do que em gatos negativos para todos os hemoplasmas (Sykes et al., 2008).

A contagem de glóbulos brancos não tem grande valor no diagnóstico pois pode estar normal, elevada ou baixa (Harrus et al., 2002; Sykes, 2010).

O perfil bioquímico pode revelar hiperbilirrubinémia (hemólise) e hiperproteinémia e aumento das enzimas hepáticas (como alanina transaminase, ALT e fosfatase alcalina, ALP), decorrentes de hipóxia hepática secundária à anemia e de lipidose hepática secundária à anorexia (Harvey, 2006; Sykes 2010; Grace & Norsworthy, 2011). A azotémia pré-renal (secundária a desidratação) (Harvey, 2006; Sykes 2010) pode também estar presente e animais moribundos podem apresentar hipoglicémia (Harvey, 2006).

## **5.8. Tratamento**

### **5.8.1. Antibióticos**

Não está descrito até agora nenhum regime de antibioterapia capaz de eliminar consistentemente a infecção (Willi, et al., 2007a), no entanto o tratamento padrão da doença passa pela administração de tetraciclina, nomeadamente a doxiciclina, de enrofloxacina e de marbofloxacina (Willi et al., 2007a; Dowers, Tasker, Radecki, & Lappin, 2009)

A doxiciclina é o antibiótico de primeira escolha (Willi et al., 2007a). É eficaz no tratamento de *M. haemofelis*, tanto na redução de sinais clínicos como na redução do número de

organismos em circulação (Tasker, 2006). A dose recomendada é de 5mg/Kg BID, PO ou 10 mg/Kg SID, PO (Tasker 2006; Grace & Norsworthy, 2011) mas a duração do tratamento para eliminar por completo a infecção não é conhecida. Estudos realizados mostram que duas semanas de tratamento não são suficientes para eliminar definitivamente a infecção mas são suficientes para resolver todos os sinais clínicos (Tasker, 2006). Grace & Norsworthy (2011) aconselham um tratamento com duração de 21 dias, no entanto, Tasker (2006) considera que deve ser efectuado um tratamento de pelo menos seis semanas para aumentar a probabilidade de a infecção se debelada por completo.

O uso de enrofloxacin é uma alternativa eficaz ao uso doxíciclina. A sua administração na dose de 5 a 10 mg/Kg/dia PO durante duas semanas mostrou ser eficaz na resolução de sinais clínicos e na redução significativa da quantidade de organismos encontrados em circulação (Willi et al., 2007a). Os tratamentos com enrofloxacin, estão associados a casos de degeneração difusa da retina e cegueira súbita e estudos realizados mostraram o prolongamento do tratamento por mais de duas semanas não é aconselhado (Tasker, 2006b).

A marbofloxacin é eficaz na resolução de sinais clínicos e na redução da carga sanguínea, no entanto não se obtêm resultados negativos em PCR mesmo após quatro semanas de tratamento. Em estudos experimentais, a pradofloxacin na dose 5 mg/Kg SID mostrou ser eficaz na resolução dos sinais clínicos e na eliminação do estado de portador (Dowers et al., 2009).

A resposta do animal ao tratamento deve ser feita através da avaliação dos sinais clínicos, mas deve ser sempre confirmada por *real time* PCR (Tasker, 2006). Normalmente o animal permanece portador da infecção após o tratamento, no entanto, raramente ocorrem recidivas (Grace & Norsworthy, 2011).

### **5.8.2. Glucocorticóides**

São considerados um adjuvante no tratamento de hemplasmas felinos dado que a anemia que se desenvolve é, em parte, imunomediada. São utilizados com o objectivo de reduzir a eritrofagocitose, estimular a medula óssea e aumentar o apetite (Grace & Norsworthy, 2011). Contudo o seu efeito benéfico no tratamento não foi ainda provado, uma vez que infecções concorrentes (como retrovírus, herpesvírus e calicivírus) podem ser exacerbadas pelo uso de corticosteroides (Willi et al., 2007a).

## 6. Leishmaniose Felina

### 6.1. Etiologia

A leishmaniose é uma doença zoonótica causada por protozoários do género *Leishmania*, ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, género *Leishmania*, que é transmitida através da picada de flebótomos e que afecta pessoas e mamíferos domésticos e selvagens em todo o mundo (Leishdomus, 2005; Baneth, 2006; Gramiccia, 2011). Os elementos do género *Leishmania* são divididos em dois subgéneros (*Leishmania* e *Viannia*) (Baneth, 2006), sendo apenas o subgénero *Leishmania* importante para a presente dissertação.

Os elementos do género *Leishmania* são protozoários pleomórficos que apresentam duas formas distintas: forma promastigota e forma amastigota.

A forma promastigota é a forma infectante do hospedeiro invertebrado. É extracelular, de forma fusiforme, com cerca de 15-30x3µm e é constituída por um núcleo, um cinetoplasto (área mitocondrial onde se encontra o material genético) e flagelo livre na extremidade anterior (que pode atingir 20µm de comprimento) (Leishdomus, 2005; Baneth, 2006; Gramiccia, 2011).

A forma amastigota tem 2,5 a 6,8µm, forma redonda a oval e é intracelular (macrófagos e células do sistema mononuclear fagocitário do hospedeiro mamífero). Tal como a forma promastigota, possui um único núcleo, um cinetoplasto e um flagelo, mas este último, é nesta forma rudimentar (Leishdomus, 2005; Gramiccia, 2011).

### 6.2. Epidemiologia

A leishmaniose tem elevada prevalência nas zonas intertropicais da América e África, estendendo-se pelas regiões temperadas da América Latina, Europa e Ásia (Gramiccia, 2011). A *Leishmania infantum* é o principal agente etiológico da leishmaniose canina (LCan), felina (LFel) e humana (LVH), na região sudoeste da Europa (nomeadamente Portugal) (Campino, et al., 2006). Em Portugal, a Área Metropolitana de Lisboa (AML) é uma área endémica de leishmaniose tanto humana como canina (Maia et al., 2010).

A infecção por *Leishmania* spp. em gatos domésticos foi já reportada em vários países da bacia mediterrânea (Pennisi, 2002; Poli et al., 2002; Martín-Sánchez et al., 2007; Solano-Gallego et al., 2007) e no Brasil (Savani, et al., 2004; Costa et al., 2010), onde esta zoonose é endémica. Em Portugal, o primeiro caso de LFel foi descrito descrito no ano de 1994 (Costa-Durão, et al., 1994).

Nos últimos anos vários estudos efectuados levantam a hipótese de que os felinos, tal como a maioria da população canina que habita em áreas endémicas, são susceptíveis à infecção por *Leishmania* (Maia et al., 2010). No entanto a sua real susceptibilidade/resistência e o seu papel como reservatório e na epidemiologia da doença não é ainda conhecido (Maia et al., 2010). Alguns autores consideram que os felinos têm um certo grau de resistência natural à infecção por *Leishmania* (Poli et al., 2002; Diakou, Papadopoulos, & Lazarides, 2009). No entanto, apesar de as seroprevalências de felinos comparativamente às de canídeos de uma mesma região terem valores mais baixos (Diakou et al., 2009), existem já estudos que demonstram que os felinos são susceptíveis a essa infecção (Maia et al., 2010), variando as seroprevalências na Europa de 0,9 a 68% (Poli et al., 2002; Vita et al., 2005; Marioli et al., 2007; Martín-Sánchez et al., 2007; Solano-Gallego, et al., 2007; Diakou et al., 2009; Cardoso et al., 2010; Duarte et al., 2010).

Em 2007, foi demonstrado pela primeira vez que um gato cronicamente infectado com *L. infantum* (título 1/160, IFI) é capaz de infectar o vector, tendo sido obtidas taxas de alimentação e infecção do vector semelhantes às conseguidas utilizando canídeos assintomáticos submetidos às mesmas condições (Maroli et al., 2007). Além disso, foi já demonstrado que *Phlebotomus perniciosus*, principal vector da *L. infantum* em Portugal (Cortes, Afonso, Alves-Pires, & Campino, 2007), se alimenta com frequência em felinos domésticos (Maia et al., 2010).

### **6.3. Zimodemes de *Leishmania***

Desde que foi criado por Ross (1903), o género *Leishmania* tem vindo a aumentar o número de espécies que inclui. Uma vez que são morfologicamente indistinguíveis, Lumsden (1974), passou a classifica-las com base em características extrínsecas (tais como sinais clínicos que provocam, distribuição geográfica e comportamento em cultura, vectores ou animais de laboratório) e extrínsecas (tais como características imunológicas, bioquímicas e moleculares) (Leishdomus, 2005).

Actualmente existem vários métodos usados para a identificação e classificação das espécies de *Leishmania*, no entanto, a caracterização izoenzimática por electroforese enzimática multilocular é o método de eleição (Campino et al., 2006). Nos países do Mediterrâneo, o zimodeme MON-1 de *L. infantum* é o principal agente etiológico de leishmaniose (Pratlong et al., 2004). Em Portugal, Cardoso et al. (2002), isolaram o zimodeme MON-28 de *L. infantum* a partir de um canídeo e Campino et al. (2006) identificaram quatro zimodemes de *L. infantum* a partir de 213 amostras recolhidas de humanos (adultos e crianças), canídeos e flebótomos infectados: MON-1, MON-24, MON-29 e MON-80. O zimodeme mais prevalente em Portugal, tal como acontece em outros países da Europa é o MON-1, que foi identificado em 96,7% dos isolados de *Leishmania* a partir de humanos, canídeos e vectores (Campino et al., 2006).

#### 6.4. Ciclo de vida

*Leishmania* spp. é um parasita heteroxeno, pelo que necessita de dois hospedeiros para que o seu ciclo de vida se complete: um vertebrado (humanos ou animais mamíferos domésticos e selvagens) e um invertebrado (flebótomo) (Diniz et al., 2008).

Os vectores de *Leishmania* pertencem essencialmente a dois géneros da família *Psychodidae*: o género *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (Maia & Campino, 2011). *Phlebotomus perniciosus* e *P. ariasi* são as espécies mais importantes na Europa Ocidental, nomeadamente em Portugal (Campino & Maia, 2010). Os flebótomos são pequenos insectos, com o corpo revestido de pêlo (Sharma & Singh, 2008), cujo comprimento raramente supera os 3 mm, mas com patas e peças bucais compridas (Baneth, 2006). Possuem maior actividade crepuscular e nocturna (Baneth, 2006) e encontram-se frequentemente nas imediações de habitações humanas ou de locais com condições favoráveis ao seu desenvolvimento (abundância de resíduos orgânicos, humidade e temperaturas amenas e elevadas) (Sharma & Singh, 2008). Em Portugal, são mais activos nos meses de verão (Maio a Outubro, com pico de actividade nos meses de Julho e Agosto) (Maia et al., 2010; Onleish, 2011). Estes insectos, por não terem grandes habilidades de voo e não percorrem distâncias superiores a um quilómetro em torno do seu local de alimentação e reprodução (Baneth, 2006).

O ciclo completo no hospedeiro invertebrado dura cerca de vinte dias (Leishdomus, 2005). Assim, aquando da picada de um mamífero infectado, os flebótomos ingerem formas amastigotas de *Leishmania*, que se alojam na porção posterior do seu intestino médio e se diferenciam, à medida que migram ao longo do intestino no sentido anterior, sendo cada fase de diferenciação é caracterizada por alterações morfológicas e funcionais que visam garantir a sua sobrevivência no vector (Kamhawi, 2006). No interior do vector o protozoário evolui sucessivamente da forma amastigota para as fases promastigotas procíclicas (Bates & Rogers, 2004), nectomonadas ou nectomonas, leptomonas (Bates, 2007), haptomonas e, por fim, promastigotas metacíclicas (Kamhawi, 2006).

Apenas os flebótomos do género feminino são responsáveis pela transmissão da doença entre hospedeiros vertebrados, uma vez que apenas estes são hematófagos necessitando de efectuar refeições sanguíneas para obter proteínas para o desenvolvimento dos ovos (Sharma & Singh, 2008).

O cão doméstico (*Canis familiaris*) é considerado o principal hospedeiro e reservatório doméstico/peridoméstico do género *Leishmania* (Navarro et al., 2010; Gramiccia, 2011). No entanto, diferentes espécies do género *Leishmania* foram já descritas em animais de diferentes ordens de mamíferos, nomeadamente em roedores e felinos (Bettini, Pozio, & Gradoni, 1980; Gramiccia et al., 1982), ovelhas, cabras e cavalos (Ashford, 1996).

Nos últimos tempos, números consideráveis de casos de leishmaniose felina em gatos domésticos (*Felis catus domesticus*) têm sido descritos, levantando questões acerca da sua importância como reservatório da doença, em alternativa ao cão (Maia & Campino, 2011).

### **6.5. Outras formas de transmissão**

Apesar de menos importantes, foram já descritas outras formas de transmissão do agente para além da picada de flebótomos. Em canídeos, Owens et al. (2001) e Freitas, Melo, & Costa-Val (2006) observaram que *Leishmania* spp. pode ser experimentalmente transmitida através de transfusão de sangue total ou fracções de células mononucleares de cães infectados. A transmissão venérea (Silva, 2007) e vertical (Silva et al., 2009) foram também já descritas em cães. Em humanos foi já reportado um caso de transmissão vertical (Filho, Uehara & Senefonte, 2005).

Pulgas *Ctenocephalides felis* (Ferreira, Fattori, Souza, & Lima, 2009) e ixodídeos *Rhipicephalus sanguineus* (Coutinho et al., 2005) são susceptíveis à infecção por *Leishmania*, no entanto o seu papel na transmissão da doença não pôde ainda ser comprovado.

Em felinos não estão ainda descritas de transmissão independentes do vector, contudo, em zonas endémicas devem testar-se todos os potenciais reprodutores ou dadores de sangue.

### **6.6. Patogenia**

As formas promastigotas metacíclicas, são as formas infectantes (Kamhawi, 2006). Estas formas são depositadas, juntamente com a saliva do vector infectado, aquando da alimentação, na pele do novo hospedeiro mamífero (Bates, 2007; Dantas-Torres et al., 2006). Uma vez no hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas metacíclicas são fagocitadas na epiderme, inicialmente por neutrófilos e eosinófilos e depois por macrófagos e células dendríticas, acumulando-se no interior dos fagolisossomas, onde perdem o flagelo e se diferenciam em formas amastigotas (Poli et al., 2002; Baneth, 2006). O progresso da infecção depende da eficácia da resposta imunitária do hospedeiro. Se as formas amastigotas conseguem vencer as resistências oferecidas pelo organismo, multiplicam-se intensamente por divisão binária, sendo libertadas por exocitose ou ruptura do macrófago, indo depois parasitar novas células e assim disseminar-se para além do local de picada (Baneth, 2006). As formas amastigotas acabam por parasitar todo o organismo do hospedeiro, mas inicialmente são os órgãos do sistema hemolinfático e determinadas zonas da derme as mais afectadas (Poli et al., 2002; Baneth, 2006).

Em canídeos, quando ocorre imunidade mediada por células CD4+ com libertação de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ , há indução da actividade anti-*Leishmania* pelos macrófagos (Baneth, Koutinas, Solano-Gallego, & Ferrer, 2008) e a infecção pode ser subclínica (animais sem sinais clínicos nem alterações clinicopatológicas) (Solano-Gallego et al., 2009). Pelo

contrário, em animais em que se desenvolve uma forte resposta humoral não-protectora associada a uma fraca imunidade mediada por células (Baneth, Koutinas, Solano-Gallego, & Ferrer, 2008), desenvolve-se uma infecção clínica (animais com sinais clínicos e/ou alterações clínico-patológicas).

Em felinos foi realizado apenas um estudo acerca de resposta imunitária local desenvolvida contra a infecção por *Leishmania* spp. Nesse estudo foi realizada uma caracterização da imunohistoquímica do infiltrado celular e das citocinas associadas à infecção por *Leishmania* sp., em lesões cutâneas, oculares e orais de um felino co-infectado por FIV (Rodriguez et al., 2002). As lesões granulomatosas cutâneas e oculares mostraram numerosos linfócitos CD4+, células plasmáticas IgG+, macrófagos e células gigantes multinucleadas, com formas amastigotas de *Leishmania* no interior. Alguns linfócitos e a maioria dos macrófagos e das células gigantes multinucleadas estavam associados à expressão de antígenos-MHC classe II, demonstrando uma boa resposta imunitária local (tipo IV), que poderá ser a responsável pelo controlo da infecção por *Leishmania* em felinos e por impedir a sua disseminação sistémica (Rodriguez et al., 2002). Pensa-se então que nos felinos a resposta imune mediada por células, na ausência de agentes imunossupressores, é suficiente para controlar a infecção, conferindo um certo grau de resistência natural (Solano-Gallego et al., 2007). Existem ainda autores que referem que a resistência natural aparentemente demonstrada pelos felinos pode ainda estar relacionada com factores genéticos (Mancianti, 2004; Vita et al., 2005; Pennisi, 2002).

### **6.7. Factores de risco em felinos/Susceptibilidade à infecção**

Apesar de a maioria dos estudos indicarem que não existe predisposição de sexo (Solano-Gallego, et al., 2007; Diakou, Papadopoulos, & Lazarides, 2009; Cardoso, Lopes, Sherry, Schallig, & Solano-Gallego 2010), um estudo realizado por Pennisi (2002) mostra existir predisposição do sexo feminino ( $p < 0,05$ ). Cardoso et al. (2010) observaram ainda que existe uma seroprevalência maior em gatos com mais de 24 meses ( $p < 0,05$ ).

De uma forma geral, os animais sem sinais clínicos, raça Europeu Comum, e que habitam em meios rurais (por permanecerem mais tempo no exterior das casas e de estarem mais susceptíveis à picada de insectos) são os mais afectados (Pennisi et al., 2002; Vita et al., 2005).

Foi sugerido por alguns autores que a presença de factores imunossupressores como infecções por FIV, FeLV, e peritonite infecciosa felina (PIF), doenças auto-imunes ou tumores pudessem estar associados à presença de doença causada pela *Leishmania* (Poli et al., 2002; Pennisi, 2002). No entanto, a maioria dos estudos serológicos e moleculares não encontra relação entre a infecção por *Leishmania* e a presença concomitante de vírus imunossupressores como o FIV e o FeLV e PIF (Vita et al., 2005; Martín-Sánchez et al., 2007; Solano-Gallego et al., 2007; Maia et al., 2010).

## **6.8. Sinais Clínicos**

A maioria dos felinos positivos para *Leishmania* spp., na ausência de infecções concomitantes, não apresenta qualquer sintomatologia da doença (Campino, 2002; Maia & Campino, 2011; Martín-Sánchez et al., 2007; Solano-Gallego et al., 2007). Quando presentes, os sinais clínicos podem apresentar-se segundo um padrão cutâneo ou sistémico (Maroli et al., 2007), sendo os sinais cutâneos sempre mais evidentes, mesmo que co-exista disseminação sistémica (Pennisi, 2002).

A forma cutânea é a mais frequente na LFel (Pennisi, 2002; Poli, et al., 2002; Mancianti, 2004; Gramiccia, 2011) e os sinais mais comuns são alopecias difusas ou localizadas e dermatites nodulares ou ulcerativas, pustulares ou papulares. Também foram descritos em alguns animais eritemas, descamação e seborreia (Pennisi, 2002; Solano-Gallego et al., 2007; Navarro et al., 2010). As lesões cutâneas aparecem com mais frequência na zona da cabeça, nomeadamente pavilhão auricular, face e em torno dos olhos e nariz, mas distribuem-se também no pescoço, tórax e abdómen (Hervás, de Lara, Pellicer, & Carrasco, 1999; Pennisi, 2002). Estes sinais não são patognomónicos da infecção, podendo ser confundidos com outras etiologias (Martín-Sánchez et al., 2007).

Quando presente, o quadro clínico sistémico é normalmente inespecífico, sendo os sinais como a febre, anorexia, desidratação, perda de peso, corrimento ocular, estomatite, vómitos, otites, icterícia e diarreia, os mais comuns (Ozon et al., 1998; Pennisi, 2002; Mancianti et al., 2004). São também descritos com relativa frequência sinais oculares como panoftalmite, conjuntivite, blefarite, queratite e uveíte (Pennisi, 2002; Navarro et al., 2010; Gramiccia, 2011), assim como linfadenomegália e presença de nódulos no baço, fígado e rins estão também descritos (Pennisi, 2002; Poli et al., 2002; Mancianti, 2004; Navarro et al., 2010; Gramiccia, 2011). Em felídeos com leishmaniose foram já identificadas insuficiência renal e doenças do foro respiratório (Pennisi, 2002; Beneth, 2006; Navarro et al., 2010), no entanto não está provado que estejam directamente relacionados com a infecção.

## **6.9. Diagnóstico**

Para o diagnóstico de LFel podem ser utilizados métodos parasitológicos, serológicos e moleculares. Por vezes é necessário recorrer a mais do que uma metodologia para que o diagnóstico seja estabelecido.

### **6.9.1. Métodos parasitológicos**

Estes são exames citológicos ou histológicos em que as formas amastigotas de *Leishmania* são observadas através do microscópio, livremente ou no interior dos macrófagos (mas também de monócitos e neutrófilos), a partir de amostras colhidas a partir de linfonodos, baço, medula óssea ou sangue periférico (Ozon et al., 1998; Pennisi et al., 2002; Baneth, 2006; Maia & Campino, 2008; Gramiccia 2011) ou de lesões cutâneas (Leishdomus, 2005;

Gramiccia, 2011). Os linfonodos poplíteos parecem ser os órgãos que apresentaram positividade em um maior número de animais, mesmo comparado com a punção de medula óssea, sugerindo que deva ser a primeira opção quando se escolhe o local onde realizar a punção aspirativa ou biópsia (Costa et al., 2010). A aplicação da técnica de imunohistoquímica em biópsia de pele, esfregaços e/ou cortes histológicos, aumentam a sensibilidade deste tipo de diagnóstico etiológico (Leishdomus, 2005; Navarro et al., 2010). O diagnóstico directo pode também ser feito por cultura *in vivo* ou *in vitro* dos parasitas a partir dos tecidos infectados (Baneth, 2006). A cultura *in vitro* tem a vantagem em relação à *in vivo* de ser menos demorada (crescimento das formas promastigotas em três a cinco dias, em vez dos meses necessários para o aparecimento de sinais clínicos num animal), no entanto, não existe ainda um meio de cultura “universal” no qual todos os isolados de *Leishmania* cresçam, sendo impossível de prever qual o meio adequado para o isolado específico que se pretende cultivar (OIE, 2008). A leishmania é um organismo bastante difícil de cultivar, e por vezes, quando subcultivados os parasitas morrem, mesmo se o isolamento inicial é bem sucedido (OIE, 2008). Não é uma técnica usada rotineiramente pelo tempo, complexidade e material exigido.

### **6.9.2. Métodos serológicos**

O diagnóstico serológico para detecção de anticorpos circulantes anti-*Leishmania*, apesar de não tão padronizado como para a LCan, pode ser usado no diagnóstico de LFel (Maia et al., 2010; Gramiccia, 2011).

Em canídeos, títulos elevados de anticorpos indicam a presença de doença activa e potencial transmissão dos protozoários aos vectores (Quinnell et al., 2003), no entanto, em felinos os títulos de anticorpos detectados são normalmente inferiores aos detectados na LCan (Poli et al., 2002; Gramiccia & Gradoni, 2005; Maia & Campino, 2011). Esse baixo nível ou ausência de anticorpos, pode estar relacionado com o facto de nos felinos não ocorrer diminuição do estatuto imunitário, não levando a uma sobreprodução de anticorpos como acontece nos canídeos (Maia et al., 2010; Maia & Campino, 2011).

Costa et al. (2010) mostraram que apesar de a IFI ter uma especificidade semelhante para felinos à mostrada para canídeos (89%), a sensibilidade na detecção de anticorpos nesta espécie é bastante baixa (25%), uma vez que apenas 2/8 animais com exame parasitológico positivo foram serologicamente positivos. Martín-Sánchez et al. (2007) avaliaram amostras de soro de 183 gatos por IFI (1:10 e 1:40) e PCR verificando que a maior proporção de animais positivos por PCR ocorreu nos animais com baixos títulos de anticorpos, mostrando que o título de anticorpos não está associado à presença de infecção activa. Os resultados de ambos os estudos referidos sugere então que a resposta imune, à infecção por *Leishmania* sp. em gatos, difere da observada em cães (o que explica o pequeno número de animais infectados e sintomáticos), e que por isso as técnicas serológicas convencionais

não são eficazes na detecção de infecção activa em felinos (Martín-Sánchez et al., 2007; Costa et al., 2010; Maia et al., 2010). Simões-Mattos et al. (2005) haviam já chegado a conclusões semelhantes, quando após infectarem experimentalmente 13 felinos errantes com *L. braziliensis*, não obtiveram relação entre a presença de lesões activas e a obtenção de serologias positivas. Pelo contrário, só obtiveram serologias positivas quando as lesões estavam já em fase de resolução, vindo reforçar a ideia de que as técnicas serológicas por si só não são suficientes para efectuar o diagnóstico de LFel, e podem levar a falhas no diagnóstico, contribuindo para a disseminação da doença para os vectores e restantes hospedeiros vertebrados (Simões-Mattos et al., 2005).

Apesar de tudo isto, as técnicas serológicas continuam a ser utilizadas no diagnóstico de LFel (IFI, ELISA, Teste de Aglutinação Directa (DAT) e *Western Blot* (Cardoso et al., 2010; Gramiccia, 2011), no entanto, os resultados devem ser confirmados por métodos parasitológicos ou moleculares (Gramiccia, 2011).

### **6.9.3. Métodos moleculares**

As técnicas moleculares baseadas em PCR têm sido cada vez mais usadas sozinhas ou em combinação com testes serológicos e parasitológicos (Cardoso et al., 2010; Gramiccia et al., 2011). Esta é uma técnica bastante sensível na detecção/identificação de *Leishmania* spp. (Beneth, 2006; Maia & Campino, 2008) e pode ser realizada a partir de sangue, punção de linfonodos, medula óssea e biópsia de pele (Leishdomus, 2005).

Em felinos o PCR parece ter vantagens em relação às técnicas serológicas. Num estudo realizado na Itália por Boari et al. (2005, citado por Venet, 2007), 11 de 203 felinos errantes testaram positivo à presença de anticorpos por IFI. Esses animais foram testados novamente dois a seis meses depois, e apenas cinco deles permaneceram seropositivos. Contudo, através de PCR, foi amplificado ADN do agente nos linfonodos de todos os 11 animais, mostrando que esta técnica, mesmo na ausência de anticorpos circulantes é capaz de detectar ADN do parasita. O PCR aplicado em sangue, amplificou ADN de apenas cinco animais, mostrando que, tal como acontece nos canídeos, o sangue não é o melhor local de pesquisa, pois as formas amastigotas dificilmente se encontram em circulação (Maia & Campino, 2011), e que a medula óssea e linfonodos são o melhor local de pesquisa do agente (Vita et al., 2005). De forma a aumentar a sensibilidade e/ou especificidade pode ser utilizados o *nested* PCR, o PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) ou o *real-time* PCR (Gramiccia, 2011).

As técnicas moleculares têm ainda a vantagem de poderem ser utilizadas como forma de controlo durante e após o tratamento, já que a “cicatriz” imunológica (sorologia positiva) permanece durante vários anos sem que o paciente apresente doença activa (Maia & Campino, 2008; Leishdomus, 2005).

#### **6.9.4. Alterações laboratoriais**

As alterações dos perfis hematológico e bioquímico podem não ocorrer (Schubach et al., 2004). A nível hematológico o que se observa mais comumente é leucocitose, neutrofilia, anemia e trombocitopénia (Ozon, et al., 1998; Pennisi, 2002; Poli et al., 2002; Schubach et al., 2004; Souza, Barros, Ishikawa, Ilha, Marin & Nunes, 2005; Souza, Nunes, Borralho & Ishikawa, 2009), e com menor frequência eosinofilia e leucopénia (Ozon et al., 1998; Hervás et al., 1999; Pennisi, 2002; Schubach et al., 2004).

Pode ainda observar-se o aumento das globulinas séricas (Ozon et al., 1998; Pennisi, 2002; Poli et al., 2002; Hervás et al., 1999), das proteínas totais (Ozon et al., 1998; Hervás et al., 1999) e da ureia e creatitina (Pennisi, 2002).

#### **6.10. Tratamento**

Dado o reduzido número de casos de LFel reportados, não existe ainda um tratamento padronizado (Goodfellow & Shaw, 2005; Maia & Campino, 2011). Além dos poucos casos descritos, existem felinos diagnosticados com *Leishmania* spp. que não receberam qualquer tipo de tratamento ou aos quais não se conseguiu fazer o devido acompanhamento (Navarro et al., 2010; Pennisi, 2002; Grevot et al., 2005). Os fármacos utilizados ao tratamento da LCan têm sido utilizados em gatos afectados, com resultados positivos, nomeadamente o alopurinol (Pennisi et al., 2002; Savani et al., 2004; Souza et al., 2005; Navarro et al., 2010; Sanches et al., 2011), o antimoniato de meglumina e/ou ketoconazol (Pennisi, 2002; Bonfante-Garrido et al., 1996).

#### **6.11. Importância em Saúde Pública**

Existem aproximadamente trinta espécies de *Leishmania* em todo o mundo, das quais apenas cerca de vinte são capazes de provocar doença no Homem. A maior parte dessas espécies são zoonóticas, existindo no entanto um pequeno número que são antroponóticas (transmissão ocorre de pessoa para pessoa através da picada de insecto) (Beneth, 2006). A leishmaniose humana (LVH) tem diferentes manifestações clínicas (visceral, cutânea e muco-cutânea) sendo a leishmaniose visceral, provocada por *Leishmania donovani* no Velho Mundo e *Leishmania infantum* (ou *Leishmania chagasi*) tanto no Velho como no Novo Mundo, a forma mais grave da doença, podendo levar à morte na ausência de tratamento (Gramiccia, 2011). As leishmanioses cutânea e muco-cutânea são provocadas por várias outras espécies de *Leishmania* tanto no Novo (América), como no Velho Mundo (Europa, África e Ásia), e apesar de não fatais, causam elevada morbidade em zonas de focos endémicos (Beneth, 2006; Gramiccia, 2011).

Apesar de o primeiro relato de LFel datar de 1912, os felinos são ainda vistos como hospedeiros incomuns de *Leishmania* spp. (Pennisi, 2002). O papel do gato doméstico como hospedeiro reservatório da leishmaniose é ainda controverso, no entanto vários autores

referem que estes possuem características que mostram que podem desempenhar um papel importante na epidemiologia da doença (Gramiccia & Gradoni, 2005; Marioli et al., 2007; Martín-Sánchez et al., 2007; Maia e Campino, 2011). Assim, os animais possuem susceptibilidade à infecção por *L. infantum*, sem que normalmente manifestem sinais clínicos (não recebendo por isso terapia adequada); existe uma elevada percentagem de felinos parasitêmicos e seropositivos nos diferentes países da Europa; felinos infectados são capazes de transmitir a infecção ao vector flebótomo; estão entre os animais de estimação mais populares, habitando normalmente perto de humanos.

Todos estes dados sugerem que os gatos podem então actuar como hospedeiros reservatórios do agente em alternativa ao cão, no entanto mais estudos devem ser realizados para que tal possa ser confirmado (Gramiccia & Gradoni, 2005).

## **7. Controlo de Doenças Transmitidas por Vectores**

As doenças transmitidas por vectores têm tido uma importância crescente tanto em medicina veterinária como em medicina humana (Harrus et al., 2005; Parola et al., 2005; Little, 2007; Alves et al., 2009). Os vectores artrópodes (como as pulgas, carraças e flebotomos) têm um papel chave na transmissão e manutenção de agentes etiológicos de doenças importantes em animais domésticos e em humanos (Little, 2007; ESCCAP, 2010a), nomeadamente *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., e *Leishmania infantum* (Shaw et al., 2001; Parola et al., 2005; Beugnet & Marie, 2009; Bitam, Dittmar, Parola, Whiting & Raoult, 2010). Dos agentes abordados, apenas *M. haemofelis* não é um agente zoonótico.

Nos últimos anos tem-se verificado na Europa um aumento de algumas doenças transmitidas por vectores, o que pode dever-se em parte a factores humanos como o aumento da facilidade de transporte de animais entre diferentes países, criação de parques e jardins nas imediações das habitações (favorecendo a permanência de vectores artrópodes) e o aumento das actividades ao ar livre (aumentando a probabilidade de picada por vectores); contudo, também questões relacionadas com alterações climáticas como o aquecimento global e as variações de temperatura e humidade que se têm vindo a sentir, afectam largamente a densidade dos vectores, sua distribuição geográfica e sua capacidade vectorial (Beugnet & Marie, 2009).

Assim, a prevenção da transmissão dos agentes e da doença, bem como a redução do risco de infecções zoonóticas passa pela implementação de programas seguros e eficientes no controlo dos vectores nos animais domésticos (Little, 2007, 2010, 2011).

### 7.1. Controlo de infecção por pulgas

O tratamento e controlo de infestações por pulgas passa por três pontos principais (Payne, Dryden & Carter, 2005):

1. Eliminação das pulgas no animal/animais
2. Eliminação da infestação ambiental existente
3. Prevenção de reinfestação dos animais e ambiente

Antigamente, o controlo de pulgas era realizado através da aplicação repetida nos animais de estimação de produtos direccionados às instalações (insectidas e reguladores do crescimento de insectos) (Payne et al., 2005). Contudo, o recente desenvolvimento de adulticidas e reguladores do crescimento de insectos altamente eficazes, com doses específicas para animais de estimação e com um efeito residual prolongado, tem facilitado e tornado mais eficaz o controlo de pulgas nos animais e no ambiente (Payne et al., 2005). Os produtos licenciados e utilizados em Portugal para o controlo de pulgas em felinos estão resumidos na Tabela 2.

**Tabela 2** Lista de produtos antiparasitários externos com acção em pulgas e ixodídeos disponíveis em Portugal. Tabela adaptada de ESCCAP, 2010b.

| Nome Comercial                   | Princípio Activo             | Posologia                   | Via de administração             | Pulgas | Ixodídeos |
|----------------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|--------|-----------|
| <b>Advantage® (Bayer)</b>        | Imidacloprid                 | 10 mg/kg                    | <i>Spot-on</i>                   | Sim    | -         |
| <b>Advocate® (Bayer)</b>         | Imidacloprid/<br>moxidectina | 10 mg/kg/<br>1,0 mg/kg      | <i>Spot-on</i>                   | Sim    | -         |
| <b>Capstar® (Novartis)</b>       | Nitempyran                   | 1 mg/kg                     | Oral                             | Sim    | -         |
| <b>Effipro (Virbac)</b>          | Fipronilo                    | -                           | <i>Spot on/<br/>Pulverização</i> | Sim    | Sim       |
| <b>Frontline combo® (Merial)</b> | Fipronilo/<br>methoprene     | 5 mg/kg/<br>6 mg/kg         | <i>Spot-on</i>                   | Sim    | Sim       |
| <b>Frontline® (Merial)</b>       | Fipronilo                    | 7,5 mg/kg                   | <i>Spot on/<br/>Spray</i>        | Sim    | Sim       |
| <b>Program® (Novartis)</b>       | Lufenurón                    | 10 mg/kg<br>cada 6<br>meses | Injectável                       | Sim*   | -         |
| <b>Program® (Novartis)</b>       | Lufenurón                    | 30<br>mg/kg/mes             | Oral                             | Sim*   | -         |
| <b>Promeris® (Pfizer)</b>        | Metaflumizona                | 40<br>mg/kg/mes             | <i>Spot-on</i>                   | Sim    | -         |
| <b>Stronghold® (Pfizer)</b>      | Selamectina                  | 6 mg/kg/mes                 | <i>Spot-on</i>                   | Sim    | -         |

Legenda: (\*)Preventivo, não adulticida

Estes produtos devem ser administrados nas doses e intervalos aconselhados pelos fabricantes, conforme indicado na bula.

Em caso de infestações mais graves, é necessário efectuar o controlo ambiental, concorrentemente ao controlo tópico ou oral instituído no animal (ESCCAP, 2010a). Esse controlo passa pela aplicação repetida de insecticidas nas instalações (Payne et al., 2005). Existem produtos desenhados para aplicação no ambiente (pulverizadores, nebulizadores, etc.) que podem ser adulticidas e/ou reguladores de crescimento de insectos. O tratamento ambiental deve concentrar-se nos locais onde o animal passa mais tempo (na sua cama, por exemplo) e nos locais de difícil acesso (por exemplo parte de trás dos tapetes) onde as pupas tendem a concentrar-se (ESCCAP, 2010a). Outras medidas que podem ser tomadas no controlo ambiental de forma a reduzir as formas juvenis são a aspiração frequente dos tapetes, a lavagem frequente das camas (Payne et al., 2005; ESCCAP, 2010a) e a substituição de carpetes por pisos mais duros e fáceis de limpar como azulejos e madeira (Little, 2007).

Em zonas onde a re-infestação é provável (zonas de clima temperado, casas com vários animais, etc.), os proprietários devem optar por realizar profilaxia regular a todos os animais com um produto registado, tal como apresentado na Tabela 2. As infestações por pulgas possuem um pico no Verão e Outono, no entanto podem ocorrer durante todo o ano, pelo que deve ser realizado um controlo permanente.

## **7.2. Controlo de infecção por ixodídeos**

O controlo de ixodídeos e de doenças por eles transmitidas é difícil uma vez que estes possuem elevada capacidade reprodutiva, inúmeros hospedeiros domésticos e silváticos, e que existem múltiplas espécies com diferentes ciclos de vida (Dryden & Payne, 2004). A base de um controlo eficaz de ixodídeos passa pelo uso apropriado de ectoparasiticidas (Blagburn, 2007).

Se uma infestação por ixodídeos está já estabelecida, deve ser feita a remoção de todos os elementos agarrados à pele do animal na altura da detecção (controlo mecânico), seguida da aplicação do controlo químico adequado (ESCCAP, 2010a). O controlo mecânico deve ser realizado com luvas, de forma a minimizar o contacto com fluidos do ixodídeo (ESCCAP, 2010a). O controlo químico deve ser efectuado com produtos licenciados para o efeito, e deve estender-se a todos os animais da habitação, durante todo o período de actividade dos ixodídeos (ESCCAP, 2010a). Os acaricidas tópicos com maior eficácia contra ixodídeos são o amitraz (colar empregado), as permetrinas (spray ou fórmulas spot-on) e fipronil (spray e fórmulas spot-on). No entanto, destes três, apenas o fipronil pode ser usado com segurança em felinos (Dryden & Payne, 2004). Na Tabela 2 encontram-se os produtos licenciados em Portugal, que devem ser utilizados de acordo com as indicações do fabricante

(nomeadamente no que respeita às doses e aos intervalos de administração) (ESCCAP, 2010a).

### **7.3. Falhas no controlo de pulgas e ixodídeos:**

Falhas no controlo destes agentes devem-se muitas vezes a (ESCCAP, 2010a; Little 2011):

- Elevada carga ambiental de fases imaturas de pulgas que continuarão a emergir durante meses;
- Incapacidade de detecção dos locais do meio ambiente em que a concentração de fases imaturas é superior;
- Não tratamento de todos os animais de uma habitação em simultâneo;
- Convívio com outros animais não desparasitados ou exposição dos animais a locais infestados (como jardins públicos e casas de amigos ou família...);
- Produtos aplicados inadequadamente ou na dose e intervalos incorrectos ;
- Não aplicação de desparasitante na ausência de ectoparasitas visíveis.

### **7.4. Controlo de picada de flebótomos**

Os canídeos são considerados o principal reservatório leishmaniose visceral zoonótica, pelo que as estratégias de prevenção da doença em humanos passam pela prevenção da doença em cães domésticos (Strauss-Ayali & Baneth, 2001).

O flebótomos são parasitas externos intermitentes, pelo que não podem ser incluídos num programa de desparasitação externa como os aplicados para ao controlo de pulgas e ixodídeos. Assim, todos os esforços visam minimizar a interacção entre o flebótomo e o hospedeiro (ESCCAP, 2010a).

No cão, as medidas preventivas incluem a utilização de insecticidas e repelentes tópicos e em coleiras no animal (principalmente piretróides de origem sintética) e nas habitações, e a manutenção dos animais no interior uma hora antes do nascer do Sol e uma hora após o pôr do Sol durante a fase de actividade do vector (Strauss-Ayali & Baneth, 2001; Gramiccia, 2011; Onleish, 2011). Recentemente em Portugal foi também lançada no mercado uma vacina protectora contra a leishmaniose (Onleish, 2011), cujo objectivo não é evitar o contacto do flebótomo com o animal mas sim evitar que a infecção se estabeleça (Gramiccia, 2011).

Para os felinos, não estão descritas vacinas nem produtos de aplicação tópica capazes de repelir os flebótomos, pelo que a prevenção nestes animais deve passar por evitar o acesso ao exterior nas alturas de maior actividade do vector.

## CAPÍTULO III- ESTUDO EXPERIMENTAL:

### DETECÇÃO DE *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

#### 1. Desenho Experimental

##### 1.1. Objectivos

O presente trabalho teve como propósito a realização um estudo epidemiológico acerca dos agentes infecciosos, nomeadamente vírus imuossupressores (FIV e FeLV) e hemoparasitas, que afectam a população felina de uma associação particular localizada na Moita, Setúbal. Os objectivos passaram também por perceber se efectivamente a presença desses agentes infecciosos têm relação com as alterações clínicas apresentadas pelos animais e por avaliar a forma como esses agentes influenciam entre si.

##### 1.2. Material e Métodos

###### 1.2.1. População em estudo e instalações

A população em estudo foi constituída por 50 felinos domésticos (*Felis catus*) de uma associação particular da Moita (Setúbal), a Associação dos Amigos dos Animais Abandonados da Moita (AAAAMoita). Os animais estavam distribuídos por três gatis, cada um albergando cerca de 20 animais. Cada gatil é constituído por duas zonas cobertas, uma interior (3 x 4 metros) e uma exterior (3 x 4 metros) (Figura 2). A história pregressa de cada animal foi efectuada, através do inquérito disponível no ANEXO V, à pessoa responsável pelo maneo dos animais.

**Figura 2** Instalações de um dos três gatis da AAAAMoita (Original).



A AAAAMoita, além de alojar felinos, alberga também aproximadamente 90 cães distribuídos por cerca de 26 canis (Figura 3).

**Figura 3** Canis em que estão alojados os canídeos da AAAAMoita (Original).



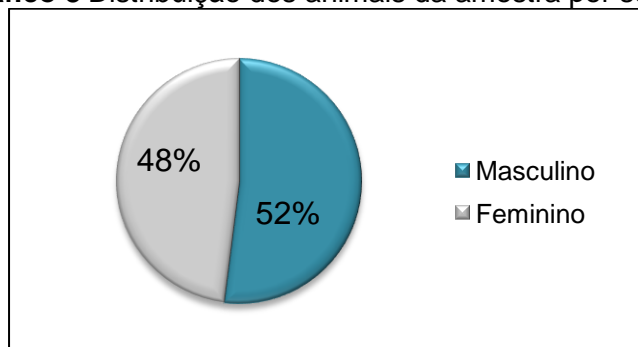
A escolha dos animais a incluir no estudo foi feita de forma aleatória, independentemente da idade, sexo, raça, origem e estado clínico do animal. O estado de vacinação e desparasitação dos animais até à entrada na AAAAMoita é desconhecido, e na associação é feita apenas a desparasitação externa sem que os intervalos entre administrações sejam cumpridos com rigor.

## 1.2.2. Caracterização da amostra populacional

### 1.2.2.1. Sexo

Da totalidade dos 50 felinos testados 26 (52%) eram do sexo masculino e 24 (48%) do sexo feminino (Gráfico 3). Todos animais do sexo masculino que integraram o estudo estavam esterilizados, à excepção de três, que foram levados para o Hospital Veterinário SosVet para serem submetidos à esterilização. Em relação aos animais de sexo feminino, não nos foi possível aferir acerca da percentagem de fêmeas esterilizadas, uma vez que não se conhece a origem e intervenções cirúrgicas prévias da maioria das fêmeas da associação e que a prática do gatil para controlo populacional passa principalmente pela esterilização dos machos.

**Gráfico 3** Distribuição dos animais da amostra por sexo.



### 1.2.2.2. Idade

De forma a facilitar o tratamento dos dados, os animais foram agrupados por classes de idades, consoante a Tabela 3.

**Tabela 3** Distribuição dos animais da amostra por idades.

| <b>Idade (anos)</b> | <b>Frequência Absoluta</b> | <b>Frequência Relativa (%)</b> |
|---------------------|----------------------------|--------------------------------|
| <b>1-3</b>          | 17                         | 34                             |
| <b>4-5</b>          | 19                         | 38                             |
| <b>6-7</b>          | 3                          | 6                              |
| <b>&gt;8</b>        | 5                          | 10                             |
| <b>Desconhecida</b> | 6                          | 12                             |

### 1.2.2.3. Origem

Apesar de alguns dos felinos que habitam o gatil terem nascido na AAAAMoita, a maioria foram recolhidos da rua ou abandonados na associação. Não foi possível recolher qual a proveniência real de cada animal utilizado no estudo.

### 1.2.2.4. Raça

Todos felinos que integraram o estudo não apresentavam raça definida.

## 1.2.3. Exame clínico e Colheita de Amostras

A recolha de amostras decorreu nas próprias instalações da AAAAMoita e no Hospital Veterinário SosVet entre os dias 3 e 13 de Maio de 2011.

Previamente à colheita de amostras, todos os animais foram submetidos a um exame de estado geral acompanhado do preenchimento de uma ficha clínica (disponível no ANEXO VI). A classificação da gengivite foi efectuada de acordo com a tabela apresentada no ANEXO VII, adaptada Gorrel (2004). A temperatura rectal não foi determinada, uma vez que os valores obtidos não corresponderiam ao valor real, dadas as elevadas temperaturas ambientais nos dias de colheita e o stress induzido aos animais, pouco habituados a manipulação.

Por dificuldade de contenção de alguns animais, foi necessário recorrer a uma sedação ligeira de seis dos animais (associação de ketamina e dexmedetomidina nas doses 5µg/Kg e 40µg/Kg, respectivamente, por via IM), para avaliação adequada do estado geral e colheita de amostras.

A cada animal foram recolhidos cerca de 4mL de sangue total periférico a partir da veia jugular, para um tubo com EDTA que, após realização do hemograma, foi mantido em refrigeração a cerca de 4°C até processamento.

#### 1.2.4. Processamento das amostras

Todas as amostras foram processadas no dia de recolha no Laboratório de Virologia da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV), Universidade Técnica de Lisboa (UTL). Do tubo de EDTA foram retirados 100 µL de sangue total dos quais foi feita extracção de ADN para pesquisa de hemoparasitas utilizando o DNeasy Blood & Tissue Kit<sup>®</sup> (Qiagen), segundo as instruções do fabricante. Após extracção, o ADN das amostras foi quantificado no Nanodrop 2000c Spectrophotometer<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific), e todas as amostras foram conservadas à temperatura de -80°C até utilização.

O restante sangue foi centrifugado durante 10 minutos a 1500G para fazer a separação do plasma e células sanguíneas que foram depois conservados separadamente à temperatura de -80°C.

#### 1.2.5. Hemograma

O hemograma foi realizado cerca de 30 minutos após cada colheita no aparelho Hemavet 950FS (Drew Scientific).

#### 1.2.6. Métodos serológicos

A pesquisa de anticorpos de FIV e antigénio de FeLV foi realizada a partir do sangue total, imediatamente após a colheita, utilizando o teste comercial Speed<sup>®</sup> Duo FeLV/FIV da Virbac, segundo as instruções do fabricante.

#### 1.2.7. Métodos moleculares (PCRc e *real-time* PCR)

O ADN extraído do sangue total foi descongelado em gelo, homogeneizado e mantido em refrigeração durante todo o procedimento.

A detecção de ADN de *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp. e *Rickettsia* spp. foi efectuada através de PCRc segundo os protocolos implementados no Laboratório de Virologia, FMV-UTL, que têm como referência o protocolo utilizado por Gal, Loeb, Yisaschar-Mekuzas & Baneth (2007) (no caso de *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp.) e Kidd, Maggi, Diniz, Tucker & Breitschwerdt (2008) (no caso de *Rickettsia* spp.). A amplificação de ADN de *M. haemofelis* foi realizada por *real-time* PCR (Taqman<sup>®</sup>) segundo o protocolo utilizado no Laboratório de Virologia, FMV, UTL, adaptado de Tasker et al. (2003).

O ADN de *Leishmania infantum* foi amplificado por *real time* PCR (Taqman<sup>®</sup>), utilizando *primers* escolhidos no Laboratório de Virologia FMV-UTL, com base na sequência completa (805bp) do ácido nucleico (minicírculos de cinetoplasto de ADN) de *Leishmania infantum* através do programa de *primers* Primer Express<sup>®</sup> (Applied Biosystems), cuja referência de acesso é AF169140.1. O *primer forward* utilizado foi 5'-AGGTGTCGTAAATTCTGGAA-3' e o *primer reverse* 3'-CGGGATTTCTGCACCCATT-5'. A sonda utilizada foi a Fam 5'-AATTCCAAACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG Tamra-3'.

Depois de amplificados, todos os produtos de PCR foram corridos por electroforese em gel de agarose 2,5%, visualizados no Image Master<sup>®</sup> VDS (Pharmacia Biotech) e fotografados através do software Liscap Image Capture, versão 1.0 (Pharmacia Biotech).

Na realização de todos os PCR's foram utilizados controlos positivos previamente sequenciados (Laboratório StabVida, Portugal) e específicos para o agente que se pretendia detectar. Em todos os PCR's realizados durante o estudo, houve amplificação dos controlos positivos que obtiveram o peso molecular que seria de esperar. Não houve amplificação de nenhum dos controlos negativos, o que nos permite validar os PCR's efectuados. O fragmento de *Leishmania* amplificado foi enviado para sequenciação no laboratório StabVida (Portugal).

### **1.2.8. Análise estatística**

O tratamento estatístico dos dados foi efectuado utilizando o programa R, e as prevalências aparentes e reais foram calculadas utilizando o pacote epi.R para o programa R, segundo o método de Willson (Sergeant, 2009). Segundo este método, as prevalências são ajustadas à sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnóstico. No caso do método serológico de detecção de FIV e FeLV, a sensibilidade e especificidade consideradas foram as fornecidas pelo fabricante, ou seja, 96,3% e 98,9% no caso do FIV e 94,7% e 99,2% no caso do FeLV (Hartmann et al., 2007). Para os PCR's, foi considerada uma sensibilidade e especificidade de 100%.

Para a realização das associações estatísticas, foi utilizado o pacote Rcmdr para o programa R, empregando o Teste Exacto de Fisher, que foi escolhido por a amostra em causa ter uma dimensão pequena (n=50). Para estas associações o nível de significância assumido foi  $p < 0,05$ , para um intervalo de confiança (IC) de 95%.

## 2. Resultados

### 2.1. Frequência absoluta, prevalência aparente e prevalência real dos agentes testados na amostra populacional

Os resultados obtidos para os agentes testados pelos testes de diagnóstico a que as 50 amostras foram submetidas estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4** Frequência absoluta, prevalência aparente e prevalência real dos agentes testados na amostra populacional.

| Agente  | Frequência Absoluta | Prevalência Aparente (%) | IC de 95%   | Prevalência Real (%) | IC de 95%   |
|---|---------------------|--------------------------|-------------|----------------------|-------------|
| FIV   | 11                  | 22,0                     | 12,8 - 35,2 | 21,9                 | 12,2 - 35,9 |
| FeLV  | 5                   | 10,0                     | 4,3 - 21,4  | 9,8                  | 3,8 - 21,9  |
| <i>Ehrlichia spp./</i><br><i>Anaplasma spp.</i> | 1                   | 2,0                      | 1,0 - 10,5  | 2,0                  | 1,0 - 10,5  |
| <i>Rickettsia spp.</i>                          | 8                   | 16,0                     | 8,0 - 29,0  | 16,0                 | 8,0 - 29,0  |
| <i>M. haemofelis</i>                            | 2                   | 4,0                      | 1,0 - 13,0  | 4,0                  | 1,0 - 13,0  |
| <i>L. infantum</i>                              | 1                   | 2,0                      | 0,1 - 10,5  | 4,0                  | 0,1 - 10,5  |

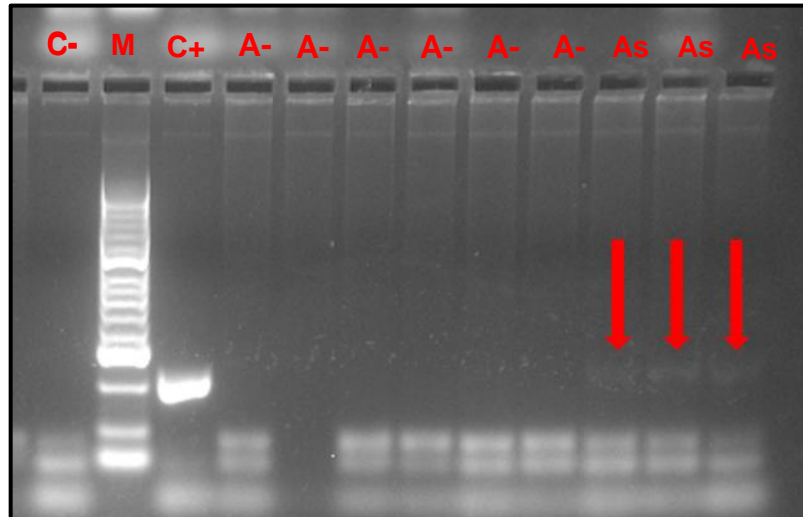
Dos 50 animais testados para FIV e FeLV através de técnicas serológicas, 21,9% (n=11) e 9,8% (n=5) foram diagnosticados como positivos para FIV e FeLV, respectivamente.

**Figura 4** Teste rápido Speed® Duo FeLV/FIV da Virbac com resultado positivo para FIV (Original).



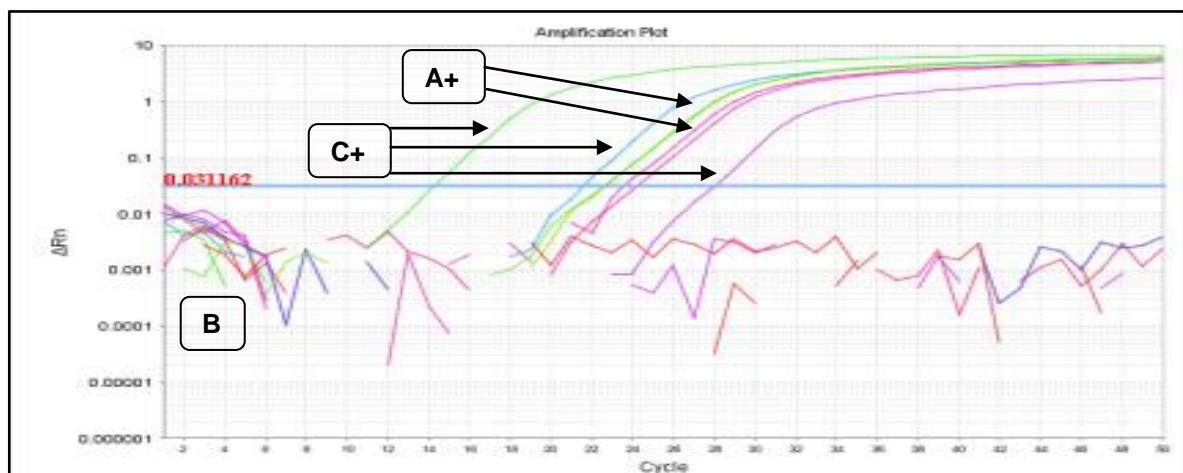
A realização do PCRc permitiu detectar 2% (n=1) dos animais com *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp. e 16% (n=8) dos animais com bandas compatíveis com a presença de *Rickettsia* spp. (Figura 5).

**Figura 5** Resultados do PCRc de *Rickettsia* spp. onde se observam o controlo negativo (C-), o marcador (M), o controlo positivo (C+), seis amostras negativas (A-) e três amostras compatíveis com a presença do agente (As) (original).

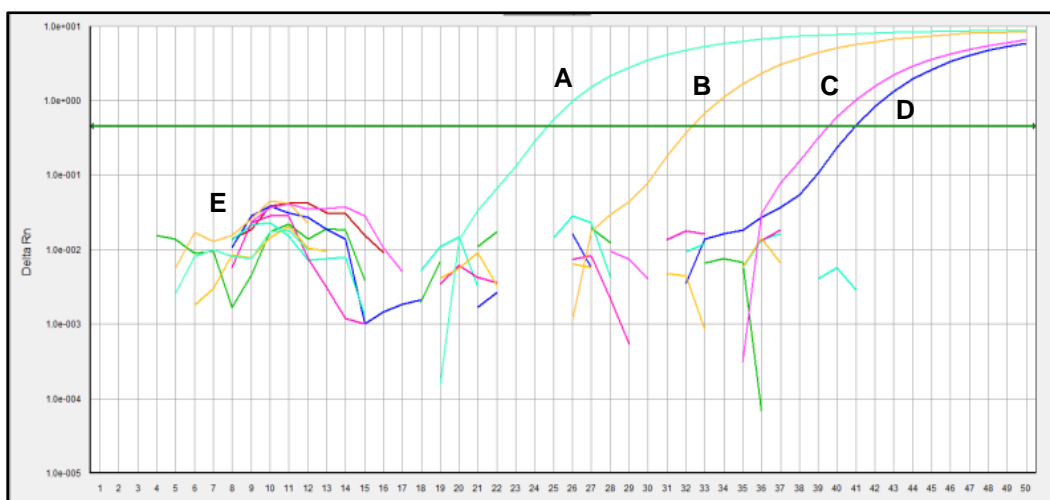


Através de *real-time* PCR foi possível detectar 4% (n=2) dos animais portadores de *M. haemofelis* (Figura 6) e 2% (n=1) com *L. infantum* (Figura 7). A banda amplificada correspondente à nossa amostra foi enviada para sequenciação e a sequência obtida mostra uma identidade de 99% com a espécie *L. infantum*.

**Figura 6** Resultados do *real time* PCR de *M. haemofelis*, onde estão representadas as curvas de amplificação de três controlos positivos (C+), das duas amostras positivas (A+) e a ausência de amplificação de três controlos negativos e de três amostras negativas (B), (Original).



**Figura 7** Resultados do *real time* PCR de *L. infantum*, onde estão representadas as curvas de amplificação de três controlos positivos (A, B e C), da amostra positiva (D) e a ausência de amplificação de três controlos negativos e de duas amostras negativas (E), (Original).



## 2.2. Caracterização dos indivíduos quanto aos agentes pesquisados

### 2.2.1. FIV e FeLV

#### 2.2.1.1. Alterações clínicas

Uma vez que não foi possível saber através da história progressa se houve ou não perda de peso, foi avaliada a condição corporal (C. corporal) de cada animal durante o exame clínico. Foi considerada a presença de linfadenomegália em todos os animais que apresentem um ou mais grupos de linfonodos aumentados. A classificação da gengivite foi feita do grau 0 ao grau 3, no entanto só a partir do grau 2 foi considerada alteração patológica. As alterações referentes a estes sinais clínicos apresentadas pelos animais estão representadas nas Tabelas 5 e 6.

**Tabela 5** Associação entre infecção por FIV e FeLV e os sinais clínicos mais comuns (frequência absoluta).

| Agente                  | Estomatite      |               | Gengivite       |               | C. corporal     |                     | Linfadenomegália |               |
|-------------------------|-----------------|---------------|-----------------|---------------|-----------------|---------------------|------------------|---------------|
|                         | Não<br>(n=33)   | Sim<br>(n=17) | 0-1<br>(n=38)   | 2-3<br>(n=12) | Magro<br>(n=5)  | Boa/Obeso<br>(n=45) | Não<br>(n=34)    | Sim<br>(n=16) |
| <b>FIV –</b><br>(n=39)  | 28              | 11            | 30              | 9             | 4               | 35                  | 26               | 13            |
| <b>FIV+</b><br>(n=11)   | 4               | 7             | 8               | 3             | 1               | 10                  | 8                | 3             |
|                         | <b>(p=0,04)</b> |               | <b>(p=1,00)</b> |               | <b>(p=1,00)</b> |                     | <b>(p=1,00)</b>  |               |
| <b>FeLV –</b><br>(n=45) | 32              | 13            | 35              | 10            | 4               | 41                  | 31               | 14            |
| <b>FeLV +</b><br>(n=5)  | 1               | 4             | 3               | 2             | 1               | 4                   | 3                | 2             |
|                         | <b>(p=0,04)</b> |               | <b>(p=0,58)</b> |               | <b>(p=0,42)</b> |                     | <b>(p=0,65)</b>  |               |

Legenda: (-): não infectado; (+): infectado

**Tabela 6** Associação entre infecção por FIV e FeLV e os sinais clínicos mais comuns (frequência relativa, %).

| Agente                  | Estomatite      |               | Gengivite       |               | C. corporal     |                     | Linfadenomegália |               |
|-------------------------|-----------------|---------------|-----------------|---------------|-----------------|---------------------|------------------|---------------|
|                         | Não<br>(n=33)   | Sim<br>(n=17) | 0-1<br>(n=38)   | 2-3<br>(n=12) | Magro<br>(n=5)  | Boa/Obeso<br>(n=45) | Não<br>(n=34)    | Sim<br>(n=16) |
| <b>FIV –</b><br>(n=39)  | 71,8            | 28,2          | 76,9            | 23,1          | 10,3            | 89,7                | 66,7             | 33,3          |
| <b>FIV+</b><br>(n=11)   | 36,4            | 63,6          | 72,7            | 27,3          | 9,1             | 90,9                | 72,7             | 27,3          |
|                         | <b>(p=0,04)</b> |               | <b>(p=1,00)</b> |               | <b>(p=1,00)</b> |                     | <b>(p=1,00)</b>  |               |
| <b>FeLV –</b><br>(n=45) | 71,1            | 28,9          | 77,8            | 22,2          | 8,9             | 91,1                | 68,9             | 31,1          |
| <b>FeLV +</b><br>(n=5)  | 20,0            | 80,0          | 60,0            | 40,0          | 20,0            | 80,0                | 60,0             | 40,0          |
|                         | <b>(p=0,04)</b> |               | <b>(p=0,58)</b> |               | <b>(p=0,42)</b> |                     | <b>(p=0,65)</b>  |               |

Legenda: (-): não infectado; (+): infectado

Tal como se verifica nas tabelas anteriores, existe associação estatística ( $p=0,04$ ) entre a presença da infecção por FIV ou FeLV e a presença de estomatite: 63,6% (7/11) dos animais FIV positivos e 80% dos animais FeLV positivos possuem estomatite. Em três dos quatro dos animais positivos a FeLV, a estomatite era grave.

No caso da gengivite, apesar de 27,3% (3/11) dos animais FIV positivos e de 40% (2/5) dos animais FeLV positivos apresentarem gengivite de grau igual ou superior a 2, essas alterações não são estatisticamente significativas na amostra em estudo. No que respeita à condição corporal, a maioria dos 50 animais da amostra tinham condição corporal “Boa/Obeso”, existindo apenas 10% (5/50) com condição corporal “Magro”. Dos animais infectados, por pelo menos um vírus imunossupressor, apenas um animal com FIV (9,1%) e um animal com FeLV (20%) possuíam condição corporal “Magro”. Em relação à presença de linfadenomegália não houve também associação estatística entre a presença de linfonodos aumentados e a infecção por vírus imunossupressores. A proporção de animais com condição corporal baixa e com linfadenomegália é semelhante entre animais com e sem vírus imunossupressores.

Outros sinais apresentados pelos animais FeLV positivos foram úlceras linguais (n=2), corrimento ocular (n=1) e corrimento nasal (n=1). O animal nº47 era o animal que se apresentava em piores condições no exame clínico, ostentando mau estado de condição corporal (magro), com desidratação de cerca de 7%, linfadenomegália generalizada (incluindo linfonodos mesentéricos avaliados ecograficamente) e estomatite grave.

Em animais com FIV além dos sinais já referidos nas Tabelas 4 e 5, encontraram-se ainda úlceras linguais (n=5), corrimento ocular (n=4), corrimento nasal (n=2), desidratação 5% (n=1), arranhões (n=2), conjuntivite bilateral (n=1) e ruído respiratório superior (n=2).

### 2.2.1.2. Alterações hematológicas

Dos animais com FIV, apenas um apresentava alterações do hemograma, revelando leucocitose, neutrofilia, linfocitose e monocitose.

As alterações do hemograma dos animais com FeLV estão apresentadas na Tabela 7.

**Tabela 7** Alterações de hemograma apresentadas pelos animais FeLV positivos.

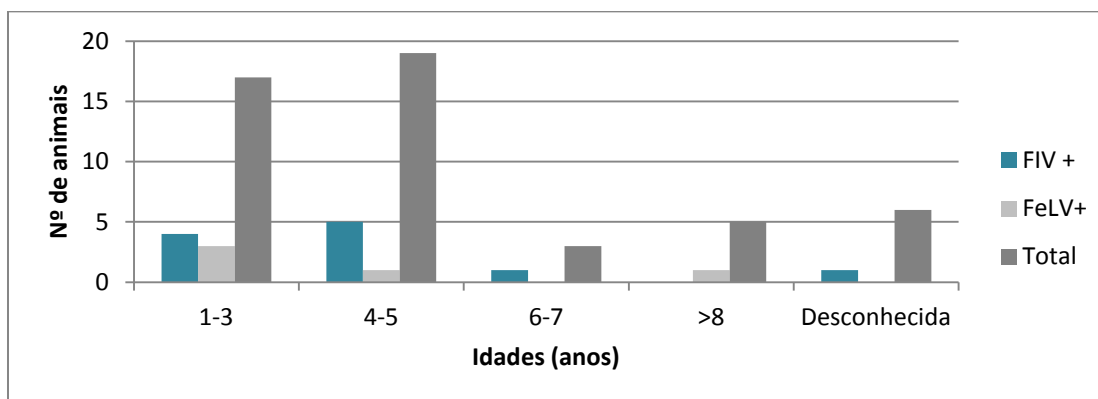
| Parâmetros                                     | Valores de Referência | Nº dos Animais      |                      |    |                        |                          |
|--|-----------------------|---------------------|----------------------|----|------------------------|--------------------------|
|  |                       | 5                   | 9                    | 11 | 35                     | 47*                      |
| <b>Células Vermelhas (M/<math>\mu</math>L)</b> | 5-11                  | -                   | -                    | -  | 11,2<br>( $\uparrow$ ) | 4,8<br>( $\downarrow$ )  |
| <b>Concentração hemoglobina (g/dL)</b>         | 8,0-15,0              | -                   | 16,0 ( $\uparrow$ )  | -  | 16,7<br>( $\uparrow$ ) | 7,8<br>( $\downarrow$ )  |
| <b>HCT (%)</b>                                 | 24,0-45,0             | 45,8 ( $\uparrow$ ) | 52,5 ( $\uparrow$ )  | -  | 52,8 ( $\uparrow$ )    | -                        |
| <b>VMC (fL)</b>                                | 39,0-52,0             | -                   | -                    | -  | -                      | 56,9<br>( $\uparrow$ )   |
| <b>HCM (pg)</b>                                | 12,5-17,5             | -                   | -                    | -  | -                      | -                        |
| <b>CHCM (g/dL)</b>                             | 30,0-37,0             | -                   | -                    | -  | -                      | 28,6<br>( $\downarrow$ ) |
| <b>Linfócitos (K/<math>\mu</math>L)</b>        | 20,0-55,0             | -                   | 7,2 ( $\downarrow$ ) | -  | -                      | -                        |

Legenda : (\*)- desidratação de 7%; HCT- hematócrito; VMC- volume corpuscular médio; hemoglobina corpuscular média; CHCM- concentração de hemoglobina corpuscular média

### 2.2.1.3. Influência dos factores: idade e sexo

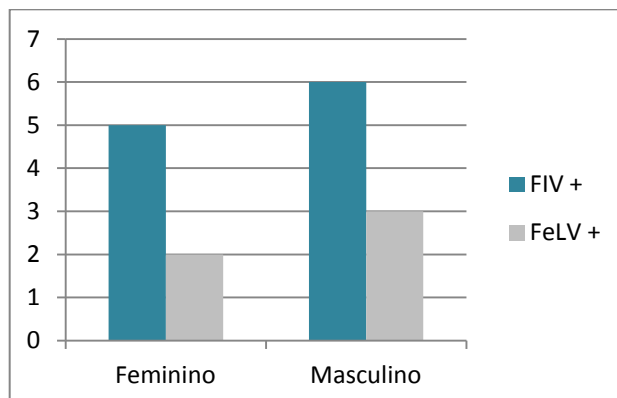
Relativamente às idades, dos 11 animais infectados por FIV 36,4% (4/11) e 45,5% (5/11), estão incluídos nas classes “1-3” e “4-5”, respectivamente, estando os restantes 18,1% (2/11) distribuídos pelas restantes três classes. A classe “>8” não tem nenhum animal infectado com FIV. Dos animais com FeLV, 60% (3/5) encontram-se na classe “1-3”, 20% (1/5) na classe “4-5” e os restantes 20% (1/5) na classe “>8” (Gráfico 4).

**Gráfico 4** Distribuição dos animais FIV e FeLV positivos pelas idades.



Da totalidade de animais positivos para FIV, 54,5% (6/11) eram do sexo masculino e 45,5% (4/11) do sexo feminino. Relativamente aos animais FeLV positivos, 60% (3/5) são do sexo masculino e os restantes 40% (2/5) do sexo feminino (Gráfico 5).

**Gráfico 5** Distribuição dos animais FIV e FeLV positivos pelos sexos.



#### 2.2.1.4. Associação entre a presença de FIV ou FeLV e a presença de hemoparasitas

**Tabela 8** Associação entre a presença de FIV/FeLV e os hemoparasitas pesquisados (frequência absoluta).

| Agentes     | <i>Anaplasma spp./ Ehrlichia spp.</i> |            | <i>Rickettsia spp.</i> |            | <i>M. haemofelis</i> |            | <i>L. Infantum</i> |            |   |
|-------------|---------------------------------------|------------|------------------------|------------|----------------------|------------|--------------------|------------|---|
|             | -<br>(n=49)                           | +<br>(n=1) | -<br>(n=42)            | +<br>(n=8) | -<br>(n=48)          | +<br>(n=2) | -<br>(n=49)        | +<br>(n=1) |   |
| <b>FIV</b>  | FIV-<br>(n=39)                        | 38         | 1                      | 38         | 7                    | <b>39</b>  | <b>0</b>           | 38         | 1 |
|             | FIV+<br>(n=11)                        | 11         | 0                      | 4          | 1                    | <b>9</b>   | <b>2</b>           | 11         | 0 |
|             |                                       | (p=1,000)  |                        | (p=0,670)  |                      | (p=0,045)  |                    | (p=1,000)  |   |
| <b>FeLV</b> | -<br>(n=45)                           | 44         | 1                      | 38         | 7                    | 44         | 1                  | 44         | 1 |
|             | +<br>(n=5)                            | 5          | 0                      | 4          | 1                    | 4          | 1                  | 5          | 0 |
|             |                                       | (p=1,000)  |                        | (p=1,000)  |                      | (p=0,190)  |                    | (p=1,000)  |   |

Legenda: (-): não infectado; (+): infectado

Apenas uma das associações que se procurou estabelecer foi estatisticamente significativa ( $p= 0,045$ , ou seja  $<0,05$ ), mostrando que na nossa amostra a proporção de animais afectados com *M. haemofelis* é maior em animais infectados por FIV (Tabela 8).

Todas as outras tentativas de associações não obtiveram significado estatístico ( $p>0,05$ ), não estando a presença dos restantes hemoparasitas associados à presença de vírus imunossupressores.

### 2.2.2. Ehrlichia spp. e Anaplasma spp.

A maioria dos sinais clínicos apresentados pelo animal em que houve amplificação de ADN de *Ehrlichia* spp. e/ou *Anaplasma* spp. foram inespecíficos como gengivite ligeira (grau 1), pêlo baço e desidratação de cerca de 5%. O animal apresentava ainda taquipneia e presença de ruídos respiratórios superiores e inferiores.

As alterações do perfil sanguíneo de cada animal, estão apresentadas na Tabela 9.

**Tabela 9** Alterações de hemograma apresentadas pelo animal positivo a *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp..

| Parâmetros                         | Valor Obtido | Valores de Referência | Alteração   |
|------------------------------------|--------------|-----------------------|-------------|
| Concentração de hemoglobina (g/dL) | 15,5         | 8,0-15,0              | Policitemia |
| Hematócrito (HCT) (%)              | 49,2         | 24,0-45,0             | Policitemia |
| Linfócitos (K/ $\mu$ l)            | 9,28         | 1,5-7,0               | Linfocitose |

### 2.2.3. Rickettsia spp.

#### 2.2.3.1. Alterações clínicas

Todas as alterações clínicas manifestadas pelos oito animais suspeitos de infecção por *Rickettsia* spp. estão resumidas na Tabela 10.

**Tabela 10** Alterações clínicas apresentadas pelos animais suspeitos de infecção por *Rickettsia* spp..

| Alterações Clínicas | Nº do Animal |           |     |          |                |          |       |       |
|---------------------|--------------|-----------|-----|----------|----------------|----------|-------|-------|
|                     | 31           | 32        | 40  | 46       | 47             | 48       | 49    | 50    |
| Outros agentes*     | -            | -         | FIV | -        | FeLV           | -        | -     | -     |
| Emagrecimento       | +            | -         | -   | -        | +              | -        | -     | -     |
| Gengivite (grau)    | 1            | 1         | -   | 1        | 1              | 1        | 1     | -     |
| C. Corporal         | Boa          | Boa       | Boa | Boa      | Magro          | Boa      | Obeso | Obeso |
| ↓ Actividade        | +            | -         | -   | -        | -              | -        | -     | -     |
| Conjuntivite        | -            | +         | -   | -        | -              | +        | -     | -     |
|                     |              | (unilat.) |     |          |                | (bilat.) |       |       |
| C. Ocular           | -            | +         | -   | +        | -              | +        | -     | -     |
|                     |              | (unilat.) |     | (bilat.) |                | (bilat.) |       |       |
| C. Nasal            | -            | -         | -   | +        | -              | -        | -     | -     |
| Linfadenomegália    | -            | -         | -   | +        | +              | +        | +     | -     |
|                     |              |           |     |          | (generalizada) |          |       |       |

Legenda: (\*) dentro dos pesquisados; (+)- presença de alteração clínica; (-)- ausência de alteração clínica; (unilat.)- unilateral; (bilat)- bilateral; (↓)- diminuída

Não houve associação estatística entre a presença de *Rickettsia* spp. e a manifestação de qualquer dos sinais clínicos acima apresentados.

### 2.2.3.2. Alterações hematológicas

As alterações do perfil sanguíneo nos animais suspeitos de infecção por *Rickettsia* spp., estão sintetizadas na tabela abaixo (Tabela 11).

**Tabela 11** Alterações de hemograma apresentadas pelos animais suspeitos de infecção por *Rickettsia* spp..

| Parâmetros                               | Valores de Referência | Nº dos Animais |             |             |    |             |              |             |             |
|--|-----------------------|----------------|-------------|-------------|----|-------------|--------------|-------------|-------------|
|  |                       | 31             | 32          | 40          | 46 | 47*         | 48           | 49          | 50          |
| <b>Eritrócitos (M/<math>\mu</math>L)</b> | 5-11                  | -              | -           | -           | -  | 4,80<br>(↓) | 12,09<br>(↑) | -           | -           |
| <b>Concentração hemoglobina (g/dL)</b>   | 8,0-15,0              | -              | -           | -           | -  | 7,8<br>(↓)  | 18,9<br>(↑)  | -           | -           |
| <b>HCT (%)</b>                           | 24,0-45,0             | -              | -           | -           | -  | -           | 55,0<br>(↑)  | 48,4<br>(↑) | 48,3<br>(↑) |
| <b>VCM (fL)</b>                          | 39,0-52,0             | -              | -           | -           | -  | 56,9<br>(↑) | -            | -           | -           |
| <b>CHM (pg)</b>                          | 12,5-17,5             | -              | 8,1<br>(↓)  | -           | -  | -           | -            | -           | -           |
| <b>CHCM (g/dL)</b>                       | 30,0-37,0             | -              | 38,2<br>(↑) | 28,8<br>(↓) | -  | 28,6<br>(↓) | -            | -           | 29,6<br>(↓) |

Legenda: (\*): desidratação 7%; (-): ausência de alteração; (↓): valor diminuído; (↑): valor aumentado

### 2.2.4. *M. haemofelis*

#### 2.2.4.1. Alterações clínicas

Um dos animais em que foi amplificado ADN de *M. haemofelis*, não apresentava qualquer alteração ao exame físico, à excepção de conjuntivite bilateral com ligeiro corrimento ocular seroso.

O outro animal apresentava como alterações o aumento dos linfonodos poplíteos, a presença de gengivite grau 1 e estomatite grave.

Ambos os animais eram obesos e apresentaram pêlo baço.

#### 2.2.4.2. Alterações hematológicas

Nenhum dos animais apresentava alterações do perfil sanguíneo.

## 2.2.5. *L. infantum*

### 2.2.5.1. Alterações clínicas

Ao exame físico o animal para o qual se observou resultado positivo para *L. infantum* não exibia alterações, além da presença de gengivite de grau 2. O pêlo estava brilhante, e não estava presente qualquer lesão cutânea indicativa de infecção por *Leishmania* spp.. A condição corporal do animal era boa e não apresentava sinais de desidratação.

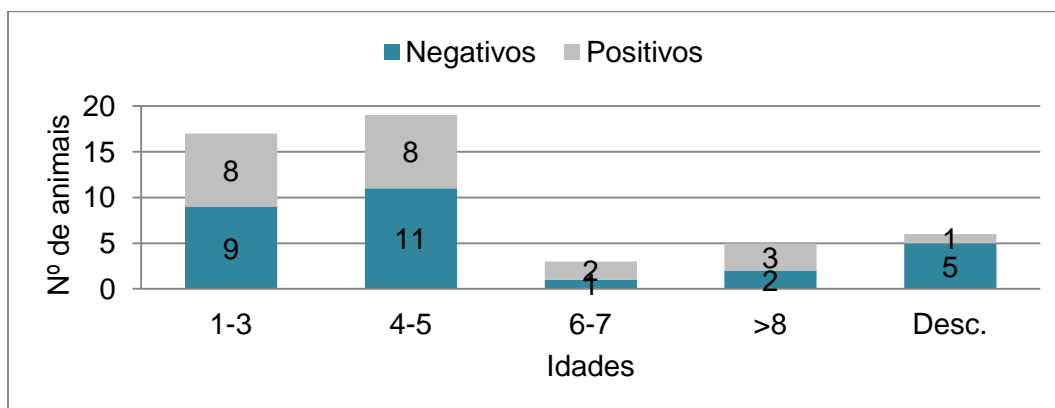
### 2.2.5.2. Alterações hematológicas

A única alteração presente no hemograma do animal afectado foi a presença de linfocitose ligeira (9,09 K/ $\mu$ L para os valores de referência 1,5-7,0 K/ $\mu$ L).

## 2.3. Animais não infectados por nenhum dos agentes

Em 56% (n=28) dos 50 animais testados, não foi encontrado nenhum dos agentes pesquisados. É nas classes “1-3 anos” e “4-5 anos” que se incluem a maior parte dos animais da nossa amostra. Dos 17 animais incluídos na classe “1-3 anos”, 52,9% não estão afectados por nenhum dos agentes testados e na classe “4-5 anos”, em 57,9% dos animais não foi encontrado nenhum dos agentes (Gráfico 6).

**Gráfico 6** Distribuição por idades dos animais positivos/negativos a pelo menos um dos agentes pesquisados.



### **3. Discussão dos resultados**

#### **3.1. FIV e FeLV**

##### **3.1.1. Prevalências obtidas**

O FIV e FeLV são vírus de distribuição mundial, cujas prevalências variam muito consoante a área geográfica e as características das populações testadas (Hosie et al., 2009; Lutz et al., 2009). O diagnóstico de FIV e FeLV é realizado normalmente por técnicas serológicas. Em Portugal, uma vez que poucos, ou mesmo nenhum, gatos infectados por FIV conseguem eliminar a infecção por completo, e que não são utilizadas vacinas contra este vírus, o seu diagnóstico é efectuado principalmente por detecção de anticorpos no sangue de animais afectados (Sellon & Hartmann, 2006). O diagnóstico de FeLV, pelo contrário, é realizado maioritariamente por detecção de antigénio através de técnicas serológicas como é o caso da ELISA e, em menor grau da IFI que detectam a proteína da cápside p27 (Hartmann, 2004; Colitz, 2005; Arjona et al., 2007; Cohn, 2007; Levy et al., 2008; Levy et al., 2009). O desenvolvimento de técnicas moleculares trouxe algumas vantagens na detecção destes agentes, contudo não substituiu ainda por completo as técnicas serológicas por ser mais demorado e mais dispendioso para o proprietário do animal. De referir que no caso do FeLV, as prevalências obtidas não correspondem à quantidade de animais expostos ao agente, pois grande parte dos animais, depois de expostos, conseguem debelar a infecção (Hartmann, 2006).

Estão descritos, um pouco por todo o mundo, imensos estudos com diferentes populações alvo com vista a apurar a prevalência e factores de risco para as infecções por FIV e FeLV. Lee et al. (2002), realizou entre Janeiro de 1995 e Setembro do ano seguinte um rastreio de FIV e FeLV em 1876 gatos errantes, observando que 3,5% apresentavam anticorpos contra FIV e 4,3% antigénios FeLV. Já Luria et al. (2004) testaram 553 felinos errantes incluídos num programa *Trap-Neuter-Return* (TNR), apurando, através de ELISA, 5,2% de animais positivos para FIV e 3,3% de animais positivos para FeLV. Little (2005), testou entre Janeiro de 2001 e Fevereiro de 2003, 74 gatos vadios e 172 gatos de particulares de Ottawa, Canadá, através de um teste rápido baseado na metodologia de ELISA. A prevalência de FIV registada neste estudo em gatos de rua (23%) foi bastante superior às reportadas pelos autores previamente citados. Pelo contrário, a prevalência de FeLV foi de 5,4%, adequando-se ao encontrado em outros estudos. Dos gatos de proprietários particulares, testados apenas rotineiramente, 5,9% foram positivos a FIV e 1,7% a FeLV. O maior estudo realizado com o propósito de determinar a prevalência de FIV e FeLV, foi realizado nos Estados Unidos por Levy et al. (2006), que entre Agosto e Novembro de 2004, avaliou a presença de ambos os agentes em 9.970 felinos provenientes de 345 clínicas veterinárias e 8.068 gatos pertencentes a 145 abrigos, num total de 18.038 animais testados. Nesse estudo foi

utilizado um *kit* comercial baseado na metodologia ELISA, tendo sido a prevalência de animais positivos de 2,5% para FIV e de 2,3% para FeLV.

No Japão, um estudo de seroprevalência realizado em 1447 gatos domésticos, mostrou prevalências de 9.8% para FIV e de 2.9% para FeLV, respectivamente (Maruyama et al., 2003). Num estudo recente realizado no Irão para apurar a incidência de FIV naquele país, 10,5% de 238 felinos testados mostraram ser positivos ao agente (Mosallanejad, Shapouri, Avizeh, & Pourmahdi, 2010).

Num estudo realizado em Madrid, Espanha, foram testados 180 animais saudáveis e 115 animais com sinais clínicos que possam estar associados à infecção por retrovírus (como anorexia, depressão, febre, linfadenomegália, rinotraqueíte, infecções cutâneas generalizadas ou tumores). No grupo de animais saudáveis 15,6% eram FeLV positivos, 8,3% FIV positivos e 1,1% co-infectados. No grupo de animais com sinais clínicos foram encontrados 30,4%, 13,8% e 2,6% de animais positivos para FeLV, FIV e FIV/FeLV, respectivamente. Este estudo mostrou que a diferença da prevalência entre animais com e sem sinais clínicos da doença nesta região parece não ser tão elevada como se podia pensar, no entanto, mais importante que isso, mostrou que existe uma elevada percentagem de animais infectados e capazes de transmitir o vírus que não demonstram qualquer sintomatologia (Arjona et al., 2000).

Em Portugal, não existem muitos estudos acerca da prevalência destes agentes. Na AML, foram reportados por Duarte et al. (2010) os resultados referentes a um estudo epidemiológico realizado entre Novembro de 2003 e Julho de 2005 em 231 felídeos incluídos num programa de captura-esterilização-libertação (CEL), em que 10.2% dos animais foram positivos a FIV (17,2% no Barreiro, 15,1% em Cascais, 5,4% em Lisboa e 0% em Sintra) e 7,1% positivos a FeLV (13% em Cascais, 4,2% em Lisboa e 11,1% em Sintra). Rosado (2009), utilizando também animais errantes da AML mas acolhidos no canil municipal de Lisboa, obteve uma frequência de 18% de animais infectados com FIV e de 10% de animais com FeLV, em 50 testados.

Nos gatos pertencentes à AAAAMoita, as prevalências de ambos os vírus imunossupressores, 22% para FIV (IC95% de 12,8 - 35,2) e 10% para FeLV (IC 95% de 4,3 - 21,4), encontradas são ligeiramente superiores às reportadas por Duarte et al. (2010). Contudo, aproximam-se bastante dos resultados obtidos por Rosado (2009). Todos esses estudos foram realizados na mesma zona geográfica (AML) em populações com características relativamente semelhantes (gatos errantes), porém, a população do presente estudo é a única na qual os animais foram sujeitos a um período relativamente prolongado de confinamento, uma vez que os gatos dos programas CEL são provenientes da rua e são libertados no máximo cerca de 24 horas após intervenção cirúrgica na mesma área (salvo problemas não esperados) e que os gatos do canil municipal não permanecem por períodos prolongados nas instalações. As diferenças de prevalências entre estudos na mesma zona e

as elevadas prevalências obtidas podem portanto dever-se às características da população testada, que por estar confinada num ambiente de gatil aumenta a pressão populacional e assim a transmissão da doença (principalmente do FeLV), e ao tamanho da amostra (Rosado (2009) utilizou uma amostra com o mesmo número de animais tendo obtido resultados semelhantes). Analisando mais cuidadosamente os resultados obtidos por Duarte et al. (2010), observamos que se considerarmos apenas os animais testados apenas no Barreiro (freguesia próxima da freguesia da Moita), a prevalência então obtida para FIV foi de 17,2%, mostrando assim dados mais compatíveis com os obtidos na presente amostra. Relativamente ao FeLV não se sabe a prevalência obtida no Barreiro, pelo que não se verifica uma situação semelhante.

Podemos então afirmar que as prevalências de FIV e FeLV obtidas se enquadram no panorama que se tem vindo a observar em Portugal e na Europa. A probabilidade de estas prevalências aumentarem em ambientes em que gatos positivos co-habitam com gatos negativos não são muito elevadas desde que exista uma hierarquia bem definida e que não sejam introduzidos novos animais no grupo (Hartmann, 2006; Sellon & Hartmann, 2006; Hosie, et al., 2009; Lutz, et al., 2009). Seria por isso importante que nesta associação se conseguisse estabelecer uma população mais ou menos estável, para que a probabilidade de transmissão dos agentes seja minimizada.

### **3.1.2. Alterações clínicas e hematológicas**

Além de sinais inespecíficos que não se conseguiram apurar, as alterações mais frequentemente encontradas no exame físico de um animal FIV e/ou FeLV positivo foram a gengivite, estomatite, perda de peso e linfadenomegália (Callanan et al., 1992; Bendinelli et al. 1995; Dunham, 2006; Cohn, 2007; Kolenda et al., 2007; Levy et al., 2008; Yamamoto, 2008; Hosie et al., 2009; Costa & Norsworthy, 2011).

A estomatite, o sinal mais frequente em animais infectados com FIV e que pode ocorrer em qualquer fase de infecção (Sellon & Hartmann, 2006), foi apresentada por 63,6% (7/11) dos animais FIV positivos e mostrou ter associação estatística ( $p=0,04$ ) com a infecção pelo vírus (Figuras 8 e 9). Já a gengivite de grau superior a 2, foi apresentada apenas por 27,3% (3/11) dos animais com a infecção viral, não mostrando estar associada à presença do vírus imunossupressor.

**Figura 8 e Figura 9:** Exemplos de animais FIV positivos com estomatite grave (Original).



Tal como se observa nas Tabelas 5 e 6, a condição corporal dos animais da nossa amostra não é influenciada pela presença de FIV. A proporção de animais com condição corporal “Magro” é semelhante tanto em animais FIV positivos (9,1%), como em animais FIV negativos (10,3%). Situação semelhante ocorre no caso da linfadenomegália, que esteve presente em proporções semelhantes em animais FIV positivos (27,3%) e FIV negativos (33,7%).

Assim, podemos concluir que nos animais da nossa amostra, apenas a presença de estomatite está associada a presença de FIV. A presença de gengivite, condição corporal baixa, linfadenomegália e de outros sinais apresentados menos frequentemente (como úlceras linguais, corrimento ocular, corrimento nasal, desidratação, conjuntivite e ruído respiratório superior), estão provavelmente relacionados com a presença de outro(s) agente(s), nomeadamente o calicivírus felino, o herpesvírus felino, entre outros.

A avaliação do hemograma dos animais FIV positivos, revelou que nenhum deles apresentava anemia ou leucopénias descritas na literatura (Bendinelli et al. 1995; Dunham, 2006). Pelo contrário, houve apenas um animal que revelou alterações hematológicas, apresentando linfocitose ligeira. Os resultados da avaliação tanto do estado clínico como do perfil hematológico permite então concluir que os animais da amostra com infecção por FIV se encontram em estado de equilíbrio imunológico.

Relativamente ao FeLV, a literatura refere que os sinais clínicos manifestados pelos animais afectados passam principalmente pela presença de sinais clínicos relacionados com tumores induzidos por FeLV, síndromes de mielossupressão, imunossupressão, doenças imunomediadas, entre outros (Hartmann, 2006). Apenas a presença de estomatite teve associação estatística com a infecção por FeLV ( $p=0,04$ ). A gengivite estava presente em dois animais, mas sempre associada a estomatite grave.

O animal nº47, diagnosticado durante o estudo como FeLV positivo, vai ser referido separadamente dos outros FeLV positivos, por ser o animal que apresentou mais alterações clínicas e o único para o qual houve acesso a história clínica mais pormenorizada. Trata-se

de uma fêmea esterilizada, com cerca de oito anos de idade com história gengivo-estomatite crónica e que havia já sido submetida a extracção dentária completa. Desde há três semanas antes da data de colheita de amostras que apresentava poliúria, polidipsia, polifagia e perda de peso. No exame clínico o animal estava magro, desidratado (7%), com mau estado do pêlo, linfadenomegália generalizada e apresentava estomatite grave. O hemograma deste animal apresentava anemia ligeira, mas que estava mascarada pela marcada desidratação que apresentava, pelo que possivelmente a anemia era moderada a grave. Foi realizada ecografia, revelando aumento generalizado dos linfonodos mesentéricos, e realizada uma PAAF para realização de citologia, que revelou diagnóstico compatível com linfoma.

Dos restantes quatro animais com FeLV, todos mostravam boa condição corporal. Apenas um outro animal apresentou aumento de linfonodos (linfonodos submandibulares), mas tratava-se de um animal com gengivite grau 2 e estomatite grave, estando o aumento dos linfonodos regionais provavelmente relacionado com essa situação. A nível de hemograma, um dos animais não apresentava qualquer alteração, e os restantes revelaram policitemia ligeira, provavelmente reflexo de uma desidratação não detectada.

### **3.1.3. Influência dos factores: idade e sexo**

A literatura refere que gatos adultos (Little, 2005; Levy et al., 2006), do sexo masculino (principalmente inteiros) (Lee et al., 2002; Luria, et al., 2004; Little, 2005; Levy et al., 2006) estão mais predispostos à infecção por FIV, pois estão mais expostos ao contacto com outros animais e caracteristicamente demonstram um comportamento mais agressivo (Sellon & Hartmann, 2006). Já no caso do FeLV, a infecção ocorre normalmente em animais mais jovens, de ambos os sexos (Hartmann, 2006; Cohn, 2007; Ford, 2010).

Na amostra testada, foram realmente os animais do sexo masculino os mais afectados (6/11 no caso do FIV e 3/5 no caso do FeLV), sem que no entanto a diferença encontrada seja estatisticamente significativa. Esta distribuição quase equitativa pelos sexos, pode dever-se às características da população, pois por se tratar de uma população relativamente fixa, confinada a um espaço restrito e cuja hierarquia está bem definida, a transmissão ocorre de forma mais uniforme, sem que um dos sexos esteja mais afectado.

No que respeita às idades, há que referir que todos os animais incluídos no estudo possuíam idade superior a 1 ano, pelo que todos foram considerados adultos. A faixa etária mais afectada por FIV (proporcionalmente ao numero de animais incluídos na classe) foi a “6-7 anos” com 33,3% dos animais dessa classe afectados, estando de acordo com o que é referido na literatura. No caso do FeLV, a classe mais afectada foi a “>8anos” com 20% dos animais incluídos nessa classe positivos. No caso do FeLV, não se verificou o descrito na literatura, o que pode dever-se ao facto de não terem sido incluídos no estudos animais jovens (<1 ano) ou o facto de os animais estarem confinados alterar a distribuição do agente

pelas classes.

#### **3.1.4. Associação com outros agentes**

Com o propósito de compreender se, e de que forma, a presença de vírus imunossupressores (FIV ou FeLV) torna os animais mais susceptíveis ao desenvolvimento de infecção por outros agentes, tentou perceber-se se existe associação entre a infecção por estes vírus, e a presença dos hemoparasitas pesquisados (Tabela 8).

Apenas uma das associações que se procurou estabelecer foi estatisticamente significativa ( $p= 0,0449$ , ou seja  $<0,05$ ), mostrando que na nossa amostra a proporção de animais afectados com *M. haemofelis* é maior em animais infectados por FIV. Todas as outras associações não obtiveram significado estatístico ( $p>0,05$ ), não se conseguindo estabelecer associação entre a presença dos restantes hemoparasitas e a presença de vírus imunossupressores.

O facto de os resultados não serem estatisticamente significativas acerca do que se passa na população, pode dever-se em parte à pequena dimensão da amostra, mas também ao reduzido número de animais positivos aos restantes hemoparasitas pesquisados.

### **3.2. Ehrlichia spp./Anaplasma spp.**

#### **3.2.1. Prevalências obtidas**

No presente estudo houve amplificação de ADN de *Ehrlichia canis* e/ou *Anaplasma* spp. em 2% (IC95% de 1,0 - 10,5) dos animais testados. Uma vez que o par de *primers* utilizado foi desenhado de modo a amplificar um largo espectro de organismos dos géneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* (Gal et al., 2007), as bandas amplificadas correspondentes ao animal positivo, podem indicar uma infecção por um agente do género *Ehrlichia*, *Anaplasma*, ou de ambos os géneros em simultâneo. Idealmente, a banda obtida teria sido enviada para sequenciação genética ou teria sido feito um segundo PCR utilizando *primers* específicos para cada espécie, de forma a aferir qual ou quais as espécies presentes.

A amplificação do ADN obtida, significa que um animal da amostra, não só esteve em contacto com agentes do género *Ehrlichia* e/ou *Anaplasma*, mas também que esse agente se encontrava em circulação na altura da colheita. A maioria da literatura publicada reporta a prevalência da presença de anticorpos para *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp., dando a informação da percentagem de animais que contactaram com o agente, mas não permitindo tirar conclusões acerca da presença de infecção activa. Estudos com base em testes serológicos (IFA e ELISA) indicam que a prevalência de *A. phagocytophilum* em felinos pode variar entre 4,3% a 38% nos EUA (Magnarelli et al., 2005; Billeter et al., 2007), e entre 1,8 e 4,9 % em Espanha (Aguirre, Tesouro, Amusatogui, Rodríguez-Franco, & Sainz, 2004; Solano-Gallego et al., 2006). Relativamente à *Ehrlichia* spp. vários estudos realizados em

Espanha mostram seroprevalências que variam entre 1,8% e 17,9% (Aguirre et al., 2004; Ortuño, Gauss, García, & Gutierrez, 2005; Solano-Gallego et al., 2006). Em alguns desses estudos em que os agentes foram detectados serologicamente e foi tentada a amplificação de ADN, mas sem sucesso (Aguirre et al., 2004; Luria et al., 2004; Lappin et al., 2006; Solano-Gallego et al., 2006).

Apesar de os estudos realizados até então não serem ainda suficientes para indicar qual a importância, distribuição e prevalência/frequência com que os agentes destes géneros infectam felinos domésticos, existem já relatos de casos de animais clinicamente doentes em que foi isolado ADN compatível com o da *E. canis* e/ou em que foi observada a presença de mórulas compatíveis com a infecção por *Ehrlichia* spp. (Lappin & Breitschwert, 2006). Também o ADN de *A. phagocytophilum* já foi isolado em gatos naturalmente infectados em vários países da Europa e Estados Unidos (Bjoersdorff et al., 1999; Heikkilä et al., 2010; Schaarschmidt-Kiener, Graf, Von Loewenich & Müller, 2009; Lappin & Breitschwert, 2006). O facto de não estarem documentados estudos de prevalência baseados em técnicas moleculares (como é o caso do PCR), não nos permite fazer comparação da prevalência obtida, no entanto, o baixo valor encontrado pode dever-se ao facto de (1) em apenas alguns animais terem sido encontrados parasitas externos; (2) os principais vectores destes agentes (nomeadamente o *R. sanguineus* e o *I. ricinus*) não utilizaram normalmente o gato doméstico como hospedeiro preferencial (Dryden & Payne, 2004); (3) felinos imunocompetentes conseguem eliminar o agente por completo (Harrus, Waner, Bjöersdorff, & Shaw, 2005; Shaw, Day, Birtles, & Breitschwert, 2001).

### **3.2.2. Factores de risco**

Uma vez que se tratam de agentes ainda pouco descritos em felinos, não está estabelecida qualquer predisposição relativamente a raça ou sexo. Contudo, com base na literatura, os animais aos quais foi diagnosticada doença clínica parecem ter em comum o facto de terem idade superior a um ano, pelagem curta, acesso ao exterior e contacto com ixodídeos (Lappin, et al., 2004; Lappin & Breitschwert, 2006). O único animal positivo da presente população parece enquadrar-se nesse padrão, tratando-se de uma fêmea, esterilizada, de pêlo curto, com cerca de três anos de idade e cuja origem, vacinações e desparasitações prévias são desconhecidas.

### **3.2.3. Alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas**

A gengivite de grau 1 apresentada pelo animal positivo é considerada ligeira, não patológica, e provavelmente sem associação ao agente pesquisado. O pêlo baço e a desidratação estão possivelmente relacionados com o ambiente de gatil em que o animal habita, não sendo sinais muito exuberantes. As únicas alterações que parecem ter alguma relevância são a taquipneia e presença de ruídos respiratórios superiores e inferiores, que segundo

Lappin & Breitschwert (2006) podem estar relacionados com a infecção por *Ehrlichia* spp.. Outros sinais clínicos descritos na literatura, como alterações oculares (corrimento, hemorragias do vítreo, conjuntivite e descolamento de retina) (Lappin & Breitschwert, 2006; Billeter et al., 2007; Komnenou, et al., 2007; Heikkilä et al., 2010;), alterações neuromusculares e artropatias (Lappin & Breitschwert, 2006; Billeter et al., 2007; Heikkilä et al., 2010), não foram observados neste animal. Existem ainda outros sinais descritos para a doença como febre, anorexia, perda de peso e letargia (Lappin & Breitschwert, 2006; Sherding, 2006; Bjoersdorff, Svendenius, Owens, & Massung, 1999), cuja presença não foi possível aferir por se tratar de animais de uma associação, que não são devidamente vigiados nem habituados a manipulação.

Ao contrário do que acontece na maioria dos casos descritos de erliquiose, o animal não apresenta anemia não-regenerativa (Lappin & Breitschwert, 2006). Pelo contrário, apresenta uma policitemia moderada que pode ser reflexo da desidratação ligeira que o animal apresentava na altura do exame clínico e colheita da amostra sanguínea. A linfocitose apresentada, pode estar também relacionada com a infecção (Lappin & Breitschwert, 2006; Sherding, 2006), ou com a presença de outra condição clínica não diagnosticada.

A infecção por *Ehrlichia* está por vezes associada à infecção por outros agentes concomitantes que contribuem para o agravamento do quadro clínico do paciente (Lappin & Breitschwert, 2006). No caso do animal em questão, foi descartada serologicamente a infecção por FIV e FeLV e através do uso de PCR a infecção pelos restantes hemoparasitas incluídos no rastreio do presente trabalho. O animal encontra-se em bom estado, aparentando estar perfeitamente adaptado à presença do agente.

### **3.3. *Rickettsia* spp.**

#### **3.3.1. Prevalências obtidas**

A infecção por *Rickettsia* spp. em felinos, apesar de descrita, não é muito frequente e normalmente não está associada à presença de sinais clínicos, mas sim a uma infecção transitória com um período de bacteriemia de curta duração (Beugnet & Marie, 2009; Kamrani et al., 2008).

Existem estudos em que o contacto de felinos com elementos do género *Rickettsia* foi já demonstrado, tendo sido detectada a presença de anticorpos anti-*Rickettsia felis*, *typhi*, e *conorii* (Matthewman et al., 1997; Sorvillo, et al., 1993; Breitschwert et al., 2005; Case et al., 2006; Kamrani et al., 2008; Alves et al., 2009; Bayliss, et al., 2009). No entanto, a amplificação de ADN de *Rickettsia* spp. foi conseguida apenas por Wedincamp & Foil (2000), através da exposição de gatos nunca antes parasitados com pulgas, a estes vectores infectados por *R. felis*. Nesse estudo, cinco dos 16 animais apresentaram

transitoriamente amplificação do ADN do agente.

Vários outros estudos tentaram a amplificação de ADN de *Rickettsia* spp., mesmo em animais que habitavam em ambientes em que 18% a 67,4% das pulgas estavam infectadas com *R. felis* (Hawley, Shaw, & Lappin, 2007; Kamrani, Parreira, Greenwood, & Prescott, 2008), no entanto não obtiveram qualquer sucesso. Segundo Bayliss et al. (2008), a dificuldade de amplificação de ADN de *Rickettsia* spp. em felinos, deve-se provavelmente ao desenvolvimento por parte do hospedeiro de uma resposta imunitária rápida e eficaz, capaz de eliminar o agente da circulação. Segundo estes autores, esta hipótese é suportada pelo facto de existirem animais com resultados positivos em serologia, mas cuja amplificação por PCR não tem sucesso. Hawley et al. (2007), consideram que a incapacidade de detecção deste agente por PCR pode dever-se ao facto de a quantidade de agente em circulação estar abaixo do limiar de detecção da técnica, ou ao facto de esta infecção ser caracterizada por bacteriémias transitórias, dificultando a probabilidade de detecção.

No *real-time* PCR efectuado às 50 amostras dos animais em estudo, houve amplificação de oito bandas ténues, cujo peso molecular é compatível com o peso molecular da banda do controlo positivo, correspondendo provavelmente, a infecção pelo agente nestes animais (Figura 5). Uma vez que se trata de uma infecção pouco descrita em felinos, teria sido interessante explorar um pouco mais os resultados obtidos de forma a conseguir a confirmação do diagnóstico e eventual determinação da espécie de *Rickettsia* infectante. Tal poderia ter sido feito enviando a banda formada para sequenciação genética ou fazendo pesquisa do agente utilizando uma técnica mais sensível como o *real-time* PCR. Por razões económicas e logísticas tal não foi possível.

### **3.3.2. Alterações clínicas e hematológicas**

Pelo que a autora conseguiu apurar, não foi até agora reportado nenhum caso de doença clínica associada à presença de ADN de *Rickettsia* spp. em felinos. Num estudo realizado por Breitschwerdt et al. (2005), em que 93/436 (21%) gatos possuíam anticorpos contra *R. typhi*, os achados mais frequentes foram a linfadenopatia, história de convulsões e outras alterações neurológicas.

Em nenhum dos oito animais da AAAAMoita suspeitos de infecção por *Rickettsia* spp., foram detectadas alterações neurológicas, contudo um animal apresentava linfadenomegália generalizada e três apresentavam pelo menos um grupo de linfonodos (sub-mandibulares, retrofaríngeos ou poplíteos) aumentados. No entanto não foi possível estabelecer associação estatística entre a presença do agente e o aumento dos linfonodos ( $p > 0,05$ ). Procurou-se ainda a existência de associação entre a presença do agente e os sinais clínicos demonstrados com mais frequência pelos animais suspeitos (corrimento ocular, conjuntivite e corrimento nasal), mas nenhuma associação foi estatisticamente significativa,

devendo-se a presença desses sinais, provavelmente à presença de outros agentes ou condições clínicas inerentes à habitação em gatil e não descartadas neste estudo. Também as alterações do perfil hematológico encontradas com mais frequência (aumento do HCT e diminuição da concentração de hemoglobina corpuscular média - CHCM), não foram relevantes e provavelmente não possuem relação com a presença do agente. De referir ainda que dos oito animais suspeitos, um era portador de FIV e outro de FeLV, mas apenas o animal FeLV positivo possuía alterações clínicas provavelmente relacionadas com o desenvolvimento de linfoma secundário à infecção retroviral.

O papel dos mamíferos, que frequentemente são infectados por *C. felis* (como gatos, cães, roedores e ouriços) como reservatórios do agente e a sua importância no ciclo de vida e circulação da *R. felis* permanece ainda desconhecido (Beugnet & Marie, 2009; Breitschwerd et al., 2005), pelo que são necessários mais estudos para que esse papel seja apurado.

O facto de as pulgas de gato (*C. felis*) serem importantes hospedeiros e vectores destes agentes, torna o gato num intermediário importante para que a doença ocorra em seres humanos (Azad et al., 1997). Os animais incluídos na nossa amostra apesar de fazerem desparasitação externa, não cumprem rigorosamente os intervalos de administração, além de que, por dificuldades de maneo, as instalações não são sujeitas a frequentes e adequados vazios sanitários, tornando-se um ambiente adequado ao desenvolvimento dos vectores e transmissão de doenças por eles veiculadas.

### **3.4. *M. haemofelis***

#### **3.4.1. Prevalências obtidas**

A detecção de *M. haemofelis* foi feita através de *real-time* PCR. Esta técnica, por usar uma sonda específica para a espécie que se pretende amplificar, e é altamente específica na detecção deste agente, (Willi et al. 2007). O *real-time* PCR tem como vantagens relativamente ao PCR convencional o facto de possibilitar a diferenciação inequívoca entre os três hemoplasmas felinos conhecidos (Tasker et al., 2003; Willi et al., 2006) e de permitir fazer a quantificação do ADN do hemoplasma, importante na monitorização clínica do animal afectado (Willi et al. 2007). Estudos realizados com base em PCR convencional (PCRc) e *real-time* PCR, em várias regiões dos Estados Unidos mostram que a prevalência de animais infectados difere consoante a região em que o estudo é realizado, mas também consoante o grupo alvo do estudo (por exemplo, doentes/não doentes; animais domésticos/de rua). Jensen et al. (2001) formou dois grupos de animais (grupo controlo e grupo de animais suspeitos) onde pesquisou, através de PCRc, a presença de *Haemobartonella*, actualmente designada de *M. haemofelis*. Nenhum dos animais do grupo controlo foi positivo, e em 28% dos animais suspeitos foi confirmada a infecção. Em 2008, Kamrani et al., utilizando PCRc procuraram a prevalência do agente em felinos domésticos e

felinos de rua, tendo obtido como resultados 0,7% e 46,6%, respectivamente para os dois grupos. Lappin et al. (2006) procuraram através de PCRc, determinar em animais domésticos infestados por pulgas levados à consulta, a prevalência do agente, tendo obtido como resultado uma prevalência de 7,6%. Luria et al. (2004) mostraram que foi possível fazer amplificação de ADN do agente em 8,3% dos gatos de rua. Estudos mais recentes, mas também nos Estados Unidos, utilizando o *real-time* PCR para amplificação do agente, demonstraram a presença de 4,8% dos felinos infectados (Sykes et al., 2008).

Na Europa, existem também estudos em que o *real-time* foi utilizado para amplificação do ADN de *M. haemofelis*, sendo as prevalências obtidas de 1,5% na Suíça (Willy et al., 2006), 5.9% em Itália (Gentilini et al., 2009) e 1,6% no Reino Unido (Willy et al., 2007a). A prevalência observada no presente estudo (4% com IC 95% = 0,1-13%) é portanto similar à que se encontra nos estudos anteriormente descritos na Europa, sendo que as diferenças encontradas se devem provavelmente às diferentes características dos grupos em estudo, nomeadamente no que respeita ao estilo de vida, área geográfica em que se inserem e contacto com os vectores.

#### **3.4.2. Associação com outros agentes**

Ambos os animais em que houve amplificação de ADN na amostra em estudo, estão incluídos no grupo de risco ao desenvolvimento da infecção, uma vez que são do sexo masculino e a sua proveniência, vacinações e desparasitações prévias são desconhecidas (Grindem, Corbett & Tomkins, 1990; Jensen et al. 2001; Luria et al., 2004; Harvey, 2006). Além disso, ambos os animais estão infectados com FIV, uma associação que está já descrita como factor predisponente à infecção por *M. haemofelis* (Luria et al., 2004; Harvey, 2006; Macieira et al., 2007; Sykes et al., 2008), e que no presente estudo parece ter significado estatístico ( $p= 0,0445$ ). Um dos animais positivos, além de infectado com FIV, era também seropositivo para FeLV, uma associação também descrita na literatura (Luria et al., 2004; Harvey, 2006; Macieira et al., 2007; Sykes et al., 2008), mas que no presente estudo não teve associação estatística, provavelmente devido ao reduzido tamanho da amostra e baixo número de animais positivos.

#### **3.4.3. Alterações clínicas e hematológicas**

Segundo a literatura consultada, apesar de a infecção por FIV estar associada ao aumento do risco de infecção por *M. haemofelis* (Luria et al. 2004; Macieira et al., 2007; Sykes et al., 2008), parece não estar associada ao agravamento da anemia e sinais clínicos que este agente desencadeia (Harvey, 2006). Por sua vez, animais com infecção mista por FeLV e *M. haemofelis* parecem ter um agravamento da anemia e dos sinais clínicos, quando comparados com animais afectados apenas por *M. haemofelis* (Harrus et al., 2002; Harvey, 2006; George et al., 2002). Nenhum dos animais positivos da amostra apresentavam

alterações do perfil sanguíneo e os sinais clínicos por eles exibidos (conjuntivite com corrimento ocular seroso e gengivite ligeira com estomatite grave), não se encontram descritos na literatura como tendo relação com a infecção por *M. haemofelis*. O facto de os animais em questão viverem em ambiente de gatil, onde o maneio diário e clínico não é feito de uma forma ideal, não permitiu obter informação acerca da presença de sinais clínicos inespecíficos descritos para a doença, nomeadamente depressão, inapetência, anorexia e perda de peso (Sykes, 2010). Ainda assim, o exame clínico permitiu observar que os animais afectados possuíam condição corporal acima da média desejada (ambos obesos), sem indício de desidratação e em estado de alerta. Segundo Willi et al. (2007a), a ausência de sinais clínicos, mesmo na presença de elevadas cargas sanguíneas de *M. haemofelis*, é possível e deve-se a susceptibilidades individuais dos felinos à infecção por este hemoplasma. A infecção por *M. haemofelis* nos animais do presente estudo parece então ser assintomática, podendo os sinais clínicos apresentados estar relacionados com a presença de outros agentes e/ou condições clínicas desconhecidas. A ausência de quaisquer alterações hematológicas nestes animais vem suportar esta teoria de que os animais se encontram em estado de equilíbrio com os agentes com os quais estão infectados.

### **3.5. *L. infantum***

#### **3.5.1. Prevalências**

A AML, na qual a AAAAMoita está inserida, é uma zona endémica de Leishmaniose canina (LCan) (OnLeish, 2011). Em 2003, um estudo realizado em 374 canídeos (277 domésticos e 97 de rua), residentes nas zonas urbanas de Lisboa, mostrou utilizando IFI (1:64), a presença de anticorpos em 19,2% dos animais (Cortes, Afonso, Alves-Pires & Campino, 2007), contrastando com a prevalência de 5,5% obtida por Abranches et al. (1983) na década de 1980 utilizando métodos de diagnóstico semelhantes (Abranches et al., 1983, citado por Cortes et al., 2007).

Nos últimos anos, o aumento do número de casos reportados de LFel tem levantado questões acerca da importância dos felinos na epidemiologia da doença. Ao que parece, os felinos além de hospedeiros acidentais, podem também actuar como hospedeiros reservatório em áreas endémicas (Martín-Sánchez et al., 2007), e ser fonte de infecção para os vectores (Maroli et al., 2007). O facto de as preferências de alimentação dos flebótomos incluírem, além da espécie canina, a espécie felina (Pennisi, 2002), torna os animais que residam em zonas endémicas de LVH e LCan, principalmente os que têm acesso ao exterior ou habitem em gatis abertos, mais expostos à picada do flebótomo, e portanto à possível infecção por *Leishmania* (Pennisi, 2002). A AAAAMoita, além de se situar numa área endémica de leishmaniose, localiza-se numa área geográfica ideal ao desenvolvimento de

vectores. Além disso, vários canídeos pertencentes à própria associação foram já diagnosticados com leishmaniose, pelo que faz sentido a pesquisa deste agente nos felinos da população em estudo.

Estudos epidemiológicos baseados em serologia indicam prevalências para este agente de 0,9% (Poli et al., 2002), 16,3% (Vita et al., 2005) e 61-68% (Pennisi et al., 2002) em Itália e de 3,9% (Diakou et al., 2009) na Grécia. Em Portugal foram também já realizados vários estudos de epidemiológicos de *L. infantum* em felinos. Vaz et al. (2005), Faria et al. (2008) e Duarte et al. (2010) recorreram a testes serológicos (IFI) para estudar a frequência de infecção em gatos na AML, tendo obtido como resultados prevalências de 1,03%, 0% e 0,6%, respectivamente. Cardoso et al. (2010) realizaram também um estudo de seroprevalência no norte de Portugal, tendo obtido uma prevalência de 2,8%. Para o diagnóstico de LCan, mesmo durante as fases iniciais da doença, os testes serológicos são os métodos de detecção mais indicados, uma vez que nestes animais, a presença de altos títulos de anticorpos são indicativos de infecção activa e consequente elevada probabilidade de transmissão do protozoário ao vector (Quinnell et al., 2003). No entanto, em felinos, isto parece não acontecer, pois a presença de ADN do protozoário pode não estar relacionada com a quantidade de anticorpos específicos presentes em circulação e detectáveis por IFI (Martín-Sánchez et al., 2007; Simões-Mattos et al., 2005). Na realidade, os títulos de anticorpos em felinos afectados parecem ser menores do que em canídeos afectados (Mancianti, 2004). Solano-Gallego et al. (2007), afirmam que a baixa produção de anticorpos nos animais desta espécie, relativamente aos canídeos, se deve ao facto de a manifestação clínica mais comum da LFel ser cutânea e não visceral. Mancianti (2004), afirma que aparentemente os felinos possuem um elevado grau de resistência natural à infecção por este protozoário, que provavelmente não está relacionada apenas com imunidade celular, mas também com factores genéticos.

Segundo Simões-Mattos et al. (2005), uma vez que a presença de anticorpos anti-*Leishmania* em felinos infectados é baixa ou inexistente, mesmo em animais com lesões cutâneas activas, o diagnóstico desta doença não deve ser baseado em técnicas serológicas por si só, uma vez que podem levar a falhas no diagnóstico etiológico, aumentando a probabilidade de transmissão do parasita ao vector e consequente disseminação do agente para outros hospedeiros vertebrados.

Existem no entanto diversos estudos que indicam que as prevalências obtidas são superiores quando se utiliza serologia relativamente ao PCR efectuado em sangue periférico (Martín-Sánchez et al., 2007; Cardoso et al., 2010). Idealmente, devem utilizar-se técnicas moleculares associadas a técnicas serológicas em sangue total periférico (Cardoso et al., 2010) ou PCR em amostras obtidas por punção de lesões cutâneas, medula óssea ou linfonodos (Boari et al., 2005, citado por Venet, 2007).

No presente trabalho a pesquisa de *L. infantum*, foi realizada através de *real-time* PCR em

sangue total periférico, tendo ocorrido detecção do ADN do agente em apenas um animal testado (2% com IC95% de 0,1 - 10,5%). Esta prevalência é bastante inferior à encontrada no estudo realizado entre Janeiro de 2007 e Agosto de 2008 por Maia et al. (2010), na mesma região (AML) e com o mesmo método de diagnóstico, em que no total foi detectado ADN do parasita em 19,7% dos 142 felinos testados (17/92 entre Outubro e Maio, período de transmissão da *Leishmania* em Portugal e 11/50 entre Junho e Setembro, período de não transmissão da *Leishmania* em Portugal). De referir que nesse estudo apenas uma pequena parte dos animais eram gatos de rua (12/142), sendo que a maioria eram animais que se apresentavam a consulta em várias clínicas veterinárias da região, aos quais foi colhido sangue para despiste de doenças metabólicas, *check-up* ou análises pré cirúrgicas. Não seria de esperar que a diferença entre as prevalências fosse tão elevada, uma vez que, a população do presente estudo, dadas as suas características, seria à partida um grupo de risco superior. No entanto essa diferença pode dever-se a vários factores. No presente estudo a colheita de amostras foi realizada em apenas 50 felinos e em apenas dez dias, fora do período de transmissão de *Leishmania*, ao contrário do que se passou no estudo de Maia, et al. (2010), que foi realizado ao longo de 15 meses em 142 felinos abrangendo o período de transmissão de *Leishmania*. Além disso a característica das populações em estudo não eram as mesmas. Enquanto a totalidade da amostra em estudo deste trabalho era constituída por animais errantes que habitavam numa associação particular de uma zona específica da AML (Moita), a maioria dos animais testados por Maia, et al. (2010), pertenciam a particulares e eram provenientes de várias zonas da AML, nomeadamente Lisboa, Loures, Sintra e Setúbal.

Idealmente, para apurar uma prevalência deste agente na população, mais próxima da real, deveria ter sido utilizado como material biológico uma amostra de pele, linfonodos ou medula óssea, o que não foi efectuado por questões de bem-estar animal e contenção de custos. No entanto, este trabalho mostrou que é essencial a realização de mais estudos epidemiológicos que permitam apurar a distribuição, prevalência e incidência da LFel, bem como saber qual a real importância dos felinos domésticos no ciclo biológico da *L. infantum*. Só assim poderão ser delineadas medidas de controlo da infecção em gatos, cães e mesmo humanos.

### **3.5.2. Alterações clínicas e laboratoriais**

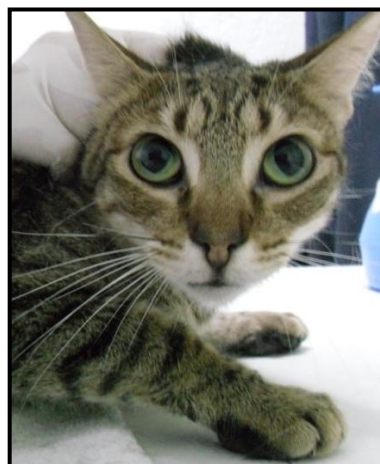
Na maioria dos casos descritos, os gatos positivos para *Leishmania* spp., na ausência de infecções concomitantes não apresentam quaisquer sinais clínicos (Campino, 2002; Maia & Campino, 2011). Quando presentes, os sinais clínicos cutâneos são os mais frequentes (Pennisi, 2002; Poli, et al., 2002; Mancianti, 2004; Gramiccia, 2011), localizando-se principalmente na zona da cabeça (Hervás, de Lara, Pellicer, & Carrasco, 1999; Pennisi, 2002), tal como exemplificado na Figura 10. O único animal da amostra testada que revelou

presença de ADN deste protozoário não se encontrava infectado por mais nenhum dos agentes testados, e não apresentava qualquer sintomatologia cutânea, ocular ou sistémica compatível com a infecção por *Leishmania* (Figura 11). A única alteração presente no hemograma (linfocitose ligeira) pode estar relacionada com a presença de LFel, no entanto, o facto de não terem sido descartados outros agentes, não permite que tal associação seja estabelecida. O caso deste animal assintomático levanta a suspeita que possam existir muitos felinos portadores assintomáticos de infecção, mas capazes de transmitir o protozoário aos vectores e de contribuírem assim para a disseminação da doença.

**Figura 10** Felino diagnosticado com leishmaniose, manifestando sinais clínicos (fotografia gentilmente cedida por Dr<sup>a</sup> Ana Sanches).



**Figura 11** Felino da AAAAMoita em que houve amplificação de ADN de *L. infantum*, não manifestando qualquer sinal clínico (Original).



### **3.6. Animais não infectados por nenhum dos agentes**

Em 56% dos animais incluídos no estudo, não foi detectada a presença de nenhum dos agentes testados. A escolha de pesquisar a presença de retrovírus baseou-se no facto de estes serem vírus de distribuição mundial, de elevada importância em medicina felina e que podem comprometer a acção de adopção. Por sua vez, a pesquisa de hemoparasitas foi ponderada por a amostra ser constituída exclusivamente por animais de gatil não sujeitos a programas de desparasitação rigorosos, que estão alojados numa associação que alberga também cerca de 90 canídeos (que tal como os felinos, não realizam desparasitação externa com a regularidade desejada), alguns deles com história de infecção por hemoparasitas (nomeadamente *L. infantum*).

Por dificuldades de logística, apenas em alguns casos é realizada quarentena e testagem para retrovírus aquando da entrada de um novo animal no gatil. Além disso a desparasitação externa e vazios sanitários regulares não são efectuados. No entanto, as instalações dos gatis e canis são higienizadas diariamente (incluindo superfícies, comedouros, bebedouros e liteiras) e as camas e mantas são lavadas a elevadas temperaturas com frequência. Estas medidas parecem ser suficientemente eficazes na manutenção da população do gatil livre de infestações por ectoparasitas, uma vez que no exame físico realizado, em apenas alguns animais de um dos gatis se encontraram pulgas.

O facto de mais de 50% dos animais testados não estarem infectados com nenhum dos agentes pesquisados, parece portanto dever-se aos cuidados de higiene praticados na associação.

### **4. Considerações finais**

As limitações à realização do presente trabalho prenderam-se principalmente com questões económicas e de manuseio dos animais. O facto de os animais da população pertencerem a uma associação particular em que estão acompanhados apenas parte do dia (cerca de três horas) por uma única pessoa, não permitiu obter uma história pregressa e anamnese adequadas de cada animal, que seria importante relacionar com a presença/ausência dos agentes pesquisados. Além disso, o facto de muitos dos animais não estarem habituados à manipulação humana não permitiu a determinação da temperatura rectal e de outros sinais inespecíficos que poderiam ter alguma relevância.

Este estudo teve o apoio financeiro da Virbac e do CIISA, sem o qual não poderia ter sido realizado. Contudo, se não existissem limitações financeiras, teria sido interessante alargar o estudo a um número superior de animais ou aprofundá-lo fazendo sequenciação genética das bandas obtidas no cPCR de *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp. (com o fim de conhecer qual o género e espécie presente) e de *Rickettsia* spp. (para que a presença do agente fosse confirmada e eventualmente identificada a espécie detectada). Apesar das referidas limitações, o presente estudo contribuiu para uma melhoria do conhecimento acerca dos

agentes que afectam ou podem afectar os felinos, particularmente os felinos da AAAAMoita. Permitiu ainda, determinar a ocorrência de associação estatística entre a infecção por FIV e a manifestação de estomatite ou de infecção por *M. haemofelis*.

De referir ainda, que independentemente da sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnóstico utilizados e dos erros laboratoriais que possam ter ocorrido, existem outros factores que podem alterar as prevalências obtidas. Tanto no caso dos retrovírus como no caso dos hemoparasitas, o facto de este ser um estudo transversal, de colheita única e com um período de colheita de apenas dez dias, pode falsear os resultados, pois alguns dos animais negativos podem estar infectados mas encontrar-se num estadio de infecção não detectável pelos métodos de diagnóstico utilizados (quantidade de agente abaixo do limiar de detecção; fase de infecção latente no caso do FeLV; fases iniciais de infecção, ou fases terminais no caso do FIV). Também o material biológico em que é efectuada a pesquisa tem influência. Por exemplo, no caso da *Leishmania* spp. o sangue não é o melhor local de pesquisa, no entanto por questões de bem-estar animal e económicas foi o material biológico possível de ser recolhido.

O facto de não existirem muitos estudos epidemiológicos acerca da prevalência de hemoparasitas em felinos, não nos permite fazer a comparação dos resultados obtidos. Contudo, o presente trabalho permitiu demonstrar que os felinos podem ser infectados e actuar como hospedeiros reservatório silenciosos de hemoparasitas que afectam frequentemente os canídeos. Fica por determinar se as baixas prevalências obtidas se devem ao facto de as prevalências serem realmente baixas em Portugal (mais concretamente na AML), se estão relacionadas com as boas práticas de manejo aplicadas (higienização diária e lavagem de camas) ou com as limitações inerentes ao estudo.

As prevalências de FIV e FeLV obtidas, são equiparadas às encontradas em outros países da Europa e em outros estudos realizados na AML. Na maioria dos felinos positivos não foi detectada sintomatologia exuberante, confirmando que estes, mesmo na presença de infecção se podem manter clinicamente saudáveis. Assim, a presença de retrovírus não deve ser encarada como sentença de morte para o animal, mas apenas como um factor que os torna mais susceptíveis ao desenvolvimento de outras doenças. Uma vez que neste caso específico se trata de animais de uma associação, seria interessante implementar na AAAAMoita algumas medidas com o fim de impedir o aumento da prevalência destes e de outros agentes, tais como: (1) realizar vazios sanitários frequentes; (2) realizar quarentena a todos os novos animais que cheguem à associação; (3) fazer separação de animais saudáveis e doentes; (4) ponderar a separação de animais FIV/FeLV positivos com devida testagem antes de da integração dos gatis de grupo.

Em ambiente de gatil pode tornar-se complicado, senão impossível, manter todos os animais em perfeito estado hígido. Contudo é essencial implementar medidas que permitam e redução de transmissão de doenças infecciosas importantes em medicina felina (como é o

caso do FIV, FeLV e *M. haemofelis*) e de agentes infecciosos com potencial zoonótico (como é o caso da *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., e *L.infantum*). O objectivo primordial deve ser o de tornar o acto de adopção possível respeitando o conceito de *One Health*, de forma a promover o bem estar humano, animal e do ambiente.

Uma vez que não se sabe ainda qual o papel dos felinos na epidemiologia de parte das doenças zoonóticas aqui descritas, mais estudos são necessários para que esse papel possa ser determinado. Só assim será possível desenvolver estratégias eficazes à sua prevenção.

De uma forma geral, é importante fazer desde já a adequada sensibilização dos profissionais de saúde, médicos veterinários e proprietários dos animais domésticos acerca do carácter zoonótico destes agentes e da importância de manter os animais livres de infestações por ectoparasitas.

## BIBLIOGRAFIA

- Aguirre, E., Tesouro, M., Amusatogui, I., Rodríguez-Franco, F. & Sainz, A. (2004). Assessment of feline ehrlichiosis in central Spain using serology and a polymerase chain reaction technique [Abstract]. *Annals of the New York Academy of Sciences* , 1026,103-105.
- Alleman, A.R., Pate, M.G., Harvey, J.W., Gaskin, J.M., & Barbet, A.F. (1999). Western immunoblot analysis of the antigens of haemobartonella felis with sera from experimentally infected cats. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(5),1474–1479.
- Alves, A., Milhano, N., Santos-Silva, M., Santos, A., Vilhena, M. & de Sousa, R. (2009). Evidence of bartonella spp., rickettsia spp. and anaplasma phagocytophilum in domestic, shelter and stray cat blood and fleas, portugal. *Clinical Microbiology and Infection* , 15(2), 1-3.
- Arai, M., Darman, J., Lewis, A. & Yamamoto, J. K. (2000). The use of human hematopoietic growth factors (rhGM-CSF and rhEPO) as a supportive therapy for FIV-infected cats. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 77(1-2), 71-92.
- Arai, M., Earl, D. & Yamamoto, J.K. (2002). Is AZT/3TC therapy effective against FIV infection or immunopathogenesis?. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 85(3-4), 189-204.
- Arjona, A., Barquero, N., Domeénech, A., Tejerizo, G., Collado, V.M., Toural, C., Martín, D., Gomez-Lucia, E. (2007). Evaluation of a novel nested PCR for the routine diagnosis of feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV). *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 9,14-22.
- Arjona, A., Escolar, E., Soto, I., Barquero, N., Martin, D., & Gomez-Lucia, E. (2000). Seroepidemiological survey of infection by feline leukemia virus and Immunodeficiency virus in Madrid and correlation with some clinical aspects. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9), 3448–3449.
- Azad, A.F. & Beard, C.B. (1998). Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerging Infectious Diseases*, 4(2),179-186.
- Azad, A.F., Radulovic, S., Higgins, J.A., Noden, B.H. & Troyer, J.M. (1997). Flea-borne rickettsioses: Ecologic considerations. *Emerging Infectious Diseases*, 3(3), 319-327.
- Azad, A.F., Sacci, J.B., Nelson, W M., Dasch, G.A., Schmidtman, E.T., & Carl, M. (1992). Genetic characterization and transovarial transmission of a typhus-like rickettsia found in cat fleas. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 89(1), 43-46.
- Baneth, G. Koutinas, A., Solano-Gallego, L.B. & Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, 24(7), 324-330.
- Barker, E., Helps, C., Heesom, K., Arthur, C., Peters, I., Hofmann-Lehmann, R., Tasker, S. (2010). Detection of humoral response using a recombinant heat shock protein 70, DnaK, of mycoplasma haemofelis in experimentally and naturally hemoplasma-infected cats. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(12), 1926–1932.

- Bates, P.A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37, 1097–1106.
- Bates, P. & Rogers, M. (2004). New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania* [Abstract]. *Current Molecular Medicine*, 4(6), 601–609.
- Bayliss, D.B., Morris, A., Horta, M.C., Labruna, M.B., Radecki, S.V., Hawley, J.R., Brewer, M.M., Lappin, M.R. (2009). Prevalence of Rickettsia species antibodies and Rickettsia species DNA in the blood of cats with and without fever. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11(4), 266-70.
- Bandinelli, M., Pistello, M., Lombardi, S., Poli, A., Garzelli, C., Matteucci, D., Ceccherini-Nelli, L.; Malvaldi, G., Tozzini, F. (1995). Feline Immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(1), 87-112.
- Baneth, B. (2006). Leishmaniases. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of Dog and Cat* (3rd. ed.). (685-689). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Berent, L., Messick, J.B. & Cooper, S.K. (1998). Detection of Haemobartonella felis in cats with experimentally induced acute and chronic infections, using a polymerase chain reaction assay [Abstract]. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 59(10), 1215-1220.
- Bettini, S., Pozio, E. & Gradoni, L. (1980). Leishmaniasis in Tuscany (Italy). Part II, leishmania from wild rodentia and carnivore in a human and canine leishmaniasis focus [Abstract]. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74 (1), pp. 77-83.
- Beugnet, F. & Marie, J.-L. (2009). Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe Frederic. *Veterinary Parasitology*, 163(4), 298-305.
- Bienzle, D., Reggeti, F., Wen, X., Little, S., Hobson, J., & Kruth, S. (2004). The variability of serological and molecular diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. *The Canadian Veterinary Journal*, 45, 753-757.
- Billeter, S.A., Spencer, J.A., Griffin, B., Dykstra, C.C. & Blagburn, B.L. (2007). Prevalence of Anaplasma phagocytophilum in domestic felines in the United States. *Veterinary Parasitology*, 147,194–198.
- Bitam, I., Dittmar, K., Parola, P., Whiting, M., & Raoult, D. (2010). Fleas and flea-borne diseases. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(8), 667-676.
- Bitam, I., Parola, P., de la Cruz, K.D., Matsumoto, K.,B., Rolain, J.-M., Belkaid, M. & Raoult, D. (2006). First molecular detection of Rickettsia felis in fleas from Algeria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(4), 532–535.
- Bjoersdorff, 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 [Abstract]. *Journal of Small Animal Practice*, 40(1), 20-24.
- Bonfante-Garrido, R., Valdivia, O., Torrealba, J., García, M.T., Garófalo, M.M., Urdanete, R., Alvarado, J., Copulillo, E., Momen, H., Jr., G.G. (1996). Cutaneous leishmaniasis in cats

(felis domesticus) caused by *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*. *Revista Científica FCV- LUZ*, 6, 187-190.

- Branger, S., Rolain, J.M. & Raoult, D. (2004). Evaluation of antibiotic susceptibilities of Ehrlichia canis, Ehrlichia chaffeensis, and Anaplasma phagocytophilum by real-time PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(12), 4822-4828.
- Breitschwerdt, E.B., Levine, J.F., Radulovic, S., Hanby, S.B., Kordick, D.L. & La Perle, K.M. (2005). Bartonella henselae and Rickettsia Seroreactivity in a sick cat population from North Carolina. *Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 3(4), 287-302.
- Campino, L. (2002). Canine reservoirs and leishmaniasis: epidemiology and disease. In J. P. Farrel (Ed.), *World Class Parasites, Leishmania* (pp. 45-57). Boston, London: Kluwer Academic Publishers.
- Campino, L. & Maia, C. (2010). Epidemiologia das leishmanioses em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 23(5), 859-864.
- Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, J.A., Santos-Gomes, G., Alves-Pires, C., et al. (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., 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, 37– 42.
- Cardoso, L., Santos, H., Cordeiro-da-Silva, A., Pratlong, F., Dedet, J.-P. & Rodrigues, M. (2002). Leishmania infantum MON-98: infection in a dog from Alto Douro, Portugal [Abstract]. *Acta Tropica*, 83(1), 83-85.
- Case, J., Chomel, B., Nicholson, W. & Foley, J. (2006). Serological survey of vector-borne zoonotic pathogens in pet cats and cats from animal shelters and feral colonies. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 8(2), 111-117.
- Castro, M.B., Machado, R.Z., Aquino, L.P., Alessi, A.C., & Costa, M.T. (2004). Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Veterinary Parasitology*, 119, 73–86.
- Cheng, H., Anderson, M. & Overbaugh, J. (2007). Feline leukemia virus T entry is dependent on both expression levels and specific interactions between cofactor and receptor. *Virology*, 359(1), 170-178.
- Cohn, L.A. (2007b). Update on feline retroviral infections. *International Congress of the Italian Association of Companion Animal Veterinarians*, (pp. 22-23). Rimini, Italy.
- Cohn, L.A. (2006). Update on serologic testing for infectious disease in cats. *International Congress of the Italian Association of Companion Animal Veterinarians*, (pp. 19-21) Rimini, Italy.

- Cohn, L.A. (2007). Update on serologic testing for infectious disease in cats. International Congress of the Italian Association of Companion Animal Veterinarians , (pp. 19-21). Rimini, Italy.
- Colitz, C.M. (2005). Feline Uveitis: Diagnosis and treatment. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 20 (2), 117-120.
- Collado, V., Gómez-Lucía, E., Tejerizo, G., Miró, G., Escolar, E., Martín, S., Doménech, A. (2007). Effect of type I interferons on the expression of feline leukaemia virus. *Veterinary Microbiology*, 123,180–186.
- Cortes, S., Afonso, M.O., Alves-Pires, C., & Campino, L. (2007). Stray dogs and leishmaniasis in urban areas, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 13(9), 1431–1432.
- Costa, F., & Norsworthy, G. (2011). Feline Leukemia Virus Diseases. In G. Norsworthy, M. Crystal, S. Grace, & T. L.P., *Feline Patient* (pp. 184-186). Iowa: Blackwell Publishing Ltd.
- 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 endêmica para leishmaniose visceral. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 47(3), 213-217.
- Costa-Durão, J., Rebelo, E., Peleteiro, M., Correia J. & Simões, G. (1994). Primeiro caso de leishmaniose em gato doméstico (*Felis Catus Domesticus*): Nota Preliminar, *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, Volume 89, n.º 551, Julho/Setembro 1994, 140-144.
- Coutinho, M.T., Bueno, L.L., Sterzik, A., Fujiwara, R.T., Botelho, J.R., Maria, M., Genaro, O. & Linardi, P.M. (2005). Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 128, 149–155.
- Crawford, P.C. & Levy, J.K. (2007). New challenges for the diagnosis of feline Immunodeficiency virus infection. *Veterinary Clinics Small Animal Practice*, 37, 335-350.
- Dantas-Torres, F., de Brito, M. & Brandão-Filho, S. (2006). Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Veterinary Parasitology*, 140(1-2), 54-60.
- Davoust, B., Marié, J.L., Mercier, S., Boni, M., Vandeweghe, A., Parzy, D. & Beugnet, F. (2003). Assay of fipronil efficacy to prevent canine monocytic ehrlichiosis in endemic areas. *Parasitology, Veterinary*, 112, 91-100.
- de Mari, K., Maynard, L., Sanquer, A., Lebreux, B. & Eun, H.M. (2004). Therapeutic effects of recombinant feline interferon-omega on feline leukemia virus (FeLV)-infected and FeLV/feline immunodeficiency virus (FIV)-coinfected symptomatic cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18(4), 477-482.
- Diakou, A., Papadopoulos, E. & Lazarides, K. (2009). Specific anti-*Leishmania* spp. antibodies in stray cats in Greece. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11, 728-730.

- Diniz, S.A., Silva, F.L., Neta, A.V., Bueno, R., Guerra, R., Abreu-Silva, A.L. & Santos, R.L. (2008). Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 2(1), 24-33.
- Donovan, R.M. (1999). *Retroviridae*. In D.C. Hirsh & Y.C. Zee (Eds.), *Microbiologia Veterinária*, (pp. 411-417). Oxford: Blackwell Science.
- Dowers, K.L., Tasker, S., Radecki, S.V., & Lappin, M.R. (2009). Use of pradofloxacin to treat experimentally induced *Mycoplasma haemofelis* infection in cats. *American Journal of Veterinary Research*, 70(1), 105-111.
- Dryden, M.W., & Payne, P.A. (2004). Biology and control of ticks infesting dogs and cats in North America. *Veterinary Therapeutics*, 5(2), 139-154.
- 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, 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, 2145–2165.
- Dunham, S.P. (2006). Lessons from the cat: development of vaccines against lentiviruses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 112(1-2), 67-77.
- Dunham, S.P. & Graham, E. (2008). Retroviral infections of small animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 38(4), 879-901.
- ESCCAP (2010a). *Ectoparásitos Control de insectos y garrapatas que parasitan a perros y gatos* (Guía ESCCAP nº3). Malvern, Worcs: UK.
- ESCCAP (2010b). *Antiparasitarios externos para GATOS disponibles en España*. Acedido em 12 de Outubro de 2011, disponível em [http://www.esccap.org/index.php/fuseaction/download/lrn\\_file/establaectoparasitos\\_perr os-gatos-imprenta.pdf](http://www.esccap.org/index.php/fuseaction/download/lrn_file/establaectoparasitos_perr os-gatos-imprenta.pdf)
- Elder, J.H., Lerner, D.L., Hasselkus-Light, C.S., Fontenot, D.J., Hunter, E., Luciw, P.A., Montelaro, R.C. & Phillips, T.R. (1992). Distinct subsets of retroviruses encode dUTPase. *Journal of Virology*, 66(3), 1791-1794.
- 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 em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Mdeicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Ferreira, M., Fattori, K.R., Souza, F. & Lima, V.M. (2009). Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. *Veterinary Parasitology*, 165, 150-154.

- Filho, E.A., Uehara, S.N. & Senefonte, F.R. (2005). Leishmaniose visceral e gestação: relato de caso. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 27(7), 92-97.
- Foley, J. (2006). Prevention and management of infectious diseases in multiple-cat environments. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of Dog and Cat* (3rd. ed.) (pp. 1037-1045). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Foley, J., Leutenegger, C., Stephen-Dumler, J., Pedersen, N. & Madigan, J. (2003). Evidence for modulated immune response to *Anaplasma phagocytophila* sensu lato in cats with FIV-induced immunosuppression. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 26(2), 103-113.
- Ford, B. (2010). FeLV and FIV: Testing...Diagnosing...Preventing. *CVC in San Diego Proceeding*, San Diego.
- Freed, E.O. & Ross, S.R. (2004). Retroviruses 2004: review of the 2004 cold spring harbor retroviruses conference. *Retrovirology*, 1 (25), 1-11.
- Freitas, E., Melo, M.N. & Costa-Val, A.P. (2006). Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology*, 136, 159–167.
- Gal, A., Loeb, E., Yisaschar-Mekuzas, Y. & Baneth, G. (2007). Detection of *Ehrlichia canis* by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. *The Veterinary Journal*, 175, 212–217.
- Galvão, M.A., Silva, L.J., Nascimento, E.M., Calic, S.B., Sousa, R. & Bacellar, F. (2006). Riquetsioses no Brasil e Portugal: ocorrência, distribuição e diagnóstico. *Revista de Saúde Pública*, 39(5), 850-856.
- Gentilini, F., Novacco, M.N., Turba, M.E., Willi, B., Bacci, M.L., & Hofmann-Lehmann, R. (2009). Use of combined conventional and real-time PCR to determine the epidemiology of feline haemoplasma infections in northern Italy. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11, 277- 285.
- George, J.W., Rideout, B.A., Griffey, S.M. & Pedersen, N. (2002). Effect of preexisting FeLV infection or FeLV and feline immunodeficiency virus coinfection on pathogenicity of the small variant of *Haemobartonella felis* in cats [Abstract]. *American Journal of Veterinary Research*, 63(8), 1172-1178.
- Gilles, J., Just, F.T., Silaghi, C., Pradel, I., Lengauer, P.H., Hellmann, K. & Pfister, K. (2008). *Rickettsia felis* in Fleas, France. *Emerging Infectious Diseases*, 14(4), 684–686.
- Gomes-Keller, M.A., Gonczi, E., Tandon, R., Riondato, F., Hofmann-Lehmann, R., Meli, M.L. & Lutz, H. (2006). Detection of feline leukemia virus RNA in saliva from naturally infected cats and correlation of PCR results with those of current diagnostic methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 916-922.
- Goodfellow, M. & Shaw, S. (2005). Exotic diseases of dogs and cats at risk of importation to Ireland. *Irish Veterinary Journal*, 271-277.

- Gorrel, C. (2004). Oral examination and recording. In *Veterinary Dentistry for the General Practitioner* (47-55). UK: Saunders, Elsevier.
- Grace, S. (2011). Feline Immunodeficiency virus infection. In G. Norsworthy, M. Crystal, S. Grace, & T.L.P., *Feline Patient (Volume 75)* (pp. 179-180). Iowa: Blackwell Publishing Ltd.
- Grace, S. & Norsworthy, G. (2011). Hemoplasmosis. In G. D. Norsworthy (Ed.). *Feline Patient* (4th Ed.). (pp. 218-219). Iowa: Blackwell Publishing Ltd.
- Gramiccia, M. (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*, 181(1), 23-30.
- Gramiccia, M. & Gradoni, L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, 35, 1169–1180.
- Gramiccia, M., Maazoun, R., Lanotte, G., Rioux, J. A., le Blancq, S., Evans, D. A., Peters, W., Bettini, S., Gradoni, L. & Pozio, E. (1982). Enzymatic typing of 11 strains of *Leishmania* isolated in mainland Italy from the visceral murine, canine and vulpine forms. Demonstration of an enzymatic variant in the fox (*Vulpes vulpes*) and the dog [Abstract]. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, 57, 527-531.
- Gratz, N. (2006). *Vector and rodent-borne diseases of Europe and North America: distribution, public health burden and control*. New York: Cambridge.
- Grevot, A., Hugues, J.P., Marty, P., Pratlong, F., Ozon, C., Haas P., Breton, C. & Bourdoiseau (2005). Leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in a FIV and FeLV positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods. *Parasite*, 12, 271-275.
- Grindem, C., Corbett, W. & Tomkins, M. (1990). Risk factors for *Haemobartonella felis* infection in cats [Abstract]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 196(1), 96-99.
- Hardy, W.D., Hess, P.W., MacEwen, E.G., McClelland, A.J., Zuckerman, E.E., Essex, M., Cotter, S.M. & O., Jarrett (1976). Biology of feline leukemia virus in the natural environment. *Cancer Research*, 36, 582-588.
- Harmann, K. (2004b). Enfermedad 2: Infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Felina. In K. de Mari, *Manual del Interferón Veterinario* (pp. 48-58). Espanha: Virbac, S.A.
- Harrus, S., Klement, E., Aroch, I., Stein, T., Bark, H., Lavy, E., Mazaki-Tovi, M. & Baneth, G. (2002). Retrospective study of 46 cases of feline haemobartonellosis in Israel and their relationships with FeLV and FIV infections. *The Veterinary Record*, 151(3), 82-85.
- 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.
- Hartmann, K., Griessmayr, P., Schulz, B., Greene, C.E., Vidyashankar, A.N., Jarrett, O. & Egberink, H.F. (2007). Quality of different in-clinic test systems for feline

immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 9, 439-445.

Hartmann, K. (2011). Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 143(3-4), 190-201.

Hartmann, K. (2004). Enfermedad I: Infección por el Virus de la Leucemia Felina. In K. de Mari (Ed.), *Manual del Interferón Veterinario* (pp. 36-47). España: Virbac, S.A.

Hartmann, K. (2006). Feline Leukemia Virus Infection. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of Dog and Cat* (3rd. ed.). (pp. 105-130). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.

Harvey, J.W. (2006). Hemotropic Mycoplasmosis (Hemobartonellosis). In C.E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of Dog and Cat* (3rd. ed.). (pp. 252-265). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.

Hawley, J.R., Shaw, S.E. & Lappin, M.R. (2007). Prevalence of *Rickettsia felis* DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 9, 258 e 262.

Hayward, J.J., Taylor, J. & Rodrigo, A. G. (2007). Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in feral and companion domestic cats of New Zealand. *The Journal of Virology*, 81(6), 2999–3004.

Heikkilä, H.M., Bondarenko, A., Mihalkov, A., Pfister, K. & Spillmann, T. (2010). *Anaplasma phagocytophilum* infection in a domestic cat in Finland: Case report. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52(62), 1-5.

Hervás, J., de Lara, C.-M. S.-I., Pellicer, F., & Carrasco, L. (1999). Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniasis in Spain. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 1(2), 101-105.

Higgins, J.A., Radulovic, S., Schriefer, M.E. & Azad, A.F. (1996). *Rickettsia felis*: a new species of pathogenic *Rickettsia* isolated from cat fleas. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(3), 671–674.

Hofmann-Lehmann, R., Cattori, V., Tandon, R., Boretti, F.S., Meli, M.L., Riond, B., Pepin, A. C., Willi, B., Ossent, P. & Lutz, H. (2007). Vaccination against the feline leukaemia virus: Outcome and response categories and long-term follow-up. *Vaccine*, 25, 5531–5539.

Hofmann-Lehmann, R., Cattori, V., Tandon, R., Meli, M. L., Riond, B., & Lutz, H. (2008). How molecular methods change our views of FeLV infection and vaccination. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 123, 119–123.

Hofmann-Lehmann, R., Tandon, R., Boretti, F.S., Meli, M.L., Willi, B., Cattori, V., et al. (2006). Reassessment of feline leukaemia virus (FeLV) vaccines with novel sensitive molecular assays. *Vaccine*, 24(8), 1087-1094.

- Horowitz, W.H., Hsieh, T.-C., Agüero-Rosenfeld, M.E., Kalantarpour, F., Chowdhury, I., Wormser, G.P. & Wu, J.M. (2001). Antimicrobial susceptibility of *Ehrlichia phagocytophila*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 786–788.
- Hosie, M.J., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M.G., Radford, A.D., Thiry, E., Truyen, U. & Horzinek, M.C. (2009). ABCD guidelines on: Feline immunodeficiency Virus. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11(7), 575-584.
- Hsu, Y., Lin, C., Chomel, B., Tsai, K., Wu, W., Huang, C.G. & Chang, C.C. (2011). Identification of *Rickettsia felis* in fleas but not ticks on stray cats and dogs and the evidence of *Rickettsia rhipicephali* only in adult stage of *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus haemaphysaloides*. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 34(6), 513-518.
- Jensen, A.W., Lappin, M.R., Kamkar, B.S. & Reagan, W.J. (2001). Use of a polymerase chain reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. *American Journal of Veterinary Research*, 62(4). 604-608.
- Johnson, C. (2005). Transmission of feline immunodeficiency virus [versión electrónica]. *56th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP)*. 3-7 December.
- Johnson, E.M., Ewing, S., Barker, R.W., Fox, J.C., Crow, D.W. & Kocan, K.M. (1998). Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (*Rickettsiales: Ehrlichieae*) by *Dermacentor variabilis* (*Acari: Ixodidae*). *Veterinary Parasitology*, 74, 277–288.
- Jordan, H.L., Howard, J., Barr, M.C., Kennedy-Stoskopf, S., Levy, J.K. & Tompkins, W.A. (1998). Feline immunodeficiency virus is shed in semen from experimentally and naturally infected cats [Abstract]. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 14(12), 1087-1092.
- Kakinuma, S., Motokawa, K., Hohdatsu, T., Yamamoto, J.K., Koyama, H. & Hashimoto, H. (1995). Nucleotide sequence of feline immunodeficiency virus: classification of Japanese isolates into two subtypes which are distinct from non-Japanese subtypes. *Journal of Virology*, 69(6), 3639–3646.
- Kamhawi, S. (2006). Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology*, 22(9), 439-445.
- Kamrani, A., Parreira, V.R., Greenwood, J. & Prescott, J.F. (2008). The prevalence of *Bartonella*, hemoplasma, and *Rickettsia felis* infections in domestic cats and in cat fleas in Ontario. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 72, 411–419.
- Kidd, L., Maggi, R., Diniz, P.P., Tucker, M. & Breitschwerdt, E. (2008). Evaluation of conventional and real-time PCR assays for detection and differentiation of spotted fever group *Rickettsia* in dog blood. *Veterinary Microbiology*, 129, 294–303.
- Klein, M.B., Nelson, C.M. & Goodman, J.I. (1997). Antibiotic susceptibility of the newly cultivated agent of human granulocytic ehrlichiosis: Promising activity of quinolones and rifamycins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(1), 76–79.

- Kolenda-Roberts, H.M., Kuhnt, L.A., Jennings, R.N., Mergia, A., Gengozian, N. & Johnson, C.M. (2007). Immunopathogenesis of feline immunodeficiency virus infection in the fetal and neonatal cat. *Frontiers in Bioscience*, 12, 3668-3682.
- Kommenou, A.A., Mylonakis, M.E., Kouti, V., Tendoma, L., Leontides, L., Skountzou, E., Dessiris, A., Koutinas, A.F. & Ofri, R. (2007). Ocular manifestations of natural canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 90 cases. *Veterinary Ophthalmology*, 10(3), 137-142.
- Kusuhara, H., Hohdatsu, T., Okumura, M., Sato, K., Suzuki, Y., Motokawa, K., Gemma, T., Watanabe, R., Huang, C., Arai, S., Koyama, H. (2005). Dual-subtype vaccine (Fel-O-Vax FIV) protects cats against contact challenge with heterologous subtype B FIV infected cats. *Veterinary Microbiology*, 108(3-4), 155-165.
- La Croix, N.C. (2005). Ocular manifestations of systemic disease in cats. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 20(2), 121-128.
- Lappin, M.R. (2006). Cat with abnormal laboratory data. In J. Rand (Ed.), *Problem-based Feline Medicine* (pp. 530-532). China: Elsevier Saunders.
- Lappin, M.R. & Breitschwert, E.B. (2006). Feline mononuclear ehrlichiosis. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of Dog and Cat* (3rd. ed.). (pp. 224-227). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Lappin, M.R., Breitschwert, E.B., Jensen, W.A., Dunnigan, B., Ji-Yeun Rha, J.Y., Williams, C.R., Brewer, M. B. & Fall, M. (2004). Molecular and serologic evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in cats in North America. *Journal of the American Animal Hospital*, 225(6), 893-896.
- Lappin, M. R., Griffin, B., Brunt, J., Riley, A., Burney, D., Hawley, J., Brewer, M.M. & Jensen, A.W. (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, 85- 90.
- Lee, I.T., Levy, J.K., Gorman, S.P., Crawford, P.C. & Slater, M.R. (2002). Prevalence of feline leukemia virus infection and serum antibodies against feline immunodeficiency virus in unowned free-roaming cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 220(5), 620-622.
- Leishdomus (2005). Leishmania. Last updated: April, 2005 - LeishDOMUS. Acedido em Setembro 2011, disponível em: <http://www.leishdomus.org/leish.htm>
- Letaïef, A., Kaabia, N., Chakroun, M., Khalifa, M., Bouzouaia, N. & Jemni, L. (2005). Clinical and laboratory features of murine typhus in central Tunisia: a report of seven cases. *International Journal of Infectious Diseases*, 9(6), 331-334.
- Levy, J.K., Scott, H.M., Lachtara, J.L. & Crawford, C. (2006). Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(3), 371-376.

- Levy, J.S. (2006). Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(3), 371-376.
- Levy, J., Crawford, C., Hartmann, K., Hofmann-Lehmann, R., Little, S., Sundahl, E., et al. (2008). 2008 American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10 (3), pp. 300-316.
- Levy, J., Crawford, C., Hartmann, K., Little, S., Sundahl, E., Thayer, V., et al. (2009). Feline Retrovirus Management Guidelines. AMERICAN ASSOCIATION OF FELINE PRACTITIONERS, pp. 1-25.
- Levy, J., Crawford, P. C., Motokawa, K., Gemma, T., Watanabe, R., Arai, S., Bienzle, D. & Hohdatsu, T. (2008). Differentiation of feline immunodeficiency virus vaccination, infection, or vaccination and infection in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(2), 330-334.
- Little, S. (2007). *Controlling Vector-Borne Diseases*. IVIS: NAVC Proceedings 2007. Acedido em: 27 de Setembro de 2011. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/navc/2007/SAE/216.asp?LA=1>
- 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. (2005). Feline immunodeficiency virus testing in stray, feral, and client-owned cats of Ottawa. *The Canadian Veterinary Journal*, (46(10)), 898-901.
- Little, S.E. (2010). Implementing successful flea control programs. In IVIS (Ed.) *Proceeding of the Latin American Veterinary Conference, 25-27 Outubro 2010*. Lima, Peru.
- Liu, W.T., Good, R.A., Trang, L.Q., Engelman, R.W. & Day, N.K. (1984). Remission of leukemia and loss of feline leukemia virus in cats injected with *Staphylococcus* protein A: association with increased circulating interferon and complement-dependent cytotoxic antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 81(20), 6471-6475.
- 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, pp. 287-296.
- Lutz, H., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M.J., Lloret, A., Marsilio, F., Pennisi, M.G., Radford, A.D., Thiry, E., Truyen, U. & Horzinek, M. (2009). ABCD guidelines on: Feline leukaemia virus. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11, 565-574.
- Macieira, D.B., Menezes, R.C., Damico, C.B., Almosny, N.R., McLane, H.L., Daggy, J.K. & Messick, J.B. (2008). Prevalence and risk factors for hemoplasmas in domestic cats naturally infected with feline immunodeficiency virus and/or feline leukemia virus in Rio de Janeiro - Brazil. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10, 120-129.

- Magnarelli, L.A., Bushmich, S.L., IJdo, J.W. & Fikrig, E. (2005). Seroprevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in cats. *American Journal of Veterinary Research*, 66(11), 1895-1899.
- Maia, C. & Campino, L. (2011). A importância do gato doméstico (*Felis catus domesticus*) na epidemiologia da leishmaniose zoonótica. *Veterinary Medicine*, 13(76), 46-49.
- Maia, C. & Campino, L. (2011). Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends in Parasitology*, 1042, 1-4.
- Maia, C. & Campino, L. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 158(4), 274-287.
- 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, 336-340.
- Mancianti, F. (2004). Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat? *Parassitologia*, 46 (1-2), 203-206.
- Maroli, M., Pennisi, M., Di Muccio, T., Khoury, C., Gradoni, L. & Gramiccia, M. (2007). Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, 145(3-4), 357-360.
- Márquez, F.J., Muniain, M.A., Pérez, J.M., & Pérez, J. (2002). Presence of *Rickettsia felis* in the cat flea from Southwestern Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 8(1), 89-91.
- 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.
- Maruyama, S., Kabeya, H., Nakao, R., Tanaka, S., Sakai, T., Xuan, X., Katsube, Y. & Mikami, T. (2003). Seroprevalence of *Bartonella henselae*, *Toxoplasma gondii*, FIV and FeLV infections in domestic cats in Japan. *Microbiology and immunology*, 47(2), 147-153.
- Matthewman, L., Kelly, P., Hayter, D., Downie, S., Wray, K., Bryson, N., Rycroft, A. & Raoult, D. (1997). Domestic cats as indicators of the presence of spotted fever and typhus group rickettsiae [Abstract]. *European Journal of Epidemiology*, 13(1), 109-111.
- Maurin, M., Bakken, J.S. & Dumler, J.S. (2003). Antibiotic Susceptibilities of *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum* strains from various geographic areas in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(1), 413-415.
- McCaw, D.L., Boon, G.D., Jergens, A.E., Kern, M.R., Bowles, M.H. & Johnson, J.C. (2001). Immunomodulation therapy for feline leukemia virus infection [Abstract]. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 37(4), 356-63.
- McElroy, K., Blagburn, B., Breitschwerdt, E., Mead, P. & McQuiston, J. (2010). Flea-associated zoonotic diseases of cats in the USA: bartonellosis, flea-borne rickettsioses, and plague. *Trends in Parasitology*, 26(4), pp. 197-204.

- Messick, J.B. (2004). Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Veterinary Clinical Pathology*, 33(1), 2-13.
- Mosallanejad, B., Shapouri, M.R.S., Avizeh, R. & Pourmahdi, M. (2010). Seroprevalence of feline immunodeficiency virus (FIV) among client-owned cats in Ahvaz, southwestern of Iran. *Veterinary Research Forum*, 1(3), 180-187.
- Nakata, R., Miyazawa, T., Shin, Y.S., Watanabe, R., Mikami, T. & Matsuura, Y. (2003). Reevaluation of host ranges of feline leukemia virus subgroups. *Microbes and Infection*, 5, 947–950.
- Navarro, J.A., Sánchez, J., Penafiel-Verdú, C., Buendía, A.J., Altimira, J. & Vilafranca, M. (2010). Histopathological Lesions in 15 Cats with Leishmaniosis. *Journal of Comparative Pathology*, 143, 297-302.
- Neer, M.T., 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, 309–315.
- Neer, T. & Harrus, S. (2006). Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis, and *Wolbachia* Infection. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of Dog and Cat* (3rd. ed.). (pp. 203-232). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Nicholson, W., Allen, K., McQuiston, J., Breitschwerdt, E. & Little, S. (2010). The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends in Parasitology*, 26(4), 205-212.
- OIE (2008). Leishmaniosis. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Volume 1* (6th ed.). (pp. 240-250). Paris, France.
- Onleish (2011). *Observatório Nacional das Leishmanioses*. Acedido em 14 de Setembro de 2011. Disponível em: <http://www.onleish.org/index.php>
- Oliveira, R., Galvão, M., Mafra, C., Chamone, C., Calic, S., Silva, S.B., Silva, S.U. & Walker, D.H. (2002). *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides* spp. fleas, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 8(3), 317-319.
- Olmsted, R.A., Hirsch, V.M., Purcell, R.H. & Jonhson, P.R. (1989). Nucleotide sequence analysis of feline immunodeficiency virus: Genome organization and relationship to other lentiviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86, 8088-8092.
- Ortuño, A., Gauss, C., García, F. & Gutierrez, J. (2005). Serological evidence of *Ehrlichia* spp. exposure in cats from northeastern Spain [Abstract]. *Journal of veterinary medicine - Series B - Infectious diseases and veterinary public health*, 52(5), 246-248.
- 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.

- Ozon, C., Marty, P., Pratlong, F., Breton, C., Blein, M., Lelievre, A. & Haas, P. (1998). Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Southern France. *Veterinary Parasitology*, 75, 273–277.
- Pacitti, A.M., Jarrett, O. & Hay, D. (1986). Transmission of feline leukaemia virus in the milk of a non-viraemic cat [Abstract]. *Veterinary Record*, 118, 381-384.
- Pancino, G., Castelot, S. & Sonigo, P. (1995). Differences in feline immunodeficiency virus host cell range correlate with envelope fusogenic properties. *Virology*, 206(2), 796-806.
- Parola, P., Paddock, C.D. & Raoult, D. (2005). Tick-Borne Rickettsioses around the world: Emerging diseases challenging old concepts. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 719–756.
- Payne, P., Dryden, M. & Carter, G. (2005). External Parasitic Diseases of Dogs and Cats. In G. Carter & P. Payne (Eds.), *A Concise Guide to Infectious and Parasitic Diseases of Dogs and Cats*. Ithaca New York. Disponível em: [http://www.ivis.org/special\\_books/carter/carter7/chapter.asp?LA=1](http://www.ivis.org/special_books/carter/carter7/chapter.asp?LA=1)
- Pecoraro, M. R., Tomonaga, K., Miyazawa, T., Kawaguchi, Y., Sugita, S., Tohya, Y., Kai, C., Etcheverrigaray, M.E. & Mikami, T. (1996). Genetic diversity of Argentine isolates of feline immunodeficiency virus. *Journal of General Virology*, 77(9), 2031-2035.
- Pedretti, E., Passeri, B., Amadori, M., Isola, P., Di Pede, P., Telera, A., Vescovini, R., Quintavalla F. & Pistello, M. (2006). Low-dose interferon-alpha treatment for feline immunodeficiency virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 109(3-4), 245-254.
- Pennisi, M.G. (2002). A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. In R. Killick-Kendrick (Ed.), *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum: Canine Leishmaniasis: moving towards a solution*. (pp. 19-48). Sevilla, Spain.
- Pinches, M.D., Helps, C.R., Gruffydd-Jones, T.J., Egan, K., Jarrett, O. & Jarrett, S. (2007). Diagnosis of feline leukaemia virus infection by semi-quantitative real-time polymerase chain reaction. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 9, 8-13.
- Poli, A., Abramo, F., Barsotti, P., Leva, S., Gramiccia, M., Ludovisi, A. & Mancianti, F. (2002). Feline leishmaniosis due to *Leishmania*. *Veterinary Parasitology*, 106, 181–191.
- Pratlong, F., Rioux, J.A., Marty, P., Faraut-Gambarelli, F., Dereure, J., Lanotte, G. & Dede, J.P. (2004). Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(9), 4077-4082.
- Pu, R., Coleman, J., Coisman, J., Sato, E., Tanabe, T., Arai, M. & Yamamoto, J.K. (2005). Dual-subtype FIV vaccine (Fel-O-Vax FIV) protection against a heterologous subtype B FIV isolate. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 7(1), 65-70.
- Quinnell, R.J., & Courtenay, O. (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 136(14), 1915-1934.

- Quinnell, R., Courtney, O., Garcez, L., Kaye, P., Shaw, M., Dye, C. & Day, M.J. (2003). IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 91, 161–168.
- Raoult, D. & Roux, V. (1997). Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(4), 694-719.
- Renvoisé, A. & Raoult, D. (2009). L'actualité des rickettsioses. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 39(2), 71-81.
- Richards, J., Elston, T., Ford, R., Gaskell, R., Hartmann, K., Hurley, K.F., Lappin, M.R., Levy, J.K., Rodan, I., Scherk, M., Schultz, R.D. & Sparkes, A.H. (2006). the 2006 american association of feline practitioners feline vaccine advisory panel report. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 29(9), 2140-2141.
- Rodriguez, J., Arevalo, J., Chacon-ManriqueDeLara, F., Fernandez, J.L., Boiso, A. & Villamandos, J. (2002). Evaluation of local immunoresponse in feline leishmaniasis. *Proceedings of the 27 WSAVA Congress: Oral Communications– Infectious diseases*, 3 a 6 October.
- Rolain, J.-M., Franc, M., Davoust, B. & Raoult, D. (2003). Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France. *Emerging Infectious Diseases*, 9(3), 338-342.
- 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 Mdeicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Rosado, R.C. (2009). Rastreo virológico de carnívoros errantes e caracterização genética viral. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Mdeicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Ross, R. (1903). Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *British Medical Journal*, 2, 1261-1262.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-489.
- Sanches, A., Pereira, A.G. & Carvalho, J.P. (2011). Um caso de leishmaniose felina. *Veterinary Medicine*, 13(73), 29-30.
- Savani, E., de Oliveira, C., de Carvalho, M., Zampieri, R., dos Santos, M., D'Auria, S., Shaw, J.J. & Floeter-Winter, L.M. (2004). The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 120(3), 229-233.
- Schaarschmidt-Kiener, D., Graf, F., Von Loewenich, F.D. & Müller, W. (2009). *Anaplasma phagocytophilum* infection in a cat in Switzerland [Abstract]. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 151(7), 336-341.

- Schabereiter-Gurtner, C., Lubitz, W. & Rölleke, S. (2003). Application of broad-range 16S rRNA PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of tick-infecting bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 52(2), 251-260.
- Schellekens, H., Geelen, G., Meritet, J.F., Maury, C. & Tovey, M.G. (2001). Oromucosal interferon therapy: relationship between antiviral activity and viral load. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 21(8), 575-581.
- Schubach, T., Figueiredo, F., Pereira, S., Madeira, M., Santos, I., Andrade, M., Cuzzi, T. & Marzochi, M.C. (2004). American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: First report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(3), 165-167.
- Sellon, R.K. & Hartmann, K. (2006). Feline immunodeficiency virus infection. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of Dog and Cat* (3rd. ed.) (pp. 131-143). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Sergeant, E.S.G. (2009). Epitools epidemiological calculators. AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease. Acedido em Set. 18, 2011, disponível em <http://epitools.ausvet.com.au>.
- Sharma, U. & Singh, S. (2008). Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *Diseases, Journal of Vector Borne*, 45, 255-272.
- Shaw, S.E. (2008). Flea - transmitted infections of cats and dogs. In IVIS, *Proceedings of the 33rd World Small Animal Veterinary Congress*, (pp. 540-542). Dublin, Ireland.
- Shaw, S.E., Day, M.J., Birtles, R.J. & Breitschwerdt, E.B. (2001). Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends in Parasitology*, 17(2), 74-80.
- Shaw, S., Kenny, M., Tasker, S. & Birtles, R. (2004). Pathogen carriage by the cat flea *Ctenocephalides felis* (Bouché) in the United Kingdom. *Veterinary Microbiology*, 102(3-4), 183-188.
- Sheets, M.A., Unger, B.A., Giggelman, G.F. & Tizard, I.R. (1991). Studies of the effect of acemannan on retrovirus infections: Clinical stabilization of feline leukemia virus-infected cats [Abstract]. *Molecular Biotherapy*, 31(1), 41-45.
- Shelton, G.H., Grant, C.K., Linenberger, M.L. & Abkowitz, J.L. (1990). Severe neutropenia associated with griseofulvin therapy in cats with feline immunodeficiency virus infection [Abstract]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 4(6), 317-319.
- Sherding, R.G. (2006). Rickettsiosis, ehrlichiosis, anaplasmosis and neorickettsiosis. In S.J. Birchard & R.G. Sherding (Eds.), *Saunders Manual of Small Animal Practice* (3rd ed.). (pp. 178-185). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Silva, F.L. (2007). Lesões genitais em cadelas naturalmente infectadas com *Leishmania chagasi* e soroconversão de cadelas acasaladas com cães portadores. Tese de Doutorado em Ciências Animais. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (Brazil).

- 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.
- Simões-Mattos, L., Mattos, M., Teixeira, M., Oliveira-Lima, J., Bevilaqua, C., Prata-Júnior, R., Holanda, C.M., Rondon, C., Bastos, K.M., Coêlho, Z.C., Coêlho, I.C., Barral, A. & Pompeu, M.M (2005). The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, 127(3-4), 199-208.
- Sodora, D.L., Shpaer, E.G., Kitchell, B.E., Dow, S.W., Hoover, E.A. & Mullins, J.I. (1994). Identification of three feline immunodeficiency virus (FIV) *env* gene subtypes and comparison of the FIV and human immunodeficiency virus type 1 evolutionary patterns. *Journal of Virology*, 68(4), 2230-2238.
- Solano-Gallego, L.K., 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., Hegarty, B., Espada, Y., Lull, 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-Cortés, 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. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(4), 676–680.
- Sorvillo, F.J., Gondo, B., Emmons, R., Ryan, P., Waterman, S. H., Tilzer, A., Andersen, E.M.; Murray, R.A. & Barr, R. (1993). A suburban focus of endemic typhus in Los Angeles County: association with seropositive domestic cats and opossums. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48(2), 269-273.
- Sousa, R., Nóbrega, S.D., Bacellar, F. & Torgal, J. (2003). Sobre a realidade da febre escarotodular em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 16, 429-436.
- Souza, A., Barros, E., Ishikawa, E., Ilha, I., Marin, G. & Nunes, V. (2005). Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 28(1-2), 41-45.
- Souza, A., Nunes, V., Borralho, V. & Ishikawa, E. (2009). Domestic feline cutaneous leishmaniasis in the municipality of Ribas do Rio Pardo, Mato Grosso do Sul state, Brazil: a case report. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 5(2), 359-365.
- Stich, R., Schaefer, J., Bremer, W., Needham, G. & Jittapalpong, S. (2008). Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. *Veterinary Parasitology*, 158, 256–273.
- Strauss-Ayali, & Baneth, G. (2001). Canine Visceral Leishmaniasis. In IVIS, *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*. Ithaca, New York, USA.

- Stuen, S. (2007). *Anaplasma phagocytophilum* - the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. *Veterinary Research Communications*, 31(1), 79–84.
- Sykes, J.E. (2010). Feline hemotropic mycoplasmas. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 20(1), 62-69.
- Sykes, J.E., Drazenovich, N.L., Ball, L.M. & Leutenegger, C.M. (2007). Use of conventional and real-time polymerase chain reaction to determine the epidemiology of hemoplasma infections in anemic and nonanemic cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21, 685–693.
- Sykes, J.E., Jeralyn, C.T., Lindsay, L.L. & Owens, S.D. (2008). Prevalences of various hemoplasma species among cats in the United States with possible hemoplasmosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232(3), 272-279.
- Tandon, R., Cattori, R., Gomes-Keller, M.A., Meli, M.L., Golder, M.C., Lutz, H. & Hofmann-Lehmann, R. (2005). Quantitation of feline leukaemia virus viral and proviral loads by TaqMan ® real-time polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 130, 124–132.
- Taroura, S., Shimada, Y., Sakata, Y., Miyama, T., Hiraoka, H., Watanabe, M., Itamoto, K., Okuda, M. & Inokuma, H. (2005). Detection of DNA of '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' and *Spiroplasma* sp. in unfed ticks collected from vegetation in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 67(12), 1277-1279.
- Tasker, S. (2006). Current concepts in feline haemobartonellosis. *In Practice* , 28,136-141.
- Tasker, S. (2006b). Fe - feline medicine: Feline haemoplasma Infections. 2006 *World Congress WSAVA/FECAVA/CSAVA*. (pp. 361-363). Prague, Czech Republic.
- Tasker, S. (2010). Haemotropic Mycoplasmas: What’s their real significance? *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12, 369-381.
- Tasker, S. & Lappin, M.R. (2006). Update on hemoplasmosis. In J.R. August (Ed.), *Consultations in feline internal medicine* (Vol. 5, pp. 605-609). China: Elsevier Saunders.
- Tasker, S., Binns, S. H., Day, M. J., Gruffydd-Jones, T. J., Harbour, D. A., Helps, C. R., et al. (2003). Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* and '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' in cats in the United Kingdom (Abstract). *The Veterinary Record* , 152 (7), pp. 193-198.
- Tasker, S., Helps, C., Day, M., Gruffydd-Jones, T. & Harbour, D. (2003a). Use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemofelis* and "*Candidatus Mycoplasma haemominutum*" DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 439–441.
- Torres, A. N., Mathiason, C. K., & Hoover, E. A. (2005). Re-examination of feline leukemia virus: host relationships using real-time PCR. *Virology*, 332, pp. 272-283.

- Vaz, Y., Almeida, V., Pereira da Fonseca, I.M., Duarte, A., Madeira de Carvalho, L.M., Meireles, J., Fazendeiro, M.I. (2005). Estudo de doenças transmissíveis em populações de gatos errantes. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias – Suplemento*, 129-130, 1-17.
- Vita, S., Santori, D., Aguzzi, I., Petrotta, E. & Luciani, A. (2005). Feline leishmaniasis and ehrlichiosis: Serological investigation in Abruzzo Region. *Veterinary Research Communications*, 29(2), 319–321.
- Vobis, M., D’Haese, J., Mehlhorn, H., & Mencke, N. (2003a). Evidence of horizontal transmission of feline leukemia virus by the cat flea (*Ctenocephalides felis*). *Parasitology Research*, 91, 467–470.
- Vobis, M., D’Haese, J., Mehlhorn, H. & Mencke, N. (2003b). The feline leukemia virus (FeLV) and the cat flea (*Ctenocephalides felis*). *Parasitology Research*, 90, 132-134.
- Wedincamp, J.J. & Foil, L.D. (2000). Infection and seroconversion of cats exposed to cat fleas (*Ctenocephalides felis Bouché*) infected with *Rickettsia felis*. *Journal of Vector Ecology*, 25(1), 123-1266.
- Wedincamp, J.J. & Foil, L.D. (2002). Vertical transmission of *Rickettsia felis* in the cat flea (*Ctenocephalides felis Bouché*). *Journal of Vector Ecology*, 27(1), 96-101.
- Willi, B., Boretti, F.S., Baumgartner, C., Tasker, S., Wenger, B., Cattori, V., Meli, M.L., Reusch, C.E., Lutz, H. & Hofmann-Lehmann, R. (2006). Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 961-969.
- Willi, B., Boretti, F.S., Meli, M.L., Bernasconi, M.V., Casati, S., Hegglin, D., Puorger, M., Neimark, H., Cattori, V., Wengi, N., Reusch, C.E., Lutz, H. & Hofmann-Lehmann, R. (2007c). Real-time PCR investigation of potential vectors, reservoirs, and shedding patterns of feline hemotropic mycoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(12), 3798–3802.
- Willi, B., Boretti, F.S., Tasker, S., Meli, M.L., Wengi, N., Reusch, C.E., Lutz, H. & Lehmann, R.H. (2007a). From *Haemobartonella* to hemoplasma: Molecular methods provide new insights. *Veterinary Microbiology*, 125, 197–209
- .
- Willi, B., Filoni, C., Catao-Dias, J., Cattori, V., M., M.L., V. A., Martinez, F., Roelke, M.E., Ryser-Degiorgis, M.P., Leutenegger, C.M., Lutz, H. & Hofmann-Lehmann, R. (2007b). Worldwide occurrence of feline hemoplasma infections in wild felid species. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 1159–1166.
- Woods, J.E., Brewer, M.M., Hawley, J.R. & Lappin, M.R. (2005). Evaluation of experimental transmission of *Candidatus Mycoplasma haemominutum* and *Mycoplasma haemofelis* by *Ctenocephalides felis* to cats [Abstract]. *American Journal Of Veterinary Research*, 66(6), 1008-1012.

Yates, K.M., Rosenberga, L.J., Harrisb, C.K., Bronstad, D.C., King, G.K., Biehle, G.A., Walker, B., Ford, C.R., Hall, J. E. & Tizard, I.R. (1992). Pilot study of the effect of acemannan in cats infected with feline immunodeficiency virus [Abstract]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 35(1-2),177-189.

## ANEXOS

### ANEXO I: Resumo da comunicação oral apresentada no V Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias

#### ***Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Leishmania* spp. e *Mycoplasma haemofelis* em gatos errantes, Moita, Setúbal, Portugal**

Martins, T.<sup>1</sup>, Rodrigues, C. B.<sup>1</sup>, Duarte, A.<sup>1</sup>, Alves, A. C.<sup>2</sup>, Braz, B.S.<sup>1</sup>, Tavares, L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal

<sup>2</sup>Hospital Veterinário SOS Vet, Cova da Piedade, Almada, Portugal

Os ectoparasitas são vectores importantes na transmissão de variadas doenças que afectam o estado hígido dos felídeos. Além da imunossupressão de que são causadores, estes agentes são também responsáveis pela transmissão de determinados hemoparasitas como a *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Leishmania infantum* e *Mycoplasma haemofelis*.

Para determinar a frequência dos principais hemoparasitas, cinquenta felídeos de uma associação de abrigo animal particular da freguesia de Alhos Vedros, Portugal, foram avaliados para determinar a frequências destes agentes.

Após exame clínico foi colhido sangue total para diagnóstico molecular de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. e *Rickettsia* spp. por PCR convencional. A detecção de ácido nucleico de *Leishmania* e *Mycoplasma haemofelis* foi efectuada por *real time quantitative* PCR.

As frequências encontradas foram de 16% (8/50) para *Rickettsia* spp., 4% (2/50) para *Mycoplasma haemofelis*, 2% (1/50) para *Leishmania infantum* e 2% (1/50) de co-infecção com *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp..

O gato infectado com *Leishmania infantum* apenas revelou uma ligeira linfocitose, não apresentando qualquer tipo de lesões cutâneas e oculares, aumento de linfonodos nem outros sinais clínicos actualmente associados à doença, o que seria de esperar, devido ao papel destes animais enquanto reservatórios da *Leishmania* spp.

Corrimento ocular foi o único sinal clínico detectado pelo animal infectado com *Ehrlichia* spp. e/ou *Anaplasma* spp. Os restantes sinais descritos na literatura tais como febre, perda de peso, vómitos e letargia não foram facilmente observáveis devido às características da população avaliada. A *Rickettsia* spp. é um agente pouco pesquisado em felinos e que normalmente não está associado à presença de sinais clínicos. As principais alterações encontradas nos animais positivos foram a linfadenomegália (4/8), corrimento ocular (3/8) e conjuntivite (2/8), no entanto estes sinais podem não estar directamente associados ao agente em questão.

Devido às características da população em estudo, e às condições de alojamento, o controlo dos vectores responsáveis pela transmissão das parasitoses acima descritas foi considerado insatisfatório, no entanto a sua prevalência não se revelou tão alta como esperado. Considerando a localização geográfica deste abrigo, numa zona com características climáticas únicas e o baixo número de animais testados, seria de todo o interesse alargar este estudo de forma a estimar a prevalência real destes agentes e avaliar o impacto destes animais enquanto reservatórios/transmissores de alguns destes agentes parasitários.

## **ANEXO II: Resumo da comunicação oral apresentada no V Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias**

### **Infecção viral e informação clínica em gatos errantes, Moita, Setúbal, Portugal**

Rodrigues, C. B.<sup>1</sup>, Martins, T.<sup>1</sup>, Duarte, A.<sup>1</sup>, Alves, A. C.<sup>2</sup>, Braz, B.S.<sup>1</sup>, Tavares, L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal

<sup>2</sup> Hospital veterinário SOS Vet, Cova da Piedade, Almada, Portugal

Este trabalho teve por objectivo determinar a frequência dos principais vírus felinos e o seu papel no aparecimento de sintomatologia clínica concomitante. O grupo de estudo incluiu cinquenta gatos de uma associação particular situada na freguesia de Alhos Vedros (Setúbal, Portugal). Após exame clínico e hemograma, os materiais biológicos recolhidos incluíram sangue total para detecção de anticorpos contra o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e de antigénio do Vírus da Leucémia Felina (FeLV) (Speed Duo FeLV/FIV, Virbac, Portugal), zaragatoa oral para detecção de ácido nucleico do Herpesvírus Felino (FHV) e do Calicivírus Felino (FCV) e uma zaragatoa rectal para detecção de ácido nucleico do Parvovírus Felino (FPV) e do Coronavírus Felino (FCoV).

Em relação ao FIV e FeLV, 22% (11/50) eram positivos para FIV, 10% (5/50) para FeLV. Relativamente ao FHV e ao FCV detectou-se 62% (31/50) e 26% (13/50) de positividade, respectivamente. Nenhum animal excretava FPV, mas 30% (15/50) da amostra foi positiva ao FCoV. Dos sinais clínicos relacionados com FIV, a estomatite foi o mais frequente, em 7/11 animais, seguida de gengivite moderada a grave e linfadenopatia (3/11). Nenhum dos animais apresentava anemia nem leucopénia, mas um animal revelou leucocitose moderada. Dos cinco animais infectados com FeLV, apenas dois exibiam linfonodos aumentados. Confirmou-se a presença de úlceras linguais e gengivite moderada a grave em 6/13 dos gatos infectados com FCV e estomatite em 9 animais. Conjuntivite (n=1), Corrimento ocular (n=3) e corrimento nasal (n=1) foram sinais clínicos raramente observados nos animais com FCV. Ao exame clínico, dos 31 animais positivos a FHV, 9 apresentavam corrimento ocular, 2 conjuntivite e 6 tinham corrimento nasal. As úlceras linguais foram observadas em 4 animais, 10 tinham estomatite e 8 apresentavam gengivite moderada a grave. Em relação ao FCoV, apenas um animal estava desidratado e nenhum apresentava dispneia, alterações oculares, cutâneas nem neurológicas.

A estomatite foi o sinal clínico mais observado, tanto nos animais infectados com os agentes em questão como nos não infectados. Verificou-se ainda que a presença de FIV ou FeLV, como agentes infecciosos agressivos e indutores de imunodeficiência grave, aumentou a manifestação de estomatite. Em relação aos dados de frequência viral, devido ao tamanho da amostra, será necessária uma análise mais extensa para formular uma correcta avaliação da prevalência destes agentes infecciosos em populações errantes felinas.

## ANEXO III: Resumo do painel submetido ao V Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias

### Detecção de leveduras na cavidade oral de gatos errantes, Setúbal, Portugal

Rodrigues C.<sup>1</sup>, Martins T.<sup>1</sup>, Martins M.<sup>2</sup>, Duarte A.<sup>3</sup>, Braz, B.S.<sup>3</sup>, Alves, A.C.<sup>4</sup>, Tavares L.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal

<sup>2</sup> Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Portugal

<sup>3</sup> Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal

<sup>4</sup> Hospital Veterinário SOS Vet, Cova da Piedade, Almada, Portugal

Este trabalho teve por objectivo analisar a microbiota micológica da boca dos felídeos domésticos e avaliar a sua relação com a sintomatologia clínica manifestada ao nível da cavidade oral e a infecção com o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e com o Vírus da Leucémia Felina (FeLV), ambos capazes de induzir imunodeficiência. O grupo de estudo incluiu cinquenta gatos de uma associação particular situada na freguesia de Alhos Vedros (Setúbal, Portugal). Após exame clínico, os materiais biológicos recolhidos incluíram sangue total para detecção de anticorpos contra o FIV e de antigénio de FeLV (Speed Duo FeLV/FIV, Virbac, Portugal) e uma zaragatoa oral para cultura micológica em meio *Sabouraud* dextrose agar. As colónias obtidas neste meio foram observadas ao microscópio óptico, após coloração com azul de algodão, para diferenciação entre bactérias e leveduras, tendo as placas com leveduras sido repicadas para uma nova placa em meio de *corn meal* agar, para realização de provas de filamentação. As culturas de leveduras foram identificadas quanto ao género e espécie, utilizando o API 32C<sup>®</sup> (bioMérieux).

Em cinco animais foi detectada a presença de *Candida* spp. na cavidade oral, dos quais dois estavam infectados com FIV e um com FeLV. As espécies identificadas foram *C. silvicola* (n=3), *C. valida* (n=1) e *C. parapsilosis* (n=1).

Clinicamente, os animais nos quais foram detectadas leveduras, apresentavam gengivite ligeira (n=5), estomatite (n=2) e úlceras linguais (n=1). O animal que apresentava os três sinais clínicos estava infectado com FIV, e o animal positivo a FeLV exibia gengivite ligeira e estomatite.

Dada a reduzida dimensão da amostra em estudo, não foi possível obter uma correlação significativa entre a infecção por retrovírus e a presença ou ausência de sinais clínicos, no entanto 60% (3/5) dos animais nos quais foram detectadas leveduras, encontravam-se infectados com FIV ou FeLV. Considerando que a informação sobre a microbiota micológica da cavidade oral dos felinos é escassa, a detecção de leveduras, em particular do género *Candida*, contribui por um lado para um melhor conhecimento nesta área, mas também para a compreensão do papel potencial do FIV e FeLV enquanto vírus imunossupressores capazes de interferir na modulação da microbiota comensal destes animais.

**ANEXO IV: Painel submetido ao V Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias**



## Detecção de leveduras na cavidade oral de gatos errantes Moita, Setúbal, Portugal

Rodrigues C.<sup>1</sup>, Martins T.<sup>1</sup>, Martins M.<sup>2</sup>, Duarte A.<sup>3</sup>, Braz, B.S.<sup>3</sup>, Alves, A.C.<sup>4</sup>, Tavares L.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, FMV-UTL

<sup>2</sup>Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Portugal

<sup>3</sup>Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal

<sup>4</sup>Hospital Veterinário SOSVet, Cova da Piedade, Almada, Portugal

### OBJECTIVOS

Analisar a microbiota micológica presente na boca dos felídeos domésticos e avaliar a sua relação com a sintomatologia clínica manifestada ao nível da cavidade oral, e a infecção com o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e com o Vírus da Leucemia Felina (FeLV), ambos capazes de induzir imunodeficiência.

### MATERIAL E MÉTODOS

População em estudo: 50 gatos de uma associação particular situada na freguesia de Alhos Vedros, Setúbal, Portugal.

Após exame clínico, foram colhidos 2mL de sangue total periférico para detecção de anticorpos contra o FIV e de antígeno de FeLV (Speed Duo FeLV/FIV, Virbac, Portugal), e uma zaragatoa oral para cultura micológica em meio *Sabouraud* dextrose agar.

Após 48 horas de incubação, as colónias obtidas foram coradas com azul de algodão e observadas ao microscópio óptico para permitir a diferenciação entre bactérias e leveduras.

As colónias puras de leveduras foram identificadas quanto ao género e espécie, utilizando o API ID 32C® (bioMérieux), e repicadas para uma nova placa em meio de *corn meal* agar, para realização de provas de filamentação.

### RESULTADOS

Foi detectada a presença de *Candida* spp. na cavidade oral de cinco animais, dos quais dois estavam infectados com FIV e um com FeLV.

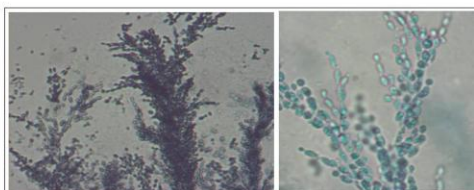
As espécies identificadas foram *C. silvicola* (n=3), *C. valida* (n=1) e *C. parapsilosis* (n=1).

Clinicamente, os animais nos quais foram detectadas leveduras, apresentavam gengivite ligeira (n=5), estomatite (n=2) e úlceras linguais (n=1).

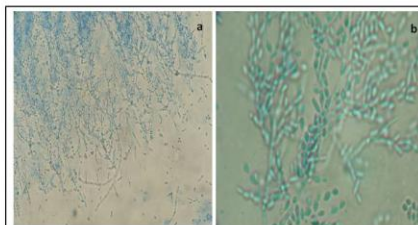
O animal que apresentava os três sinais clínicos estava infectado com FIV, e o animal positivo a FeLV exibia gengivite ligeira e estomatite.



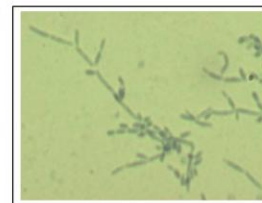
Coloração azul de algodão.  
*C. valida* (100x).



*C. valida*. Prova de filamentação com coloração azul de algodão (a - ampliação 100x; b - ampliação de 200x).



*C. silvicola*. Prova de filamentação com coloração azul de algodão (a - ampliação 100x; b - ampliação 200x).



*C. parapsilosis*. Prova de filamentação com coloração azul de algodão (ampliação 200x).

### DISCUSSÃO/CONCLUSÃO

Devido à reduzida dimensão da amostra em estudo, não foi possível obter uma correlação significativa entre a infecção por retrovírus e a presença ou ausência de sinais clínicos, embora 4/5 animais nos quais foram detectadas leveduras, encontrava-se infectado com FIV ou com FeLV.

Considerando que a informação sobre a microbiota micológica da cavidade oral dos felinos é escassa, a detecção de leveduras, em particular do género *Candida*, contribui um melhor conhecimento nesta área, mas também para a compreensão do papel potencial do FIV e FeLV enquanto vírus imunossupressores capazes de interferir na modulação da microbiota comensal destes animais.

### AGRADECIMENTOS

Professor Doutor Fernando Bernardo (FMV-UTL)  
Doutora Anabela Lança (FMV-UTL)  
CIISA, FMV/UTL  
LNIV  
VIRBAC, Portugal  
AAAA Moita  
SOSVet

## ANEXO V: Inquérito relativo à história pregressa dos animais em estudo

Número

|                      |     |
|----------------------|-----|
| <b>Nome</b>          |     |
| <b>Idade</b>         |     |
| <b>Sexo</b>          |     |
| <b>Raça</b>          |     |
| <b>Esterilização</b> | Sim |
|                      | Não |

|  |                       |  |
|--|-----------------------|--|
| <b>Origem</b>  | Apanhado na rua       |  |
|  | Oferecido à AAAAmoita |  |
|  | Nasceu na AAAAmoita   |  |
| <b>Ambiente<br/>(se oferecido)</b>                   | Exclusivamente casa   |  |
|  | Exclusivamente rua    |  |
|  | Misto                 |  |
| <b>Convívio<br/>anterior<br/>(se oferecido)</b>      | cães                  |  |
|  | gatos                 |  |
|  | exóticos              |  |
|  | não sabe              |  |
| <b>Tempo de<br/>convívio diário<br/>com o animal</b> | <2h                   |  |
|  | 2-6h                  |  |
|  | 6-8h                  |  |
|  | >8h                   |  |
| <b>Desparasitação</b>                                | Interna               |  |
|  | Externa               |  |
|  | Produto               |  |
|  | Última desparasitação |  |
| <b>Vacinação</b>                                     | Sim                   |  |
|  | Qual?                 |  |
|  | Não                   |  |
|  | Última vacinação      |  |

|  |                    |  |
|--|--------------------|--|
| <b>Depressão</b>                                     | Sim                |  |
|  | Não                |  |
| <b>Actividade</b>                                    | Muito activo       |  |
|  | Pouco activo       |  |
|  | Fraqueza           |  |
| <b>Dificuldades<br/>respiratórias</b>                | Sim                |  |
|  | Não                |  |
| <b>Peso</b>  | Mantém             |  |
|  | Perdeu             |  |
|  | Ganhou             |  |
| <b>Doenças<br/>diagnosticadas</b>                    | Quais              |  |
|  | Há quanto<br>tempo |  |
| <b>Tratamentos<br/>actuais</b>                       |                    |  |
| <b>Alimentação</b>                                   | Húmida             |  |
|  | Seca               |  |
|  | Mista              |  |
|  | Caseira            |  |
| <b>Anorexia</b>                                      | Sim                |  |
|  | Não                |  |
| <b>Dificuldades na<br/>preensão de<br/>alimentos</b> | Sim                |  |
|  | Não                |  |
| <b>Dificuldades na<br/>ingestão de água</b>          | Sim                |  |
|  | Não                |  |
| <b>Salivação</b>                                     | Sim                |  |
|  | Não                |  |
| <b>Halitose</b>                                      | Sim                |  |
|  | Não                |  |
| <b>Fezes</b>   | Normais            |  |
|  | Pastosas           |  |
|  | Diarreia           |  |

**ANEXO VI: Exame de estado geral efectuado a cada animal**

|               |  |
|---------------|--|
| <b>Número</b> |  |
| <b>Nome</b>   |  |
| <b>Idade</b>  |  |
| <b>Sexo</b>   |  |
| <b>Raça</b>   |  |

|                                |             |  |
|--------------------------------|-------------|--|
| <b>Condição física</b>         | Boa         |  |
|                                | Magro       |  |
|                                | Obeso       |  |
| <b>Estado do pêlo</b>          | Brilhante   |  |
|                                | Baço        |  |
| <b>Hidratação</b>              | Ok          |  |
|                                | Desidratado |  |
| <b>Arranhões/mordeduras</b>    | Sim         |  |
|                                | Não         |  |
| <b>Linfonodos</b>              | Normais     |  |
|                                | Aumentados  |  |
|                                | Quais?      |  |
| <b>Auscultação cardíaca</b>    | Normal      |  |
|                                | Taquicardia |  |
|                                | Arritmia    |  |
|                                | Sopro       |  |
|                                | Abafamento  |  |
| <b>Auscultação pulmonar</b>    | Normal      |  |
|                                | Taquipneia  |  |
|                                | Fervores    |  |
|                                | Sibilos     |  |
| <b>Palpação abdominal</b>      | Normal      |  |
|                                | Dolorosa    |  |
| <b>Alterações de locomoção</b> | Não         |  |
|                                | Quais?      |  |
| <b>Fraqueza muscular</b>       | Sim         |  |
|                                | Não         |  |
| <b>Temperatura rectal</b>      |             |  |

|                            |            |  |
|----------------------------|------------|--|
| <b>TRC</b>                 | <2seg.     |  |
|                            | >2seg.     |  |
| <b>Mucosas</b>             | Rosadas    |  |
|                            | Pálidas    |  |
|                            | Cianóticas |  |
|                            | Ictéricas  |  |
| <b>Úlceras orais</b>       | Quantas    |  |
|                            | Dimensão   |  |
| <b>Gengivite</b>           | Sim        |  |
|                            | Não        |  |
| <b>Tártaro</b>             | Sim        |  |
|                            | Não        |  |
| <b>Alterações oculares</b> |            |  |
| <b>Corrimento ocular</b>   | Sim        |  |
|                            | Não        |  |
| <b>Corrimento nasal</b>    | Sim        |  |
|                            | Não        |  |
| <b>Otite</b>               | Sim        |  |
|                            | Não        |  |

**ANEXO VII: Tabela de classificação de gengivite por graus. Adaptado de Gorrel (2004).**

| <b>Grau de gengivite</b> | <b>Descrição clínica</b>  |
|--------------------------|---|
| 0                        | Gengiva saudável  |
| 1                        | Gengivite ligeira: bordo gengival ligeiramente vermelho e inchado; sem sangramento                        |
| 2                        | Gengivite Moderada: bordo gengival vermelho e inchado; sangra à manipulação                               |
| 3                        | Gengivite grave: bordo gengival muito inchado e vermelho; hemorragia espontânea e/ou ulceração da gengiva |