

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



**FREQUÊNCIA DE HEMOPARASITAS EM CÃES E GATOS REFERENTE À
CASUÍSTICA DA REGIÃO DE LEIRIA, NO PERÍODO COMPREENDIDO ENTRE
JANEIRO DE 2015 E NOVEMBRO DE 2018**

BEATRIZ GOMES GUERRA

ORIENTADORA:

Dr^a Lara Filipa Ribeiro Antunes

COORDINADOR(A):

Doutora Solange Judite Roque Coelho

Alves Gil

2019

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

U LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



**FREQUÊNCIA DE HEMOPARASITAS EM CÃES E GATOS REFERENTE À
CASUÍSTICA DA REGIÃO DE LEIRIA, NO PERÍODO COMPREENDIDO ENTRE
JANEIRO DE 2015 E NOVEMBRO DE 2018**

BEATRIZ GOMES GUERRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor Virgílio da Silva Almeida

ORIENTADORA:

Dr^a Lara Filipa Ribeiro Antunes

VOGAIS:

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca Sampaio

Doutora Solange Judite Roque Coelho
Alves Gil

COORIENTADORA:

Doutora Solange Judite Roque Coelho
Alves Gil

2019

Anexo 3 – DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE OU DISSERTAÇÃO

Nome: Beatriz Gomes Guerra

Título da Tese ou Dissertação: Freqüência de hemoparasitas em cães e gatos referente à casuística da região de Leiria, no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2019

Designação do curso de
Mestrado ou de
Doutoramento: Mestrado integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Clínica Produção Animal e Segurança Alimentar
 Morfologia e Função Sanidade Animal

Declaro sob compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de 6 meses, 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três, retirando as que não interessam):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, ____ de _____ de 20 ____

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer à minha orientadora Dr^a Lara Antunes, por me ter dado a oportunidade de estagiar e de desenvolver as minhas capacidades médico-veterinárias no Hospital Veterinário de Leiria.

Quero agradecer à minha coorientadora Doutora Solange Gil, por me ter guiado nesta caminhada e auxiliado sempre que necessário.

Quero agradecer ao Laboratório Beatriz Godinho por me ter facultado com tamanha prontidão e rapidez as amostras necessárias para a realização do meu estudo.

Quero agradecer aos meus pais, a oportunidade que me deram de poder ingressar num curso Universitário. Ao longo de todo o meu percurso académico, sempre me apoiaram e é graças ao seu esforço que consegui realizar este sonho de seguir medicina veterinária.

Quero agradecer à minha irmã, por todo o apoio, pelas inúmeras vezes que me acompanhou nas viagens até Lisboa para a realização dos exames académicos e por me ter ajudado a manter no rosto sempre um sorriso mesmo em alturas mais difíceis.

Quero agradecer com um carinho especial ao meu namorado, Edgar Ferreira, que me acompanhou na fase mais complicada de todo o meu percurso académico, ouvindo os meus desabafos e ajudando me sempre a ver os problemas de uma perspetiva diferente.

Quero agradecer a todos os meus familiares, que desde o início deste percurso sempre me apoiaram.

Quero agradecer à minha grande companheira e amiga de faculdade, Brigitte Fonseca, por me ter acompanhado ao longo de todos estes anos de vida universitária, quer nas viagens para Lisboa, quer como companheira de casa e de estudo.

Quero agradecer às minhas amigas que estiveram sempre presentes durante estes anos de faculdade, por terem ajudado a tornar este caminho bem mais fácil de percorrer e por todos os bons momentos que passámos nestes anos de faculdade.

Quero agradecer ao meu amigo Diogo Pereira por me ter dado um apoio fundamental nesta última etapa da minha vida académica.

A todos os que tornaram este percurso possível, um enorme OBRIGADA!

RESUMO

Título: “Frequência de hemoparasitas em cães e gatos referente à casuística da região de Leiria, no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018”

Dentro do vasto grupo de doenças parasitárias que acometem os animais domésticos, as hemoparasitoses destacam-se pelas consequências em que se traduzem para os animais infetados, podendo mesmo em alguns casos chegar a ser fatais. Acresce ainda o facto, de que a grande maioria das infeções são zoonóticas, tratando-se então o problema não só de saúde veterinária como também de saúde pública.

O recurso a medidas de prevenção e profilaxia revelam-se fundamentais no controlo dos vetores e principalmente dos hemoparasitas, evitando-se assim a longo prazo consequências devastadoras tanto para os animais como para os próprios donos.

O estudo apresentado incidiu sobre os hemoparasitas detetados na região de Leiria no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018, nomeadamente, *Babesia* spp., *Dirofilaria* spp., *Ehrlichia* spp., *Hepatozoon* spp., *Leishmania* spp., *Mycoplasma* spp. e *Rickettsia* spp.

Os objetivos principais do estudo foram determinar qual a hemoparasitose encontrada com maior frequência na região de Leiria, qual a espécie, *Canis lupus familiaris* ou *Felis silvestris catus*, com maior frequência de infeção, realizar uma análise ao sexo e idade dos animais com hemoparasitas e tendo o animal contraído a infeção, quais os sinais clínicos mais característicos das hemoparasitoses. Para o efeito, recorreu-se a 582 análises do Laboratório Beatriz Godinho e a 19 casos clínicos do Hospital Veterinário de Leiria.

Com o estudo, concluiu-se que na região de Leiria, em cada 100 animais domésticos, nomeadamente cães e gatos, cerca de 14 estão infetados por hemoparasitas, sendo a espécie *Ehrlichia* spp. a que predomina, face aos restantes hemoparasitas, e sendo os gatos do sexo masculino o grupo mais frequentemente infetado.

Palavras-Chave: Doenças parasitárias, Hemoparasitas, Zoonoses, Leiria.

ABSTRACT

Title: “Frequency of hemoparasites in dogs and cats relative to the casuistic in the region of Leiria, between January 2015 and November 2018”

Compared to other parasitic diseases that affect domestic animals, hemoparasitic diseases deserve particular attention due to the kind of health consequences they can cause to infected animals, which can in some cases be fatal. Adding to this, the fact that the great majority of infections are zoonotic reveals that it is not only a matter of animal health, but of public health as well.

The recourse to prophylaxis proves as the most reliable way of controlling vectors and blood parasites, resulting in a prevention of devastating long term consequences to both animals and their owners.

This study focuses on blood parasites that are found in the region of Leiria between January 2015 and November 2018, these being *Babesia* spp., *Dirofilaria* spp., *Ehrlichia* spp., *Hepatozoon* spp., *Leishmania* spp., *Mycoplasma* spp. and *Rickettsia* spp.

The main purpose of this review was to determine which hemoparasitosis is most commonly found in the region of Leiria, finding out which one of the two reviewed species reveal the greatest rates of infection, carry out an analysis on sex and age of the infected animals and verify what are the most characteristic clinical signs of blood parasites after having contracted the infection.

To reach these results, 582 blood-tests from Laboratório Beatriz Godinho and 19 clinical cases of Hospital Veterinário de Leiria were reviewed.

The findings of this review reveal that in the region of Leiria around 14 out 100 domestic animals are infected with blood parasites, *Ehrlichia* spp. being the predominating one compared to other hemoparasites and shows that male felines to be the group with the most commonly infected.

Key-Words: Parasitic diseases, Blood parasites, Zoonosis, Leiria.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
ÍNDICE DE TABELAS.....	12
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS.....	15
Capítulo I-RELATÓRIO DE ESTÁGIO.....	16
Capítulo II-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. <i>BABESIA</i> SPP.	
2.1 Caracterização geral.....	17
2.2 Ciclo de vida.....	18
2.3 Epidemiologia.....	19
2.4 Sinais Clínicos.....	20
2.5 Diagnóstico.....	21
2.6 Tratamento.....	22
3. <i>DIROFILARIA</i> SPP.	
3.1 Caracterização geral.....	23
3.2 Ciclo de vida.....	24
3.3 Epidemiologia.....	25
3.4 Sinais Clínicos.....	27
3.5 Diagnóstico.....	28
3.6 Tratamento.....	30
4. <i>EHRlichia</i> SPP.	
4.1 Caracterização geral.....	31
4.2 Ciclo de vida.....	32
4.3 Epidemiologia.....	33
4.4 Sinais Clínicos.....	33
4.5 Diagnóstico.....	35
4.6 Tratamento.....	36

5. <i>HEPATOZOON SPP.</i>	
5.1 Caracterização geral.....	37
5.2 Ciclo de vida.....	37
5.3 Epidemiologia.....	38
5.4 Sinais Clínicos.....	39
5.5 Diagnóstico.....	40
5.6 Tratamento.....	41
6. <i>LEISHMANIA SPP.</i>	
6.1 Caracterização geral.....	42
6.2 Ciclo de vida.....	43
6.3 Epidemiologia.....	44
6.4 Sinais Clínicos.....	46
6.5 Diagnóstico.....	47
6.6 Tratamento.....	49
7. <i>MYCOPLASMA SPP.</i>	
7.1 Caracterização geral.....	50
7.2 Ciclo de vida.....	51
7.3 Epidemiologia.....	51
7.4 Sinais Clínicos.....	52
7.5 Diagnóstico.....	53
7.6 Tratamento.....	54
8. <i>RICKETTSIA SPP.</i>	
8.1 Caracterização geral.....	54
8.2 Ciclo de vida.....	55
8.3 Epidemiologia.....	56
8.4 Sinais Clínicos.....	57
8.5 Diagnóstico.....	58
8.6 Tratamento.....	59
9. MEDIDAS DE PREVENÇÃO E PROFILAXIA.....	60

Capítulo III- Estudo frequência de hemoparasitas e cães e gatos, referente à casuística da região de Leiria, no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018

1. OBJECTIVOS.....	61
2. MATERIAL E MÉTODOS	
2.1 Caracterização da amostra.....	62
2.2 Animais Testados.....	62
2.3 Método laboratorial.....	62
2.4 Limitações do Estudo.....	64
3. RESULTADOS	
3.1 Laboratório Beatriz Godinho.....	64
3.2 Hospital Veterinário de Leiria.....	70
4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	72
5. CONCLUSÃO.....	76
IV.BIBLIOGRAFIA.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I- Distribuição geográfica de <i>Babesia</i> spp. em cães, na Europa, tendo como base maioritariamente análise molecular.....	20
Figura II- Distribuição de Leishmaniose devido a <i>Phlebotomus</i> spp. na Europa.....	45

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I: Resultados obtidos das 582 análises do Laboratório Beatriz Godinho.....	64
Tabela II: Frequência relativa de hemoparasitas na região de Leiria, tanto em cães como em gatos, tendo em conta uma amostra de 582 análises.....	64
Tabela III: Frequência relativa de hemoparasitas em cães e em gatos na região de Leiria, tendo em conta uma amostra de 582 análises.....	64
Tabela IV: Frequência de hemoparasitas em cães na região de Leiria, tendo em conta uma amostra de 51 casos, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018.....	65
Tabela V: Análise do sexo de cães infetados com hemoparasitas na região de Leiria, tendo em conta uma amostra de 51 casos, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018.....	65
Tabela VI: Análise da idade em cães infetados com hemoparasitas na região de Leiria, tendo em conta a amostra do Laboratório Beatriz Godinho, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018.....	66
Tabela VII: Frequência de hemoparasitas em gatos na região de Leiria, tendo em conta uma amostra de 32 casos, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018.....	67
Tabela VIII: Análise do sexo em gatos infetados com hemoparasitas tendo em conta uma amostra de 32 casos, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018.....	68
Tabela IX: Análise da idade em gatos infetados com hemoparasitas tendo em conta uma amostra de 32 casos, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018.....	69
Tabela X: Casos positivos e Técnica Laboratorial de diagnóstico do Hospital Veterinário de Leiria.....	70
Tabela XI: Frequência absoluta de hemoparasitas dos 19 casos positivos em cães do Hospital Veterinário de Leiria.....	70

Tabela XII: Sintomas observados em exame clínico dos 19 casos clínicos de cães recolhidos do Hospital Veterinário de Leiria no período compreendido entre janeiro de 2015 e agosto de 2018.....70

Tabela XIII: Alterações no Hemograma e Leucograma dos 19 casos clínicos de cães recolhidos do Hospital Veterinário de Leiria no período compreendido entre janeiro de 2015 e agosto de 2018.....71

Tabela XIV: Alterações nas análises bioquímicas dos 19 casos clínicos de cães recolhidos do Hospital Veterinário de Leiria no período compreendido entre janeiro de 2015 e agosto de 2018.....72

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico I: Representação gráfica da frequência relativa de hemoparasitas em cães na região de Leiria, tendo em conta uma amostra de 51 casos, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018.....65

Gráfico II: Representação gráfica da análise do sexo de cães infetadas com hemoparasitas na região de Leiria, tendo em conta uma amostra de 51 casos, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018.....66

Gráfico III: Representação gráfica da análise da idade em cães infetados com hemoparasitas, tendo em conta a amostra do Laboratório Beatriz Godinho, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018.....67

Gráfico IV: Representação gráfica da frequência de hemoparasitas em gatos na região de Leiria, tendo em conta uma amostra de 32 casos, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018.....68

Gráfico V: Representação gráfica da frequência relativa de gatos machos versus fêmeas, infetados com hemoparasitas na região de Leiria, tendo em conta uma amostra de 32 casos, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018.....68

Gráfico VI: Representação gráfica da análise de gatos infetados com hemoparasitas na região de Leiria, tendo em conta uma amostra de 32 casos, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018.....69

ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

ALT- Alanina aminotransferase

ALP- Fosfatase Alcalina

AST- Aspartato aminotransferase

ANA- Anticorpos Anti-nucleares

BID- A cada 12 horas, duas vezes ao dia

BUN- “Blood urea nitrogen”- Azoto ureico no sangue

DNA- “Deoxyribonucleic acid” - Ácido desoxirribonucleico

ELISA- “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” -Ensaio de imunoabsorção Enzimática

FELV- “Feline leukemia virus” - Virus da leucemia felina

FIV- “Feline immunodeficiency virus” - Virus da imunodeficiência felina

g- Grama

HARD- “Heartworm associated Respiratory Disease” - Dirofilariose associada a doença respiratória

IgA- Imunoglobulina A

IgG- Imunoglobulina G

IgM- Imunoglobulina M

IM- Intramuscular

IV- Intravenosa

L- Litro

ml- Mililitro

PBS- “Phosphate buffered saline”-Tampão fosfato-salino

PCR- “Polymerase Chain Reaction” - Reação de polimerase em cadeia

PO- Posologia Oral

RFLP- “Restriction fragment length polymorphism” -Polimorfismo de comprimento de fragmento de limitação

SC- Subcutânea

SID- A cada 24 horas, uma vez por dia

TID- A cada 8 horas, três vezes ao dia

µm- Micrómetro

Capítulo I- RELATÓRIO DE ESTÁGIO

Realizei o meu estágio curricular na área de clínica de pequenos animais no Hospital Veterinário de Leiria no período compreendido entre 26 de fevereiro a 29 de junho de 2018, tendo realizado previamente no mesmo hospital veterinário um estágio extracurricular de 2 de outubro de 2017 a 12 de janeiro de 2018.

O hospital disponibiliza como serviços, consultas de pequenos animais, vacinação, análises clínicas, internamentos, radiologia, ecografia, cirurgia e ortopedia, tendo eu ao longo do estágio tido a possibilidade de participar em todas as áreas referenciadas.

Maioritariamente participei em consultas de carácter geral, as quais exigiam quase sempre a obtenção de imagens radiográficas, como tal, auxiliei na sua obtenção, vacinações, principalmente primo-vacinações, auxiliei também na recolha de sangue para hemograma e na realização de análises bioquímicas, assim como forneci apoio aos internamentos do hospital, nomeadamente colocação e mudança de cateteres e de sistemas de soros nos animais internados, preparação e administração (via endovenosa, via oral, via intramuscular ou via subcutânea) da medicação necessária, no fornecimento da alimentação e na realização de passeios aos animais internados.

O hospital disponha de quatro internamentos, um de cães, um de gatos e uma unidade de infetocontagiosas com duas salas de internamento, uma para cães e uma para gatos. Assim sendo, tive oportunidade durante o estágio curricular de desenvolver competências na área de animais infetocontagiosos, nomeadamente, no que se refere ao uso correto de equipamento de proteção individual, correto manuseamento de pacientes infetocontagiosos, assim como, métodos de desinfeção e esterilização adequados em casos de infeções contagiosas.

No que diz respeito à área cirúrgica desempenhei tarefas maioritariamente como anestesista, preparava e administrava (via intramuscular) a pré-medicação ao animal sobre o qual se iria proceder a realização da cirurgia, preparava o animal para o bloco operatório procedendo à devida assepsia do campo cirúrgico e era responsável pela monitorização anestésica do animal durante o decorrer do procedimento cirúrgico em causa, controlo da frequência cardíaca, da frequência respiratória, da capnometria, oximetria de pulso, da tensão arterial, da fluidoterapia e dos reflexos oculares. Participei, maioritariamente em ovariohisterectomias, castrações, laparotomias e cirurgias ortopédicas.

Considero que a realização do estágio curricular foi fundamental para o desenvolvimento de competências práticas principalmente na área clínica, porém gostaria de ter tido oportunidade de ter tido um papel mais ativo nas atividades próprias da profissão.

Capítulo II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUÇÃO

A detecção de organismos patogénicos associados a vetores constitui um desafio constante tanto para veterinários como para investigadores (Mascarelli et al. 2016). O vasto conjunto de organismos patogénicos, como sejam protozoários, bactérias, vírus, o seu comportamento biológico distinto, a sua diferente distribuição e o largo espectro de sinais clínicos, contribuem para a dificuldade associada com o diagnóstico de doenças transmitidas por vetores (Mascarelli et al. 2016). Um único ixodídeo pode funcionar como vetor para múltiplos agentes patogénicos, pelo que, a ocorrência de infeções simultâneas com diferentes organismos é possível (Rautenbach et al. 2018).

Os animais carnívoros selvagens são do ponto de vista epidemiológico relevantes tanto na área veterinária, como na zoonótica não só devido à sua proximidade filogenética com os cães e os gatos, o que favorece a transmissão de agentes patogénicos entre espécies, sendo que os carnívoros selvagens atuam muitas vezes como hospedeiros reservatórios, assim como, alguns carnívoros demonstram um comportamento antropofílico, o qual facilita a transmissão de agentes patogénicos para o ser humano e respetivamente para os seus animais domésticos (Millán et al. 2018).

Os gatos são por natureza animais mais resistentes a infeções que os cães, já que têm uma suposta resistência inata ou adaptação a infeções, sendo por isso provavelmente menos predispostos a infeções transmitidas por ixodídeos, tendo assim uma menor prevalência de hemoparasitas quando comparados com os cães (Correa et al. 2011). No entanto, a natureza inespecífica dos sinais clínicos nos gatos infetados, associada à baixa sensibilidade e especificidade da técnica de esfregaço sanguíneo podem estar na origem do subdiagnóstico de infeções parasitárias nesta espécie (Correa et al. 2011). O facto de existirem poucos relatos sobre biologia molecular no diagnóstico de hemoparasitas em gatos no mundo, contribui também para o subdiagnóstico de infeções parasitárias que se observa na espécie (Correa et al. 2011).

2. *BABESIA* SPP.

2.1 Caracterização Geral

Babesia spp. é um protozoário pertencente à ordem *Piroplasmida*, ao filo Apicomplexa, e à classe *Sporozoasida*, que infecta e conseqüentemente se multiplica nos eritrócitos (Barr and Bowman 2012), principalmente os eritrócitos jovens (Fonseca et al. 2010), de um vasto conjunto de mamíferos, nomeadamente, seres humanos, ruminantes, equinos e carnívoros (Beugnet and Guillot 2018).

A infecção ocorre quando o parasita se encontra no estágio de merozoito despoletando lise nos eritrócitos ou lesão celular de origem imunomediada (Barr and Bowman 2012). A infecção pode ser originada por picada de um ixodídeo infetado, por via transplacentária ou ainda por transfusão sanguínea de um animal que esteja infetado pelo parasita (Barr and Bowman 2012). O período de incubação é de aproximadamente 2 semanas (Barr and Bowman 2012).

Nos cães podemos encontrar dois grandes grupos de *Babesia* spp., as de grandes dimensões, entre 3 a 5,5 µm, e as de pequenas dimensões, inferiores a 3 µm (Beugnet and Guillot 2018). Dentro do grupo de babesias de grandes dimensões encontram-se três espécies, *Babesia vogeli*, *Babesia rossi*, *Babesia canis* (Solano-Gallego et al. 2016) frequentes em algumas zonas da Ásia e sendo as que predominam na Europa (Barr and Bowman 2012). Do grupo de babesias de pequenas dimensões fazem parte as espécies *Babesia gibsoni*, *Babesia Conradae*, *Babesia annae*, também conhecida por *Theileria*, (Barr and Bowman 2012; Solano-Gallego et al. 2016) e *Babesia microti-like* (Cardoso et al. 2013).

Nos gatos a espécie mais encontrada é a *Babesia felis* pertencendo ao grupo de *babesias* de pequenas dimensões, com cerca de 2 a 5 µm (Barr and Bowman 2012).

A espécie *Babesia rossi* é a que apresenta maior patogenicidade causando uma grave e geralmente fatal síndrome hemolítica (Cardoso et al. 2013). A espécie *Babesia canis*, apesar de ser menos patogénica que a espécie *Babesia rossi*, apresenta, contudo, patogenicidade moderada a grave (Simões et al. 2011). A espécie *Babesia vogeli*, é a espécie com menor patogenicidade (Simões et al. 2011).

2.2 Ciclo de vida

Os ixodídeos, vetores de *Babesia* spp., são mais ativos durante o Inverno, com atividade aumentada durante os meses de outubro a março, caso o Inverno não seja demasiado rigoroso (Solano-Gallego et al. 2016). O ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus* é frequentemente encontrado em zonas mediterrânicas, demonstrando preferência por zonas de clima temperado, porém consegue também tolerar temperaturas mais baixas, como as das regiões centrais da Europa e das ilhas Britânicas (Solano-Gallego et al. 2016). É espectável também que em torno das margens dos rios, locais com concentração elevada de carnívoros, sejam frequentes as infestações por ixodídeos adultos, atingindo o pico da infestação entre os meses de maio a agosto (Solano-Gallego et al. 2016).

Nos ixodídeos, a infecção transovariana garante a transmissão de geração em geração do hemoparasita, tanto no estágio larvar, como no estágio de ninfa e de adulto (Fonseca et al. 2010). O estado larvar aparece nos hospedeiros no Verão, com a última fase do desenvolvimento a acontecer entre agosto e setembro (Solano-Gallego et al. 2016). A fase

de hibernação ocorre tanto na fase de ingurgitação da ninfa ou no adulto recém-formado (Solano-Gallego et al. 2016).

No ixodídeo, mais concretamente no seu lúmen intestinal numa primeira fase e no hemocele numa segunda fase, ocorre a conjugação sexual assim como a fase de esporozoítos do ciclo de vida de *Babesia* spp. (Solano-Gallego et al. 2016). Aquando da refeição sanguínea do ixodídeo o hemoparasita é transmitido da glândula salivar deste ao seu novo hospedeiro vertebrado (Solano-Gallego et al. 2016).

No hospedeiro vertebrado, ao nível dos glóbulos vermelhos, a *Babesia* spp. completa o seu ciclo de vida recorrendo a reprodução assexuada, originando merozoítos (Solano-Gallego et al. 2016). A infeção ocorre quando o parasita se encontra no estágio de merozoito despoletando lise nos eritrócitos ou lesão celular de origem imunomediada (Barr and Bowman 2012).

2.3 Epidemiologia

Nas últimas décadas devido à expansão geográfica do principal vetor de *Babesia* spp., *Dermacentor reticulatus* (Barr and Bowman 2012), o qual se deve em grande parte ao aumento da mobilidade dos cães, o que promove a circulação do vetor e a sua dispersão para áreas geográficas onde anteriormente não era endémico (Simões et al. 2011), o número de casos clínicos de babesiose aumentaram a nível global, principalmente na Europa Central (Barr and Bowman 2012).

Das três espécies de grandes dimensões, a *Babesia vogeli* é frequentemente encontrada nos EUA, em África, na Ásia, na Austrália (Barr and Bowman 2012) e na Europa (Solano-Gallego et al. 2016), a *Babesia rossi* é encontrada principalmente em África, e por fim, a *Babesia canis*, é frequente em algumas zonas da Ásia e sendo a que predomina na Europa (Barr and Bowman 2012; Solano-Gallego et al. 2016).

O ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus*, o qual apresenta distribuição geográfica mundial, é o principal vetor de *Babesia vogeli* (Beugnet and Guillot 2018). A espécie *Babesia canis* tem como principal vetor o ixodídeo *Dermacentor reticulatus*, sendo este o principal transmissor do hemoparasita a nível Europeu (Beugnet and Guillot 2018). A espécie *Babesia rossi* tem como principal vetor o ixodídeo *Haemaphysalis elliptica* (Beugnet and Guillot 2018).

Dentro do grupo das babesias de pequenas dimensões, a *Babesia gibsoni* apresenta uma distribuição mundial, (Barr and Bowman 2012) sendo o seu principal vetor o ixodídeo *Haemaphysalis longicornis* (Beugnet and Guillot 2018), a *Babesia Conradae* é específica da Califórnia e a *Babesia annae* (Barr and Bowman 2012), cujo vetor principal é o *Ixodes hexagonus* (Beugnet and Guillot 2018), é maioritariamente encontrada em Espanha (Barr and Bowman 2012).

A babesiose canina é endémica no norte de Portugal, 96% dos casos, da doença, caracterizados molecularmente, foram infetados com *Babesia canis* e apenas 4% com *Babesia vogeli* (Simões et al. 2011).

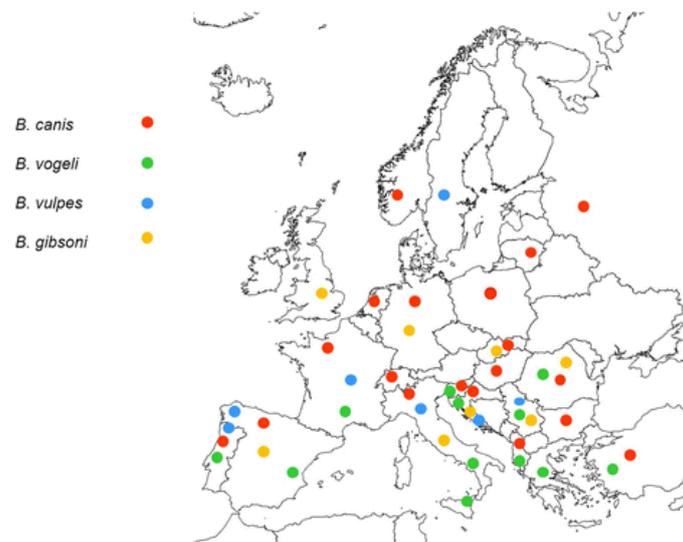


Figura I: Distribuição geográfica de *Babesia* spp. em cães, na Europa, tendo como base maioritariamente análise molecular. Destaque para a maior concentração de *Babesia vogelis* na zona mediterrânica assim como de *Babesia canis* nas regiões de clima mais frio, norte e centro da Europa (adaptado de Solano-Gallego and Baneth 2011)

2.4 Sinais Clínicos

Na grande maioria dos casos, o período de incubação de todos os piroplasmas é de aproximadamente uma semana, contudo pode variar de 2 a 3 dias até 10 a 15 dias, dependendo do estado do sistema imunitário do hospedeiro (Beugnet and Guillot 2018).

A babesiose pode ser classificada em babesiose pré-aguda, babesiose aguda, babesiose crónica e babesiose assintomática (Fonseca et al. 2010; Barr and Bowman 2012).

A forma clássica da doença, a forma aguda, é a mais comum, aparecendo em mais de 50% dos casos (Beugnet and Guillot 2018). Esta é definida por alterar o comportamento do animal, apresentando-se este mais deprimido, prostrado e com tendência a ignorar os estímulos (Beugnet and Guillot 2018). Observa-se também anorexia e picos de hipertermia, com temperaturas mínimas de 40° C durante pelo menos 48 horas, combinadas com taquicardia e polipneia e encontrando-se ainda presentes sinais hemolíticos (Beugnet and Guillot 2018). Dentro dos sinais hemolíticos destaca-se anemia, nomeadamente uma anemia hemolítica regenerativa (Fonseca et al. 2010), alterações hematológicas, com diminuição dos eritrócitos, presença de eritroblastos, ocasionalmente leucopenia e trombocitopenia, bem como linfocitose (Beugnet and Guillot 2018).

Nas primeiras 24 horas, as alterações observadas são trombocitopenia, eosinopenia, linfopenia (Beugnet and Guillot 2018). Após as 24 horas persiste a trombocitopenia e a

eosinopenia, a anemia, a linfocitose e a monocitose (Beugnet and Guillot 2018). Na doença observa-se também esplenomegalia (Simões et al. 2011), linfadenopatia, hemoglobinemia, hemoglobinúria, icterícia, associada à presença de infecção aguda com intensa hemólise intravascular, e sinais gastrointestinais, tais como, vômito, diarreia e melena (Barr and Bowman 2012).

Na forma aguda da doença pode se observar ainda aumento da ureia, da creatinina, da ALT e da ALP, o que pode indicar o início de insuficiência hepática e/ou renal (Beugnet and Guillot 2018).

A forma crónica da doença pode surgir num animal que tenha sido previamente diagnosticado e tratado para a babesiose, aparecendo aproximadamente 15 dias após o fim do tratamento, como um novo pico de parasitemia, idêntico ao primeiro (Beugnet and Guillot 2018). Este segundo episódio da doença revela melhorias clínicas ao tratamento (Beugnet and Guillot 2018). Estas recaídas sucessivas são da responsabilidade de um mecanismo imunitário de evasão, ou relacionadas com incorreto funcionamento do sistema imunitário, permitindo que a *Babesia* spp. se multiplique mesmo após a destruição dos piroplasmas (Beugnet and Guillot 2018). Outra possível manifestação da forma crónica da doença é observada num animal que apresente anemia crónica, cujo teste ao parasita é sempre negativo, mas em que os sinais clínicos tendem a melhorar após a administração de piroplasmicidas (Beugnet and Guillot 2018).

Os animais mais jovens, uma vez que são mais sensíveis, tendem a apresentar uma forma mais grave da doença (Fonseca et al. 2010).

Na babesiose tende a ocorrer imunossupressão o que leva conseqüentemente ao aumento da parasitemia e ao aparecimento de manifestações clínicas em animais que apresentem infecção crónica (Barr and Bowman 2012). Podem observar-se também alterações da locomoção, como sejam, alterações na marcha, dor nas articulações, parésia, paralisia e ataxia (Beugnet and Guillot 2018). Alterações oculares e cerebrais como, convulsões, nistagmus, anisocoria, alterações comportamentais e coma também podem ocorrer (Beugnet and Guillot 2018).

2.5 Diagnóstico

Como meios de diagnóstico de eleição de babesiose temos o hemograma, bioquímicas, esfregaço sanguíneo, PCR, Imunofluorescência e o teste de Coombs (Barr and Bowman 2012).

Devido às diferenças na patogenicidade das espécies de *Babesia* spp., informação relativa à distribuição geográfica das diferentes espécies assim como, a prevalência destes agentes, revela-se fundamental para o diagnóstico do hemoparasita bem como para gerir cada caso individualmente (Simões et al. 2011).

No hemograma de um animal infetado pelo protozoário *Babesia* spp. é frequente estar presente anemia regenerativa moderada a severa, havendo no entanto casos em que não se observa anemia, como por exemplo situações pré-agudas em que não houve tempo para o organismo se ajustar à infecção (Barr and Bowman 2012). Frequentemente também se deteta trombocitopenia moderada e em alguns casos mesmo grave e de forma mais inespecífica, tanto se pode detetar leucocitose como leucopenia (Barr and Bowman 2012).

Com a realização de bioquímicas ou urianálises a estes animais é de esperar encontrar hiperbilirrubinémia e hiperbilirrubinúria quando já se está perante casos de hemólise aguda e severa (Barr and Bowman 2012). Hiperglobulinemia é um achado comum em casos de infecção crónica, sendo que se poderá encontrar também aumento das enzimas hepáticas, quando presente anemia e hipoxia, e em casos de infecção pelo protozoário *Babesia canis rossi* as bioquímicas podem revelar falência renal assim como, acidose metabólica (Barr and Bowman 2012).

O diagnóstico deve ser confirmado, quer seja diretamente através de esfregaço sanguíneo com observação do parasita, quer seja com recursos a testes serológicos, revelando anticorpos através de métodos como ELISA e imunofluorescência indireta, ou através de PCR em amostras sanguíneas (Beugnet and Guillot 2018).

O esfregaço sanguíneo é útil para distinguir espécies de grandes dimensões de pequenos piroplasmas intra-eritrócitários, porém mecanismos de diagnóstico molecular, tais como PCR e sequenciação de DNA, constituem métodos mais sensíveis, que providenciam uma deteção mais detalha da espécie, subespécie e dos níveis de genótipo (Simões et al. 2011).

Microscopicamente a deteção baseia-se no caso específico da *Babesia canis*, na observação dos grandes piroplasmas com a forma piriforme dentro dos eritrócitos assim como de formas anelares do parasita, ao passo que a espécie *Babesia gibsoni* é mais pequena e são encontradas formas singulares nos eritrócitos (Barr and Bowman 2012).

2.6 Tratamento

A abordagem terapêutica de um animal com babesiose deve ter em conta o estado do animal ao exame clínico, sendo que, caso este apresente um grau de anemia grave deverá ser ponderada a realização de uma transfusão sanguínea ou uma transfusão de eritrócitos (Barr and Bowman 2012). Alguns pacientes requerem também a realização de fluidoterapia, a qual é fundamental em casos de choque hipovolémico (Barr and Bowman 2012). Após a estabilização do paciente inicia-se então a administração da terapêutica específica para a doença (Barr and Bowman 2012).

Para a babesiose a terapia de eleição é o dipropionato de imidocarb (Fonseca et al. 2010), tendo uma elevada taxa de sucesso na completa eliminação do protozoário do

hospedeiro, diminuindo ainda a taxa de mortalidade e de morbidade (Barr and Bowman 2012). O imidocarb tem uma elevada eficácia contra as espécies de *Babesia* de grandes dimensões e tem menor eficácia em pequenos piroplasmas (Beugnet and Guillot 2018). O tratamento realiza-se através da administração SC ou IM do medicamento numa dose mínima de 3 mg de imidocarb/kg de peso corporal em dose única até um máximo de 7mg/Kg em casos de reincidências (Fonseca et al. 2010; Beugnet and Guillot 2018). Após a administração da injeção o animal deve ficar em observação já que são frequentes reações secundárias como, hipersalivação, aumento da lacrimação, corrimento nasal, tremores, diarreia, vômito, edema periorbital e por vezes reações anafiláticas, que podem eventualmente conduzir à morte do animal (Barr and Bowman 2012). Poderá administra-se para diminuir estes efeitos secundários um pré-tratamento com sulfato de atropina na dose de 0,02 a 0,04 mg/kg IV (Fonseca et al. 2010). O parasita é capaz de se evadir ao tratamento, observando-se frequentemente recaídas ao fim de 10 dias, o que requer uma segunda injeção do fármaco (Beugnet and Guillot 2018).

Pode-se recorrer ainda para o tratamento da babesiose aos antibióticos metronidazol, clindamicina e doxiciclina já que estes diminuem os sinais clínicos e provocam a redução do parasita até valores inferiores aos necessários para a sua deteção por PCR, no entanto, não eliminam por completo o protozoário, o que propicia o aparecimento de reinfeções (Barr and Bowman 2012).

Por vezes associa-se ainda ao tratamento prednisolona para ajudar no tratamento da componente imunomediada da anemia (Barr and Bowman 2012). Aproximadamente 36 horas após a administração da injeção, o comportamento, apetite e temperatura do animal retornam ao normal (Beugnet and Guillot 2018).

O tratamento de espécies de *Babesia* de pequenas dimensões é mais difícil, pelo que a terapêutica passa pela combinação de vários fármacos, especialmente para a espécie *Babesia Gibsoni* (Beugnet and Guillot 2018). Um protocolo terapêutico a seguir no tratamento de pequenas babesioses poderá ser, por exemplo, diminazeno, na dose de 3,5 mg/Kg IM em dose única, combinado com imidocarb, na dose de 6mg/Kg em dose única, 24 horas após a administração de diminazeno, e por último clindamicina, na dose de 30mg/Kg BID durante 40 a 60 dias (Beugnet and Guillot 2018).

3. DIROFILARIA SPP.

3.1 Caracterização geral

A dirofilariose é originada pelo helminte *Dirofilaria* spp., um nemátode da ordem Spirurida e da família Onchocercidae (Meireles et al. 2014).

Das doenças zoonóticas transmitidas por mosquitos a *Dirofilaria* spp., nomeadamente a *Dirofilaria immitis* e a *Dirofilaria repens*, desempenham um papel bastante importante para a saúde pública (Capelli et al. 2018; Genchi et al. 2019).

A dirofilariose afeta cães, no entanto, também pode afetar gatos (Genchi et al. 2019) de forma acidental (Meireles et al. 2014) principalmente em áreas enzoóticas, assim como mustelídeos, como são exemplo as doninhas, leões marinhos e focas (Beugnet and Guillot 2018). Os gatos são menos suscetíveis que os cães, pelo que, quando o risco de infeção é elevado, a prevalência em gatos é cerca de cinco vezes menor do que a prevalência da infeção em cães (Beugnet and Guillot 2018).

As espécies *Dirofilaria immitis* e *Dirofilaria repens* são nemátodes filaróides, caracterizados por um corpo fino e alongado, com uma região anterior simples, sem cápsula e cuja região posterior, também simples, não apresenta bolsa copuladora, sendo torcida e encaracolada nos machos (Beugnet and Guillot 2018). As fêmeas depositam microfilárias no sangue com aproximadamente 300 µm de comprimento e 6 µm de diâmetro (Beugnet and Guillot 2018).

A *Dirofilaria* spp. é reconhecida como agente zoonótico emergente no continente Europeu (Sauda et al. 2018; Genchi et al. 2019).

A espécie *Dirofilaria immitis* provoca no hospedeiro, carnívoros e ocasionalmente humanos, doença com um quadro bastante grave (Capelli et al. 2018).

Nos cães a espécie *Dirofilaria repens* é o agente etiológico da dirofilariose subcutânea ao passo que a espécie *Dirofilaria immitis* é a grande responsável pela dirofilariose cardiopulmonar (Sauda et al. 2018).

3.2 Ciclo de vida

A *Dirofilaria* spp. é transmitida por um hospedeiro intermediário culicídeo, nomeadamente, *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* (Meireles et al. 2014).

Os parasitas adultos de *Dirofilaria immitis* alojam-se na artéria pulmonar (Barr and Bowman 2012) e no ventrículo direito (Meireles et al. 2014; Beugnet and Guillot 2018) ao passo que, os parasitas adultos da espécie *Dirofilaria repens* se localizam no hospedeiro ao nível do tecido subcutâneo e/ou do tecido intramuscular (Capelli et al. 2018). Quando se verifica a presença de um vasto número de parasitas, os nemátodes podem ser encontrados na veia cava posterior causando hemólise aguda, conhecida como, síndrome da veia cava (Beugnet and Guillot 2018). Localizações erráticas já foram descritas, nomeadamente ao nível da câmara anterior do olho, tecido subcutâneo, medula espinhal, entre outros (Beugnet and Guillot 2018).

As fêmeas de *Dirofilaria repens* são vivíparas e assim que cruzam, as microfilárias são libertadas para o sangue sendo posteriormente ingeridas por várias espécies de mosquitos,

os quais constituem o hospedeiro intermediário, durante a sua alimentação (Meireles et al.; 2014, Capelli et al. 2018). Após as microfilárias terem sido ingeridas vão migrar do intestino do mosquito para os túbulos de Malpighian através do hemocele do inseto (Meireles et al. 2014; Capelli et al. 2018). Nos túbulos de Malpighian as microfilárias sofrem maturação, passam a larvas L1 e após cerca de 4 dias atingem o segundo estado larvar (Beugnet and Guillot 2018). Por volta do décimo dia, as larvas L2 atingem o terceiro estado larvar (Beugnet and Guillot 2018), passando a larvas L3, estas com capacidade infetante (Capelli et al. 2018). De seguida as formas larvares L3 saem dos túbulos de Malpighi e migram pelas cavidades do corpo e pelo tórax até à cabeça e ao probóscide, onde ficam a aguardar até serem transmitidos a outro hospedeiro (Capelli et al. 2018). Apenas L3 transmitidas por mosquitos se tornam filárias adultas (Beugnet and Guillot 2018). Quando o mosquito pica o hospedeiro definitivo a probóscide dobra e as larvas L3 são transferidas para o local da picada (Beugnet and Guillot 2018) e penetram na ferida (Meireles et al. 2014). Após penetrarem na ferida as larvas L3 deslocam-se para o tecido subcutâneo onde ficam cerca de 60 a 80 dias, durante os quais passam ao quarto estado larvar, ao fim de 10 dias, e sofrem maturação para pré-adultos por volta do 60º dia (Beugnet and Guillot 2018). Estes pré-adultos têm aproximadamente 2 a 5 cm de comprimento e deslocam-se através da circulação sanguínea para o átrio e ventrículo direito do coração (Beugnet and Guillot 2018). De seguida vão alojar-se na artéria pulmonar por volta do 80º dia e mantém-se nesta durante aproximadamente 7 semanas, voltando de seguida, novamente, para o ventrículo por migração retrógrada, onde ficam adultos e acasalam (Beugnet and Guillot 2018). Em casos de grande infestação alguns pré-adultos podem manter-se na artéria pulmonar (Beugnet and Guillot 2018).

O período pré-patente tem uma elevada duração podendo demorar 6 a 7 meses, (Barr and Bowman 2012) ou em alguns casos ainda mais (Beugnet and Guillot 2018).

Os adultos podem sobreviver durante muitos anos, 4 a 5 anos, porém as fêmeas tornam-se menos prolíficas a partir dos 3 anos de idade (Beugnet and Guillot 2018).

Qualquer microfilária transmitida através da placenta da progenitora para a cria ou através de transfusão sanguínea mantem-se em circulação, porém não se vai desenvolver (Beugnet and Guillot 2018).

Nos gatos a infestação costuma ser de 2 a 4 filárias adultas, podendo variar de uma filária a um máximo de 8 parasitas adultos, o período pré-patente é de apenas 7 a 9 meses e os adultos sobrevivem apenas entre 2 a 4 anos (Beugnet and Guillot 2018).

3.3 Epidemiologia

A dirofilariose encontra-se vastamente distribuída pelo mundo, sendo particularmente comum em áreas tropicais, África, Ásia, Austrália, sul e centro da América e ilhas do Pacífico, onde entre 20% a 60% dos cães estão infetados (Beugnet and Guillot 2018). Pode também

ser encontrada no Japão, Canadá, e na grande maioria dos estados dos Estados Unidos da América (Beugnet and Guillot 2018).

A prevalência de *Dirofilaria* spp. nos últimos cinco anos, a nível Europeu, tem vindo a aumentar nos países do Sul, onde a dirofilariose já era endémica, observando-se também um aumento da dispersão da doença nas regiões do Norte, zonas que anteriormente não eram endémicas a dirofilariose (Meireles et al. 2014).

No sul da Europa pode ser encontrada principalmente na área Mediterrânica, Espanha, Itália e Grécia, e esporadicamente no sul de França (Beugnet and Guillot 2018).

Nas regiões tropicais o principal vetor de *Dirofilaria* spp. é o mosquito *Aedes aegypti*, enquanto que no mediterrâneo o mosquito *Culex pipiens* desempenha um papel mais importante (Beugnet and Guillot 2018).

A prevalência da espécie *Dirofilaria repens* aumentou, nas últimas décadas, em áreas onde anteriormente já tinha sido reportada, assim como, também a sua distribuição se expandiu a novas áreas na Europa, representando um paradigmático exemplo de um patógeno emergente (Capelli et al. 2018). O aquecimento global e as alterações climáticas proporcionam as condições ideais para que os vetores se consigam desenvolver em áreas onde antes lhes era impossível (Meireles et al. 2014). O crescente aumento nas deslocações dos animais de companhia, o aumento no número de animais abandonados, as resistências aos inseticidas, o aumento na população de raposas (hospedeiro reservatório), e por último a diminuição do controlo e prevenção da dirofilariose devido à atual economia, predispõem ao aumento da dirofilariose na Europa que se tem observado nos últimos cinco anos (Meireles et al. 2014).

A predisposição para desenvolver dirofilariose é cerca de quatro a cinco vezes superior em animais com acesso ao exterior e animais errantes (Meireles et al. 2014).

Evidências indicam que *Dirofilaria repens* se expandiu mais depressa face à espécie *Dirofilaria immitis* nas zonas endémicas do sul ao norte da Europa, devendo-se esta rápida expansão provavelmente à enorme quantidade de cães que contraíram a infeção, mas a qual não foi diagnosticada, perpetuando assim o ciclo de vida de *Dirofilaria repens* (Capelli et al. 2018). Atualmente *Dirofilaria repens* é praticamente endémica em toda a península ibérica, variando a sua prevalência de 1,5% a 12% e na grande maioria os cães infetados apresentam coinfeção com outros filaróides (Capelli et al. 2018). *Dirofilaria repens* foi também encontrada em mosquitos da espécie *Culex pipiens* na região nordeste da península ibérica, com uma capacidade infetante na ordem dos 0,23% a 0,71% (Capelli et al. 2018). Em Portugal, apenas recentemente, foi reportado um caso de infeção por *Dirofilaria repens* em cães no Algarve (Capelli et al. 2018).

3.4 Sinais Clínicos

Os cães que contenham um reduzido número de filárias geralmente não apresentam sinais clínicos, já que, estes tendem a aparecer apenas em casos de grandes infestações (Beugnet and Guillot 2018).

Podem-se observar 4 fases clínicas diferentes da doença nos cães (Beugnet and Guillot 2018). Na primeira fase observa-se perda de apetite e fadiga excessiva, o coração tende a compensar a hipertensão pulmonar, e como tal, começa-se a desenvolver insuficiência cardíaca, numa fase muito inicial (Beugnet and Guillot 2018). Na segunda fase da doença, já se encontra presente um grau moderado de dirofilariose, começando o animal a demonstrar tosse, dispneia quando em esforço, falta de ar em repouso (Barr and Bowman 2012) e anemia (Beugnet and Guillot 2018). Na terceira fase da doença, observa-se taquicardia, dispneia, tosse em repouso, ascite, insuficiência renal crónica, mucosas cianóticas, perda de peso e de modo geral a condição clínica do animal piora (Barr and Bowman 2012; Beugnet and Guillot 2018). Nesta fase a vida do animal já se encontra em risco, podendo ocorrer embolismo pulmonar associado a fragmentos de nemátodes (Beugnet and Guillot 2018). Na última fase, as complicações observadas estão associadas há elevada infestação parasitária, podendo observar-se síndrome da veia cava (Barr and Bowman 2012; Beugnet and Guillot 2018), sendo que nestes casos, o animal morre geralmente ao fim de 2 a 3 dias (Meireles et al. 2014).

Na maioria dos casos o animal apresenta anemia, hemoglobinúria e encontra-se em estado de choque associado à intensa hemólise, provocada pela interrupção da hemodinâmica (Beugnet and Guillot 2018). Murmúrios cardíacos podem ser detetados na auscultação em qualquer fase da doença (Beugnet and Guillot 2018).

Associado à presença de microfilárias, as quais provocam tromboembolismos, bem como recções inflamatórias e imunitárias locais, podem ainda observar-se no hospedeiro definitivo, sinais clínicos cutâneos, como alopecia, necrose das extremidades, prurido e sinais neurológicos, como paresia, incoordenação motora, crises convulsivas ocasionais, perda temporária de consciência e fases de aumento da agressividade (Beugnet and Guillot 2018). Tendem também a ocorrer sinais hemorrágicos, como melena, epistaxis e hemoptise, sinais oculares, como uveíte e alterações renais, como desenvolvimento de insuficiência renal crónica (Beugnet and Guillot 2018).

As lesões macroscópicas que caracterizam a doença são cardiomegália, congestão hepática, ascite e pneumonia (Beugnet and Guillot 2018).

A espécie *Dirofilaria repens* geralmente causa uma infeção não patogénica subcutânea nos cães (Capelli et al. 2018).

Nos gatos, a infeção pode ser clinicamente assintomática, crónica ou aguda (Beugnet and Guillot 2018). Os sinais clínicos são particularmente mais óbvios em duas fases

específicas da infecção, quando a filária pré-adulta alcança a artéria pulmonar e morre, cerca de 4 a 6 meses após a infecção, e mais tarde, quando o parasita adulto morre (Meireles et al. 2014; Beugnet and Guillot 2018).

A infecção natural do parasita nos gatos é pulmonar, como tal, os sinais clínicos observados têm na sua grande maioria origem pulmonar, porém sinais digestivos também são frequentes (Beugnet and Guillot 2018). Os sinais respiratórios mais comuns são dispnéia, tosse, taquipnéia e com menor frequência, espirros (Beugnet and Guillot 2018). Vômito, que não está associado com a ingestão de alimento, é o sinal gastrointestinal mais comum, mas outros sinais como diarreia, também podem acontecer ocasionalmente (Beugnet and Guillot 2018).

A doença nos gatos é denominada de HARD, a qual está associada a anorexia, letargia, perda de peso, tosse, aumento da frequência cardíaca, vômito, diarreia, cegueira, convulsões, colapso e morte súbita (Beugnet and Guillot 2018). Em casos agudos, os gatos morrem tão rapidamente que os proprietários nem chegam a observar sinais clínicos (Beugnet and Guillot 2018). Nos casos mais raros, nos quais os parasitas adultos se localizam no coração direito, podem ser detetados à auscultação, murmúrios cardíacos sistólicos, provocados por insuficiência da válvula tricúspide e pelo ritmo cardíaco a galope (Beugnet and Guillot 2018).

Alguns gatos infetados recuperam espontaneamente da infecção, com ou sem tratamento sintomático (Beugnet and Guillot 2018).

A reversão para a fase aguda é possível mesmo em casos crônicos, quando os parasitas adultos morrem (Beugnet and Guillot 2018). Nestes casos, há uma intensa reação inflamatória pulmonar em resposta ao tromboembolismo, o qual é responsável pela ocorrência de enfartes e hemorragias pulmonares (Beugnet and Guillot 2018). Seguindo-se colapso circulatório, bem como falência respiratória (Beugnet and Guillot 2018).

3.5 Diagnóstico

O diagnóstico em zonas enzoóticas é fácil, os animais geralmente exibem cansaço, falta de ar, tosse, e os sinais clínicos tendem a pior com o exercício físico (Beugnet and Guillot 2018).

Ao hemograma observa-se anemia regenerativa, sendo possível encontrar também hipereosinofilia (Beugnet and Guillot 2018).

O recurso à auscultação e ao ECG permite detetar apenas, caso presente, insuficiência cardíaca direita, que pode auxiliar ao diagnóstico (Beugnet and Guillot 2018).

Ao exame radiográfico é possível encontrar cardiomegália e arborização dos vasos pulmonares, (Beugnet and Guillot 2018) principalmente nos lobos caudais (Meireles et al. 2014). Geralmente recorre-se a radiografia torácica em cães que apresentem alterações

cardíacas e/ ou respiratórias (Beugnet and Guillot 2018). Normalmente, o ventrículo direito aparece dilatado, com forma de D invertido em radiografias frontais e observa-se aumento do contacto esternal em exposições laterais, devido ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca direita (Beugnet and Guillot 2018). O tronco da artéria pulmonar normalmente aparece ao raio-x de espessura normal a dilatado e a bifurcação traqueal pode estar aumentada (Beugnet and Guillot 2018). As artérias pulmonares ao exame radiográfico surgem dilatadas, deformadas ou interrompidas e a arborização que caracteriza o parênquima pulmonar deixa de ser visível ou pode encontrar-se reduzido (Beugnet and Guillot 2018). Podem ser visíveis também regiões do parênquima pulmonar com áreas de densificação, potencialmente com pneumonia eosinofílica (Beugnet and Guillot 2018).

Ao contrário do exame radiográfico, a ecocardiografia, permite o diagnóstico de dirofilariose cardiopulmonar através da visualização do parasita (Meireles et al. 2014; Beugnet and Guillot 2018). Usualmente observa-se dilatação da artéria pulmonar, dilatação do ventrículo direito, parasitas adultos no ventrículo direito e no tronco pulmonar e trombos nos vasos pulmonares (Beugnet and Guillot 2018).

A doença parasitária pode também ser confirmada pela identificação sanguínea das microfilárias ou pela deteção de antigénios em circulação (Beugnet and Guillot 2018). As microfilárias são detetadas com recurso a esfregaço sanguíneo ou observação de uma gota de sangue fresco (Meireles et al. 2014; Beugnet and Guillot 2018). A sensibilidade vai depender não só da técnica utilizada assim como do nível da infestação e por vezes do tempo a que foi realizada a colheita, já que as microfilárias tendem a circular mais durante o crepúsculo (Beugnet and Guillot 2018). Alguns cães podem ser portadores da doença sem apresentarem microfilárias no sangue, caso por exemplo, a infestação seja apenas por filaróides masculinos, por filaróides mais velhos, em casos em que o animal esteja sob tratamento com ivermectina ou por destruição pelo sistema imunitário (Beugnet and Guillot 2018).

Os atuais testes rápidos de antigénios detetam a circulação de proteínas, produzidas maioritariamente pelas fêmeas adultas de *Dirofilaria immitis* (Beugnet and Guillot 2018). Estes kits usam diferentes técnicas serológicas, tais como ELISA ou Aglutinação, as quais são bastante sensíveis, sendo possível detetar o parasita mesmo se só estiver presente um espécime do sexo feminino (Beugnet and Guillot 2018). Este teste em particular é específico para a espécie *Dirofilaria immitis* porque recorre a anticorpos monoclonais específicos de espécie (Beugnet and Guillot 2018). Estes kits só podem ser utilizados em cães, porque os antigénios detetados são excretados apenas pelas fêmeas adultas e nos gatos os parasitas geralmente permanecem na forma imatura (Beugnet and Guillot 2018). Testes que recorrem a respostas a anticorpos já se encontram disponíveis para todas as espécies (Beugnet and Guillot 2018). A altura mais precoce em que é possível proceder à deteção dos antigénios

bem como das microfilárias é cerca de 5 a 6 meses após a infestação (Beugnet and Guillot 2018).

Muitos cães que contraíram *Dirofilaria repens* continuam sem serem diagnosticados devido à natureza subclínica da doença, à falta de ferramentas de diagnóstico rápidas e fiáveis e devido ao pobre conhecimento da espécie em áreas não endêmicas (Capelli et al. 2018).

3.6 Tratamento

O tratamento de cães assintomáticos não está recomendado, medidas para prevenir recidivas são mais úteis do que o combate às poucas filárias existentes que gradualmente tendem a desaparecer (Beugnet and Guillot 2018). Mensalmente, a administração profilática de um larvicida, como são exemplo as avermectinas ou milbemicinas, esterilizam as filárias fêmeas e reduzem a sua longevidade (Beugnet and Guillot 2018).

O tratamento adequado para a eliminação de filárias adultas, é para as primeiras duas fases, duas injeções IM de melarsomina, na dose de 2,5 mg/ Kg SID (Barr and Bowman 2012; Meireles et al. 2014; Beugnet and Guillot 2018). Em casos mais complexos, com sinais clínicos mais graves, nomeadamente na terceira fase, devem ser administradas três injeções, uma primeira injeção única e no mês seguinte duas injeções com intervalos de 24 horas (Barr and Bowman 2012; Beugnet and Guillot 2018). Existe a possibilidade de ocorrerem embolismos pulmonares, devido à morte das filárias, pelo que o animal deve ser mantido em repouso (Meireles et al. 2014; Beugnet and Guillot 2018). A melarsomina pode ter efeitos secundários (Meireles et al. 2014), tais como anorexia, letargia, depressão (Barr and Bowman 2012), vômito, diarreia, e nervosismo, 24 a 48 horas após a injeção (Beugnet and Guillot 2018).

A eficácia da terapêutica só pode ser confirmada por ELISA, 4 a 6 meses após o fim do tratamento, devido à persistência dos antígenos do parasita em circulação (Beugnet and Guillot 2018).

O tratamento adequado para a eliminação de microfilárias deve ser administrado um mês após o tratamento adulticida, uma vez que as microfilárias podem sobreviver mais do que 18 meses nos capilares (Beugnet and Guillot 2018). Este tratamento consiste também na administração de avermectinas, milbemicinas, desaparecendo as microfilárias 3 a 4 semanas após o tratamento (Beugnet and Guillot 2018).

Alguns efeitos secundários associados à morte das microfilárias podem ser observados, nomeadamente reações alérgicas como diarreia, prostração e ataxia (Beugnet and Guillot 2018) sendo a administração de corticosteroides benéfica nestes casos (Barr and Bowman 2012).

Deve-se recorrer a um tratamento anti trombótico, a fim de evitar a agregação plaquetária, usando por exemplo, aspirina, na dose de 5 mg/Kg/dia 4 dias antes do tratamento para os adultos, o qual deve ser prolongado até 3 semanas (Beugnet and Guillot 2018).

A remoção cirúrgica das filárias adultas é possível nos casos mais graves da doença, fase 3 e 4 (Beugnet and Guillot 2018), sendo uma alternativa terapêutica vantajosa uma vez que reduz a toxicidade da melarsomina e o risco de ocorrência de tromboembolismos (Meireles et al. 2014).

4. EHRLICHIA SPP.

4.1 Caracterização Geral

A *Ehrlichia* spp. é uma bactéria gram-negativa pertencente à ordem Rickettsiales e dentro desta à família *anaplasmataceae*, a qual engloba o género *Ehrlichia*, o género *Anaplasma* e o género *Neorickettsia* (Barr and Bowman 2012; Allison and Little 2013).

Ehrlichia canis, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia sennetsu* e *Ehrlichia risticii* têm afinidade para os monócitos, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia equi* e *Ehrlichia phagocytophila*, têm afinidade para os granulócitos e a espécie *Ehrlichia platys* tem afinidade para as plaquetas (Stiles 2000; Barr and Bowman 2012).

Os cães podem ser infetados por todas as espécies de *Ehrlichia* spp. (Fonseca et al. 2010) à exceção de *Ehrlichia sennetsu* que infeta apenas seres humanos (Stiles 2000).

Ehrlichia canis é o agente responsável pelo desenvolvimento de erliquiose monocítica, multiplicando-se dentro das células mononucleares, pelo que se distribui por órgãos com elevada população de fagócitos mononucleares, tais como, o fígado, o baço e os linfonodos (Stiles 2000). A hiperplasia linforreticular que se observa nestes casos resulta no aumento destes órgãos (Stiles 2000).

As espécies de *Ehrlichia* spp. granulocíticas replicam-se e crescem em neutrófilos e eosinófilos (Stiles 2000). A patogénese da erliquiose granulocítica é menos marcada do que a da erliquiose monocítica (Stiles 2000). Na erliquiose granulocítica os organismos são libertados de um granulócito infetado para de seguida serem fagocitados por um novo leucócito granulócito, no qual se multiplicam dentro de um vacúolo da membrana formando uma mórula (Stiles 2000). À medida que o antígeno circula é exposto ao sistema imunitário, podendo se formar complexos imunes, ativando-se assim o complemento (Stiles 2000). A doença clínica observada em animais com erliquiose granulocítica resulta muito provavelmente da deposição de complexos imunes (Stiles 2000).

Ehrlichia platys é responsável pelo desenvolvimento de trombocitopenia cíclica infecciosa canina (Stiles 2000). O organismo replica-se nas plaquetas, diminuindo o seu tempo de vida e originando trombocitopenia (Stiles 2000). Poucos dias após a infeção pelo parasita,

a contagem plaquetária diminui drasticamente, para dias mais tarde voltar a subir, mantendo-se assim um ciclo no decurso da doença (Stiles 2000). A trombocitopenia inicial é originada por lesão plaquetária, porém em fases mais avançada da doença, esta deve-se à remoção de plaquetas por parte do sistema imunitário (Stiles 2000).

Apenas duas raças de cães, Doberman Pinscher e Pastor Alemão, têm maior predisposição para desenvolver um carácter mais grave da doença, aquando da infeção por *Ehrlichia canis* (Silva 2015). No Pastor Alemão, por exemplo, esta predisposição deve-se ao facto de existir na raça uma diminuição da imunidade mediada por células o que predispõe a que os animais desta raça quando infetados possam vir a desenvolver distúrbios hemorrágicos graves (Silva 2015).

Nos casos de infeções por *Ehrlichia* spp. em gatos os vetores são desconhecidos e não estão definidas as vias de transmissão da infeção na espécie, porém é provável que a infeção natural ocorra por exposição a artrópodes ou pela ingestão de roedores (Correa et al. 2011).

4.2 Ciclo de Vida

A infeção do hospedeiro definitivo tanto pode ocorrer através da picada deste por um ixodídeo que transmite o parasita na saliva (Barr e Bowman 2012) como através de transfusões sanguíneas (Stiles 2000; Allison and Little 2013; Rucksaken et al. 2019).

As formas imaturas de ixodídeos são infetadas quando se alimentam do sangue de um canídeo infetado durante a fase aguda da doença, mantendo a infeção transestadial (Barr and Bowman 2012).

O período de incubação da doença varia de 2 a 4 semanas (Barr and Bowman 2012).

De uma forma geral pode-se dizer que o vetor *Rhipicephalus sanguineus* é responsável pela transmissão maioritária de *Ehrlichia canis* (Fonseca et al. 2010) e *Anaplasma platys*, o vetor *Ixodes* spp. transmite mais frequentemente *Anaplasma phagocytophilum* e por último os vetores *Dermacentor* spp. e *Amblyoma* spp. transportam *Ehrlichia chaffensis* e *Ehrlichia ewingii* (Correa et al. 2011).

Cães, incluindo cães domésticos, raposas, coiotes e chacais, são considerados os hospedeiros reservatório (Stiles 2000). Quando os ixodídeos se fixam aos hospedeiros reservatório e iniciam a sua refeição, ingerem o parasita, passando a ser portadores deste durante pelo menos 155 dias após a infeção (Stiles 2000).

As erliquioses são observadas durante todo o ano já que o ixodídeo transmissor de *Ehrlichia* spp. permanece ativo durante os meses de Inverno nos canis ou nas casas (Stiles 2000).

O ciclo de vida da *Ehrlichia* spp. é constituído por três fases (Silva 2015). Numa primeira fase ocorre a entrada dos corpos elementares nos monócitos nos quais ficam aproximadamente 2 dias para que ocorra o seu crescimento (Silva 2015). De seguida, numa

segunda fase, ocorre a multiplicação do agente com a formação do corpo inicial, entre 3 a 5 dias e por último, numa terceira fase, verifica-se a formação das mórulas, as quais são um conjunto de corpos elementares envolvidos por uma membrana (Silva 2015).

4.3 Epidemiologia

A distribuição geográfica dos vetores tem influência direta sobre a prevalência da doença em uma determinada área (Correa et al. 2011).

Na Europa pode observar-se *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia platys*, enquanto que na Ásia apenas se encontra *Ehrlichia sennetsu* (Stiles 2000). A espécie *Ehrlichia canis* tem distribuição mundial (Barr and Bowman 2012; Allison and Little 2013).

Nos Estados Unidos da América predominam as espécies *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia risticii*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia equi* e *Ehrlichia platys* (Stiles 2000). No Canadá, encontra-se principalmente *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia risticii* (Stiles 2000). A espécie *Ehrlichia equis*, transmitida pelo vetor *Ixodes pacificus* foi reportada maioritariamente em cães na costa oeste dos Estados Unidos da América (Stiles 2000). No norte da Califórnia a infeção em equinos por *Ehrlichia equis* é considerada endémica, sendo ainda de salientar que nesta região a taxa de cães infetados também é superior (Stiles 2000). Foram também já reportados casos de cães infetados pelo parasita no estado de Wisconsin e Minnesota (Stiles 2000). A infeção por *Ehrlichia platys* é comum em cães nos Estados Unidos da América, particularmente nos estados do Sul como sejam o estado da Florida e do Louisiana (Stiles 2000).

4.4 Sinais Clínicos

A erliquiose pode ter três estadios, nomeadamente agudo, subclínico ou crónico (Barr and Bowman 2012).

No caso da expressão clínica aguda, que tende a ocorrer 8 a 20 dias após a infeção e com duração de cerca de 2 a 4 semanas (Stiles 2000), a infeção vai progredindo desde o local da picada até ao baço, fígado e linfonodos, provocando nos órgãos em questão organomegália e podendo dar origem ao aparecimento de trombocitopenia subclínica (Barr and Bowman 2012). Nestes casos a infeção afeta principalmente as células endoteliais conduzindo a vasculites, ligeira anemia (Barr and Bowman 2012), assim como, leucopenia (Rautenbach et al. 2018), variando, no entanto, a gravidade das lesões com o organismo hospedeiro em questão (Barr and Bowman 2012). Nesta fase da doença os sinais mais frequentemente observados são febre, depressão e anemia, porém em muitos casos estes sinais clínicos acabam por passar despercebidos (Stiles 2000).

Em alguns animais a doença na fase aguda, adquire um caráter mais grave, observando-se fraqueza, prostração, anorexia e consequente perda de peso, vômito (Stiles 2000), piroxia e alteração da coagulação (Fonseca et al. 2010). Esta manifesta-se por sangramento espontâneo, epistaxes em cerca de 35% dos animais, associada ao sangramento dos cornetos nasais ou nos pulmões e hemorragias no abdômen, mucosas genital, conjuntival ou bucal (Fonseca et al. 2010). Pode ainda observar-se em alguns animais alterações do sistema nervoso central como ataxia, inclinação da cabeça e meningoencefalite (Fonseca et al. 2010; Barr and Bowman 2012). Pode também ocorrer linfadenopatia generalizada, hepatoesplenomegalia, edema do membro intermitente (Fonseca et al. 2010) e sinais oculares, como uveíte anterior e posterior, coriorretinite, infiltrado inflamatório perivascular na retina, descolamento da retina, hemorragias intraoculares e necrose esclerótica (Stiles 2000) Nos gatos pode estar presente também poliartrite (Barr and Bowman 2012).

A ligação de anticorpos revestidos com *Ehrlichia chaffeensis* aos recetores dos macrófagos estimula a produção de citocinas (Stiles 2000). A libertação sistémica de citocinas pode estar relacionada com os sinais clínicos de vasculite e choque séptico que se observam em alguns animais (Stiles 2000). A trombocitopenia resulta da diminuição do tempo de vida das plaquetas e do aumento da sua utilização (Stiles 2000).

Se a fase aguda da doença não for tratada, especialmente em casos nos quais a manifestação clínica da doença não foi grave, o canídeo acaba por passar para a fase subclínica da doença (Stiles 2000). Esta fase pode durar meses a anos (Stiles 2000). Durante a fase subclínica o animal deixa de ter febre, e aparenta estar melhor clinicamente (Stiles 2000). Nesta fase, o organismo irá despoletar uma resposta imunomediada aumentada, o hospedeiro produz uma maior quantidade de anticorpos e desenvolve consequentemente hiperglobulinemia (Barr and Bowman 2012). Ao hemograma vai ser também evidente a presença de trombocitopenia (Barr and Bowman 2012). Na fase subclínica, o organismo pode ser eliminado do sistema, pode permanecer controlado pelo sistema imunitário ou pode evoluir para a fase crónica da doença (Stiles 2000).

Nos casos crónicos, a infeção vai afetar a produção de células hematopoiéticas por parte da medula, diminuindo a produção de plaquetas e de eritrócitos, provocando o aparecimento de anemia (Barr and Bowman 2012), leucopenia e trombocitopenia (Stiles 2000). Observa-se também febre, perda de peso e depressão (Barr and Bowman 2012).

Casos de anemia grave ou de infeções secundárias à leucopenia que se desenvolve na erliquiose podem acabar por ser fatais para o animal (Stiles 2000).

Caso haja intervenção médica no estadio inicial da doença frequentemente a terapêutica é eficaz e elimina o parasita sem que haja consequências graves para o hospedeiro (Barr and Bowman 2012). Porém quando o parasita se mantém no hospedeiro

durante mais tempo, em fases crônicas da doença, as consequências para o organismo parasitado são maiores (Barr and Bowman 2012). Este pode começar a apresentar anemia, já que há supressão da produção de eritrócitos, sangramentos espontâneos, linfadenomegalia generalizada, poliartrite, edema do escroto, esplenomegalia e hepatomegalia, uveítes, edema da córnea, hemorragia e possível descolamento da retina, o que eventualmente conduz a cegueira e em casos mais raros a tonturas (Barr and Bowman 2012).

4.5 Diagnóstico

Numa primeira fase, há que ter em conta, se a doença se encontra num estadio agudo ou crónico (Barr and Bowman 2012).

Na fase aguda é de esperar encontrar sinais hematológicos como trombocitopenia (Fonseca et al. 2010; Rautenbach et al. 2018), anemia (Stiles 2000; Fonseca et al. 2010), leucocitose, monocitose e mórulas, as quais são mais frequentes nos neutrófilos do que nos leucócitos (Barr and Bowman 2012). A nível bioquímico podem estar presentes ligeiros aumentos da ALT, ALP, BUN, creatinina e bilirrubina total, hiperglobulinemia, a qual aumenta progressivamente na primeira à terceira semana de infeção e hipoalbuminemia, principalmente devido a insuficiência renal e proteinúria (Barr and Bowman 2012).

Na fase crónica da doença é de esperar encontrar pancitopenia, monocitose e linfocitose, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia e aumento da creatinina e da BUN, associado a lesão renal primária (Barr and Bowman 2012).

O indicador mais fiável de infeção por *Ehrlichia* spp. é o teste de imunofluorescência indireta (Stiles 2000). O teste de imunofluorescência tem elevada sensibilidade, porém apresenta baixa especificidade na reação cruzada entre a espécie *E. canis* e *A. phagocytophila* (Barr and Bowman 2012). A partir do sétimo dia de infeção já é possível detetar anticorpos no soro, sendo que quase todos os cães são positivos ao teste cerca de 20 a 28 dias após a infeção (Stiles 2000). A resposta primária aos anticorpos é feita por IgA e IgM (Stiles 2000). Como a grande maioria dos laboratórios recorre a IgG para fazer o diagnóstico, o qual fica positivo apenas 3 a 4 semanas após a infeção, esse período é considerado o mínimo necessário para se obter um resultado fiável (Stiles 2000). De modo geral, títulos maiores que 1:20 indicam infeção ou exposição ao parasita (Stiles 2000). Em animais que não sejam tratados observa-se um pico no título de anticorpos ao octogésimo dia (Stiles 2000). Com o tratamento o título normalmente atinge valores negativos entre 6 a 9 meses, embora em alguns casos possa persistir durante anos (Stiles 2000).

Organismos do género *Ehrlichia* spp. são encontrados frequentemente em amostras de sangue periférico (Allison and Little 2013). O organismo multiplica-se por fissão binária dentro de um vacúolo citoplasmático dando origem a uma micro colónia ou mórula, a qual

pode atingir 4 a 6 µm de diâmetro (Allison and Little 2013). Em observação ao microscópio as mórulas surgem classicamente como uma estrutura intracitoplasmática basofílica (Allison and Little 2013). A observação de *Ehrlichia* spp. nos eritrócitos aquando da realização do esfregaço sanguíneo serve como diagnóstico definitivo (Fonseca et al. 2010).

Nos gatos o diagnóstico passa numa primeira fase pela constatação no hemograma da presença de anemia não regenerativa, leucopenia, em cerca de um terço dos gatos e trombocitopenia, presente frequentemente em um quarto dos animais infetados (Barr and Bowman 2012). Assim como também, pela observação microscópica de mórulas nos leucócitos e nas plaquetas, presente em metade dos gatos infetados (Barr and Bowman 2012).

Numa fase posterior para confirmação da infeção pode recorrer-se à realização de PCR e de exames serológicos, já que em animais infetados estes irão apresentar um título ANA positivo (1:640) (Barr and Bowman 2012).

4.6 Tratamento

A terapêutica em animais infetados com *Ehrlichia* spp. passa inicialmente pela resolução das complicações secundárias (Barr and Bowman 2012). É recomendada a administração de glucocorticoides quando está presente trombocitopenia que ponha em risco a vida do paciente, assim como, a administração de esteroides androgénicos, cuja função irá ser a de estimular as células da medula óssea em animais com infeção crónica (Barr and Bowman 2012).

Como tratamento de eleição para a erliquiose recomenda-se a doxiciclina (Stiles 2000; Fonseca et al. 2010; Barr and Bowman 2012; Rautenbach et al. 2018) na dose de 10 mg/Kg SID, PO, durante 28 dias, provocando uma subida rápida, em cerca de 72 horas, nas plaquetas do organismo infetado (Barr and Bowman 2012), ou na dose de 5mg/Kg BID durante 14 dias em animais com infeção aguda (Stiles 2000).

O dipropionato de imidocarb, na dose de 5mg/kg toma única IM, revela-se eficaz tanto no tratamento de *Ehrlichia canis* como de *Babesia* spp., sendo uma ótima opção aquando da presença de infeções mistas, provocando, no entanto, efeitos secundários como sejam aumento da salivação, das descargas nasais e aparecimento de diarreia (Barr and Bowman 2012). Recorrendo à administração de atropina antes do início da administração do fármaco, consegue-se diminuir a ocorrência destes efeitos secundários (Barr and Bowman 2012).

Outras opções para o tratamento de erliquiose incluem, cloranfenicol na dose de 15 a 25 mg/Kg TID, durante pelo menos 14 dias, minociclina na dose de 10 mg/Kg BID durante 14 dias e tetraciclina na dose de 22mg/Kg TID durante 14 a 21 dias (Stiles 2000).

Para tratar os sinais oculares, característicos de erliquiose deve-se incluir no tratamento anti-inflamatórios em associação com antibióticos sistémicos (Stiles 2000). Para

o tratamento de uveíte anterior, deve-se prescrever um corticosteroide tópico, como são exemplo, o acetato de prednisolona a 1% e a dexametasona a 0,1%, variando a frequência da administração consoante a gravidade das lesões, mas de modo geral, recomenda-se a aplicação mínima de 6 em 6 horas (Stiles 2000). Alterações do segmento posterior do globo ocular devem ser tratadas com recurso a medicamentos sistémicos, incluindo prednisolona oral na dose de anti-inflamatório (Stiles 2000).

A administração de corticosteroides orais além de auxiliar na resolução de alterações do segmento posterior do globo ocular, são úteis para tratar outras complicações imunomediadas características de erliquiose, como vasculites e a produção de anticorpos antiplaquetários que pioram a já presente trombocitopenia (Stiles 2000).

5. HEPATOZOON SPP.

5.1 Caracterização geral

A hepatozoonose é uma doença infecciosa não contagiosa originada pelo desenvolvimento do protozoário *Hepatozoon canis* em várias células do hospedeiro, tais como células endoteliais, leucócitos, fagócitos, monócitos e polimorfonucleares neutrófilos (Beugnet and Guillot 2018).

O protozoário *Hepatozoon* spp. pertence à ordem Eucoccidiida, subclasse Coccida, subordem Adeleorina, e família Haemogregarinidae (Beugnet and Guillot 2018), fazendo parte do apicomplexo de parasitas intracelulares (Sousa et al. 2017), heteroxenos obrigatórios (Allen et al. 2011) podendo infetar um vasto conjunto de animais vertebrados, os quais desempenham o papel de hospedeiros intermediários (Sousa et al. 2017).

Hepatozoon canis é um parasita de cães, cães e raposas (Beugnet and Guillot 2018), assim como de gatos, domésticos e selvagens (Hodzic et al. 2017).

A espécie predominante em gatos foi caracterizada morfológica e geneticamente como *Hepatozoon felis* (Hodzic et al. 2017), porém, recentemente num estudo realizado por Hodzic et al. foi reportada a deteção de duas espécies de *Hepatozoon* spp., diferentes morfológica e geneticamente, que infetam os gatos, *Hepatozoon felis* já previamente conhecida e *Hepatozoon silvestris*.

O parasita aparentemente não revela propriedades zoonóticas (Beugnet and Guillot 2018).

5.2 Ciclo de vida

Ao contrário de outros protozoários transmitidos por ixodídeos a espécie *Hepatozoon canis* infeta leucócitos e o parênquima, sendo transmitido aos cães pela ingestão de ixodídeos contendo oócitos maduros (Otranto et al. 2011).

O seu principal vetor é *Rhipicephalus sanguineus* porém, já foram encontrados oócitos do hemoparasita em *Amblyomma ovale* e *Rhipicephalus microplus* (Sousa et al. 2017).

Após a ingestão do ixodídeo infetado, os esporozoítos são libertados no intestino e penetram a parede do trato gastrointestinal, invadindo de seguida as células mononucleares (Beugnet and Guillot 2018) e disseminando-se pela corrente sanguínea, bem como pelo sistema linfático, para vários órgãos alvo, tais como baço, medula óssea, pulmão, fígado e rim (Otranto et al. 2011). Nestes órgãos ocorre o processo de merogonia dando origem ao aparecimento de merontes, os quais contêm macro ou micromerozoítos (Beugnet and Guillot 2018). Os merozoítos maduros (Beugnet and Guillot 2018) são libertados e invadem por sua vez os leucócitos, principalmente os neutrófilos e monócitos (Otranto et al. 2011) evoluindo para gamontes (Allen et al. 2011). A ingestão, pelos ixodídeos, de gamontes presentes no sangue dos cães é seguida pela fertilização, fusão de gametócitos, e formação de oocinetes as quais deixam o trato gastrointestinal do ixodídeo e entram no hemocelo (Beugnet and Guillot 2018). Posteriormente estes tornam-se em oocistos com capacidade infetante, depois de passarem por um processo de esporogonia, e cada oocisto produz vários esporocistos contendo dezasseis esporozoítos cada (Beugnet and Guillot 2018).

A ninfa geralmente é infetada durante a sua refeição e apenas a fase adulta do ixodídeo é responsável pela transmissão ao canídeo (Beugnet and Guillot 2018).

Uma vez que os esporozoítos não se localizam nas glândulas salivares dos ixodídeos, a infeção dos cães só ocorre caso estes ingeram o ixodídeo e não apenas com a mordedura pelo parasita, como é frequente em outras infeções hemoparasitárias (Beugnet and Guillot 2018).

5.3 Epidemiologia

A hepatozoonose é prevalente no sul da Europa, norte de África, médio oriente, principalmente Israel, e Ásia (Elias and Homans 1988; Beugnet and Guillot 2018).

Rhipicephalus sanguineus é frequentemente encontrado em regiões quentes e temperadas o que indica um grande potencial de distribuição de *Hepatozoon canis* (Beugnet and Guillot 2018).

A espécie de *Hepatozoon* spp. que maioritariamente infecta os cães é o *Hepatozoon canis* com distribuição geográfica em quatro continentes diferentes, Ásia, Europa, Africa e Brasil (Eiras et al. 2007; Otranto et al. 2011).

A espécie *Hepatozoon americanum*, a segunda espécie mais comum de *Hepatozoon* spp. a infetar cães, tem uma distribuição geográfica mais restrita nomeadamente à região sudeste dos Estados Unidos da América, sendo transmitida pelo ixodídeo *Amblyomma maculatum* (Eiras et al. 2007; Beugnet and Guillot 2018). A infeção por *Hepatozoon*

americanum alastrou-se do norte e este do Texas para Louisiana, Alabama, Oklahoma, Georgia, Tennessee e Florida (Beugnet and Guillot 2018).

Estudos realizados em vários países concluíram que cerca de 20 a 30% dos cães em zonas enzoóticas são seropositivos, no entanto, destes, apenas 1% estão parasitados, o que indica que o nível de exposição ao hemoparasita é muito superior do que aquele que o nível de parasitemia sugere (Beugnet and Guillot 2018).

O protozoário *Hepatozoon* spp. é encontrado principalmente em cães de rua (Beugnet and Guillot 2018) durante o período de maio a setembro (Elias and Homans 1988). A existência de formas assintomáticas esconde a atual prevalência da doença (Beugnet and Guillot 2018).

Em cerca de 40% dos casos, a hepatozoonose encontra-se associada a outras doenças graves, tais como, leishmaniose, erliquiose, dirofilariose e esgana (Beugnet and Guillot 2018).

5.4 Sinais Clínicos

As infeções por *Hepatozoon* spp. são normalmente subclínicas, porém em organismos imunocomprometidos o organismo pode tornar-se potencialmente patógeno ou ser um parasita oportunista (Sousa et al. 2017).

O período de incubação das hepatozoonoses ainda é desconhecido, porém em contexto laboratorial este varia de 3 dias a uma semana (Beugnet and Guillot 2018).

Hepatozoon canis, infecta leucócitos assim como tecidos hemolinfáticos (Eiras et al. 2007).

Sugere-se que a ocorrência de doença clínica aconteça maioritariamente devido à presença de fatores predisponentes tais como condições de imunossupressão ou terapias, deficiência genética no funcionamento dos neutrófilos, associação de vários agentes infecciosos, como o vírus da esgana canina, ou por último, o facto do sistema imunitário em animais jovens ser imaturo, fazendo com que se encontrem mais predispostos a doença clínica animais com idades inferiores a quatro ou seis meses (Eiras et al. 2007).

Hepatozoon spp. é um parasita característico do tecido muscular causando miosite e significantes dificuldades locomotivas (Beugnet and Guillot 2018).

A forma mais comum da doença é benigna, estando geralmente associada com um baixo nível de parasitemia (1,5% de leucócitos infetados) (Beugnet and Guillot 2018). A forma mais grave da doença está associada com um elevado nível de parasitemia, frequentemente com aproximadamente 100% dos neutrófilos infetados (Beugnet and Guillot 2018).

Na maioria dos casos infeções por *Hepatozoon americanum* resultam numa forma mais grave da doença que conduz a deterioração da condição geral do animal e tende a conduzir à sua morte (Beugnet and Guillot 2018). Nestes casos, os cães infetados tendem a

experienciar febre, alterações da locomoção, dores musculares associadas a miosites, atrofia muscular generalizada e descargas oculares mucopurulentas (Beugnet and Guillot 2018). A dor pode ser generalizada, ou localizada nas articulações, pescoço e na região lombar (Beugnet and Guillot 2018). Alterações na locomoção incluem rigidez muscular, paralisia dos membros posteriores, ataxia e dificuldade em levantar (Beugnet and Guillot 2018).

A ocorrência de marcada neutrofilia é uma característica hematológica significativa desta doença assim como contagens de leucócitos entre 30 mil a 200 mil por ml de sangue (Beugnet and Guillot 2018).

Alterações bioquímicas incluem aumento da atividade da ALP e hipoalbuminemia (Beugnet and Guillot 2018).

Os sinais clínicos mais observados são febre, anorexia, perda de peso, letargia, (Eiras et al. 2007) e hiperglobulinemia (Beugnet and Guillot 2018). Cães com um elevado nível de parasitemia geralmente exibem uma neutrofilia considerável, mais de 150 mil leucócitos/ μL de sangue (Beugnet and Guillot 2018). Pode também observar-se dor difusa, algumas vezes aguda e persistente, tais como, dores na região posterior, dores nas articulações e hipersensibilidade à palpação das pernas e da coluna (Beugnet and Guillot 2018). Esta dor difusa pode causar dificuldades e alterações na locomoção (Beugnet and Guillot 2018). O animal pode inclusive recusar-se a movimentar ou a realizar determinados exercícios característicos do seu quotidiano (Beugnet and Guillot 2018). Nos animais infetados pode também observar-se excessivas descargas nasais, diarreia, vômito, poliadenopatia, esplenomegalia, epistaxis, epilepsia e polidipsia (Beugnet and Guillot 2018).

Coinfecções com outros agentes infecciosos e deficiências imunitárias estão frequentemente associadas com hepatozoonose canina (Beugnet and Guillot 2018). A resposta imunitária induzida por simultâneas infeções pode enfraquecer o sistema imunitário e interferir com as defesas dos cães contra novas infeções de *Hepatozoon canis* ou permitir que uma infeção latente possa emergir (Beugnet and Guillot 2018).

Biópsias tecidulares e necropsias de cães infetados com *Hepatozoon canis* revelam que este parasita maioritariamente órgãos hemolinfáticos, incluindo, linfonodos, baço e medula óssea (Beugnet and Guillot 2018).

5.5 Diagnóstico

A técnica com maior sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de *Hepatozoon canis* é o PCR (Otranto et al. 2011; Beugnet and Guillot 2018) no entanto o diagnóstico de hepatozoonoses é baseado frequentemente na deteção em neutrófilos de gamontes intracitoplasmáticos, de forma elipsoidal, medindo aproximadamente $11 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$ (Beugnet and Guillot 2018), em esfregaços sanguíneos ou em visualizações histopatológicas de

merontes ou de quistos monozoíticos nos tecidos, uma vez que são técnicas que envolvem menores custos (Otranto et al. 2011).

A concentração dos leucócitos, através da centrifugação do sangue num tubo de microhematócrito, permite aumentar a sensibilidade da deteção do hemoparasita, uma vez que facilita a observação dos esquizontes e/ou merontes de *Hepatozoon canis* nos tecidos infetados (Beugnet and Guillot 2018). Estes esquizontes e/ou merontes contêm micromerozoítos, organizados em círculos em redor do núcleo central. (Beugnet and Guillot 2018).

Quando não é possível a realização de PCR para diagnóstico imediato da infeção deveria dar-se preferência ao exame citológico da camada leuco-plaquetária face ao esfregaço sanguíneo (Otranto et al. 2011).

No entanto, pode se recorrer também, para maior sensibilidade do diagnóstico, especialmente em animais com doença crónica, a testes serológicos, nomeadamente o teste de imunofluorescência indireta, no qual se detetam anticorpos anti-*Hepatozoon canis* (Otranto et al. 2011). Os anticorpos IgM e IgG contra *Hepatozoon canis* são detetados experimentalmente 16 e 22 dias depois da infeção respetivamente, antes dos gamontes poderem ser detetados no sangue, o que acontece apenas ao 28º dia após a infeção (Beugnet and Guillot 2018). O soro de cães infetados com *Hepatozoon canis* revela apenas um pequeno nível de reatividade a antígenos de *Hepatozoon canis* (Beugnet and Guillot 2018).

5.6 Tratamento

O fármaco de eleição para o tratamento da hepatozoonose canina é o dipropionato de imidocarb (Elias and Homans 1988; Beugnet and Guillot 2018), na dose de 5 a 6 mg/Kg a cada 14 dias, até não se observarem gamontes ao esfregaço sanguíneo, em associação com toltrazuril, um fármaco coccidiostático, na dose de 5 a 10 mg/Kg/dia num mínimo de 10 dias consecutivos (Beugnet and Guillot 2018). Normalmente associa-se também ao tratamento a administração oral de doxiciclina, 10 mg/Kg/dia durante 21 dias (Beugnet and Guillot 2018). O fármaco dipropionato de imidocarb não deve ser administrado por via IM, estando referidos casos em que alguns minutos após a injeção se verificaram reações de choque transitando entre sinais de profunda salivação, dispneia e tremores (Elias and Homans 1988).

A eliminação dos gamontes de *Hepatozoon canis* geralmente é um processo demorado, podendo o tratamento demorar até 8 semanas e mesmo assim haver casos de insucesso (Beugnet and Guillot 2018).

Infeções por *Hepatozoon americanum* são tratadas com a combinação oral de trimetropim-sulfadiazina, 15 mg/Kg BID, pirimetamina, 0,25 mg/Kg SID, e clindamicina, 10 mg/Kg TID, devendo o tratamento ser realizado durante várias semanas (Beugnet and Guillot 2018). Após a remissão dos sinais clínicos, este tratamento pode ser prolongado pela

administração oral de decoquinato, um fármaco antiprotozoário, na dose de 10 a 20 mg/Kg misturado na comida, a cada 12 horas durante dois anos (Beugnet and Guillot 2018).

Reincidências são comuns, independentemente se foi respeitado ou não o período de tratamento (Beugnet and Guillot 2018). O tratamento sintomático de cães infetados com anti-inflamatórios alivia a dor e a febre (Beugnet and Guillot 2018).

6.LEISHMANIA SPP.

6.1 Caracterização geral

A leishmaniose é originada pela presença e multiplicação nas células da linha fagocitária mononuclear, do protozoário flagelado *Leishmania infantum* (Beugnet and Guillot 2018), incluído no complexo *Leishmania donovani* (Rosypal et al. 2010; Asfaram et al. 2019) o qual pertence à família Trypanosomatidae, à ordem Kinetoplastida, e ao filo Sarcomastogiphora (Beugnet and Guillot 2018).

A leishmaniose é predominantemente uma doença imunológica, estando a sua patogenicidade relacionada com a infecção de células do sistema imunitário (Beugnet and Guillot 2018).

Cães infetados com *Leishmania infantum* podem desenvolver Leishmaniose visceral sendo uma potencial fonte de contaminação para outros cães bem como para seres humanos (Teske et al. 2002), já que o parasita é um agente zoonótico (Beugnet and Guillot 2018; Lombardi et al. 2019).

Os cães, tanto domésticos como selvagens (Asfaram et al. 2019) são os principais reservatórios do parasita (Sauda et al. 2018; Asfaram et al. 2019; Lombardi et al. 2019) e para que ocorra a propagação da doença é fundamental a presença de *Phlebotomus* (Lombardi et al. 2019; Moafi et al. 2019) e *Lutzomyia* (Moafi et al. 2019), os quais desempenham o papel de vetores do hemoparasita (Teske et al. 2002).

Leishmania spp. existe em duas formas distintas morfologicamente em vertebrados e em invertebrados (Beugnet and Guillot 2018). A forma extracelular flagelada é designada de promastigota e pode ser encontrada em flebotomos e em cultura, enquanto que nos cães é possível encontrar a forma intracelular e não flagelada, denominada de amastigota (Beugnet and Guillot 2018). As formas amastigotas são encontradas dentro dos vacúolos parasitóforos nos macrófagos parasitados (Beugnet and Guillot 2018). Estes são ovais e medem entre 3 a 4 µm x 2 µm e contêm grandes núcleos, bem como cinetoplasto (Beugnet and Guillot 2018). As formas amastigotas sobrevivem à fagocitose e a sua multiplicação é feita por fissão binária longitudinal (Beugnet and Guillot 2018).

Leishmania spp. pode ser encontrada numa localização extracelular quando os macrófagos sofreram lise ou quando foram alterados por técnicas de amostragem (Beugnet

and Guillot 2018). Os macrófagos infetados estão aumentados e têm aspecto de amora (Beugnet and Guillot 2018). *Leishmania* spp. sobrevive dentro dos macrófagos porque inibe a sua atividade e ajusta a resposta imunitária do hospedeiro para que o sistema fagocítico do macrófago não seja ativado, estimulando uma resposta do tipo humoral, Th2, em detrimento de uma resposta celular, Th1 (Beugnet and Guillot 2018).

Leishmania infantum é dermatrópica e viscerotrópica nos cães (Beugnet and Guillot 2018).

Leishmania spp. tal como todos os parasitas, tem uma complexa estrutura antigénica, a qual inclui, antígenos de superfície, tais como, lipofosfoglicanos, glicoproteínas de superfície e antígenos somáticos (Beugnet and Guillot 2018). O revestimento antigénico difere entre as duas formas infetantes de *Leishmania* spp., a forma promastigota e amastigota, o que constitui um mecanismo de evasão ao sistema imunitário (Beugnet and Guillot 2018).

Após a infeção do animal inicia-se a resposta imunitária, do tipo celular e humoral (Beugnet and Guillot 2018). A resposta primária é do tipo humoral e manifesta-se pelo aparecimento de anticorpos maioritariamente do tipo IgG, o que facilita a fagocitose pelos macrófagos (Beugnet and Guillot 2018). A abundância de macrófagos e a formação de complexos com antígenos são responsáveis por sinais imunopatológicos, tais como, glomerulonefrites e artrites (Beugnet and Guillot 2018). A resposta à mediação celular normalmente é insuficiente para erradicar o parasita (Beugnet and Guillot 2018). Esta é baseada no fenómeno de citotoxicidade mediado por linfócitos “killer”, e por uma intensa reação oxidativa por parte dos macrófagos, induzida pelas citoquinas (Beugnet and Guillot 2018). *Leishmania* spp. promove maioritariamente uma resposta imunitária humoral através da estimulação de linfócitos Th2 e de linfócitos auxiliares, TCD 4+ (Beugnet and Guillot 2018).

Infeções naturais por outras espécies de *Leishmania* spp. podem ocorrer em cães, mas o seu papel como reservatório ainda é incerto (Rosypal et al. 2010).

Qualquer raça pode ser afetada por leishmaniose, porém algumas raças, nomeadamente Pastores Alemães e Boxers, aparentam estar mais predispostos a adquirir a doença (Paltrinieri et al. 2010).

Alguns casos de leishmaniose foram detetados em gatos, na região Sul da Europa, e em equinos, porém estes casos continuam a ser raros (Beugnet and Guillot 2018), uma vez que a infeção subclínica do parasita em gatos é comum (Asfaram et al. 2019).

6.2 Ciclo de vida

O ciclo de vida de *Leishmania* spp., um ciclo dimórfico (Alcolea et al. 2010), envolve flebótomos e cães (Beugnet and Guillot 2018). O ciclo dimórfico do parasita consiste no desenvolvimento de formas promastigotas no intestino do flebótomo até uma fase infetante

seguida da transmissão ao hospedeiro definitivo do parasita, alojando-se as formas amastigotas dentro de fagócitos (Alcolea et al. 2010).

O período de incubação do parasita pode variar de 1 mês a vários anos (Barr and Bowman 2012).

As fêmeas de flebótomos ingerem durante a sua refeição sanguínea as formas amastigotas do parasita, as quais se vão deslocar para o intestino médio do vetor e lá irá decorrer o seu desenvolvimento (Beugnet and Guillot 2018). Após 15 a 20 dias, dependendo da temperatura, as formas promastigotas que infetam os hospedeiros vertebrados concentram-se nas glândulas salivares do inseto (Beugnet and Guillot 2018). Aquando da refeição do inseto, este transmite as formas promastigotas ao hospedeiro vertebrado, no qual, as formas promastigotas entram em contacto com as células macrofágicas e são fagocitadas (Beugnet and Guillot 2018). Nos macrófagos, o parasita inicia processos de multiplicação e é transmitido de macrófago a macrófago por fagocitose, até se disseminar por todo o organismo (Beugnet and Guillot 2018). Os flebótomos inoculam o parasita *Leishmania* spp. através de picada nas regiões glabras dos cães, tais como o nariz e as orelhas (Beugnet and Guillot 2018).

O contágio direto entre cães, e entre cães e humanos, é extremamente raro, uma vez que requer contacto de uma ferida aberta contendo um exsudado rico em *Leishmania* spp. com outra área lesionada (Beugnet and Guillot 2018). No entanto, a transmissão uterina é possível (Beugnet and Guillot 2018).

6.3 Epidemiologia

O protozoário *Leishmania* spp. encontra-se difundido por 98 países (Asfaram et al. 2019). Em cada ano cerca de 58 mil cães estão em risco de exposição à infeção por *Leishmania* spp. no sul da Europa (Teske et al. 2002).

A *Leishmania infantum* é endémica na bacia mediterrânea (Alcolea et al.2010), médio oriente, Ásia central e China bem como na região oeste da África subsariana (Beugnet and Guillot 2018). A doença encontra-se também presente no sul e centro da América, no entanto, o parasita na América tem a designação de *Leishmania chagasi*, porém as suas características são exatamente iguais as de *Leishmania infantum* (Beugnet and Guillot 2018).

A leishmaniose visceral é endémica na América, no Mediterrâneo e em algumas regiões da Ásia como, a China e o Médio Oriente (Rosypal et al. 2010). A leishmaniose canina é endémica em Itália, Sardenia, Sicília, Espanha, Portugal, Corsica, Grécia e na região sul da França (Beugnet and Guillot 2018), variando bastante a prevalência da doença entre estes países (Sauda et al. 2018). Já foram reportados casos de Leishmaniose na região norte da França, na Bélgica, na Holanda, no Reino Unido e na Alemanha, porém estes devem-se a animais importados portadores da infeção e não de casos autóctones (Beugnet and Guillot

2018). Também já foram reportados casos de *Leishmania infantum* no Norte da América, mas nestes a infecção ocorre por transmissão vertical do parasita (Beugnet and Guillot 2018).

As infecções são sazonais, ocorrendo entre a Primavera e o Outono, contudo a expressão clínica da doença é observada durante todo o ano, devido ao facto de os tempos de incubação serem variáveis (Beugnet and Guillot 2018). Ciclos epidemiológicos rurais e periurbanos foram reportados (Beugnet and Guillot 2018). A maior prevalência da doença é observada em regiões mais remotas, no entanto, casos em cães que vivem nos subúrbios da cidade estão a ficar cada vez mais frequentes (Beugnet and Guillot 2018).

As duas espécies principais de vetores na Europa são *Phlebotomus ariasi* e *Phlebotomus perniciosus* (Beugnet and Guillot 2018). *Phlebotomus ariasi* está ativo no Verão e é característico da região oeste, nomeadamente norte da Espanha e sudoeste da França (Beugnet and Guillot 2018). O vetor pode ser encontrado no exterior das casas e em pequenas colinas, o que explica a natureza rural da infecção por *Leishmania* spp. (Beugnet and Guillot 2018). *Phlebotomus perniciosus* é ubiqüitário podendo ser encontrado em toda a região mediterrânica, vive perto das habitações e está mais ativo durante o crepúsculo (Beugnet and Guillot 2018). A sua população atinge o pico na Primavera e no Outono (Beugnet and Guillot 2018). Na Sérvia e na Croácia o principal vetor é o *Phlebotomus perfiliewi*, e na Grécia é maioritariamente o *Phlebotomus major* (Beugnet and Guillot 2018).

O estilo de vida dos cães tem um grande efeito no risco de contrair a infecção, já que, os cães que vivem no exterior, como sejam os cães de guarda e cães de rebanhos, estão mais suscetíveis às picadas dos flebótomos. (Beugnet and Guillot 2018).

Os gatos são afetados ocasionalmente pelo que não desempenham um papel epidemiológico (Beugnet and Guillot 2018).

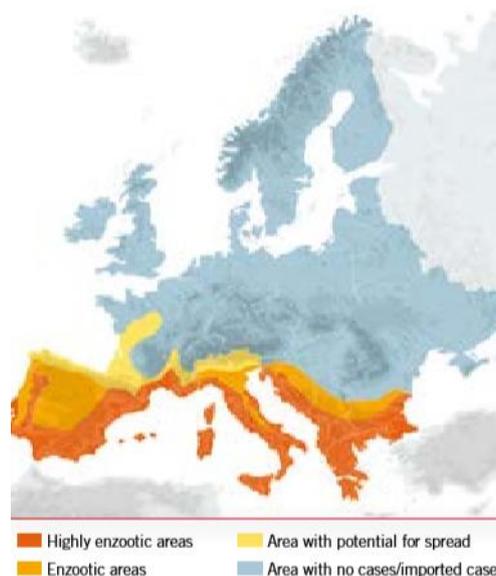


Figura II: Distribuição de Leishmaniose devido a *Phlebotomus* spp. na Europa (adaptado de Beugnet and Guillot 2018)

6.4 Sinais Clínicos

Os sinais clínicos em animais infetados com *Leishmania* spp. podem manifestar-se desde poucos meses a vários anos após a infeção (Teske et al. 2002), porém normalmente tendem a aparecer 3 meses a um ano após a infeção, por este motivo, podem encontrar-se animais positivos a *Leishmania* spp. que tenham estado em áreas enzoóticas há vários meses ou mesmo há vários anos (Beugnet and Guillot 2018).

Os sintomas na leishmaniose estão associados com a infiltração de todos os órgãos pelas células da linha macrofágica, causando alterações funcionais e destruindo os tecidos (Beugnet and Guillot 2018). A síntese de citocinas, responsáveis pela produção de interferão, IL-1 e o Fator de Necrose Tumoral, por exemplo, ajuda a explicar muitas das alterações que se observam na doença (Beugnet and Guillot 2018; Lombardi et al. 2019).

Um dos primeiros sinais a aparecer nos cães afetados é uma alteração no carácter do animal, este torna-se mais apático, deprimido e com apetite diminuído (Beugnet and Guillot 2018). Observa-se também desgaste muscular, iniciando-se na cabeça, especialmente nos músculos da mandíbula e na região temporal, conferindo ao animal um aspeto mais envelhecido (Beugnet and Guillot 2018). Em estadios mais avançados da doença o desgaste começa a ser notório também nos membros e nas ancas (Beugnet and Guillot 2018). Em animais novos, com menos de dois anos de idade pode observar-se também hipertermia inconstante (Beugnet and Guillot 2018).

As análises bioquímicas e o hemograma revelam normalmente a presença de anemia, leucopenia e trombocitopenia (Beugnet and Guillot 2018). A leucopenia geralmente é acompanhada por monocitose e hiperproteinémia (Beugnet and Guillot 2018). O aumento das globulinas que se observa resulta na alteração do rácio albumina/globulina de um para 0,3-0,1 (Beugnet and Guillot 2018).

Os sinais clínicos mais frequentes são intolerância ao exercício, perda de peso, diarreia, vômito, melena, esplenomegália (Barr and Bowman 2012), linfadenopatia, e problemas cutâneos (Teske et al. 2002; Asfaram et al. 2019). Os problemas cutâneos são variáveis, mas geralmente incluem hiperqueratose, apresentando-se como excessiva descamação da epiderme (Barr and Bowman 2012), especialmente no nariz, em redor dos olhos e na parte externa da orelha (Teske et al. 2002), a qual desaparece rapidamente quando o canídeo é tratado (Beugnet and Guillot 2018), observa-se ainda engrossamento, despigmentação e fissuras na região bucal e nas almofadinhas plantares (Teske et al. 2002). A epiderme fica mais fina e torna-se pigmentada, conferindo à pele um aspeto envelhecido (Beugnet and Guillot 2018). Observa-se também alopecia difusa, com diminuição do revestimento sem, no entanto, se observarem claramente zonas com perda total de pelo (Beugnet and Guillot 2018). A alopecia é mais pronunciada nos membros e na cabeça, especialmente em redor dos olhos, nas orelhas e na cauda (Beugnet and Guillot 2018).

Outro achado comum em cães com *Leishmania* spp. é onicogribose, a qual se deve à multiplicação do parasita na matriz das unhas, causando o sinal característico de crescimento constante e rápido das unhas (Beugnet and Guillot 2018). O crescimento das unhas está associado à presença de macrófagos infetados na matriz ungueal e à inflamação crônica que estimula o crescimento (Beugnet and Guillot 2018). Na leishmaniose outro sinal clínico que se observa são danos da mucosa, com o aparecimento de úlceras, as quais tendem a expandir, aumentando o fluxo de fluido seroso rico em *Leishmania* spp. (Beugnet and Guillot 2018). A principal localização das úlceras são no interior da orelha, no nariz, nas almofadinhas plantares, o que causa no canídeo, dor grave e origina muitas vezes claudicações, na mucosa pituitária, originando epistaxis, e na mucosa oral e gástrica (Beugnet and Guillot 2018).

É frequente encontrar ainda em algumas raças, por exemplo Boxers, nódulos subcutâneos, uma vez que a proliferação de células da linha macrofágica na derme pode originar nódulos com vários centímetros de diâmetro (Beugnet and Guillot 2018). Eventualmente pode-se observar também sinais oculares (Asfaram et al. 2019) como conjuntivites, queratite azul, uveíte anterior e coriorretinite (Beugnet and Guillot 2018). Sinais sistêmicos incluem diátese hemorrágica, uremia e anemia (Teske et al. 2002).

A abundância de complexos imunes explica a grande maioria das alterações, incluindo desenvolvimento progressivo de insuficiência renal crônica associado a glomerulonefrites, e poliartrites (Beugnet and Guillot 2018).

A leishmaniose é uma doença crônica e o animal pode manter uma condição satisfatória por vários meses, no entanto, geralmente tende a progredir para caquexia e numa fase mais avançada, morte (Beugnet and Guillot 2018). Apenas 10% dos cães são portadores saudáveis do parasita (Beugnet and Guillot 2018). O tratamento não elimina o parasita pelo que as recidivas são frequentes (Beugnet and Guillot 2018). A progressão da doença pode ser acelerada pelo desenvolvimento de poliartrite ou glomerulonefrite imunomediada (Beugnet and Guillot 2018).

6.5 Diagnóstico

O diagnóstico de *Leishmania* spp. é clínico, sendo baseado numa primeira fase em evidências clínicas e epidemiológicas (Beugnet and Guillot 2018).

A observação de alterações no hemograma e nas bioquímicas, com recurso a eletroforese proteica e a análise do perfil plasmático (Paltrinieri et al. 2010), constitui uma primeira evidência de que o animal possa estar infetado com *Leishmania* spp. (Beugnet and Guillot 2018). Geralmente observa-se, hiperproteinemia (100% dos casos), hipoalbuminemia (95% dos casos), proteinúria (85% dos casos), aumento das enzimas hepáticas (55% dos casos), trombocitopenia (50% dos casos), azotemia (45% dos casos), leucopenia, linfopenia

(20% dos casos) (Barr and Bowman 2012), monocitose de 4 a 40% e gamaglobulinemia (Beugnet and Guillot 2018).

O diagnóstico definitivo de leishmaniose pode ser obtido através de um método direto, nomeadamente, deteção das formas amastigotas de *Leishmania* spp., avaliação citológica e histológica, cultura de organismos e PCR ou por métodos indiretos, deteção serológica da infeção e avaliação da resposta imune (Paltrinieri et al. 2010).

Leishmania spp. vive dentro dos macrófagos, nomeadamente em órgãos como, baço, fígado, derme, e medula óssea, no entanto é raro encontrar nos monócitos sanguíneos o parasita, o que faz do sangue uma má amostra para diagnóstico da doença nos cães (Beugnet and Guillot 2018).

Leishmania spp. pode ser revelada pela coloração de May-Grunwald-Giemsa através da observação ao microscópio ótico com uma ampliação de 1000x de diversas amostras, tais como, uma camada de pele proveniente de uma lesão ulcerada, de raspagem da pele, da punção do linfonodo poplíteo ou de aspirado de medula óssea (Beugnet and Guillot 2018). A punção do linfonodo não é dolorosa, fácil de executar e segura para o animal, constituindo uma boa fonte de diagnóstico (Beugnet and Guillot 2018).

A seroconversão pode ocorrer meses após a infeção, para infeções naturais o intervalo pode variar de 1 a 22 meses, sendo o tempo médio de 5 meses (Paltrinieri et al. 2010). Como o período de incubação é longo, quando o animal começa a apresentar sinais clínicos os testes serológicos normalmente já são positivos ao parasita (Beugnet and Guillot 2018). As imunoglobulinas podem ser detetadas mediante o recurso a ELISA ou Imunofluorescência indireta (Barr and Bowman 2012; Beugnet and Guillot 2018). Os testes de imunodifusão encontram-se disponíveis para uso nas clínicas veterinárias (Beugnet and Guillot 2018).

A serologia pode ser utilizada para avaliar o prognóstico, uma vez que, quanto mais elevados forem os valores de anticorpos pior é o prognóstico (Beugnet and Guillot 2018). O tratamento deve reduzir o nível de anticorpos para no mínimo duas diluições, preferencialmente abaixo de 1: 320 (Beugnet and Guillot 2018). A serologia deve ser realizada um mês antes do fim do tratamento e posteriormente a cada 6 meses, de forma a monitorizar a doença no animal (Beugnet and Guillot 2018).

A apresentação clínica da doença nos gatos é ambígua pelo que o diagnóstico é realizado frequentemente após biopsia de pele, de medula óssea ou de um linfonodo (Beugnet and Guillot 2018).

6.6 Tratamento

A doença nos cães pode ser grave, avança gradualmente até à morte do animal e a terapêutica apenas providência uma melhoria temporária, não eliminando o parasita e sendo frequentes as recaídas (Beugnet and Guillot 2018).

Tendo em conta o carácter zoonótico da doença e devido ao papel desempenhado pelos cães como reservatório deve se recomendar a eutanásia em animais que apresentem um grande número de lesões externas e com condição clínica geral pouco saudável (Barr and Bowman 2012; Beugnet and Guillot 2018).

Na Europa os únicos fármacos registados para o tratamento de leishmaniose canina são meglumina antimoniato, miltefosina e aminosidina (Lombardi et al. 2019). O tratamento para a leishmaniose consiste na administração de meglumina antimoniato na dose de 100mg/Kg, SC, durante 30 dias, sendo que a dose máxima para um canídeo de grande porte é de 5g por dia (Beugnet and Guillot 2018).

Na primeira semana do tratamento pode observar-se o aparecimento de novos sinais clínicos associados com a libertação de antigénios de *Leishmania* spp. para o corpo (Beugnet and Guillot 2018). Como estes podem afetar o rim e o fígado, especialmente em cães enfraquecidos ou com insuficiência renal crónica, deve-se administrar terapia de suporte, nomeadamente protetores hepáticos e diuréticos (Beugnet and Guillot 2018). Assim como, fornecer ao animal uma dieta com proteína de elevada qualidade (Barr and Bowman 2012).

O medicamento alopurinol funciona como leishmaniostático em cães na dose de 15 mg/Kg BID, durante 30 dias, podendo ser administrado logo de seguida à confirmação do diagnóstico, mesmo se a condição clínica do animal exigir terapêutica de suporte renal, o que não se verifica se se recorrer a tratamento tradicional (Beugnet and Guillot 2018). Este tratamento inicial é seguido da administração de alopurinol (Barr and Bowman 2012) na dose de 15 mg/Kg por dia (Beugnet and Guillot 2018). Se o tratamento for descontinuado, a grande maioria dos animais sofre recaída nos meses que se seguem à interrupção do tratamento (Beugnet and Guillot 2018). A administração continuada de alopurinol reduz o número de parasitas que recuperam fazendo com que a probabilidade de ocorrerem recidivas seja menor (Beugnet and Guillot 2018; Lombardi et al. 2019). No entanto, o alopurinol não elimina completamente o parasita pelo que *Leishmania* spp. pode continuar a ser identificada em cultura ou por PCR de amostras de medula óssea, de sangue periférico e de punção de linfonodos, de cães que tenham atingido após o tratamento, uma condição clínica satisfatória (Beugnet and Guillot 2018).

O medicamento miltefosina pode ser utilizado como terapêutica única em cães ou em combinação com o alopurinol (Beugnet and Guillot 2018; Lombardi et al. 2019) ou com anfotericina B (Barr and Bowman 2012; Lombardi et al. 2019). A sua administração é feita na dose de 2 mg/Kg PO por dia durante 30 dias (Beugnet and Guillot 2018). Este medicamento

é recomendado para cães que tenham tido efeitos secundários ao tratamento com meglumina antimoniato (Beugnet and Guillot 2018).

Os tratamentos em gatos, até à data, não têm tido sucesso (Beugnet and Guillot 2018).

7.MYCOPLASMA SPP.

7.1 Caracterização geral

Os dados relativos a doenças transmitidas por vetores de origem bacteriana são escassos (Mascarelli et al. 2016).

Mycoplasma spp. é uma bactéria fastidiosa, anaeróbia facultativa, gram negativa e que constitui o organismo procariota mais pequeno e mais simples, cerca de 0,2 a 0,3 µm, capaz de realizar autorreplicação, através do processo de fissão binária (Barr and Bowman 2012). A bactéria não tem parede celular (Maggi et al. 2013; Bergmann et al. 2017) pelo que é sensível a lise por choque osmótico, a detergentes e a álcool (Barr and Bowman 2012).

Mycoplasma spp. é um organismo comensal da membrana das mucosas do sistema respiratório superior, sistema digestivo e aparelho genital (Barr and Bowman 2012). De um modo geral, esta bactéria induz infeções persistentes intravasculares assintomáticas em animais domésticos e selvagens, não sendo as infeções consideradas de elevado risco patogénico (Maggi et al. 2013).

A análise filogenética de sequências de gene 16S rRNA permitiram a identificação de duas espécies principais, *Mycoplasma suis* e *Mycoplasma haemofelis* (Maggi et al. 2013). O subgrupo de *Mycoplasma suis* inclui “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, *Mycoplasma suis*, *Mycoplasma wenyonii*, “*Candidatus Mycoplasma haemolamae*” e “*Candidatus Mycoplasma haemodidelphidis*”, os quais já foram reportados em gatos, suínos, alpacas, bovinos, e em elementos da família *didelphidae*, respetivamente (Maggi et al. 2013). O subgrupo *Mycoplasma haemofelis* inclui *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemomuris* e *Mycoplasma haemocanis*, reportados respetivamente em gatos, roedores e cães (Maggi et al. 2013). Estes agentes são denominados de micoplasmas hemotrópicos ou hemoplasmas gatos e são responsáveis pelo aparecimento da doença Micoplasmosse hemotrópica, (Munhoz et al. 2018) na qual a principal manifestação clínica é a anemia hemolítica (Bergmann et al. 2017). As espécies *Mycoplasma gateae* e *Mycoplasma felis* geralmente são encontrados na cavidade oral e no trato urogenital de cerca de 70% a 80% dos gatos (Barr and Bowman 2012).

Mycoplasma spp. é exigente quanto ao hospedeiro, uma vez que, requer contacto direto com as células dos hospedeiros para obter nutrientes (Barr and Bowman 2012).

A bactéria induz numa primeira fase uma resposta imunitária humoral, induzindo a formação de um exsudado fibrinoso, o qual protege o organismo de antibióticos e medicamentos antimicrobianos e contribui para a ocorrência de infeções crónicas (Barr and Bowman 2012). As bactérias comensais do organismo tendem a despoletar infeções sistémicas quando associadas a imunodeficiências, imunossupressão ou a cancro (Barr and Bowman 2012). Alterações da resistência do hospedeiro permitem que os organismos passem a barreira mucosa e se disseminem pelo organismo (Barr and Bowman 2012).

7.2 Ciclo de vida

A transmissão natural dos micoplasmas hemotrópicos em gatos é desconhecida, no entanto, como estes já foram detetados na saliva de gatos, através de PCR, supõe-se que a transmissão direta em contexto de interações sociais e agressivas possa ocorrer (Museux et al. 2005; Bergmann et al. 2017).

Um estudo realizado por Museux et al. em 2009 demonstrou que a ocorrência de infeção por partilha de taças de refeição ou durante a higienização entre animais infetados e animais saudáveis é pouco provável, no entanto caso estas estejam contaminadas com sangue infetado, a probabilidade de ocorrer infeção aumenta. Segundo Bergmann et al. em 2017 o parasita também pode ser transmitido por vetores artrópodes.

7.3 Epidemiologia

Os micoplasmas hemotrópicos apresentam elevadas variações quanto à sua prevalência e à sua distribuição geográfica (Munhoz et al. 2018).

De um modo geral, em todo o planeta é possível observar-se infeções por *Mycoplasma* spp. em gatos, sendo até mesmo consideradas comuns, havendo estudos que indicam que a prevalência da infeção é de 9,9% na Suíça e de 38,5% em África (Bergmann et al. 2017). Em ambiente selvagem, os micoplasmas hemotrópicos já foram detetados num vasto conjunto de gatos por todo o mundo (Millán et al. 2018).

Recentemente, o ADN de diversas espécies de hemoplasmas foram reportados num elevado número de espécies no Japão e no Brasil, em *Lycalopex fulvipes* no Chile, em *Vulpes lagopus* no Canadá, em *Procyon lotor* nos Estados Unidos da América e em *Vulpes vulpes* na Eslováquia (Millán et al. 2018).

Infeções por hemoplasmas na península ibérica são comuns em mamíferos selvagens (Millán et al. 2018). A prevalência na península ibérica de infeções por hemoplasmas, tendo em conta um estudo levado a cabo por Millán et al. em 2018, foi de 15 % a 60%, variando conforme a espécie afetada.

7.4 Sinais Clínicos

A infecção por *Mycoplasma haemofelis* tende a ser a mais patogénica, (Bergmann et al. 2017) especialmente na fase aguda da doença, com elevada parasitemia nos eritrócitos, a qual conduz a anemia hemolítica grave (Woods et al. 2005; Munhoz et al. 2018).

Em estudos experimentais em gatos, a infecção aguda por *Mycoplasma haemofelis* resultou geralmente em anemia hemolítica grave, em animais imunocompetentes (Barker 2019). No entanto, houve situações em que apenas se observou o desenvolvimento de uma anemia moderada, tendo sido sugerido que o fator idade possa influenciar a gravidade da anemia presente, em que os animais mais jovens são mais suscetíveis a anemias mais severas (Barker 2019).

A infecção por "*Candidatum Mycoplasma haemominutum*" apenas é patogénica em casos de coinfeção (Munhoz et al. 2018). "*Candidatum Mycoplasma turicensis*" pode provocar o aparecimento no hospedeiro de anemia moderada a grave (Munhoz et al. 2018).

A infecção por *Mycoplasma* spp. é maioritariamente subclínica (Bergmann et al. 2017). Sinais clínicos podem ocorrer após longos períodos de latência sob condições de imunossupressão (Bergmann et al. 2017). Infeções pelo vírus da imunodeficiência felina (Woods et al. 2005) e o vírus da leucemia felina, podem estar associadas com o desenvolvimento de sinais clínicos em alguns gatos (Bergmann et al. 2017).

Após o aparecimento dos primeiros sinais clínicos, podem ocorrer períodos alternados de anemia com fases subclínicas (Bergmann et al. 2017). Muitos dos sinais clínicos reportados nas hemoplasmoses resultam da anemia que se desenvolve na infecção ou como consequência do processo imunomediado, o qual pode ser fatal (Barker 2019).

Nos gatos observam-se alterações principalmente a nível oftálmico, com a ocorrência de conjuntivites, no sistema respiratório, observando-se pneumonias e infecção do trato respiratório superior e a nível músculo-esquelético, com a ocorrência de poliartrite fibrino-purulenta crónica (Barr and Bowman 2012). Ao nível do trato urogenital observam-se infeções urinárias e ao nível reprodutivo verifica-se aumento da incidência de aborto e morte fetal (Barr and Bowman 2012). As alterações cutâneas que geralmente ocorrem são abscessos cutâneos crónicos (Barr and Bowman 2012).

Nos cães os sinais clínicos mais frequentes ao nível do trato respiratório são febre, desconforto, pneumonia e infeções do trato respiratório superior (Barr and Bowman 2012). Ao nível do trato urogenital observam-se principalmente balanopostites, uretrites, prostatites, cistites, nefrites, vaginites e endometrites ao passo que, ao nível do trato reprodutivo se observam casos de infertilidade, morte prematura do embrião, aborto, recém-nascidos frágeis e aumento da mortalidade neonatal (Barr and Bowman 2012). Podem ocorrer ainda ao nível do sistema musculoesquelético, artrites e ao nível do sistema gastrointestinal, colites (Barr and Bowman 2012).

7.5 Diagnóstico

Animais infetados com *Mycoplasma* spp. tendem a revelar ao hemograma anemia moderada e leucocitose neutrofilica, associada muitas vezes com a presença de poliartrites ou pneumonia (Barr and Bowman 2012).

Nas análises bioquímicas costuma-se encontrar hipoalbuminemia e hiperglobulinemia, estando esta última associada à poliartrite (Barr and Bowman 2012). O médico pode ainda recorrer ao exame de urinálise, o qual poderá revelar a presença de proteinúria em casos clínicos onde estejam presentes glomerulonefrites com formação de complexos imunes (Barr and Bowman 2012).

O grande desafio no diagnóstico de micoplasmoses é distinguir entre a presença de organismos comensais de organismos patogénicos (Barr and Bowman 2012). A bactéria é difícil de demonstrar em tecidos, sendo extremamente pleomórfica em esfregaços, muitas vezes observada como coccobacilos, com forma de anel ou de coccus, espirais ou filamentos, acresce ainda o facto de que a bactéria cora pouco, já que é gram-negativa (Barr and Bowman 2012). Assim sendo, o método de coloração preferível é a coloração de Giemsa ou outras colorações de Romanowsky (Barr and Bowman 2012).

A examinação citológica de esfregaços sanguíneos com recurso ao microscópio ótico, consiste no método mais simples e tradicional utilizado para a deteção de *Mycoplasma* spp. (Woods et al. 2005; Munhoz et al. 2018) em medicina veterinária, especialmente durante a fase aguda da infeção, na qual está presente uma forte bacteriemia com mais de 90% dos eritrócitos parasitados (Maggi et al. 2013). No entanto, a sensibilidade de um esfregaço sanguíneo é geralmente inferior a 20% em animais com infeções crónicas, além de que, a especificidade da observação de esfregaços sanguíneos é dificultada pela presença de artefactos, tais como, corpos de Howell-Jolly e precipitados (Maggi et al. 2013). Estas duas condicionantes ao diagnóstico conduzem a que se acabe por recorrer muitas vezes a métodos mais sensíveis, tais como PCR (Woods et al. 2005), PCR em tempo real e Western Blot, essenciais na deteção e diferenciação de micoplasmas hemotrópicos, especialmente em casos com baixa parasitemia (Munhoz et al. 2018).

Os fatores de risco normalmente associados com a infeção são a idade, o sexo, a raça, o nível de stress a que o animal está sujeito, e infeções por FIV e FELV (Munhoz et al., 2018). A infeção por FIV e FELV tende a provocar imunossupressão no hospedeiro, o que resulta em alguns casos no aumento da multiplicação de micoplasmas hemotrópicos, permitindo que o animal fique mais suscetível a desenvolver micoplasmoses hemotrópicas agudas (Munhoz et al. 2018).

O diagnóstico definitivo é baseado no isolamento e identificação ou deteção do *Mycoplasma* spp. em tecidos com recurso a anticorpos fluorescentes (Barr and Bowman 2012).

7.6 Tratamento

Gatos com anemias graves que possam resultar em compromisso cardiovascular, incluindo aqueles com anemia causada por micoplasmoses, são animais frágeis e que exigem manuseamento cuidadoso até à confirmação do diagnóstico (Barker 2019).

A micoplasmose clínica, quando confirmada, pode ser tratada com sucesso recorrendo a um conjunto de antibióticos apropriados em conjugação com manutenção de suporte básico (Barker 2019). Apesar da resolução clínica de micoplasmose, a infecção só é eliminada numa minoria dos casos, sendo que, alguns gatos podem curar espontaneamente a infecção sem qualquer tratamento antibiótico (Barker 2019).

O tratamento de primeira escolha para as infeções por *Mycoplasma* spp. é a doxiciclina, uma vez que o fármaco é bem tolerado pelos gatos, tendo elevada eficácia no tratamento de infeções por *Mycoplasma* spp. (Lappin et al. 2017). O tratamento dura 4 a 6 semanas sendo a doxiciclina administrada na dose de 5 mg/kg, PO ou IV, BID (Barr and Bowman 2012) ou na dose de 10 mg/kg PO SID (Lappin et al. 2017). Em alguns gatos a doxiciclina pode provocar esofagite e constrição esofágica (Barr and Bowman 2012). O fármaco está ainda contraindicado em animais gestantes ou em lactação (Barr and Bowman 2012).

Podem também ser utilizadas no tratamento de micoplasmoses, tetraciclina, na dose de 22 mg/kg PO, TID, durante 4 a 6 semanas, cloranfenicol, na dose de 50 mg/kg, PO, IV, SC, IM, TID em cães e BID em gatos (Lappin et al. 2017), durante 4 a 6 semanas e outros medicamentos alternativos, como as gentamicinas, dose de 9 a 14 mg/kg nos cães e na dose 5 a 8 mg/kg nos gatos, IV SID (Lappin et al. 2017), espectinomicina, canamicina, espiramicina, tilosina, eritromicina, na dose de 10 a 20 mg/kg, PO, em intervalos de 8 a 12 horas, durante 4 a 6 semanas e fluoroquinolonas, nomeadamente enrofloxacina, na dose de 5 mg/kg PO SID em gatos e na dose de 5 a 20 mg/kg em cães PO, IM, IV, SID (Lappin et al. 2017), durante 4 a 6 semanas (Barr and Bowman 2012).

Quando os animais afetados desenvolvem sinais clínicos, como conjuntivites, deve ser prescrito terapêutica que auxilie a cura clínica, além da terapêutica que elimina o parasita, recorrendo-se por exemplo ao uso de antibióticos tópicos (Barr and Bowman 2012).

8. RICKETTSIA SPP.

8.1 Caracterização Geral

Dentro da ordem Rickettsiales, fazem parte duas famílias, Rickettsiaceae e Anaplasmataceae, de bactérias gram-negativas (Oliveira et al. 2019) intracelulares obrigatórias, com capacidade para infetar cães e gatos (Allison and Little 2013). Os membros da família Rickettsiaceae crescem livremente no citoplasma das células dos hospedeiros, ao

passo que os membros da família Anaplasmataceae se replicam dentro de um vacúolo constituído por membrana citoplasmática do hospedeiro (Allison and Little 2013).

O género *Rickettsia* spp. é responsável por despoletar no ser humano “Febre da carraça”, rondando a taxa de mortalidade cerca de 2,5% (Solano-Gallego et al. 2015).

O papel dos cães como transmissores ao ser humano do hemoparasita ainda não é claro, apesar dos cães serem os principais vetores de *Rickettsia* spp. a sua suscetibilidade à infeção pelo parasita, bem como o tempo em que a infeção está ativa constituindo um potencial zoonótico, não é totalmente conhecida (Solano-Gallego et al. 2015).

O género *Rickettsia* spp. encontra-se dividido em 4 grupos, com base nas suas características genotípicas (Oliveira et al. 2019). O grupo da febre maculosa associado a ixodídeos, do qual fazem parte as espécies *Rickettsia rickettsi*, *Rickettsia conorii* e *Rickettsia parkeri*, grupo tifo associado a piolhos e pulgas (Oliveira et al. 2019), do qual fazem parte as espécies *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*, o grupo transicional, associado a pulgas, ácaros e carraças (Oliveira et al. 2019), do qual fazem parte as espécies *Rickettsia felis*, *Rickettsia akari* e *Rickettsia australis*, e por último, o grupo ancestral não patogénico associado a um vasto conjunto de vetores, tais como carraças, sanguessugas, insetos, protozoários e plantas (Oliveira et al. 2019), do qual fazem parte as espécies *Rickettsia bellii* e *Rickettsia canadensis* (Contreras et al. 2019).

Do grupo da febre maculosa, a espécie *Rickettsia rickettsi* tem como principais vetores *Dermacentor variabilis*, *Dermacentor andersoni* (Barr and Bowman 2012), *Amblyomma cajennense*, *Rhipicephalus sanguineus* enquanto *Rickettsia conorii* tem apenas como principal vetor *Rhipicephalus sanguineus* (Allison and Little 2013). A espécie *Rickettsia felis* tem como principal vetor *Ctenocephalides felis* e a espécie *Rickettsia akari*, *Liponyssoides sanguineus* (Allison and Little 2013).

8.2 Ciclo de vida

Todos os agentes patogénicos da ordem Rickettsiales que afetam cães e gatos, necessitam de um vetor para a manutenção da infeção na natureza e para a transmissão de animais infetados a outros animais (Allison and Little 2013).

A transmissão ocorre através da saliva do vetor, por transfusão sanguínea (Barr and Bowman 2012), através de produtos contaminados com sangue ou através de contacto por exposição direta a animais vertebrados infetados ou a vetores infetados (Allison and Little 2013).

Os principais vetores são artrópodes, nomeadamente carraças e pulgas, sendo que a transmissão ocorre durante o processo de alimentação dos vetores (Allison and Little 2013). Os ixodídeos ficam infetados durante o processo de alimentação em pequenos mamíferos,

como sejam os roedores, assim como, através de transmissão transestadial e vertical mediante passagem transovariana entre gerações (Stiles 2000).

De modo geral, para que ocorra a transmissão do hemoparasita é necessário que o ixodídeo se alimente no hospedeiro durante pelo menos 5 a 20 horas (Barr and Bowman 2012). Os vetores tremátodes infetados com *Rickettsia* spp. são transmitidos aos cães e ou gatos através da ingestão de um hospedeiro intermediário contendo metacercárias (Allison and Little 2013).

O principal vetor de *Rickettsia felis* é *Ctenocephalides felis*, porém carraças, ácaros, e piolhos também já foram encontrados infetados pelo hemoparasita (Contreras et al. 2019).

A espécie *Rickettsia felis* na população de *Ctenocephalides felis* é mantida principalmente através de transmissão transestadial e transovariana (Contreras et al. 2019). Em colônias de *Ctenocephalides felis* a transmissão vertical é considerada a forma de transmissão primária, com a prevalência de *Rickettsia felis* nas colônias de *Ctenocephalides felis* a variar de 43 a 100% (Contreras et al. 2019).

Na natureza, a alimentação das pulgas em hospedeiros mamíferos infetados com *Rickettsia felis* amplifica a prevalência de *Rickettsia felis* na população de pulgas (Contreras et al. 2019).

8.3 Epidemiologia

A espécie *Rickettsia rickettsi* encontra-se principalmente no norte e sul da América, ao passo que a espécie *Rickettsia conorii* predomina na Europa, Ásia, Médio oriente, Índia e África (Allison and Little 2013). A espécie *Rickettsia akari* tem distribuição mundial (Allison and Little 2013).

Investigações epidemiológicas permitiram a detecção de *Rickettsia felis* em pulgas de diferentes áreas geográficas do mundo, o que suporta a distribuição cosmopolita do agente patogénico (Capelli et al. 2009). Casos de pulgas infetadas foram reportados em vários países da América e casos humanos de febre maculosa por *Rickettsia felis* foram descritos recentemente nos Estados Unidos da América, México e Brasil (Contreras et al. 2019).

Na região sudeste dos Estados Unidos a seroprevalência de *Rickettsia rickettsi* no ser humano está estimada em 10 a 12% nas crianças e de 20% nos adultos, sendo que casos reportados em cães sugerem uma seroprevalência igualmente elevada (Allison and Little 2013). Vários estudos, recorrendo a testes de imunofluorescência indireta, conduzidos em regiões endémicas de *Rickettsia conorii*, como é exemplo a Itália, reportaram em cães anticorpos anti-*R.conorii* registando-se taxas de seroprevalências de 15,5% a 74% (Solano-Gallego et al. 2015). A elevada taxa de seroprevalência encontrada nos cães em Itália leva a crer que a exposição ao hemoparasita é bastante frequente ou então que se verifica uma persistente infeção de baixa severidade com organismos da ordem Rickettsiales ou com

organismos que realizam reação cruzada com antígenos de *Rickettsia conorii* em testes de imunofluorescência indireta (Solano-Gallego et al. 2015). Vários estudos detectaram DNA de *Rickettsia* spp. no sangue de cães em Espanha e Itália (Solano-Gallego et al. 2015).

A febre da carraça no ser humano na região mediterrânica é uma doença sazonal, sendo frequentemente diagnosticada entre abril e outubro, tendo um pico máximo entre junho e agosto, nos meses quentes da Primavera e Verão (Huntzinger 2007), o qual tem forte correlação com o ciclo de vida do principal vetor do microrganismo, o ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus* (Barr and Bowman 2012; Solano-Gallego et al. 2015).

8.4 Sinais Clínicos

A grande maioria das espécies de *Rickettsia* spp. infetam as células endoteliais (Barr and Bowman 2012), apenas a espécie *Rickettsia rickettsi* além de afetar as células endoteliais afeta também a camada muscular (Allison and Little 2013). *Rickettsia rickettsi* invade os vasos sanguíneos e replica-se nas células endoteliais, o que conduz eventualmente a dano endotelial observando-se posteriormente vasculite e ativação plaquetária e do sistema de coagulação (Stiles 2000). Vasculite necrosante pode ocorrer devido à ativação do complemento, com posterior extravasamento sanguíneo (Stiles 2000).

A infecção de cães e gatos com *Rickettsia* spp. resulta num vasto espectro de doença desde sintomatologia inaparente e subclínica a severa, potencialmente fatal (Allison and Little 2013). Três dias após a fixação da carraça pode começar a observar-se febre, seguindo-se posteriormente o aparecimento de anorexia e depressão (Stiles 2000; Barr and Bowman 2012). Quando a infecção resulta em doença, os animais infetados geralmente desenvolvem febre, letargia, mialgia e em casos mais graves, diátese hemorrágica (Allison and Little 2013).

Cães infetados com *Rickettsia rickettsi* tanto podem ter uma infecção subclínica como podem desenvolver a doença com expressão mais grave, observando-se febre, anorexia, letargia, trombocitopenia, hemorragias petequiais e sinais neurológicos (Allison and Little 2013). As hemorragias petequiais e as equimoses ocorrem frequentemente e são mais frequentemente observadas na membrana mucosa dos olhos, boca, vulva e prepúcio (Stiles 2000). Alterações neurológicas, como sejam, doença vestibular, são comuns em casos de infecção pelo parasita (Stiles 2000). Também é comum observar-se edema (Barr and Bowman 2012) e necrose dos tecidos moles das extremidades (Stiles 2000).

Nos gatos a infecção por *Rickettsia rickettsi* não é comum (Allison and Little 2013).

As restantes espécies de *Rickettsia* spp. têm apresentações subclínicas da doença tanto em cães como em gatos (Allison and Little 2013).

A ocorrência de trombocitopenia é bastante comum, mesmo em casos subclínicos, porém a anormalidade na função plaquetária é provavelmente o responsável pelo aparecimento de petéquias, equimose e epistaxes observadas na grande maioria dos animais

infetados (Allison and Little 2013). Em casos de infecção por *Rickettsia rickettsi* também se pode observar lesões oculares, envolvendo a ocorrência de vasculite (Stiles 2000). As alterações podem incluir hiperemia conjuntival, hemorragia subconjuntival, hifema, uveíte anterior, hemorragia do estroma da íris, hemorragia da retina, edema da retina, e infiltração perivascular de células inflamatórias na retina (Stiles 2000). Em casos mais graves, o hifema pode culminar em glaucoma, especialmente se não for desobstruído rapidamente (Stiles 2000).

Em casos de infecção por agentes do grupo da febre maculosa as alterações laboratoriais mais frequentes incluem leucopenia inicial seguida de moderada leucocitose, trombocitopenia, anemia (Barr and Bowman 2012), aumento do fibrinogênio, aumento do tempo de coagulação ativada e do tempo de tromboplastina parcial ativada, aumento moderado ALP, ALT, AST, hipercolesterolemia e hipoalbuminemia (Stiles 2000).

8.5 Diagnóstico

Testes serológicos, como sejam a IFA e ELISA, têm sido um alicerce fundamental na confirmação de suspeitas clínicas de infecções por organismos da ordem *Rickettsiales* (Stiles 2000; Barr and Bowman 2012), principalmente devido às dificuldades que se observam no isolamento do agente em cultura assim como, nas dificuldades em identificar o parasita em sangue periférico com recurso a PCR (Allison and Little 2013). Ambos os testes são altamente sensíveis, requerem apenas uma pequena quantidade de soro e os anticorpos segregados reagem tanto à classe IgM e IgG (Stiles 2000; Barr and Bowman 2012).

O método mais utilizado para diagnóstico serológico de *Rickettsia rickettsi* é a Imunofluorescência Indireta (Allison and Little 2013). Para a realização da técnica, o soro de animais suspeitos de terem contraído a infecção é colocado em slides que foram previamente revestidos com células infetadas com *Rickettsia rickettsi* (Allison and Little 2013). Os anticorpos presentes no soro do animal, os quais se unem às células infetadas com *Rickettsia* spp., são detetados por identificação dos fluorocromos de isotiocianato de fluoresceína, ligados aos antigénios, mediante a união anticorpo, antigénio (Allison and Little 2013).

O título de anticorpos é determinado pela realização de uma série de diluições (Allison and Little 2013). Títulos de IgG inferiores ou iguais a 64 são considerados negativos (Stiles 2000). Cães infetados podem não ter títulos superiores a 64 no início do aparecimento dos sinais clínicos, uma vez que os níveis de IgG só aumentam 2 a 3 semanas após a infecção (Stiles 2000). O título de IgM pode aumentar antes do título de IgG, sendo que, títulos inferiores ou iguais a 8 de IgM são considerados negativos (Stiles 2000). O título máximo de IgM vai ser tipicamente quatro diluições mais baixo do que o título de IgG no mesmo animal (Stiles 2000). O título de IgM atinge o seu pico 4 a 8 semanas após a infecção, sofrendo uma descida gradual posteriormente, ao passo que, o título de IgG começa a diminuir 3 a 5

semanas após a infecção (Stiles 2000). Quando se recorre a Imunofluorescência indireta, uma alteração de 4 vezes superior ou inferior no título de anticorpos no espaço de 4 semanas, evidência que a infecção está ativa (Allison and Little 2013).

Doentes com febre maculosa tendem a apresentar uma situação clínica aguda porem podem não ter desenvolvido ainda uma resposta imunitária detetável, pelo que um teste negativo de anticorpos não deve ser utilizado para descontinuar ou não prescrever antibióticos específicos para a infecção quando existem fortes suspeitas da presença da doença (Allison and Little 2013). Por outro lado, em animais clinicamente normais, é frequente detetarem-se anticorpos anti-*Rickettsia rickettsi*, particularmente em regiões com elevada população de ixodídeos, especialmente devido a infeções passadas ou recentes com outras espécies de *Rickettsia* spp., muitas das quais se sabe não serem patogénicas (Allison and Little 2013).

A biopsia de lesões cutâneas para a realização de imunofluorescência direta pode detetar *Rickettsia* spp. cerca de 3 a 4 dias após a infecção, no entanto a biopsia de regiões de pele normal tende a ser negativa mesmo em cães infetados (Stiles 2000). Um diagnóstico positivo pode ser alcançado em 75% das amostras de regiões cutâneas com lesões (Stiles 2000). Resultados falsos-positivos são raros de acontecer, contudo, pode ocorrer até cerca de 40% de resultados falsos-negativos (Stiles 2000). No entanto, o recurso a biopsia de lesões cutâneas deve ser considerado na mesma como uma importante ferramenta de diagnóstico precoce da doença (Stiles 2000).

Para a deteção de alterações oculares, revela-se fundamental o recurso ao exame oftálmico de fundoscopia (Stiles 2000).

8.6 Tratamento

A administração de doxiciclina na dose de 10 a 20 mg/Kg BID durante 7 dias tem sido a terapêutica eficaz no tratamento de cães com infecção por *Rickettsia* spp. do grupo da febre maculosa (Stiles 2000; Barr and Bowman 2012).

Tetraciclina na dose de 22 a 30 mg/Kg TID, cloranfenicol na dose de 15 a 30 mg/Kg TID e enrofloxacin na dose de 3mg/Kg BID, cada um dos fármacos administrados durante 7 dias, revelou ser um tratamento igualmente eficaz na eliminação do parasita (Stiles 2000; Barr and Bowman 2012).

O recurso a doxiciclina ou trovafloxacin na dose de 5 mg/Kg BID durante 7 dias foi igualmente eficaz no tratamento dos sinais clínicos, reduzindo as lesões vasculares da retina como demonstrado mediante o recurso a angiografia com fluoresceína e eliminou de forma viável os organismos em circulação (Stiles 2000). Azitromicina na dose de 3mg/Kg SID durante 3 dias, revelou-se menos eficaz (Stiles 2000).

O tratamento de animais jovens, com tetraciclina, doxiciclina ou com fluoroquinolonas, deve ser evitado, tendo em conta que estes fármacos, tendem a provocar o aparecimento de manchas dentárias e alterações na cartilagem, respetivamente (Stiles 2000), estando então recomendado o uso de cloranfenicol em animais com idade inferior a 6 meses (Barr and Bowman 2012).

O tratamento específico das lesões oculares em casos de febre maculosa pode ser necessário, consoante a gravidade das lesões (Stiles 2000). Lesões oculares moderadas podem resolver-se rapidamente com a antibioterapia sistémica adequada (Stiles 2000). Uveíte anterior e hifema devem ser tratados com a aplicação tópica de corticosteroides, tais como, acetato de prednisolona a 1% ou 0,15 de dexametasona (Stiles 2000). A aplicação de tropicamida (miotático de curta duração) várias vezes ao dia, em casos de hifema, pode ajudar a minimizar o risco de glaucoma associado ao uso de atropina (Stiles 2000). Lesões em regiões posteriores mais graves, tais como, coriorretinites, descolamento da retina, ou grandes áreas de hemorragias, devem ser tratadas com corticosteroides sistémicos em associação com a antibioterapia (Stiles 2000).

9.MEDIDAS DE PREVENÇÃO E PROFILAXIA

Uma vez que as hemoparasitoses são uma questão de saúde pública, recorrer a palestras e campanhas orientadas por profissionais da área da saúde, com o objetivo de informar a população quanto ao modo de transmissão, tratamento e prevenção da doença, poderá revelar-se uma boa medida de profilaxia (Silva 2015).

Sempre que um animal entra num canil ou numa propriedade, deve ser realizado tratamento de prevenção para ixodídeos, assim como quarentena, caso existam outros animais no local, para evitar a infeção dos restantes animais (Silva 2015).

No que se refere à babesiose em alguns países é possível vacinar os animais contra *Babesia canis* (Beugnet and Guillot 2018). A vacina é baseada na administração de antigénios naturais de *Babesia canis*, sendo o objetivo da administração a redução da gravidade dos sinais clínicos (Beugnet and Guillot 2018).

O controlo e a prevenção de dirofilarioses revela-se um ponto chave para reduzir a dispersão da doença em animais e seres humanos (Genchi et al. 2019). A prevenção em casos de dirofilariose subcutânea passa pelo uso de ectoparasiticidas de largo espectro, que repelem e destroem os vetores da doença (Maireles et al. 2014).

No caso da leishmaniose a profilaxia é limitada e difícil devido à dificuldade de destruição do vetor (Beugnet and Guillot 2018). É impossível controlar o ambiente exterior quimicamente, pelo que o controlo passa por evitar as picadas de flebótomos (Beugnet and Guillot 2018). Algumas moléculas têm um efeito repelente nos flebótomos, tal como é o caso

da permetrina e deltametrina (Beugnet and Guillot 2018). A sua eficácia depende da concentração inicial, do método de aplicação, spot-on ou coleiras, do animal em questão, do seu estilo de vida, interior ou exterior e das condições climáticas (Beugnet and Guillot 2018). Coleiras impregnadas com deltametrina em áreas com elevada incidência de *Leishmania infantum* apresentam 48% de eficácia (Coura-Vital et al. 2018).

Vacinas contendo proteínas excretadas por *Leishmania infantum* ou proteínas recombinantes são comercializadas na Europa e no Sul da América, sendo que a sua administração pode ser iniciada a partir dos 6 meses de idade em cães não positivos a *Leishmania* spp., de forma a reduzir o risco de desenvolverem uma infeção ativa ou a doença clínica quando em contacto com o parasita (Beugnet and Guillot 2018). O plano vacinal recomendado é de três injeções iniciais seguida de uma vacina anual para o resto da vida do animal (Beugnet and Guillot 2018). Na Europa atualmente encontram-se disponíveis duas vacinas, CaniLeish e LetiFend (Solano-Gallego et al. 2017).

Em infeções originadas por organismos pertencentes à ordem Rickettsiales a prevenção é realizada mediante o controlo e remoção rápida dos ixodídeos que estejam fixados aos cães e gatos, uma vez que, ainda não existe vacina disponível para prevenção da doença (Stiles 2000).

Capítulo III- Estudo da frequência de hemoparasitas em cães e gatos, referente à casuística da região de Leiria, no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018

1.OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram numa primeira fase avaliar a presença de hemoparasitas na região de Leiria de forma a ser possível averiguar se efetivamente as hemoparasitoses constituem um problema na região, qual a hemoparasitose que surge com maior frequência na região, qual a espécie, *Canis lupus familiaris* ou *Felis silvestres catus*, com maior prevalência de infeção, qual o sexo com maior frequência de infeção consoante a respetiva espécie, e a análise da idade dos animais infetados com hemoparasitas consoante a espécie. Com esta primeira fase do estudo pretende-se não só informar a população da região de Leiria face ao problema observado, assim como desenvolver e pôr em prática métodos de prevenção das infeções parasitárias, uma vez que, sendo Leiria uma região atravessada por um rio, rio Lis, se revela como um local perfeito para o desenvolvimento de várias espécies de parasitas.

Numa segunda fase pretendeu-se verificar quais os sinais clínicos e sinais hematológicos e bioquímicos que são encontrados com maior frequência em contexto de consulta em animais com hemoparasitoses.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização da Amostra

O presente estudo foi realizado em duas fases. Numa primeira fase teve-se em conta 582 análises, tanto em gatos como em cães, realizadas no Laboratório Beatriz Godinho em Leiria, de janeiro de 2015 até novembro de 2018.

Numa segunda fase do estudo teve-se em conta os 19 pacientes positivos a hemoparasitas, da espécie *Canis lupus familiaris*, do Hospital Veterinário de Leiria no período compreendido entre janeiro de 2015 e agosto de 2018.

2.2 Animais Testados

O presente estudo visa tanto gatos como cães, e tem como base, numa primeira fase, os dados recolhidos no Laboratório Beatriz Godinho, sendo que os animais testados para o efeito foram animais cujo sangue foi enviado pelas várias clínicas veterinárias da região de Leiria para análise no laboratório, por suspeita de presença de infeção nos pacientes. O estudo visa também os animais da espécie *Canis lupus familiaris*, cujos animais testados foram animais que à consulta no Hospital Veterinário de Leiria apresentaram sintomas clínicos compatíveis com presença de hemoparasitoses.

2.3 Método laboratorial

Nos Laboratórios Beatriz Godinho o teste laboratorial usado para o diagnóstico de infeções por hemoparasitas foi a observação do parasita em esfregaço sanguíneo.

Quando preparados com sangue fresco os esfregaços sanguíneos constituem um excelente método de diagnóstico de infeções parasitárias, permitindo a obtenção rápida de resultados (Beugnet and Guillot 2018). O esfregaço sanguíneo permite a deteção de vários hemoparasitas, tais como, *Babesia* spp., *Trypanosoma* spp., *Cytauxzoon felis*, microfilárias, *Dirofilaria* spp., *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. (Beugnet and Guillot 2018). A grande maioria dos hemoparasitas detetados em esfregaços sanguíneos são transmitidos por vetores artrópodes hematófagos pelo que o mecanismo de transmissão da infeção concentra o parasita nos capilares periféricos, sendo assim é recomendável para obtenção de uma boa amostra a colheita de sangue de capilares periféricos, como por exemplo, do pavilhão auricular (Beugnet and Guillot 2018).

No Hospital Veterinário de Leiria para a realização do diagnóstico definitivo de infeção por hemoparasitas recorreu-se a testes imunológicos, nomeadamente imunofluorescência indireta.

A imunofluorescência indireta utiliza para a deteção de parasitas os anticorpos produzidos pelo organismo em resposta à presença do parasita (Aguilera 2010).

Para a execução da técnica é necessário recorrer a uma série de diluições prévias que variam normalmente entre 1:40 e 1:1280 com o auxílio de uma solução tampão de fosfato de pH neutro a ligeiramente básico, adicionando posteriormente ao soro, o plasma contendo a possível infeção (Aguilera 2010). De seguida as diluições são adicionadas ao antigénio correspondente, o qual foi previamente fixado com acetona numa lâmina e conservado por congelação (Aguilera 2010). Segue-se a fase de incubação, a temperatura ambiente, durante 30 minutos de modo a favorecer a união do antigénio com o anticorpo (Aguilera 2010). Procedem-se seguidamente a três lavagens da lâmina com PBS, cada lavagem com duração de 5 minutos a 37°, com o objetivo de eliminar o excesso de soro, plasma e antigénio (Aguilera 2010). Posteriormente, junta-se o fluorocromo e volta-se a incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente para que ocorra a fixação com o imunocomplexo (Aguilera 2010). O fluorocromo consiste numa substância fluorescente que deteta o imunocomplexo resultante da união antigénio-anticorpo (Aguilera 2010). Voltam-se a repetir as três lavagens com PBS, de cinco minutos cada a 37°, eliminando o excesso de conjugado que não se uniu ao imunocomplexo (Aguilera 2010). Dispõe-se uma pequena quantidade de glicerina tamponada com PBS sobre a lâmina e sobre esta coloca-se uma lamela (Aguilera 2010). Por último observa-se a lâmina num microscópio de fluorescência para a obtenção dos resultados.

Deve-se realizar sempre um controlo positivo e um controlo negativo para comprovar que a técnica foi realizada corretamente (Aguilera 2010).

2.4 Limitações do Estudo

Uma das principais limitações à realização do presente estudo foi a dificuldade em obter clínicas na região de Leiria que pudessem fornecer dados relativos a animais infetados com hemoparasitas, devido em grande parte, ao sigilo profissional que impedia a divulgação das informações clínicas dos pacientes. Outra limitação resultou do facto de nos Laboratórios Beatriz Godinho não estarem disponíveis informações relativas ao estilo de vida, interior ou exterior, dos animais cujo sangue foi analisado, sabendo-se apenas a sua espécie, sexo e idade, o que iria permitir um estudo mais pormenorizado relacionando a aquisição de hemoparasitas com o estilo de vida do animal. Por último, o facto de o estudo não ter abrangido animais de rua, que caso tivessem feito parte do mesmo permitiriam a obtenção de uma amostra mais abrangente, constituiu também uma enorme limitação do estudo.

3.RESULTADOS

3.1 Laboratório Beatriz Godinho

Das 582 análises realizadas no Laboratório Beatriz Godinho em Leiria, obtiveram-se 83 casos positivos a hemoparasitas, 32 em gatos e 51 em cães, como se observa na tabela I. Constatou-se assim, uma frequência relativa de 14,26% de animais infetados na amostra, como representado na tabela II. Das 582 análises, 400 foram realizadas em cães e 182 em gatos, obtendo-se então, uma frequência relativa de hemoparasitas em cães de 12,75% e de 17,58% em gatos, como evidenciado na tabela III.

Tabela I: Resultados obtidos das 582 análises do Laboratório Beatriz Godinho

	Técnica laboratorial	Nº Total de análises	Cães Positivos	Gatos Positivos
Laboratório Beatriz Godinho	Esfregaço sanguíneo	582	51	32

Tabela II: Frequência relativa de hemoparasitas na região de Leiria, tanto em cães como em gatos, tendo em conta uma amostra de 582 análises

Amostra	Casos positivos	Frequência relativa
582	83	14,26%

Tabela III: Frequência relativa de hemoparasitas em cães e em gatos na região de Leiria, tendo em conta uma amostra de 582 análises

Espécie	Amostra	Casos positivos	Frequência relativa
<i>Canis lupus familiaris</i>	400	51	12,75%
<i>Felis silvestres catus</i>	182	32	17,58%

Cães

Estudo da frequência de hemoparasitas em cães na região de Leiria

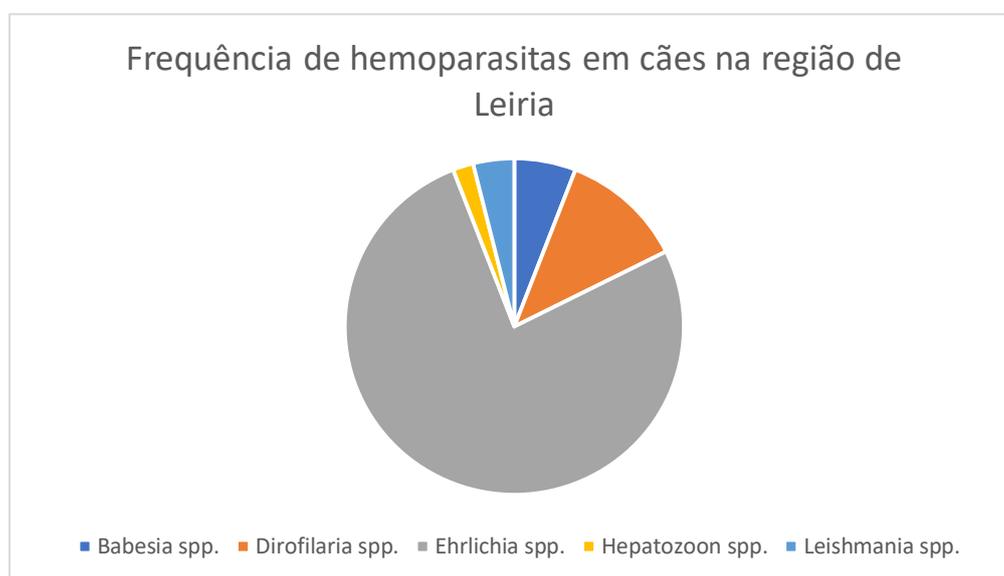
Da amostra de cães do Laboratório Beatriz Godinho, verificou-se que, que dos 51 casos positivos, 39 foram positivos a *Ehrlichia* spp., 6 a *Dirofilaria* spp., 3 a *Babesia* spp., 2 a *Leishmania* spp. e 1 a *Hepatozoon* spp., como apresentado na tabela IV.

Obteve-se uma frequência relativa de 76,47% de infeções por *Ehrlichia* spp., de 11,76% de infeções por *Dirofilaria* spp., de 5,88% de infeções por *Babesia* spp., de 3,92 % de infeções por *Leishmania* spp. e por último, de 1,96% de infeções por *Hepatozoon* spp., como evidenciado na tabela III e representado no gráfico I.

Tabela IV: Frequência de hemoparasitas em cães na região de Leiria, tendo em conta uma amostra de 51 casos, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018

Hemoparasita	Frequência Absoluta	Frequência Relativa
<i>Ehrlichia</i> spp.	39	76,47%
<i>Dirofilaria</i> spp.	6	11,76%
<i>Babesia</i> spp.	3	5,88%
<i>Leishmania</i> spp.	2	3,92%
<i>Hepatozoon</i> spp.	1	1,96%

Gráfico I: Representação gráfica da frequência relativa de hemoparasitas em cães na região de Leiria, tendo em conta uma amostra de 51 casos, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018



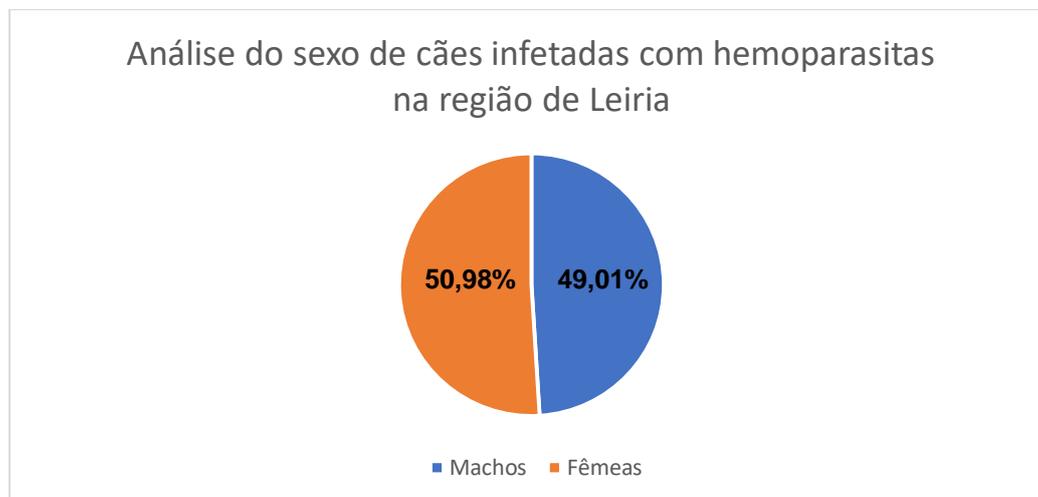
Análise do sexo dos cães infetados com hemoparasitas

Da amostra de cães positivos a hemoparasitas na região de Leiria, observou-se que 26 dos animais pertenciam ao sexo feminino e 25 ao sexo masculino, obtendo-se uma frequência relativa de cães infetados com hemoparasitas do sexo feminino de 50,98% e de 49,01% para o sexo masculino como apresentado na tabela V e representado no gráfico II.

Tabela V: Análise do sexo de cães infetados com hemoparasitas na região de Leiria, tendo em conta uma amostra de 51 casos, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018

Sexo	Frequência Absoluta	Frequência Relativa
Machos	25	49,01%
Fêmeas	26	50,98%

Gráfico II: Representação gráfica da análise do sexo de cães infetados com hemoparasitas na região de Leiria, tendo em conta uma amostra de 51 casos, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018



Análise da idade em cães infetados com hemoparasitas

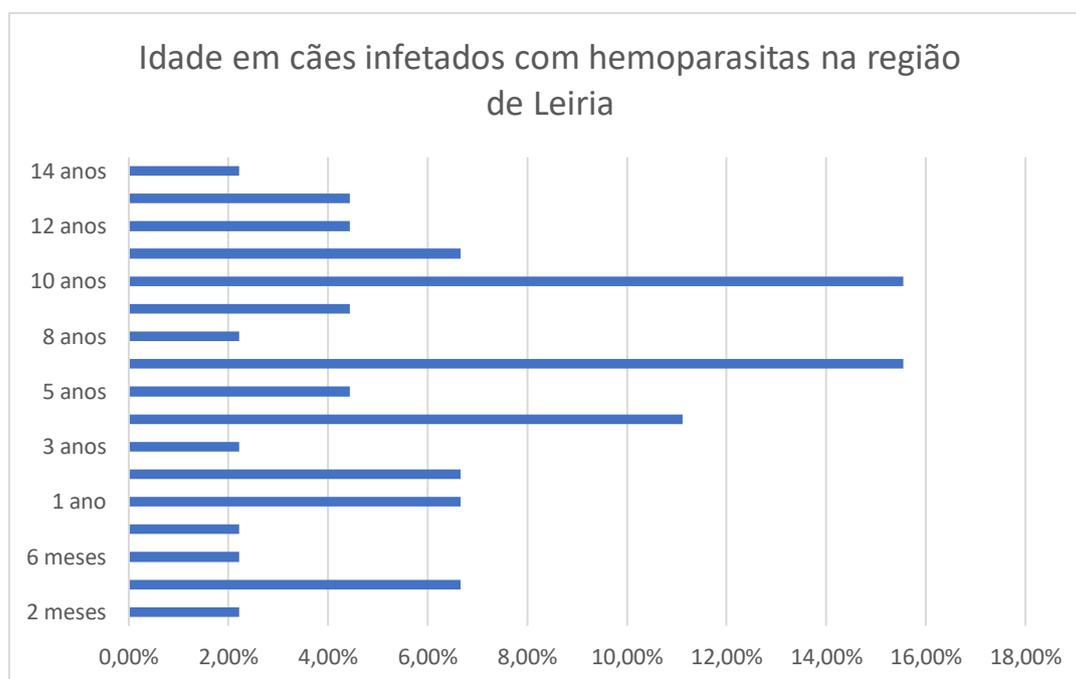
Na tabela VI estão representadas as frequências absolutas, assim como as frequências relativas, observadas na amostra, quanto à análise da idade em cães infetados com hemoparasitas.

Dos casos analisados obteve-se 3 picos no gráfico III, relativo à idade de ocorrência da infeção em cães, nomeadamente aos 7 e 10 anos de idade, com frequência relativa de 15,55%, aos 4 anos de idade com frequência relativa de 11,11%.

Tabela VI: Análise da idade em cães infetados com hemoparasitas na região de Leiria, tendo em conta a amostra do Laboratório Beatriz Godinho, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018

Idade	Frequência Absoluta	Frequência Relativa
2 meses	1	2,22%
3 meses	3	6,66%
6 meses	1	2,22%
9 meses	1	2,22%
1 ano	3	6,66%
2 anos	3	6,66%
3 anos	1	2,22%
4 anos	5	11,11%
5 anos	2	4,44%
7 anos	7	15,55%
8 anos	1	2,22%
9 anos	2	4,44%
10 anos	7	15,55%
11 anos	3	6,66%
12 anos	2	4,44%
13 anos	2	4,44%
14 anos	1	2,22%

Gráfico III: Representação gráfica da idade em cães infetados com hemoparasitas, tendo em conta a amostra do Laboratório Beatriz Godinho, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018



Gatos

Estudo da frequência de hemoparasitas em gatos na região de Leiria

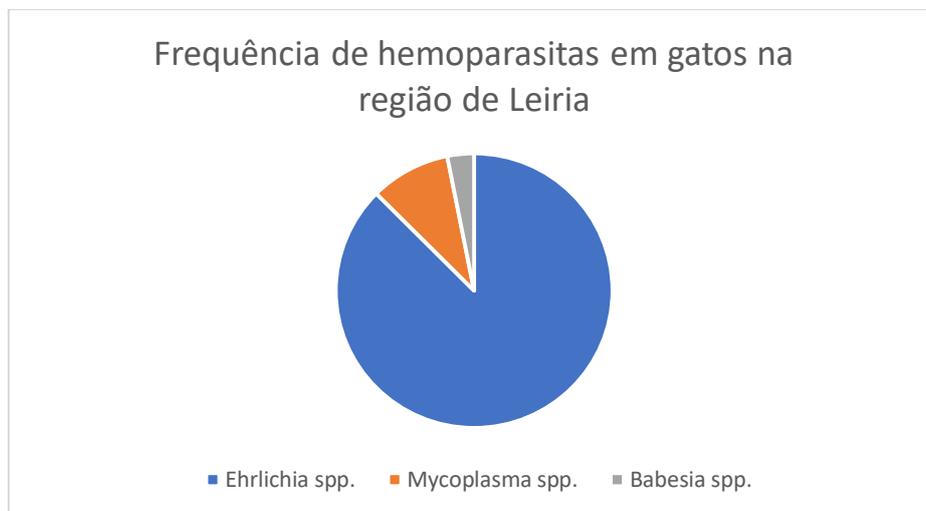
Da amostra de gatos da região de Leiria verificou-se que, dos 32 casos positivos, 28 foram positivos a *Ehrlichia* spp., 3 a *Mycoplasma* spp. e 1 a *Babesia* spp., como apresentado na tabela IX.

Obteve-se uma frequência relativa de 87,50% de infeções por *Ehrlichia* spp., de 9,38% de infeções por *Mycoplasma* spp. e de 3,13% de infeções por *Babesia* spp., como apresentado na tabela IX e representado no gráfico IV.

Tabela VII: Frequência de hemoparasitas em gatos na região de Leiria, tendo em conta uma amostra de 32 casos, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018

Hemoparasita	Frequência Absoluta	Frequência Relativa
<i>Ehrlichia</i> spp.	28	87,50%
<i>Mycoplasma</i> spp.	3	9,38%
<i>Babesia</i> spp.	1	3,13%

Gráfico IV: Representação gráfica da frequência de hemoparasitas em gatos na região de Leiria, tendo em conta uma amostra de 32 casos, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018



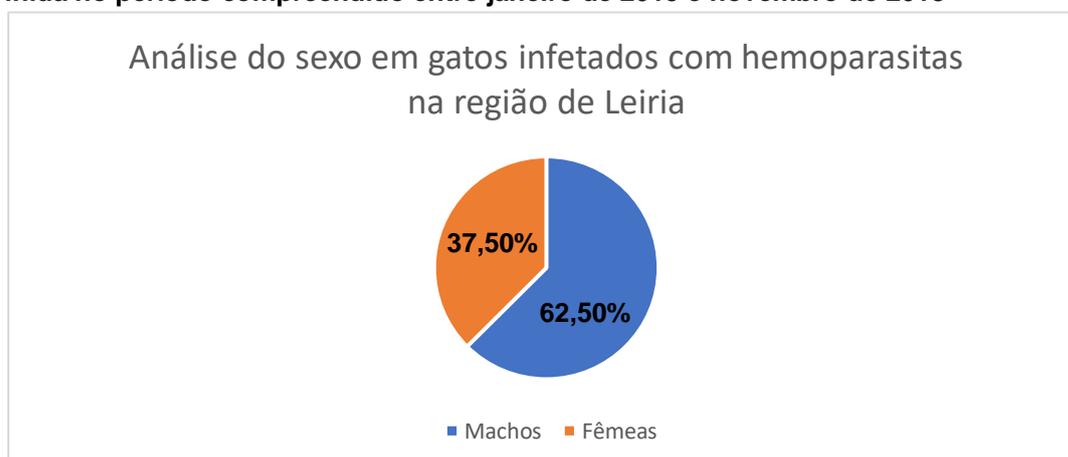
Análise do sexo em gatos infetados com hemoparasitas

Da amostra de gatos positivos a hemoparasitas na região de Leiria observou-se que 20 dos animais pertenciam ao sexo masculino e 12 ao sexo feminino, obtendo-se uma frequência relativa de gatos infetados com hemoparasitas do sexo masculino de 62,50% e de 37,50% para o sexo feminino como apresentado na tabela X e representado no gráfico V.

Tabela VIII: Análise do sexo em gatos infetados com hemoparasitas na região de Leiria, tendo em conta uma amostra de 32 casos, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018

Sexo	Frequência Absoluta	Frequência Relativa
Machos	20	62,50%
Fêmeas	12	37,50%

Gráfico V: Representação gráfica da frequência relativa de gatos machos versus fêmeas, infetados com hemoparasitas na região de Leiria, tendo em conta uma amostra de 32 casos, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018



Análise da idade em gatos infetados com hemoparasitas

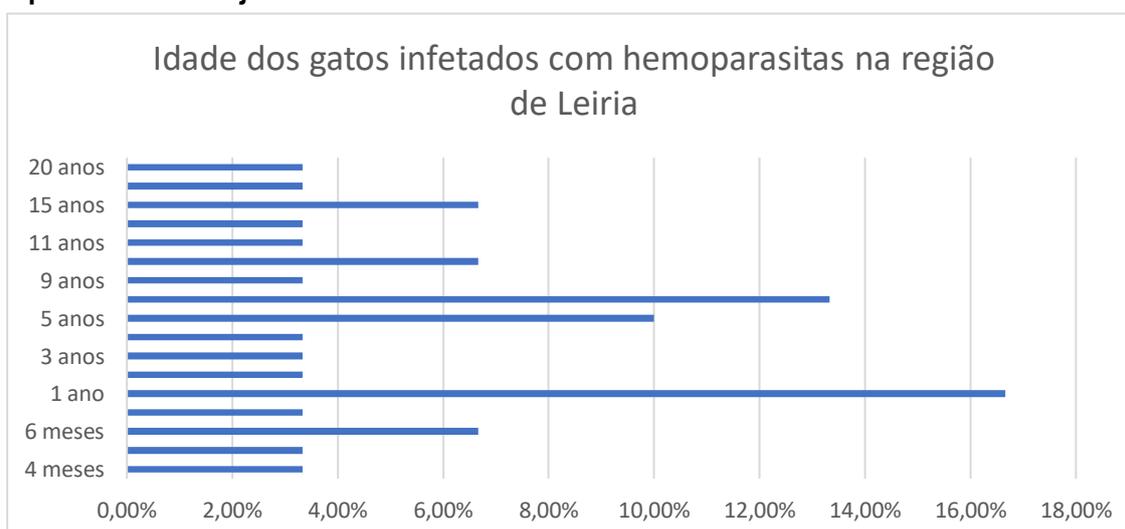
Na tabela XI estão representadas as frequências absolutas assim como as frequências relativas, observadas na amostra, quanto à análise da idade em gatos infetados com hemoparasitas.

Dos 32 casos analisados obteve-se 3 picos no gráfico VI, relativo à idade de ocorrência da infeção em gatos, nomeadamente a um ano de idade, prevalência relativa de 16,66%, aos 8 anos de idade, prevalência relativa de 13,33% e aos 5 anos de idade, prevalência relativa de 10,00%.

Tabela IX: Análise da idade em gatos infetados com hemoparasitas tendo em conta uma amostra de 32 casos, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018

Idade	Frequência Absoluta	Frequência Relativa
4 meses	1	3,33%
5 meses	1	3,33%
6 meses	2	6,66%
8 meses	1	3,33%
1 ano	5	16,66%
2 anos	1	3,33%
3 anos	1	3,33%
4 anos	1	3,33%
5 anos	3	10,00%
8 anos	4	13,33%
9 anos	1	3,33%
10 anos	2	6,66%
11 anos	1	3,33%
14 anos	1	3,33%
15 anos	2	6,66%
17 anos	1	3,33%
20 anos	1	3,33%

Gráfico VI: Representação gráfica da análise da idade em gatos infetados com hemoparasitas na região de Leiria, tendo em conta uma amostra de 32 casos, recolhida no período compreendido entre janeiro de 2015 e novembro de 2018



3.2 Hospital Veterinário de Leiria

Tabela X: Casos positivos e Técnica Laboratorial de diagnóstico do Hospital Veterinário de Leiria

	Técnica laboratorial	Cães Positivos
Hospital Veterinário de Leiria	Imunofluorescência indireta	19

Tabela XI: Frequência absoluta de hemoparasitas dos 19 casos positivos em cães do Hospital Veterinário de Leiria

Hemoparasitas			
<i>Babesia</i> spp.	<i>Ehrlichia</i> spp.	<i>Leishmania</i> spp.	<i>Rickettsia</i> spp.
2	4	2	18

Dos 19 casos clínicos do Hospital Veterinário de Leiria verificou-se a ocorrência de coinfeções em 6 animais. Um caso de coinfeção de *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp. e *Rickettsia* spp., um caso de coinfeção de *Babesia* spp. e *Rickettsia* spp., dois casos de coinfeção de *Leishmania* spp. e *Rickettsia* spp. e dois casos de coinfeção de *Ehrlichia* spp. e *Rickettsia* spp.

Sinais clínicos frequentemente observados nos cães da amostra do Hospital Veterinário de Leiria, infetados com hemoparasitas

O presente estudo incidiu sobre os sinais clínicos observados em contexto de consulta dos 19 casos de cães positivos a hemoparasitas do Hospital Veterinário de Leiria.

Na tabela VII estão apresentados os sinais clínicos observados na população da amostra e a respetiva frequência relativa com que ocorreram.

Dos resultados obtidos destacou-se a presença de anorexia e inapetência com frequência relativa de 47,37%, hipertermia, com frequência de 26,31%, mucosas pálidas, com frequência de 21,05% e emagrecimento, fraqueza e prostração com frequência de 15,79%.

Tabela XII: Sintomas observados em exame clínico dos 19 casos clínicos de cães recolhidos do Hospital Veterinário de Leiria no período compreendido entre janeiro de 2015 e agosto de 2018

Sinais Clínicos	Frequência absoluta	Frequência relativa
Alopecia	1	5,26%
Anorexia/Inapetência	9	47,37%
Claudicação do membro posterior direito	1	5,26%
Depósitos brancos na córnea	1	5,26%
Diarreia	1	5,26%

Dificuldade em mover-se/Marcha rígida	1	5,26%
Dor cervical	1	5,26%
Dor generalizada	1	5,26%
Emagrecimento	3	15,79%
Fraqueza	3	15,79%
Hematúria	1	5,26%
Hipertermia	5	26,31%
Ligeira dor abdominal	1	5,26%
Linfadenomegalia	2	10,53%
Melena	1	5,26%
Mucosas pálidas	4	21,05%
Paresia súbita dos posteriores súbita	1	5,26%
Prostração	3	15,79%
Vômito	2	10,53%

Dos resultados obtidos com a análise dos hemogramas e leucogramas, dos 19 casos clínicos hospitalares, apresentados na tabela VIII, constatou-se que em 47,37% dos cães ocorreu aumento da hemoglobina global média e neutrofilia, em 42,11% verificou-se diminuição dos eritrócitos assim como leucocitose, em 36,84% observou-se eritrócitos crenados e eritrócitos policromatófilos, em 31,58% constatou-se diminuição da hemoglobina e anisocitose plaquetária, em 26,32% diminuição do hematócrito e em 21,05% aumento da hemoglobina média, linfopenia e diminuição das plaquetas.

Com menor expressão hematológica, verificou-se em 15,79% dos cães macrocitose, em 10,53% aumento do hematócrito, acantócitos, anisocromia e neutropenia e por último em 5,26% dos cães observou-se aumento dos eritrócitos, presença de corpos de Howell-Jolly, hiperchromia, ovalocitos, basofilia, eosinopenia e aumento das plaquetas.

Tabela XIII: Alterações no Hemograma e Leucograma dos 19 casos clínicos de cães recolhidos do Hospital Veterinário de Leiria no período compreendido entre janeiro de 2015 e agosto de 2018

Alterações do Hemograma e do Leucograma	Frequência Absoluta	Frequência Relativa
Aumento dos eritrócitos	1	5,26%
Aumento do hematócrito	2	10,53%
Aumento da hemoglobina global média	9	47,37%
Aumento da hemoglobina média	4	21,05%
Diminuição dos eritrócitos	8	42,11%
Diminuição do hematócrito	5	26,32%
Diminuição da hemoglobina	6	31,58%
Acantócitos	2	10,53%
Anisocromia	2	10,53%
Corpos de Howell-Jolly	1	5,26%
Eritrócitos crenados	7	36,84%
Eritrócitos policromatófilos	7	36,84%

Hipercromia	1	5,26%
Macrocitose	3	15,79%
Ovalocitos	1	5,26%
Basofilia	1	5,26%
Eosinofilia	3	15,79%
Eosinopenia	1	5,26%
Leucocitose	8	42,11%
Linfopenia	4	21,05%
Monocitose	2	10,53%
Neutrofilia	9	47,37%
Neutropenia	2	10,53%
Trombocitose	1	5,26%
Trombocitopenia	4	21,05%
Anisocitose plaquetária	6	31,58%

Dos resultados obtidos nas análises bioquímicas, dos 19 casos clínicos hospitalares, apresentados na tabela VIII, constatou-se que em 21,05% dos cães ocorreu aumento da ALT, em 10,53% aumento da ALP e da Glucose, e com menor expressão, em 5,26% aumento da creatinina, da fosfatase alcalina, da GPT e diminuição do potássio.

Tabela XIV: Alterações nas análises bioquímicas dos 19 casos clínicos de cães recolhidos do Hospital Veterinário de Leiria no período compreendido entre janeiro de 2015 e agosto de 2018

Alterações Bioquímicas	Frequência Absoluta	Frequência Relativa
Aumento da ALP	2	10,53%
Aumento da ALT	4	21,05%
Aumento da Creatinina	1	5,26%
Aumento da Fosfatase Alcalina	1	5,26%
Aumento da Glucose	2	10,53%
Aumento da GPT	1	5,26%
Diminuição de Potássio	1	5,26%

4.DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos tendo em conta a amostra de cães do Laboratório Beatriz Godinho, para o estudo, foram de que o hemoparasita com maior frequência na região de Leiria nos cães foi a espécie *Ehrlichia* spp., com uma frequência de 76,47% na população total de cães infetados, como se pode observar na tabela IV. Tendo em conta um estudo desenvolvido por Rucksaken et al. (2019) na província de Buriram na Tailândia, a prevalência de *Ehrlichia* spp. destaca-se também face aos restantes hemoparasitas, sendo, no entanto, de 36,73%, frequência bastante inferior quando comparada com a frequência obtida na região de Leiria. Em França, na província de Côte-d'Azur e em Languedoc Roussillon, Beugnet e Marié (2009) obtiveram num estudo realizado com base em PCR, percentagens de *Ehrlichia* spp. de 0,15% na população de cães. *Ehrlichia* spp. é transmitido aos cães através de

ixodídeos (Rucksaken et al. 2019), pelo que a constatação de um tão elevado número de casos positivos a *Ehrlichia* spp. possa significar que o controlo destes parasitas na região não esteja a ser efetuado devidamente.

Com menor frequência relativa na população de cães surgem os hemoparasitas *Dirofilaria* spp., 11,76%, *Babesia* spp., 5,88%, *Leishmania* spp., 3,92% e *Hepatozoon* spp., 1,96%, como se observa no gráfico I. Em Portugal, estudos sobre a dirofilariose reportaram que na região de Coimbra, Santarém e Setúbal, cerca de 10,71% a 12,34% da amostra foi positiva a *Dirofilaria* spp. (Meireles et al. 2014). valores estes, que se assemelham ao valor obtido na região de Leiria, de 11,76%, acresce ainda que em Itália, um estudo realizado por Genchi et al. (2019) concluiu que no país cerca de 47% das 662 clínicas que constituíram a amostra tinham detetado pelo menos um caso de *Dirofilaria* spp. Beugnet e Marié (2009) observaram que a percentagem de cães positivos a *Babesia* spp. em França, num estudo realizado com recurso a PCR, foi de 4%, valor bastante ao obtido na região de Leiria, em Portugal, de 5,88% mesmo tendo por base técnicas laboratoriais diferentes, no primeiro caso PCR e no segundo esfregaço sanguíneo. No caso do hemoparasita *Leishmania* spp. geralmente a prevalência da infeção excede os 10% em algumas regiões do sul de França, Itália e Espanha e alcança valores de prevalência superiores a 60% na Grécia (Beugnet and Guillot 2018). A frequência obtida em Leiria de *Leishmania* spp. foi inferior a 5%. Num estudo realizado por Rucksaken et al. (2019) a prevalência de *Hepatozoon canis* na província Buriram na Tailândia foi igualmente baixa, de 2,04%, e Bhattacharjee e Sarmah (2013) reportaram valores de prevalência de *Hepatozoon canis* de 1,41%, na região nordeste da Índia, o que entra em concordância com o valor de 1,96% obtido no presente estudo para a espécie.

No estudo da análise do sexo dos cães infetados com hemoparasitas, observou-se que 49,01% dos animais eram machos e que 50,98% eram fêmeas, como se pode visualizar na tabela V. No entanto, segundo Paltrinieri et al. (2010) no caso da leishmaniose parece haver predisposição quanto ao sexo, já que os machos têm um risco maior de adquirir a infeção do que as fêmeas.

Quanto à análise da idade nos cães infetados com hemoparasitas observou-se que a maioria dos cães, precisamente 53,31% dos cães infetados, apresentou idades compreendidas entre os 4 anos e os 10 anos inclusive, observando-se dois picos no gráfico III nos 7 e 10 anos de idade. No caso específico da leishmaniose, de acordo com Paltrinieri et al. (2010) a prevalência dentro de certas faixas etárias tem distribuição bimodal, com um primeiro pico em cães com idade inferiores a 3 anos e um segundo pico em cães com 8 a 10 anos de idade.

Do grupo dos gatos positivos a hemoparasitas, nomeadamente 32 casos clínicos, a grande maioria foi positiva a *Ehrlichia* spp., exatamente 28 animais, o que corresponde a uma

frequência relativa de 87,50%, como apresentado na tabela VII. Com frequências substancialmente mais baixas surgem o hemoparasita *Mycoplasma* spp., 9,38%, 3 casos positivos e o hemoparasita *Babesia* spp., com apenas 1 caso positivo, obtendo uma frequência relativa de 3,13%. Beugnet e Marié (2009) observaram que a percentagem de gatos positivos a *Ehrlichia* spp. na província de Côte-d'Azur e em Languedoc Roussillon, em França, foi de 0%. No mesmo estudo, Beugnet e Marié (2009) observaram também a prevalência de *Mycoplasma* spp. e de *Babesia* spp. na população de gatos da região Sul de França, constatando que as prevalências eram de 26, 4% e de 0% respectivamente. Valores que apresentam elevado contraste face aos valores obtidos na região de Leiria, onde o parasita com maior frequência foi *Ehrlichia* spp. e não *Mycoplasma* spp. A prevalência de infeções por *Mycoplasma* spp. geralmente são elevadas, variando de 20% a 40% (Beugnet and Marié 2009), o que entra em concordância com o valor obtido no estudo de Beugnet e Marié (2009), no entanto, o mesmo não se verificou para o presente estudo. Em contraste com a literatura, um estudo, envolvendo 1585 gatos, em Bristol, Reino Unido, encontrou 2,8% dos gatos infetados com *Mycoplasma haemofelis* e 1,7% positivos a "*Candidatus Mycoplasma Turicensis*", (Peters et al. 2008; Abdullah et al. 2019) valores diferentes dos descritos por Beugnet and Marié (2009) e que se assemelham mais com o valor de frequência relativa obtido na região de Leiria, de 9,38%, para a espécie *Mycoplasma* spp. Pode-se inferir então, que nos gatos na região de Leiria que fizeram parte do estudo, o hemoparasita mais frequente foi a espécie *Ehrlichia* spp. tal como se observou nos cães da mesma região.

Dos 32 casos positivos em gatos, 20 foram observados em machos, 62,5% e apenas 12 casos em fêmeas, 37,5%, como evidenciado na tabela VIII, revelando-se assim que os animais do sexo masculino foram mais afetados pela ocorrência de hemoparasitoses, facto que pode ser explicado devido aos gatos do sexo masculino terem possivelmente mais acesso ao exterior uma vez que, além de se tentarem evadir mais vezes na procura de fêmeas em cio, lhes seja facilitado pelos donos o acesso à rua quando em comparação com as fêmeas já que nestas há o risco de ocorrência de gestação não desejada.

Quanto à análise da idade nos gatos infetados com hemoparasitas observou-se que, a maioria dos gatos, precisamente 53,3% dos gatos infetados, apresentam idades compreendidas entre os 4 meses e os 5 anos inclusive, observando-se um pico no gráfico VI na idade de 1 ano, tendo-se obtido uma frequência relativa de 16,66%. O aparecimento de hemoparasitoses em gatos mais jovens poderá dever-se ao comportamento mais ativo destes, característico da idade juvenil. Tal comportamento, usualmente resulta num maior acesso ao exterior e deste modo maior probabilidade de contacto com pulgas, carraças, mosquitos, e consequentemente de contrair infeção pelos agentes que estes transportam (Morganti et al. 2019).

Atendendo aos sinais clínicos observados nos cães em contexto hospitalar pode-se concluir que o sinal clínico que se observou com maior frequência nos casos clínicos do Hospital Veterinário de Leiria foi a anorexia/inapetência, tendo aparecido em 9 dos 19 animais positivos a hemoparasitas. Com menor frequência, mas igualmente importante, observou-se a presença de 5 animais com hipertermia, numa frequência de 26,31%, de 4 animais com mucosas pálidas, numa frequência de 21,05%, de 3 animais com emagrecimento, numa frequência de 15,79% e de 3 animais com prostração, numa frequência de 15,79%, como evidenciado na tabela VI. Os restantes sintomas foram observados com menor frequência pelo que se pode afirmar que dos 19 casos clínicos do Hospital Veterinário de Leiria os sintomas que predominaram nos animais infetados com hemoparasitas foram anorexia, hipertermia, mucosas pálidas, prostração e emagrecimento. A observação destes sinais clínicos entra em concordância com a literatura. As hemoparasitoses babesiose e erliquiose canina frequentemente estão associadas e causam anemia acentuada, apatia, perda de peso, anorexia, febre, entre outras manifestações (Fonseca et al. 2010). Nas dirofilarioses a perda de peso também se encontra frequentemente presente (Barr and Bowman 2012). Em casos de infeção por *Ehrlichia spp.*, *Hepatozoon spp.*, *Leishmania spp.*, *Rickettsia spp.* observa-se geralmente anorexia, caquexia, febre, assim como diarreia (Barr and Bowman 2012) o que vai na sua grande maioria, de encontro com os sinais clínicos gerais observados nos casos clínicos da amostra. Assim sendo, sempre que em clínica apareça um animal que apresente os sintomas anteriores deve-se sempre considerar a hipótese de se estar perante um caso de hemoparasitas, entrando as hemoparasitoses nas listas de diagnósticos diferenciais.

Como meios de auxílio ao diagnóstico, recorreu-se à realização de hemograma, leucograma e de análises bioquímicas. Nos hemogramas realizados observou-se que a maioria dos animais apresentava aumento da hemoglobina global média, assim como diminuição dos eritrócitos, diminuição da hemoglobina e diminuição do hematócrito, como se pode observar na tabela XIII, evidenciando deste modo presença de anemia, o que vai de encontro com a literatura. Em infeções despoletadas por *Babesia spp.*, *Dirofilaria spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Hepatozoon spp.* e *Rickettsia spp.* observa-se frequentemente anemia moderada a grave (Barr and Bowman 2012). O caso clínico apresentado por Fonseca et al. (2010) de um canídeo infetado com babesiose e erliquiose revelou ao hemograma, antes da administração da terapêutica, aumento da hemoglobina global média, diminuição dos eritrócitos e diminuição da hemoglobina, o que entra em concordância com os resultados obtidos no presente estudo.

Recentemente, um estudo realizado no Brasil, revelou que os maiores problemas à implementação de estratégias nos grandes centros urbanos, para o caso específico de Leishmaniose, mas aplicável para todos as parasitoses, são a descontinuidade das ações

estratégicas devido a falhas financeiras, de material, ou de pessoas, recusa da população em permitir a colheita de sangue em cães e o controlo químico das mesma e por último, a resistência dos donos à eutanásia (Coura-Vital et al. 2018).

No caso de doenças como a Leishmaniose, a eutanásia de cães seropositivos é justificada pelo elevado parasitismo cutâneo nos animais, que contribui para a manutenção e expansão do ciclo de transmissão da doença (Coura-Vital et al. 2018).

Assim sendo, revela-se cada vez mais importante o papel do médico veterinário no aconselhamento dos proprietários dos animais na prevenção de parasitoses (Meireles et al. 2014), nomeadamente, alertando os proprietários para que os seus animais façam visitas regulares ao médico veterinário para despiste de possíveis infeções e para que realizem a desparasitação externa dos cães e gatos. Revela-se também fundamental a divulgação de folhetos informativos assim como a realização de palestras por profissionais de saúde (Silva 2015), de modo a sensibilizar a população para a existência de infeções parasitárias nos seus animais domésticos. Mais do que um problema de saúde veterinária, é importante referir e lembrar que algumas hemoparasitoses, tendo carácter zoonótico, constituem também um problema para a saúde pública (Genchi et al. 2019).

5.CONCLUSÃO

Tendo em conta o estudo realizado pode concluir-se que na região de Leiria a frequência de hemoparasitas na população de cães e gatos afeta aproximadamente 14% da população. Há que ter em conta, no entanto, que o estudo foi efetuado tendo por base cães e gatos domésticos, que frequentam regularmente o veterinário. Assim sendo, ficaram descartados deste estudo animais vadios, que entrando na equação iriam provocar alterações nas frequências obtidas, muito provavelmente, aumentando a população de animais infetados, já que a prevenção parasitária neste grupo é praticamente nula. Na região de Leiria as hemoparasitoses tendem a afetar mais gatos do que cães sendo a diferença de aproximadamente 5%.

O hemoparasita mais frequente, tanto em cães como em gatos, é *Ehrlichia* spp., destacando-se em larga escala face aos restantes hemoparasitas estudados.

O tipo de sexo do animal não influencia o aparecimento de hemoparasitoses nos cães, porém, na população de gatos o mesmo já não se verificou. Os gatos do sexo masculino revelaram ser portadores da infeção com muito maior frequência que os gatos do sexo feminino.

Cães com idades compreendidas entre os 4 e os 10 anos de idade são afetados com maior frequência. Nos gatos mais de metade das infeções tendem a ocorrer em animais com idades compreendidas entre os 4 meses e os 5 anos.

Tendo em conta o estudo referente à sintomatologia observada em cães com hemoparasitoses, pode-se concluir, de um modo geral, que a grande maioria dos animais surge em consulta apresentado anorexia, perda de peso, hipertermia e mucosas pálidas. Apesar de a sintomatologia observada ser comum a um vasto conjunto de doenças, sempre que estes sintomas surjam associados, o clínico deverá considerar como diagnóstico diferencial hemoparasitoses, especialmente em Leiria, onde foi efetuado o presente estudo.

Concluindo, na região de Leiria, cerca de 14 em cada 100 animais domésticos, nomeadamente cães e gatos, desenvolvem infeção por hemoparasitas, pelo que se revela fundamental a adoção de medidas de prevenção. Este cuidado deve ser especialmente redobrado na população de gatos masculinos, grupo que apresenta maior frequência de infeção.

IV. BIBLIOGRAFIA

ABDULLAH, S. et al. 2019. Pathogens in fleas collected from cats and dogs: distribution and prevalence in the UK. *PARASITES & VECTORS*. 12:71

AGUILERA, F. 2010. Manual Prático de Parasitología Veterinaria. 1ª edición Universidad de Extremadura, Servicio de Publicaciones

ALCOLEA, P. et al. 2010. Transcriptomics throughout the life cycle of *Leishmania infantum*: High down-regulation rate in the amastigote stage. *INTERNATIONAL JOURNAL FOR PARASITOLOGY* 40. Elsevier. 1497-1516

ALLEN, K. et al. 2011. Novel Hepatozoon in vertebrates From the Southern United States. *JOURNAL OF PARASITOLOGY* 97. *AMERICAN SOCIETY OF PARASITOLOGY*. 648-653

ALLISON, R. and LITTLE, S. 2013. Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. *VETERINARY CLINICAL PATHOLOGY*.1-18

ASFARAM, S. et al. 2019. Is the cat an important reservoir host for visceral leishmaniasis? A systematic review with meta-analysis. *THE JOURNAL OF VENOMOUS ANIMALS AND TOXINS INCLUDING TROPICAL DISEASES* 25

BARKER, E. 2019. Update on Feline Hemoplasmosis. *ELSEVIER*

BARR, S.C and BOWMAN, D.D. 2012. Canine and Feline Infectious Diseases and Parasitology. 2ª edition. *WILEY- BLACK WELL*

BERGMANN, M. et al. 2017. Risk factors of different hemoplasma species infections in cats. *BMC VETERINARY RESEARCH*.13:52

BEUGNET, F. and MARIÉ J. 2009. Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *VETERINARY PARASITOLOGY* 163.Elsevier. 298-305

BEUGNET, F., HALOS, L. and GUILLOT, J. 2018. Textbook of Clinical Parasitology in dogs and cats. English edition. *SERVET EDITORIAL-Grupo Asis Biomedica, S.L*

BHATTACHARJEE and SARMAH. Novembro 2013. Prevalence of haemoparasites in pet, working and stray dogs of Assam and North-East India: A hospital based study. *VETERINARY WORLD*. Volume 6 (11). 874-878

CAPELLI, G. et al. 2009. Occurrence of *Rickettsia felis* in dog and cat fleas (*Ctenocephalides felis*) from Italy. PARASITES & VECTORS

CAPELLI, G. et al. 2018. Recent advances on *Dirofilaria repens* in dogs and humans in Europe. PARASITES & VECTORS.11:663

CARDOSO, L. et al. 2013. Prevalence of *Babesia microti*-like infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Portugal. VETERINARY PARASITOLOGY 196. Elsevier. 90-95

CONTRERAS, V. et al. 2019. Infection by *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides felis felis* Fleas from North of Colombia. ARTHROPODE BORNE DISEASES.1-8

CORREA, E.S et al. Outubro 2011. Investigação molecular de *Ehrlichia spp.* e *Anaplasma platys* em gatos domésticos: alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas. PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA. 899-909

EIRAS, D. et al. Julho 2007. First molecular characterization of canine hepatozoonosis in Argentina: evaluation of asymptomatic *Hepatozoon canis* infection in dogs from Buenos Aires. VETERINARY PARASITOLOGY 149. 275- 279

ELIAS, E. and HOMANS, P. 1988. *Hepatozoon canis* infection in dogs: clinical and haematological findings; treatment. JOURNAL OF SMALL ANIMAL PRACTICE 29. 55-62

FONSECA, Z. et al. 2010. Eriquiose x Babesiose canina: relato de caso. PUBVET. Londrina. Edição 107. Art.719. Vol. 4. Número 2.

GENCHI, M. et al. Janeiro 2019. *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat: a questionnaire study in Italy. VETERINARY PARASITOLOGY

HODZIC, A. et al. 2017. *Hepatozoon silvestris* sp. Nov.: Morphological and molecular characterization of a new species of *Hepatozoon* (Adeleorina *Hepatozoidae*) from the European wild cat (*Felis silvestris silvestris*). PARASITOLOGY 144. 650-661

HUNTZINGER, A. 2007. Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Tick-Borne Rickettsial Diseases. AMERICAN FAMILY PHYSICIAN. 1; 76 (1) 137-139

LAPPIN, M. et al. 2017. Antimicrobial use Guidelines for Treatment of Respiratory Tract Disease in Dogs and Cats: Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society of Companion Animals Infectious Diseases. JOURNAL OF VETERINARY INTERNAL MEDICINE 31. 279-294

LOMBARDI, P. et al. Julho 2019. Clinical and Immunological Response in Dogs Naturally Infected by *L. Infantum* Treated with a Nutritional Supplement. ANIMALS 9. MDPI

MAGGI, R. et al. 2013. Infection with hemotropic *Mycoplasma* species in patients with or without extensive arthropod or Animal contact. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. Volume 51. Número 10.3237-3241

MASCARELLI, P. et al. 2016. Detection of *Mycoplasma haemocanis*, *Mycoplasma haematoparvum*, *Mycoplasma suis* and other vector-borne pathogens in dogs from Córdoba and Santa Fé, Argentina. PARASITES & VECTORS. 9:642

MEIRELES, J. et al. 2014. *Dirofilaria* canina e felina. REVISTA PORTUGUESA DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS. 70-78

MILLÁN, J. et al. 2018. High Diversity of hemotropic mycoplasmas in Iberian wild carnivores. COMPARATIVE IMMUNOLOGY MICROBIOLOGY & INFECTIOUS DISEASES

MOAFI, M. et al. Agosto 2019. *Leishmania* Vaccines Entered in Clinical Trials: A Review of Literature. INTERNATIONAL JOURNAL OF PREVENTIVE MEDICINE. Wolters Kluwer. 10:95

MORGANTI, G. et al. 2019. Emerging feline vector-borne pathogens in Italy. PARASITES & VECTORS.12:193

MUNHOZ, A. et al. 2018. Hemotropic mycoplasmas in naturally infected cats in Northeastern Brazil. BRAZILIAN JOURNAL OF VETERINARY PARASITOLOGY

MUSEUX, K. et al. Maio 2009. In vivo transmission studies of "Candidatus Mycoplasma turicensis" in the domestic cat. VETERINARY RESEARCH. EDP Sciences. 40-45

OLIVEIRA, P. et al. 2019. Serologic and molecular survey of Rickettsia spp. In dogs, horses and ticks from Atlantic rainforest of the State of Bahia, Brazil. EXPERIMENTAL AND APPLIED ACAROLOGY. 431-442

OTRANTO, D. et al. 2011. Diagnosis of Hepatozoon canis in young dogs by cytology and PCR. PARASITES & VECTORS 4: 55

PALTRINIERI, S. et al. Junho 2010. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. JOURNAL OF THE AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION 11. Volume 236.

PETERS, I. et al. 2008. The prevalence of three species of feline haemoplasmas in samples submitted to a diagnostics service as determined by three novel real-time duplex PCR assays. VETERINARY MICROBIOLOGY 126. Science Direct. Elsevier.142-150

RAUTENBACH, Y. et al. Outubro 2018. Prevalence of canine Babesia and Ehrlichia co-infection and the predictive value of haematology. ONDERSTEPSOORT JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH. 85 (1) a1626

ROSYPAL, A. et al. 2010. Surveillance for Antibodies to Leishmania spp. in Dogs from Sri Lanka. JOURNAL OF PARASITOLOGY 96. 230-231

RUCKSAKEN, R. et al. Maio 2019. Comparison of conventional polymerase chain reaction and routine blood smear for the detection of Babesia Canis, Hepatozoon canis, Ehrlichia canis, and Anaplasma platys in Buriram Province, Thailand. VETERINARY WORLD. Volume 12

SAUDA, F. et al. 2018. Leishmania infantum, Dirofilaria spp., and other endoparasite infections in kennel dogs in central Italy. PARASITE 25. 2. EDP Sciences

SCHÖNIAN, G. et al. 2003. PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples. DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASE 47. Elsevier. 349-358

SILVA, I. janeiro 2015. Erliquiose canina-Revisão de literatura. REVISTA CIENTÍFICA DE MEDICINA VETERINÁRIA SSN:1679-7353. Ano XIII. Número 24.

SIMÕES, P.B, et al. 2011. Babesiosis due to the canine Babesia microti-like small piroplasm in dogs-first report from Portugal and possible vertical transmission. PARASITES & VECTORS 4:50

SOLANO-GALLEGO, L. and BANETH, G. 2011. Babesiosis in dogs and cats – Expanding parasitological and clinical spectra. VETERINARY PARASITOLOGY 181. Elsevier. 48-60, Elsevier.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. 2015. Acute febrile illness is associated with Rickettsia spp. infection in dogs. PARASITES & VECTORS. 8:216

SOLANO-GALLEGO, L. et al. 2016. A review of canine babesiosis: The European Perspective. PARASITES & VECTORS 9:336

SOLANO-GALLEGO, L. et al. 2017. Diagnostic Challenges in the Era of Canine *Leishmania infantum* Vaccines. CELL PRESS TREPAP 1656.

SOUSA, K. et al. 2017. Molecular detection of Hepatozoon spp. in domestic dogs and wild mammals in southern Pantanal, Brazil with implications in the transmission route. VETERINARY PARASITOLOGY.

STILES, J. 2000. Canine rickettsial infections. VETERINARY CLINICS OF NORTH AMERICA: SMALL ANIMAL PRACTICE. Elsevier. Volume 30. Capítulo 5. 1135- 1149

TESKE, E. et al. 2002. Risk of infection with *Leishmania* spp. In the canine population in the Netherlands. ACTA VET.SCAND. 43. 195-201

COURA-VITAL, W. et al. 2018. Effectiveness of deltamethrin-impregnated dog collars on the incidence of canine infection by *Leishmania infantum*: A large scale intervention study in an endemic area in Brazil. PLOS ONE 13(12)

WOODS, J. et al. Junho 2005. Evaluation of experimental transmission of *Candidatus Mycoplasma haemominutum* and *Mycoplasma haemofelis* by *Ctenocephalides felis* to cats. AMERICAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH. Volume 66. Número 6