



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

INFECÇÃO POR *AELUROSTRONGYLUS ABSTRUSUS* E *ANGIOSTRONGYLUS VASORUM* (NEMATODA: ANGIOSTRONGYLIDAE), EM GATOS E CÃES NO DISTRITO DE LISBOA, PORTUGAL

JOANA NUNES PIRES NABAIS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da  
Fonseca Sampaio

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho  
Doutora Esmeralda Sofia da Costa Delgado  
Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

ORIENTADOR

Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

CO-ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

2012

LISBOA

---





UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

INFECÇÃO POR *AELUROSTRONGYLUS ABSTRUSUS* E *ANGIOSTRONGYLUS VASORUM* (NEMATODA: ANGIOSTRONGYLIDAE), EM GATOS E CÃES NO DISTRITO DE LISBOA, PORTUGAL

JOANA NUNES PIRES NABAIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da  
Fonseca Sampaio

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho  
Doutora Esmeralda Sofia da Costa Delgado  
Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

ORIENTADOR

Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

CO-ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

2012

LISBOA

---

*Aos meus pais e à minha irmã.*



## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, Dr. Gonçalo Vicente, por toda a aprendizagem e crescimento que me proporcionou ao longo do estágio, pelo companheirismo demonstrado e pela boa disposição que o caracteriza. Por ser um exemplo a seguir.

Ao meu co-orientador, Prof. Doutor Luís Madeira de Carvalho, por me ter aceite enquanto orientanda e fomentar o meu gosto pela parasitologia. Por todo o incentivo e acompanhamento constantes, sem os quais não teria realizado este trabalho.

Aos médicos, auxiliares e funcionários do Hospital Escolar da FMV-UTL que contribuíram para a minha formação, pelo seu empenho e bons momentos que proporcionaram.

À Dr.<sup>a</sup> Lídia, pela preciosa ajuda no Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV-UTL, pela boa disposição e por manter a harmonia daquele lugar.

A todos os que me permitiram desenvolver este trabalho, facultando a recolha de amostras no Canil Municipal de Sintra, Canil Municipal de Lisboa, Gatil da União Zoófila em Tercena, hotel para cães “Quinta do Sol” e todos os donos que, com maior ou menor estranheza, colaboraram comigo. Ao sector de Anatomia Patológica da FMV-UTL, por me facultar as amostras pulmonares.

Ao Dr. Telmo Nunes, pela pronta disponibilidade e auxílio no tratamento estatístico dos dados.

Aos amigos que sempre me apoiaram e tornaram inesquecível o meu percurso académico, em especial à Joana Pita, Ana Patrícia Caeiros, Fabiana Couto e Tiago Gonçalves, assim como à Juliana Carreira e Sílvia Cruz no culminar desta etapa. À Mónica Marques, que me acompanha há quase 20 anos, incansável. À Maria Manso, Catarina Fernandes e Ana Bernardo, por toda a amizade e partilha. Ao João Gaiola, por todo o carinho, por me incentivar e apoiar desde o dia em que entrou na minha vida.

Aos meus pais, por todo o apoio e dedicação, pelo amor incondicional. Por me proporcionarem ser quem sou. Por tudo. Aos meus avós paternos, que me amam com todas as forças e anseiam pelo melhor. Aos meus avós maternos, que, embora já não estejam presentes, estariam certamente orgulhosos. Aos meus tios e primo, por toda a disponibilidade e amizade. À minha irmã, por toda a cumplicidade e partilha desde o dia em que nascemos, por tudo o que é para mim.

A todos os meus colegas, amigos e familiares que, não estando aqui nomeados, contribuíram para um percurso académico e pessoal feliz e afortunado, repleto de boas recordações.



## Resumo

### **Infecção por *Aelurostrongylus abstrusus* e *Angiostrongylus vasorum* (Nematoda: Angiostrongylidae), em gatos e cães no distrito de Lisboa, Portugal**

O número de casos de parasitoses respiratórias nos nossos animais de companhia, causadas por nemátodes pulmonares, tem aumentado nos últimos anos em várias áreas geográficas, incluindo a Europa. *Aelurostrongylus abstrusus* e *Angiostrongylus vasorum* têm assumido especial importância nos gatos e cães, respectivamente. Ambos podem provocar pneumonia verminosa no animal, de gravidade variável, mas a infecção por *A. vasorum* pode resultar ainda em alterações neurológicas e da coagulação. Diversos estudos têm sido realizados de modo a averiguar a prevalência destas parasitoses, as quais aparentam estar subestimadas em vários países.

Este trabalho foi elaborado com o intuito de avaliar a situação epidemiológica de *A. abstrusus* em gatos e *A. vasorum* em cães no distrito de Lisboa. Para isso foi realizada uma pesquisa em 100 amostras (50 de gatos e 50 de cães), maioritariamente fecais, mas também pulmonares de animais necropsiados. As amostras foram analisadas através da técnica de Baermann, actualmente considerado o método de eleição no diagnóstico destas parasitoses. A sua detecção e identificação foram baseadas na morfologia das larvas L1. Os resultados obtidos foram 12% (6/50) para *A. abstrusus* em gatos e 2% (1/50) para *A. vasorum* em cães.

Estes dados realçam a presença de *A. abstrusus* e *A. vasorum* em gatos e cães, respectivamente, no distrito de Lisboa, em Portugal. Assim, este facto deve ser tido em consideração pelo médico veterinário na prática clínica, assim como a utilização rotineira da técnica de Baermann para o diagnóstico destes parasitas.

Palavras-chave: *Aelurostrongylus abstrusus*, *Angiostrongylus vasorum*, prevalência, técnica de Baermann, gato, cão, Lisboa, Portugal





## Abstract

### ***Aelurostrongylus abstrusus* and *Angiostrongylus vasorum* (Nematoda: Angiostrongylidae) infection in cats and dogs from Lisbon, Portugal**

The number of cat and dog lungworm reported cases has increased in various geographic areas, including Europe. *Aelurostrongylus abstrusus* and *Angiostrongylus vasorum* assume special importance in cats and dogs, respectively. Both cause verminous pneumonia, with different levels of severity, but the infection by *A. vasorum* may also result in neurological and coagulation problems. Several studies have been conducted in order to determine their prevalence, which seems to be underestimated in many countries.

This study aimed to assess the epidemiological situation of *A. abstrusus* and *A. vasorum* in cats and dogs in the Lisbon area. A research was performed in 100 samples (50 cats and 50 dogs), mostly fecal, but also from lungs of necropsied animals. All samples were screened with Baermann technique, currently considered the gold standard in their diagnosis. L1's detection and identification was based on their morphology. The results showed a prevalence of 12% (6/50) for *A. abstrusus* in cats and 2% (1/50) for *A. vasorum* in dogs.

These data emphasize the presence of *A. abstrusus* and *A. vasorum*, respectively in cats and dogs in the Lisbon area, Portugal. Therefore, it should be taken into consideration for veterinarians in clinical practice, as the routine use of Baermann's technique for the diagnosis of these parasites.

Key words: *Aelurostrongylus abstrusus*, *Angiostrongylus vasorum*, prevalence, Baermann's technique, cat, dog, Lisbon, Portugal



## Índice

I.	Introdução.....	1
II.	Actividades desenvolvidas durante o estágio curricular .....	2
III.	Revisão Bibliográfica.....	5
1.	Nemátodes pulmonares .....	5
2.	Biologia .....	5
3.	Epidemiologia.....	9
4.	Patofisiologia e sinais clínicos .....	12
5.	Diagnóstico .....	18
6.	Tratamento.....	27
7.	Profilaxia .....	29
IV.	Estudo: Infecção por <i>Aelurostrongylus abstrusus</i> e <i>Angiostrongylus vasorum</i> (Nematoda: Angiostrongylidae) em gatos e cães no distrito de Lisboa, Portugal .....	31
1.	Objectivos.....	31
2.	Material e métodos .....	31
2.1.	Caracterização das amostras .....	31
2.1.1.	Gatos.....	31
2.1.2.	Cães.....	33
2.2.	Métodos.....	34
2.2.1.	Técnica de Baermann.....	35
2.2.2.	Técnica de flutuação de Willis .....	36
2.3.	Análise estatística.....	36
3.	Resultados.....	37
3.1.	<i>Aelurostrongylus abstrusus</i> .....	37
3.1.1.	Prevalência.....	37
3.1.2.	Teste exacto de Fisher.....	39
3.1.3.	Técnica de flutuação de Willis.....	40
3.2.	<i>Angiostrongylus vasorum</i> .....	41
3.2.1.	Prevalência.....	41
3.2.2.	Teste exacto de Fisher.....	42
3.2.3.	Técnica de flutuação de Willis.....	43
V.	Discussão .....	45
VI.	Conclusão .....	51
VII.	Bibliografia .....	53

## Índice de figuras

Figura 1: Suspeita de contacto oral com <i>Thaumetopoea pityocampa</i> (Processionária).....	3
Figura 2: Toracotomia para biópsia do pulmão .....	3
Figura 3: Gato com criptococose, no início do tratamento (A), com anfotericina B, e cerca de um mês depois (B).....	3
Figura 4: <i>Theba pisana</i> , um dos hospedeiros intermediários de <i>Aelurostrongylus abstrusus</i> . 6	
Figura 5: <i>Arion rufus</i> , um dos hospedeiros intermediários de <i>Angiostrongylus vasorum</i> . .....	8
Figura 6: <i>Deroceas laeve</i> , outro hospedeiro intermediário de <i>Angiostrongylus vasorum</i> .....	8
Figura 7: Ciclo de vida indirecto de <i>A. vasorum</i> .....	8
Figura 8: Secção histológica de pulmão de gato com broncopneumonia. ....	13
Figura 9: Secção histológica de pulmão de gato com alterações do músculo liso.....	13
Figura 10: Pulmão de cão num caso fatal de angiostrongilose.....	15
Figura 11: Secção histológica de pulmão de cão inoculado com L3 de <i>A. vasorum</i> , com reacção granulomatosa à volta de larva.....	15
Figura 12: Secção histológica de pulmão de cão, onde se observam numerosas larvas e ovos de <i>A. vasorum</i> dentro dos alvéolos.....	15
Figura 13: Secção histológica de pulmão de cão, onde se observa um trombo associado a adultos de <i>A. vasorum</i> numa artéria pulmonar .....	15
Figura 14: Hemorragia conjuntival associada a infecção por <i>A. vasorum</i> em cadela Golden Retriever, de 14 meses .....	16
Figura 15: Secção transversa do cérebro a nível do hipocampo, revelando um hematoma de 2,5cm de diâmetro associado a infecção por <i>A. vasorum</i> , em cão Basset Hound, de 11 meses. ....	16
Figura 16: L1 de <i>Aelurostrongylus abstrusus</i> . ....	19
Figura 17: Pormenor da cauda da L1 de <i>Aelurostrongylus abstrusus</i> . ....	19
Figura 18: L1 de <i>Angiostrongylus vasorum</i> .....	20
Figura 19: Pormenor da cauda da L1 de <i>Angiostrongylus vasorum</i> .....	20
Figura 20: Larvas de <i>A. vasorum</i> (L1) em citologia de lavado broncoalveolar .....	21
Figura 21: Radiografia torácica de um gato com aelurostrongilose, onde se observa um padrão brônquico. ....	24
Figura 22: Radiografia torácica lateral direita de um cão com angiostrongilose, onde se pode observar um padrão alveolar periférico e um aumento marcado do lado direito da silhueta cardíaca .....	25
Figura 23: Copos cónicos com as amostras preparadas e submersas (A) e passadas 24 horas, após remoção das bonecas (B).....	35
Figura 24: Pormenor da cauda de uma L1 de <i>A. abstrusus</i> , ocular 10x e objectiva 40x.....	39
Figura 25: L1 de <i>A. abstrusus</i> , ocular 10x e objectiva 40x .....	39
Figura 26: L1 de <i>A. abstrusus</i> , com o corpo enrolado em forma de espiral, ocular 10x e objectiva 40x.....	39
Figura 27: Várias L1 de <i>A. abstrusus</i> , ocular 10x e objectiva 10x .....	39
Figura 28: Ovo de <i>Toxocara cati</i> , ocular 10x e objectiva 40x .....	40
Figura 29: Oocisto de <i>Cystoisospora felis</i> e L1 de <i>A. abstrusus</i> , ocular 10x e objectiva 20x; lâmina obtida pela técnica de Baermann. ....	40
Figura 30: Ovo de <i>Ancylostoma tubaeforme</i> , ocular 10x e objectiva 40x. ....	40
Figura 31: Ovo de <i>Uncinaria stenocephala</i> , ocular 10x e objectiva 40x .....	40
Figura 32: Larva de <i>A. abstrusus</i> , com pormenor da cauda, encontrada na técnica de flutuação de Willis; ocular 10x e objectivas 20x e 40x. ....	41
Figura 33: Ovos de ácaro (A) e o de <i>U. stenocephala</i> (B), ocular 10x e objectiva 10x .....	41

Figura 34: L1 de <i>A. vasorum</i> , ocular 10x e objectivas 10x (à esquerda) e 40x (à direita).....	42
Figura 35: Pormenor da cauda de L1 de <i>A. vasorum</i> , ocular 10x e objectiva 40x .....	42
Figura 36: Ovo de <i>Toxocara canis</i> , ocular 10x e objectiva 20x .....	43
Figura 37: Oocisto de <i>Cystoisospora canis</i> , ocular 10x e objectiva 40x .....	43

## Índice de gráficos

Gráfico 1: Distribuição das amostras felinas, por local ou origem da recolha (n=50).....	32
Gráfico 2: Distribuição das amostras felinas, segundo a estação do ano em que foram analisadas (n=50) .....	33
Gráfico 3: Distribuição das amostras caninas, por local ou origem da recolha (n=50).....	33
Gráfico 4: Distribuição das amostras caninas, segundo a estação do ano em que foram analisadas.....	34
Gráfico 5: <i>A. abstrusus</i> : resultados (em percentagem) das análises através da técnica de Baermann .....	37
Gráfico 6: Distribuição das seis amostras positivas, segundo a sua origem.....	38
Gráfico 7: <i>A. vasorum</i> : resultados (em percentagem) das análises através da técnica de Baermann. ....	41

## Índice de tabelas

Tabela 1: Distribuição das amostras felinas segundo as características idade, sexo e raça (n=50). ....	32
Tabela 2: Distribuição das amostras caninas segundo as características idade, sexo e raça (n=50). ....	34
Tabela 3: Quadro resumo com as características das amostras/gatos positivos.....	38
Tabela 4: Amostras felinas: resultados do teste exacto de Fisher.....	39
Tabela 5: Amostras caninas: resultados do teste exacto de Fisher.....	43
Tabela 6: Parasitas gastrointestinais identificados pela técnica de flutuação de Willis.....	44

## Lista de símbolos e abreviaturas

%	Porcentagem
µm	Micrómetros
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CID	Coagulação intravascular disseminada
cm	Centímetros
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FMV-UTL	Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa
g	Gramma
GI	Gastrointestinal
kDa	Quilodalton
kg	Quilograma
L1	Larvas de estágio um ou 1º estágio
L3	Larvas de estágio três ou 3º estágio
L5	Larvas de estágio cinco ou 5º estágio
mg	Miligramma
mm	Milímetros
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCR-RFLP	<i>PCR-restriction fragment length polymorphism</i>
RM	Ressonância magnética
sp.	Espécie
spp.	Espécies
TAC	Tomografia axial computadorizada
TP	Tempo de protrombina
TTP	Tempo de tromboplastina parcial
WB	<i>Western blot</i>





## I. Introdução

As parasitoses respiratórias em cães e gatos causadas por nemátodes pulmonares, têm vindo a despertar interesse na comunidade científica e a ganhar maior importância na prática veterinária, pois o número de casos descritos tem aumentado nos últimos anos em várias áreas geográficas, incluindo diversos países da Europa. O facto de constituírem um desafio a nível de diagnóstico e representarem um risco para a saúde animal contribui para o interesse (Traversa & Guglielmini, 2008; Koch & Willeesen, 2009; Morgan & Shaw, 2010; Traversa, Di Cesare & Conboy, 2010).

Entre outros, os metastrongilídeos *Aelurostrongylus abstrusus* e *Angiostrongylus vasorum* têm assumido especial importância nos nossos animais de companhia, sendo que o primeiro afecta o gato (*Felis catus*) e o segundo afecta o cão (*Canis familiaris*). Ambos podem provocar uma pneumonia verminosa no animal, de gravidade variável, mas a infecção por *A. vasorum* pode resultar ainda em alterações neurológicas e da coagulação. Diversos estudos têm sido realizados de modo a averiguar a prevalência destas parasitoses em vários países, as quais aparentam estar subestimadas (Traversa & Guglielmini, 2008; Koch & Willeesen, 2009; Traversa et al, 2010).

A presente dissertação incidirá sobre duas espécies de nemátodes pulmonares - *Aelurostrongylus abstrusus* e *Angiostrongylus vasorum*, englobando uma primeira parte de revisão bibliográfica sobre o actual conhecimento destes parasitas e uma segunda baseada num estudo de prevalência dos mesmos, desenvolvido em cães e gatos da zona de Lisboa. O principal objectivo deste trabalho consiste então num maior esclarecimento da situação epidemiológica destes parasitas em Portugal, mais concretamente do distrito de Lisboa. É também pretendido chamar a atenção dos veterinários clínicos para estas parasitoses passíveis de afectar os nossos animais de companhia, assim como dos métodos a utilizar para o seu diagnóstico.

Além destas componentes, a dissertação inclui ainda uma breve descrição das actividades desenvolvidas e acompanhadas durante o estágio curricular.

## **II. Actividades desenvolvidas durante o estágio curricular**

O estágio curricular, inserido no âmbito de Clínica de Animais de Companhia, foi realizado no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa (FMV-UTL), no período de 1 de Fevereiro a 31 de Maio de 2011, sob a orientação do Dr. Gonçalo Vicente. Adicionalmente foram desenvolvidas actividades no Laboratório de Doenças Parasitárias da mesma instituição, de Junho a Dezembro do mesmo ano, sob a orientação do Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho e de modo a executar os procedimentos necessários à realização da presente dissertação.

Além destas componentes, no período de 21 de Setembro a 21 de Dezembro de 2010 decorreu um outro estágio, extracurricular, na mesma área de clínica mas realizado no Hospital Clínico Veterinário da Universidade Cardenal Herrera em Valência, Espanha.

O estágio realizado no Hospital Escolar da FMV permitiu o desenvolvimento e a consolidação do conhecimento científico e raciocínio crítico, assim como a aprendizagem e execução de diversos procedimentos médicos. Os serviços abrangidos consistiram em Medicina Interna, Cirurgia e Imagiologia, com a realização de turnos de oito horas e Internamento de pequenos animais, com turnos de 12 ou 24 horas. Em Medicina Interna foi progressivamente instituída uma participação activa nas consultas, sendo elaborada a história pregressa do animal, efectuado o exame físico e discutidos os diagnósticos diferenciais, exames complementares e terapêutica a instituir com o Médico Veterinário (fig. 1). Além das consultas de rotina, também foi possível assistir e participar em consultas de urgência, assim como de especialidade (por exemplo cardiologia, oftalmologia, dermatologia, ortopedia, neurologia, oncologia e animais exóticos). Vários procedimentos puderam ser executados e auxiliados neste período, nomeadamente: imunização, colocação de identificação electrónica, administração de fármacos por via oral e injectável, venopunção para colocação de cateter e sistema de venoclise, colheita de sangue para análise, dádivas de sangue para posterior transfusão, realização de testes rápidos de diagnóstico, limpeza e observação do canal auditivo externo, limpeza de feridas, execução de pensos, raspagens cutâneas e sua observação microscópica, exame com lâmpada de Wood, algaliação, toracocentese, electrocardiograma e administração de oxigénio, entre outros.

Já no serviço de Cirurgia, foi possível assistir a diversas cirurgias e participar em algumas delas, variando entre as funções de anestesista, ajudante de cirurgião e circulante (fig. 2). Os animais foram acompanhados desde o momento de admissão até ao pós-operatório, sendo que as tarefas desempenhadas incluíram a preparação do animal para a cirurgia (medicação pré-anestésica, indução anestésica, colocação do tubo endotraqueal e

preparação do campo cirúrgico) e a sua monitorização no período pós-cirúrgico, assim como a participação em consultas de seguimento.

Na área de Imagiologia foi possível assistir, auxiliar e interpretar diversos exames radiológicos (simples, de trânsito baritado e mielografia), ecografias (abdominal e ecocardiografia), tomografias computadorizadas e ainda endoscopias.

Por fim, no serviço de Internamento foram exercidas funções relacionadas com o bem-estar, higiene e tratamento dos animais internados. A monitorização, alimentação, administração de medicação e passeio dos pacientes caninos no exterior foram algumas das práticas rotineiras, além da realização de vários procedimentos médicos já referidos anteriormente. Permitiu ainda um acompanhamento mais próximo e dedicado de alguns casos (fig. 3).

Figura 1: Suspeita de contacto oral com *Thaumetopoea pityocampa* (Processionária) (original).



Figura 2: Toracotomia para biópsia do pulmão (original).

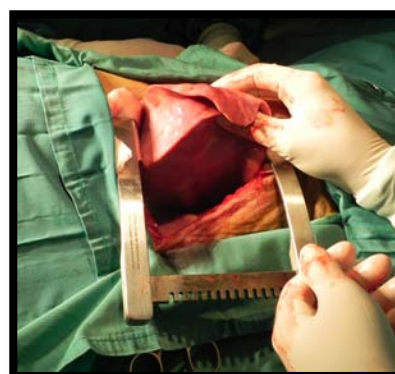


Figura 3: Gato com criptococose, no início do tratamento (A), com anfotericina B, e cerca de um mês depois (B) (originais).



No Laboratório de Doenças Parasitárias foi possível processar e analisar as amostras fecais e pulmonares recolhidas. De modo a detectar a presença de larvas de 1º estágio, quer de *Aelurostrongylus abstrusus* quer de *Angiostrongylus vasorum*, a técnica coprológica selecionada foi o método de Baermann. Além desta, também a técnica de flutuação de Willis

foi por vezes executada, com o intuito de pesquisar ovos e larvas de outros nemátodes ou oocistos de coccídeas que coexistissem com o parasitismo por metastrongíldeos.

O Hospital Clínico Veterinário da Universidade Cardenal Herrera constitui um hospital de referência, contando com pacientes remetidos de toda a comunidade valenciana. O estágio de três meses aí realizado decorreu nos serviços de Medicina Interna, Cardiopulmonar, Dermatologia, Oftalmologia, Neurologia, Oncologia, Anestesiologia, Cirurgia geral, Traumatologia e cirurgia ortopédica, Imagiologia e Internamento incluindo a Unidade de cuidados intensivos. Sendo também um hospital escolar, o corpo clínico mostrou-se bastante empenhado em proporcionar o desenvolvimento do conhecimento científico e inculcar espírito crítico, possibilitando a execução e o auxílio de diversos procedimentos médicos.

Assim, qualquer um dos estágios realizados constituiu uma experiência enriquecedora e de crescimento, quer a nível profissional, quer a nível pessoal.

### III. Revisão Bibliográfica

#### 1. Nemátodes pulmonares

A transmissão de nemátodes cardiopulmonares para zonas previamente não endémicas verifica-se especialmente no caso dos metastrongilídeos *Aelurostrongylus abstrusus*, *Angiostrongylus vasorum* e *Crenosoma vulpis*, do capilarídeo *Eucoleus aerophilus* e do filarídeo *Dirofilaria immitis*, os dois últimos com potencial zoonótico. Os outros nemátodes pulmonares a ter em consideração na prática clínica são *Oslerus* spp. e *Filaroides* spp. (também metastrongilídeos), embora estes sejam considerados esporádicos (Traversa, 2009; Traversa et al, 2010).

Em Portugal, as espécies de maior relevância identificadas até ao momento são *Aelurostrongylus abstrusus*, na família Felidae, e *Angiostrongylus vasorum*, *Crenosoma vulpis*, *Eucoleus aerophilus* e *Filaroides martis* (este descrito apenas em animais selvagens) na família Canidae (Madeira de Carvalho, Pereira da Fonseca, Gomes & Meireles, 2009).

As razões para a crescente ocorrência destas parasitoses são ainda pouco conhecidas, mas variados factores poderão ser responsáveis, como o aquecimento global, mudanças na epidemiologia do hospedeiro intermediário ou movimentação das populações animais (Morgan, Jefferies, Krajewski, Ward & Shaw, 2009; Traversa et al, 2010). Também uma maior atenção por parte dos veterinários clínicos e melhores meios de diagnóstico e vigilância poderão explicar o aumento da sua detecção. Ainda assim, a prevalência destes parasitas está provavelmente subestimada, uma vez que determinados exames coprológicos, nomeadamente a técnica de Baermann, são utilizados com pouca frequência na prática clínica (Traversa & Guglielmini, 2008).

Em sùmula, a questão básica segundo alguns autores continua a ser: estas parasitoses são raras ou são raramente diagnosticadas? (Madeira de Carvalho et al, 2009).

#### 2. Biologia

Os principais nemátodes pulmonares do cão e gato pertencem à superfamília Metastrongyloidea, ordem Strongylida, famílias Filaroididae e Angiostrongylidae, apresentando ciclos de vida directos ou indirectos, envolvendo neste caso um molusco gastrópode como hospedeiro intermediário (Bowman, Lynn, Eberhard & Alcaraz, 2003).

A forma adulta destes parasitas geralmente reside no tecido pulmonar, como bronquíolos e ductos alveolares, ou nos vasos sanguíneos associados, mais concretamente nas artérias pulmonares. As fêmeas adultas depositam ovos não embrionados nos quais se desenvolvem depois as larvas de estágio um (L1), que ao emergirem começam a subir o tracto respiratório, através de mobilidade própria e da ajuda do sistema muco-ciliar e tosse

do hospedeiro. Ao alcançar a faringe são deglutidas e posteriormente eliminadas para o ambiente através das fezes (Anderson, 2000; Bowman et al, 2003; Payo-Puente et al, 2008). Diversas espécies de lesmas e caracóis, geralmente terrestres, são utilizadas como hospedeiros intermediários, no qual se desenvolvem as larvas infectantes (as L1 sofrem duas mudas e alcançam o terceiro estágio – L3). O hospedeiro definitivo adquire a infecção ao ingerir acidental ou intencionalmente o gastrópode ou, mais comum, sendo carnívoros, ao ingerir um hospedeiro paraténico (como anfíbios, répteis, aves, roedores ou musaranhos) (Scott, 1972; Anderson, 2000; Grewal, Grewal, Tan & Adams, 2003; Morgan et al, 2005). No hospedeiro definitivo, uma vez ingeridas as larvas penetram pelo intestino e migram até aos pulmões, através da circulação linfática e/ou sanguínea. Dependendo da espécie, as larvas sofrem as mudas durante a migração ou em tecido pulmonar, sendo em todos os casos atingido o estágio adulto já no sistema respiratório (Urquhart, Armour, Duncan, Dunn & Jennings, 1996; Anderson, 2000).

A principal espécie de nemátodes pulmonares encontrada nos gatos é *Aelurostrongylus abstrusus* (conhecido na literatura anglo-saxónica como “feline lungworm”), que pertence à família Angiostrongylidae e apresenta uma distribuição mundial. É o parasita pulmonar mais comum nos felinos e aparece com maior frequência em gatos jovens e de zonas rurais, com hábitos de caça (Bowman et al, 2003).

Várias espécies de gastrópodes infectados experimentalmente demonstraram funcionar como hospedeiro intermediário, como por exemplo *Helicella* sp., *Limax flavus* ou *Theba pisana*, este último englobado nas espécies existentes em Portugal (fig. 4) (Anderson, 2000; Grewal et al, 2003; Bank, 2011). A primeira muda parece ocorrer uma/duas semanas pós-infecção e a segunda após duas/três semanas. Também foi demonstrado que rãs, sapos, lagartos, cobras, pardais, galinhas, patos e pequenos roedores podem exercer o papel de hospedeiros paraténicos (Hobmaier & Hobmaier, 1935).

Figura 4: *Theba pisana*, um dos hospedeiros intermediários de *Aelurostrongylus abstrusus* ([http://en.wikipedia.org/wiki/Theba\\_pisana](http://en.wikipedia.org/wiki/Theba_pisana)).



Após serem ingeridas pelo hospedeiro definitivo, através dum hospedeiro intermediário ou paraténico, as larvas penetram na mucosa do esófago, estômago e intestino, no primeiro dia pós-infecção, ao final do qual já é possível encontrar larvas no pulmão. A terceira muda ocorre nos pulmões após cinco/seis dias e a última após oito/nove dias. Ao fim de quatro semanas as fêmeas começam a depositar ovos, que são embrionados nos ductos alveolares, os quais ficam preenchidos e distendidos, assim como os alvéolos adjacentes. Após a quinta semana aparecem larvas nas fezes (Hobmaier & Hobmaier, 1935).

Os parasitas adultos, com cerca de 10 mm de comprimento, localizam-se nos bronquíolos terminais e ductos alveolares. O período pré-patente geralmente varia entre quatro e oito semanas e alguns adultos podem sobreviver vários anos nos pulmões, mesmo não havendo larvas nas fezes (Scott, 1972; Urquhart et al, 1996; Anderson, 2000; Ribeiro & Lima, 2001; Bowman 2002).

Pertencente à mesma família, *Angiostrongylus vasorum* constitui actualmente um dos mais importantes parasitas cardiopulmonares do cão, pois além de ter vindo a aumentar a sua distribuição, este nemátode é potencialmente fatal para o seu hospedeiro. Conhecido como “French heartworm”, o seu nome reflecte o facto de ter sido reportado pela primeira vez em França, em meados do século XIX, revelando ser endémico na zona de Toulouse. Entretanto, a sua distribuição era tradicionalmente apontada a certas áreas da Europa, América do Norte e do Sul e África, sendo encontrado em climas tropicais, subtropicais e temperados; contudo, na última década têm surgido novos focos, tendo sido já detectado na Suécia, Alemanha e Itália, entre outros (Anderson, 2000; Morgan et al, 2005; Traversa & Guglielmini, 2008; Koch & Willezen, 2009; Devine, 2011).

De pequenas dimensões (o comprimento geralmente varia entre 13 e 21 mm), as formas adultas do parasita residem no coração direito e nas artérias pulmonares, afectando não só canídeos domésticos mas também silvestres, como raposas, lobos, lontras ou furões (Anderson, 2000; Koch & Willezen, 2009).

Os hospedeiros intermediários englobam diversos gastrópodes, entre os quais se encontram as lesmas *Arion rufus* e *Deroceras laeve* (fig. 5 e 6), ambas existentes no território nacional (Anderson, 2000; Grewal et al, 2003; Bank, 2011). A sua infecção pode ocorrer por ingestão ou por penetração da epiderme do gastrópode pelas L1, excretadas nas fezes do hospedeiro definitivo. Após duas mudas tornam-se L3 infectantes, o que sucede por volta do dia 16 pós-infecção. O cão adquire a infecção ao ingerir um hospedeiro intermediário, ou paraténico, existindo ainda a hipótese de ingestão de alimentos contaminados com L3 por secreções desses hospedeiros (Devine, 2011). As larvas penetram depois o intestino do hospedeiro definitivo e alcançam os linfonodos viscerais, onde sofrem duas mudas tornando-se L5. As L5 migram através da circulação portal até ao fígado, alcançando depois o coração e a circulação pulmonar, onde se tornam adultos maduros sexualmente activos.



As fêmeas depositam os ovos nos capilares pulmonares, de onde emergem depois as L1 que vão invadir os alvéolos pulmonares e subir a árvore respiratória, até serem deglutidas e finalmente excretadas nas fezes (Rosen, Ash & Wallace, 1970; Anderson 2000; Devine, 2011).

Figura 5: *Arion rufus*, um dos hospedeiros intermediários de *Angiostrongylus vasorum* (<http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1372018>).

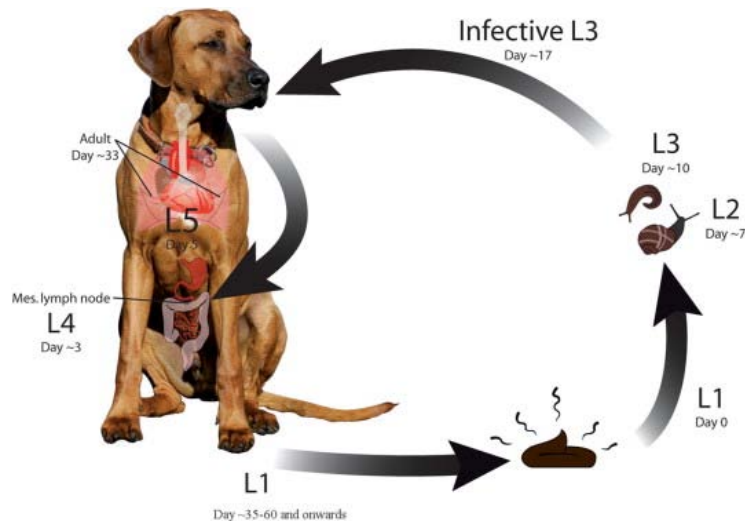


Figura 6: *Deroceras laeve*, outro hospedeiro intermediário de *Angiostrongylus vasorum* (<http://eol.org/pages/58018/overview>).



Este parasita apresenta um período pré-patente de aproximadamente sete semanas mas bastante variável (de um a quatro meses), e pode sobreviver bastante tempo no animal (por mais de dois anos) (fig. 7). Assim, os hospedeiros definitivos não tratados podem manter-se infectados para a vida, além de que a população selvagem de raposas pode actuar como reservatório desta parasitose (Rosen et al, 1970; Urquhart et al, 1996; Oliveira-Júnior, Barçante, Barçante, Dias & Lima, 2006; Devine, 2011).

Figura 7: Ciclo de vida indirecto de *A. vasorum* (Koch & Willesen, 2009).



### 3. Epidemiologia

Nos últimos anos, diversos estudos foram realizados no intuito de averiguar a prevalência de infecções por nemátodes pulmonares em carnívoros domésticos e selvagens, em vários países da Europa, incluindo Portugal. Os resultados até agora obtidos demonstram uma crescente ocorrência destas parasitoses, sugerindo que na verdade estão subestimadas e pouco diagnosticadas.

Portugal não é excepção. Dados da FMV-UTL mostraram uma prevalência global de 1,5% de *Aelurostrongylus abstrusus* em gatos, em 1999-2000 (Madeira de Carvalho et al, 2009). Contudo, um estudo realizado no Porto, em que foram recolhidas amostras fecais de gatos errantes entre 2003 e 2005, revelou uma prevalência de 17,4%. Na maioria dos casos positivos foi encontrado um número elevado de L1 na amostra fecal, sendo de fácil diagnóstico, embora houvesse amostras onde foram observadas apenas duas ou três L1 (Payo-Puente et al, 2008). Mais recentemente, uma pesquisa desenvolvida em Lisboa detectou 11,8% de gatos parasitados por este nemátode (Waap & Gomes, 2011).

Dos restantes países da Europa, apenas a Itália e a Croácia apresentaram uma prevalência de *A. abstrusus* semelhante àquela encontrada no Porto. Durante o período de 1990-1998 foi desenvolvido um estudo na Croácia com o objectivo de descobrir a sua prevalência em dois grupos distintos, um rural e outro urbano. Através de exames histopatológicos, no primeiro grupo foram diagnosticados 22% e no segundo 3,9% de gatos com esta parasitose (Grabaveric et al, 1999). Relativamente a Itália, um estudo publicado em 2008 revelou uma distribuição difusa do parasita pela região central e sul, com taxas de prevalência de 17,3% e 18,5%, respectivamente (Traversa et al, 2008c). Também na zona norte do país existem casos reportados (Traversa et al, 2009b).

Os resultados de outros países demonstram uma prevalência bastante menor, como a Roménia, em que 5,6% dos gatos se revelaram positivos (Mircean, Titilincu & Vasil, 2010) e Alemanha, onde tal ocorreu também em 5,6% (Taubert, Pantchev, Vrhovec, Bauer & Hermosilla, 2009). Anteriormente, num estudo elaborado entre os anos 1984 e 1991 na Alemanha, foram detectados 1% de gatos positivos a *A. abstrusus*, o que sugere realmente um aumento da sua prevalência nos últimos anos (Epe, Ising-Volmer & Stoye, 1993). Em Espanha apenas 1% dos gatos se revelaram positivos (contudo o estudo abrangia diversos parasitas intestinais e a técnica utilizada para analisar as amostras fecais não é explícita) (Miró et al, 2004).

Desde a sua descoberta em França, *Angiostrongylus vasorum* foi descrito em vários países europeus, assim como no continente Africano (como Uganda) e Americano (Canadá). Nestes países, o parasita parece ser comum em zonas endémicas bem definidas, ocorrendo fora delas apenas casos esporádicos. Contudo, nos últimos anos não só o número de casos

reportados em áreas endémicas conhecidas (como França, Dinamarca e Reino Unido) sofreu um claro aumento, como surgiram novos focos em zonas previamente livres de infecção (Morgan et al, 2005; Traversa et al, 2010).

De modo a avaliar a situação actual, em França foi realizado um estudo através de inquéritos enviados a clínicas veterinárias distribuídas por todo o país, em 2008, das quais 11,4% haviam já diagnosticado angiostrongilose canina. O mesmo demonstrou ainda que actualmente esta doença se encontra dispersa pela maior parte do país, ultrapassando a tradicional área do sudoeste francês (Bourdeau & Laboure, 2009).

Até recentemente, a Holanda era considerada livre de infecção por *A. vasorum* autóctone. Em 2007 foi diagnosticada angiostrongilose em cães que nunca tinham saído do país e, embora no estudo posteriormente efectuado fossem encontrados poucos animais positivos, este parasita passou a ser considerado autóctone. A atenção acrescida por parte dos médicos veterinários levou ao aumento das amostras enviadas para pesquisa deste nemátode, tendo sido já diagnosticada uma infecção dupla por *A. vasorum* e *Crenosoma vulpis* (Nijssse & van Doorn, 2009).

Um estudo efectuado entre 2003 e 2007, em cães da Alemanha e Dinamarca que apresentavam sintomatologia compatível com infecção por nemátodes pulmonares, demonstrou que 1,2% e 2,2% dos cães eram positivos a *A. vasorum*, respectivamente (Taubert et al, 2009). Em 2008 realizaram uma nova pesquisa de modo a obter mais informação, estendendo-a também ao Reino Unido. Esta revelou um acréscimo na prevalência do parasita, subindo para 1,8% na Alemanha e 2,4% na Dinamarca. Curiosamente, na primeira pesquisa tinham registado uma diminuição da frequência de infecções entre 2003 e 2006. No Reino Unido descobriram 1,8% de cães positivos (amostras recolhidas num abrigo de animais em Londres, de cães aparentemente sem sintomatologia), sendo todos eles originários da área de Londres (Hermosilla et al, 2009).

Uma outra pesquisa desenvolvida na Alemanha entre 2007 e 2009, em cães com sinais clínicos de doenças respiratórias, revelou uma prevalência de *A. vasorum* mais elevada (7,4%). Também *C. vulpis* apresentou uma prevalência relativamente elevada (6%) nos cães desse estudo, indicando que ambos os parasitas são endémicos neste país (Barutzki & Schaper, 2009).

Em Portugal, a informação relativa a *A. vasorum* em canídeos domésticos é escassa. De 1999 a 2008 foram diagnosticados na FMV/UTL apenas dois nemátodes pulmonares diferentes, em cães: *A. vasorum* e *E. aerophilus*, registando-se uma prevalência global de apenas 0,3% (Madeira de Carvalho et al, 2009). Já em canídeos silvestres, várias espécies foram isoladas; por exemplo um estudo realizado em raposas (*Vulpes vulpes*), de 1970 a 1987, revelou as seguintes prevalências: *A. vasorum* 0,3%, *E. aerophilus* 1%, *C. vulpis* 1,3% e *F. martis* 1% (Carvalho-Varela & Crespo, 1993). Inesperadamente, uma pesquisa mais

recente demonstrou uma prevalência de *A. vasorum* em raposas bastante superior (16,1%) (Eira, Vingada, Torres & Miquel, 2006).

Bolt et al (1992) demonstraram haver viabilidade de transferência de *A. vasorum* entre raposas e cães, confirmando que a população selvagem de raposas deve ser considerada um potencial reservatório da infecção para os cães domésticos. Além do importante papel que possa desempenhar na epidemiologia da angiostrongilose canina, a infecção de raposas por este parasita também pode afectar a sua própria saúde, assim como a sua dinâmica populacional. Apesar dos valores bastante variáveis, tal como em Portugal também noutros países foram detectadas prevalências elevadas de *A. vasorum* em raposas: 7,3% no Reino Unido, com clara diferença entre regiões (0% na Escócia e Norte de Inglaterra a contrastar com 23% do sudeste de Inglaterra) (Morgan et al, 2008), 49% na Dinamarca (Willingham, Ockens, Kapel & Monrad, 1996), embora um outro estudo tenha obtido uns surpreendentes 92,9% (Koch & Willesen, 2009 citando Tonsberg, Saeed & Koch, 2004), 39% em Itália (Poli, Arispici, Manciatì & Abramo, 1991) e 21% em Espanha (Gortázar, Villafuerte, Lucientes & Fernández-de-Luco, 1998), entre outros. Geralmente, a prevalência deste parasita nas raposas é bastante superior àquela encontrada nos cães (Koch & Willesen, 2009).

Outros animais selvagens foram também alvo de pesquisa de nemátodes pulmonares, incluindo *A. vasorum*, o qual foi identificado por exemplo no lobo (*Canis lupus*) em Espanha (Segovia, Torres, Miquel, Llana & Feliu, 2001). Num estudo dirigido ao panda vermelho (*Ailurus fulgens*) que decorreu em 2008, com amostras de vários zoos europeus, encontraram 35% dos animais parasitados por metastrongilídeos: *A. vasorum* em 2,6%, *Crenosoma* sp. em 4,3% e uma espécie não identificada em 27,8% (Bertelsen et al, 2009). Mais tarde, ao serem analisadas por PCR (*polymerase chain reaction*), esta última revelou ser geneticamente similar a *Stenurus minor* e *Torynurus convolutus*, metastrongilídeos aparentemente menos patogénicos (Bertelsen et al, 2010).

A distribuição que *A. vasorum* apresenta nos diferentes continentes e a relação entre si também tem sido alvo de interesse e pesquisas. De modo a comparar o *A. vasorum* proveniente da Europa e da América do Sul, foram realizadas análises filogenéticas dos dois, revelando que pertencem a diferentes linhagens e possivelmente constituem diferentes espécies (Jefferies, Shaw, Viney & Morgan, 2009). Através de análises genéticas, foi também realizado um estudo envolvendo o *A. vasorum* encontrado na Europa e no Canadá, onde curiosamente apresenta uma distribuição muito restrita. Embora existam hospedeiros definitivos e intermediários disponíveis por grande parte da América do Norte, o parasita parece restringir-se a uma população isolada na província da Terra Nova (Canadá), permanecendo desconhecida a razão de tal distribuição. Foi então demonstrado nesse estudo que a origem do *A. vasorum* encontrado em Terra Nova remonta provavelmente à Europa, tendo sido possivelmente introduzido pelos descobridores e colonizadores

européus, quando levaram os seus cães para o continente americano (Jefferies, Shaw, Willesen, Viney & Morgan, 2010).

A expansão geográfica destas parasitoses pulmonares nos últimos anos não pode ser explicada unicamente pela maior vigilância e melhores meios de diagnóstico utilizados na prática clínica. Embora seja especulativo, factores como o aquecimento global e mudanças na relação hospedeiro/parasita/hospedeiro intermediário estarão provavelmente envolvidos (Koch & Willesen, 2009; Morgan et al, 2009). A ocorrência da doença em diferentes áreas geográficas é influenciada pela presença de lesmas e caracóis, e o aumento da dispersão destes hospedeiros intermediários foi sugerido como responsável pelo maior número de casos de parasitoses reportados, contudo não existe evidência científica para confirmar as suspeitas (Traversa & Guglielmini, 2008). Sabe-se contudo que a actividade e dinâmica da população de moluscos gastrópodes é altamente sensível à temperatura e humidade (Morgan et al, 2009), assim como o desenvolvimento da larva de metastrongilídeos no hospedeiro intermediário se encontra dependente da temperatura (Jenkins, Kutz, Hoberg & Polley, 2006).

O risco de disseminação desta parasitose a longa distância também deve ser considerado, devido à importação de animais para zonas não endémicas. Por exemplo em 2007 foi reportado um caso de angiostrongilose na Austrália, num cão proveniente do Reino Unido (Tebb, Johnson & Irwin, 2007).

Morgan et al. (2009) demonstraram haver diversas áreas geográficas em que *A. vasorum* não é considerado endémico, na Europa e globalmente, que contudo constituem zonas bastante adequadas para o seu estabelecimento, com base nas condições climáticas. Alguns exemplos são Suíça, Holanda, Japão e Nova Zelândia, entre outros.

Diversas publicações foram disponibilizadas, especialmente relacionadas com a distribuição, epidemiologia e controlo, contudo existem vários aspectos da biologia, patologia e diagnóstico que necessitam ser elucidados (Traversa et al, 2010)

#### **4. Patofisiologia e sinais clínicos**

Os sinais clínicos presentes em animais infectados por nemátodes pulmonares dependem da gravidade da infecção, pelo que podem constituir desde uma doença assintomática a um caso fatal, embora este último seja raro e esteja reportado apenas em algumas espécies (como o *A. vasorum*). Geralmente apresentam sintomatologia respiratória, sendo a tosse, a taquipneia e a dispneia as manifestações mais comuns. No caso da angiostrongilose canina podem ainda ser observadas alterações cardíacas, hematológicas e neurológicas (Traversa & Guglielmini, 2008; Brennan 2009).

A manifestação de sintomatologia depende da carga parasitária, da idade do animal, da sua resposta imunitária e presença ou não de doenças concomitantes (Traversa et al, 2010).

A idade jovem e vida no exterior constituem factores de risco importantes na infecção felina por *A. abstrusus*. Gatos com menos de um ano de idade têm maior probabilidade de ficarem infectados devido ao seu maior instinto predador, assim como os gatos que vivem no exterior têm maior acesso aos hospedeiros intermediários e paraténicos (Headley, 2005; Traversa et al, 2008c; Mircean et al, 2010). A presença de sintomatologia respiratória é também considerada um factor de risco (Traversa & Guglielmini, 2008).

Nem sempre são observáveis sinais clínicos nos gatos parasitados, pois a doença pode ser assintomática ou sub-clínica. A forma ligeira, mais frequente em animais adultos e/ou com baixa carga parasitária, pode ser auto-limitante, com desaparecimento gradual dos sintomas (Lautenslauger, 1976). As infecções mais graves, encontradas geralmente em gatos jovens, debilitados e/ou imunodeprimidos, são habitualmente acompanhadas de tosse ligeira a intensa, espirros, corrimento nasal muco-purulento, dispneia grave e taquipneia, podendo ter um desfecho fatal (Ribeiro & Lima 2001; Bowman et el, 2003; Tuzer, Toparлак, Gargili, Keles, & Ulutas Esatgil, 2002). Estes sinais são provocados pela produção de ovos e migração larvar pela árvore bronquial, levando a uma resposta inflamatória com lesões graves nos alvéolos pulmonares, bronquíolos e artérias locais (fig. 8) (Naylor, Hamilton & Weatherley, 1984). Geralmente é induzida uma pneumonia granulomatosa e observa-se hiperplasia e hipertrofia dos músculos lisos das artérias pulmonares e do parênquima (fig. 9) (Headley, 2005).

Outros sinais, como letargia, depressão ou perda de peso, podem também ocorrer (Grandi et al, 2005).

Figura 8: Secção histológica de pulmão de gato com broncopneumonia. Podem observar-se numerosos ovos embrionados e larvas L1 de *Aelurostrongylus abstrusus* no interior dos alvéolos pulmonares (Ferreira da Silva et al, 2005).

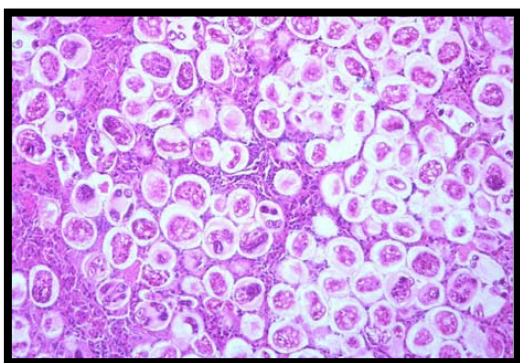
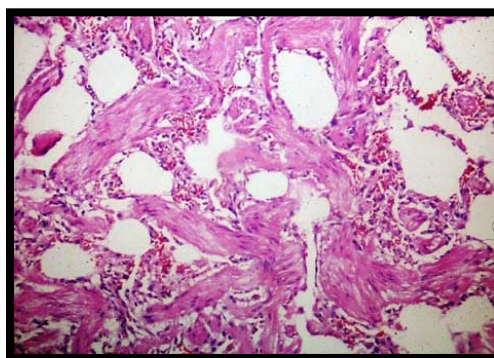


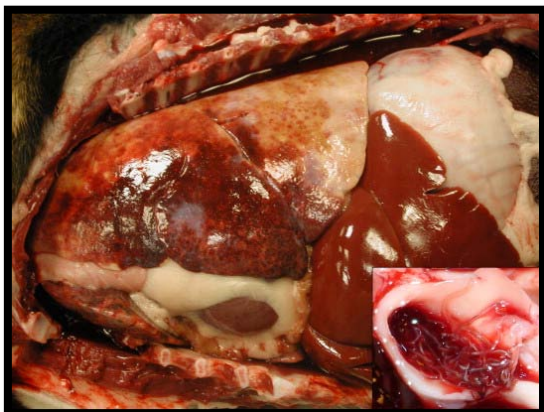
Figura 9: Secção histológica de pulmão de gato com alterações do músculo liso. Observa-se hipertrofia e hiperplasia severas do músculo liso dos septos alveolares, devidas a *Aelurostrongylus abstrusus* (Headley, 2005).



A maioria dos casos de angiostrongilose canina ocorre em animais jovens, provavelmente inerente à sua natureza mais curiosa, contudo a infecção também pode surgir em cães mais velhos (Brennan, 2009; Devine, 2011). Um estudo realizado em Copenhaga registou angiostrongilose em cães dos três meses aos 14 anos, contudo mais de metade dos afectados tinha menos de um ano (Koch & Willesen, 2009); também num outro estudo, em França, um terço dos animais com angiostrongilose tinha menos de um ano (Bourdeau & Laboure, 2009). Os sinais clínicos manifestados em cães mais velhos são geralmente menos intensos do que nos animais mais jovens. Não parece existir predisposição a nível de sexo (Koch & Willesen, 2009) mas relativamente à raça os dados são divergentes: Koch & Willesen (2009) não encontraram predisposição rácica, contudo um outro estudo sugeriu Cavalier King Charles Spaniels e Staffordshire Bull Terriers como raças mais propensas a esta doença (Chapman, Boag, Guitian & Boswood, 2004). A predisposição do primeiro poderá estar relacionada com um defeito na imunidade sistémica ou local a nível pulmonar (Chapman et al 2004). Também os cães de caça poderão ser mais susceptíveis de contrair esta parasitose (Devine, 2011). Por outro lado, segundo uma revisão de casos em Dublin, os cães urbanos ou suburbanos parecem ser mais afectados do que os cães de zonas rurais (Brennan, 2009). A doença aparenta ainda ter alguma sazonalidade, de acordo com um estudo em França, em que a maioria dos casos foi diagnosticada entre Setembro e Dezembro (Bourdeau & Laboure, 2009).

A sintomatologia apresentada por cães parasitados por *A. vasorum* é bastante variável, podendo ser ligeira ou mesmo ausente mas podendo também colocar em risco a vida do animal (Chapman et al, 2004; Koch & Willesen, 2009). Três principais categorias podem ser observadas, em simultâneo ou isoladamente: cardiorespiratória, hematológica (coagulopatias) e neurológica. Na primeira, os sinais reportados incluem tosse, dispneia, taquipneia, sons pulmonares anormais, hemoptise, síncope, intolerância ao exercício físico e ascite. Os sinais respiratórios são causados pela inflamação e broncopneumonia resultantes da deposição de ovos e migração das larvas pela árvore brônquica do hospedeiro (fig. 10, 11 e 12) (Brennan, McCarthy, McAllister, Bassett & Jones, 2004; Koch & Willesen, 2009). A presença de nemátodes adultos em vasos arteriais pulmonares pode resultar em trombose e hipertrofia do músculo liso dos vasos (fig. 13), levando a hipertensão pulmonar e eventualmente insuficiência cardíaca direita, com *cor pulmonale*, dependendo da gravidade e duração da infecção. Poderão então ser observados sinais de insuficiência cardíaca congestiva e ouvido um sopro cardíaco sistólico, devido a regurgitação da válvula tricúspide; cães gravemente afectados podem sofrer morte súbita (Nicolle et al, 2006; Bourque, Conboy, Miller & Whitney, 2008; Traversa & Guglielmini, 2008). Pode ainda ocorrer hemorragia pulmonar, contribuindo para as alterações respiratórias (Brennan, 2009).

Figura 10: Pulmão de cão num caso fatal de angiostrongilose.



Legenda: No pulmão são observáveis manchas vermelhas e pequenos granulomas palpáveis no parênquima; no canto inferior direito observa-se um aglomerado de *A. vasorum* adultos, envoltos em material fibrinoso na artéria pulmonar (Koch & Willeesen, 2009).

Figura 11: Secção histológica de pulmão de cão inoculado com L3 de *A. vasorum*, com reacção granulomatosa à volta de larva (Schnyder, 2010).

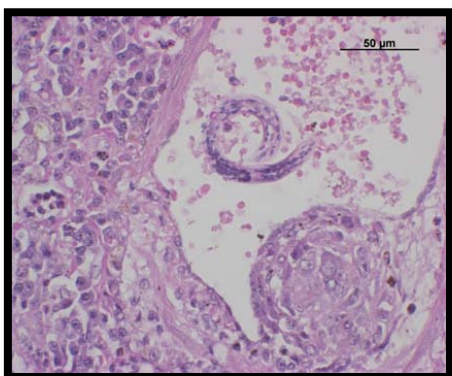


Figura 12: Secção histológica de pulmão de cão, onde se observam numerosas larvas e ovos de *A. vasorum* dentro dos alvéolos (Brennan et al, 2004).

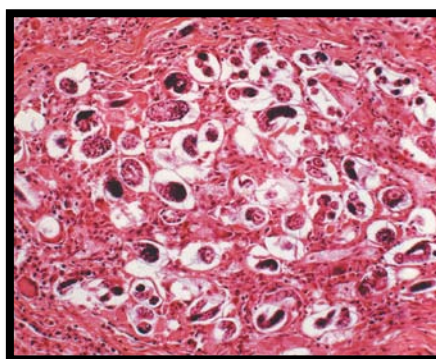
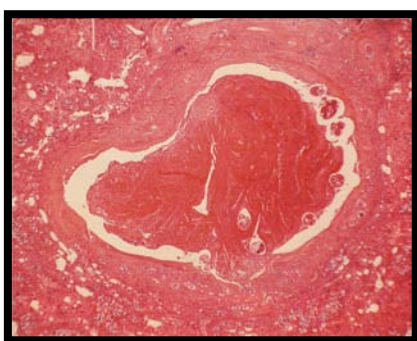


Figura 13: Secção histológica de pulmão de cão, onde se observa um trombo associado a adultos de *A. vasorum* numa artéria pulmonar (Brennan et al, 2004).



Alterações na coagulação também têm sido reportadas com alguma frequência. Podem ser observados sinais associados a hemorragias de diversas partes do organismo: do tracto respiratório (como epistaxis ou mesmo hemotórax), oral, da conjuntiva e da esclera, cutânea

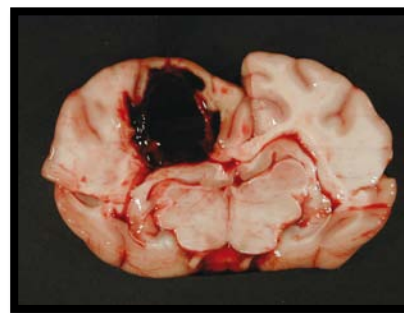


e subcutânea, retroperitoneal, abdominal, tracto gastrointestinal, tracto urinário e sistema nervoso central (fig. 14 e 15) (Brennan et al, 2004; Chapman et al, 2004; Garosi, Platt, McConnel, Wray & Smith, 2005; Wessmann et al, 2006; Sasanelli, Paradies, Otranto, Lia & De Caprariis, 2008; Willesen, Bjornvad & Koch, 2008; Brennan, 2009; Denk et al, 2009; Gredal et al, 2011). A presença de petéquias e equimoses é então comum, podendo surgir também hematomas traumáticos (como por exemplo pós-cirúrgicos). No estudo desenvolvido por Chapman et al (2004), aproximadamente 35% dos casos de angiostrongilose apresentavam diátese hemorrágica, com manifestação em diferentes sítios (já referidos).

Figura 14: Hemorragia conjuntival associada a infecção por *A. vasorum* em cadela Golden Retriever, de 14 meses (Whitley et al, 2005).



Figura 15: Secção transversa do cérebro a nível do hipocampo, revelando um hematoma de 2,5cm de diâmetro associado a infecção por *A. vasorum*, em cão Basset Hound, de 11 meses (Gredal et al, 2011).



Os mecanismos que originam a coagulopatia ainda não são claros e diversas explicações foram propostas, contudo nenhuma parece ser facilmente aplicável a todos os casos. Uma das hipóteses mais consistente e frequentemente sugerida baseia-se no desenvolvimento de uma coagulopatia de consumo secundária a coagulação intravascular disseminada (CID) induzida pelo parasita (Ramsey, Littlewood, Dunn & Herrtage, 1996; Cury, Lima, Guimarães & Carvalho, 2002b). Os testes de coagulação convencionais podem ser falíveis nestes pacientes, pois a contagem plaquetária, o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial (TTP) podem não apresentar alterações ou apenas ligeiras (Adamantos, 2009). Contudo, a maioria dos cães afectados apresenta trombocitopenia, TP e TTP prolongados e diminuição da actividade dos factores V e VIII, o que corrobora a hipótese de CID crónica (Ramsey et al 1996; Cury et al 2002b; Schelling, Greene, Prestwood & Tsang, 1986).

Outros mecanismos sugeridos incluem trombocitopenia imunomediada secundária a infecção por *A. vasorum* (Gould & McInnes, 1999) e deficiência do factor de von Willebrand adquirida (Whitley, Corzo-Menendez, Carmichael & McGarry, 2005). Também foi proposta a

secreção de um agente anticoagulante pelo parasita que actue como inibidor da coagulação, embora não tenha sido encontrada qualquer prova disto (Adamantos, 2009).

As alterações da coagulação geralmente ficam resolvidas em 24 a 48 horas depois de começar o tratamento anti-helmíntico (Devine, 2011). Quando por outro lado o desfecho é fatal, habitualmente a causa reside em hemorragia severa ou insuficiência respiratória (Koch & Willeesen, 2009). A mortalidade pode ser de 10 a 15%, apesar do tratamento (Chapman et al, 2004).

Está documentada anemia de gravidade variável em cães com angiostrongilose (Brennan et al, 2004; Sasanelli et al, 2008; Devine, 2011).

Sinais neurológicos também podem ser observados em alguns casos de angiostrongilose, sendo atribuídos a hipóxia cerebral por insuficiência cardíaca (Bolt, Monrad, Koch & Jensen, 1994) ou hemorragia ou embolismo por larvas no sistema nervoso central (Perry, Hertling & Kennedy, 1991; Oliveira-Júnior, Barçante, Barçante, Ribeiro & Lima, 2004; Garosi et al, 2005; Whitley et al, 2005; Bourque et al, 2008). As manifestações clínicas incluem paralisia de membros, défices de propriocepção, tetraparesia, ataxia, tremores de intenção, andar em círculos, convulsões, alterações comportamentais, fraqueza, depressão, dor lombar aguda (Wessmann et al 2006; Negrin, Cherubini, & Steeves, 2008; Brennan, 2009; Koch & Willeesen, 2009; Gredal et al, 2011) e alterações oculares, como hipermetria, nistagmo, ausência do reflexo de ameaça, estrabismo e cegueira (Brennan, 2009). O uso de ressonância magnética tem permitido identificar hemorragias focais e multifocais no cérebro e na medula espinhal, assim como, mais recentemente, meningite (Negrin et al, 2008; Brennan, 2009).

O quadro clínico presente em cães com infecção por *A. vasorum* pode igualmente incluir sinais gastrointestinais, como vômito e diarreia, e outros sinais não específicos, como anorexia, perda de peso e letargia (Chapman et al, 2004; Negrin et al, 2008; Koch & Willeesen, 2009).

Ainda, a localização ectópica de larvas e adultos constitui um factor importante na patogénese desta doença e na sintomatologia desenvolvida, pois pode provocar lesões que alterem a função normal do órgão atingido. Numa necrópsia realizada a um cão com angiostrongilose que morreu subitamente, foram encontrados um adulto na bexiga e outro no saco pericárdico. A presença de L1 foi também notada em diversos tecidos: pele, diafragma, fígado, pâncreas, cérebro e cerebelo, recolhidas através de uma modificação da técnica de Baermann. Este cão apresentava, ao exame físico, perda de peso, dermatite generalizada, mucosas pálidas, sons pulmonares anormais bilaterais e arritmia cardíaca (Oliveira-Júnior et al, 2004). A morte de animais infectados por *A. vasorum* devido à sua localização ectópica na artéria femoral foi já descrita (Cury & Lima, 1996).

Num pequeno número de animais afectados pelo parasita, também já foi reportada a sua localização a nível ocular, tanto da forma adulta como da larvar, aparecendo como

opacidades filamentosas e móveis na câmara anterior do olho (Manning, 2007; King, Grose & Startup, 1994). A alteração ocular mais frequente é a uveíte (Perry et al, 1991; Rosenlund, Boserup & Monrad, 1993; Manning, 2007).

## 5. Diagnóstico

Actualmente, a infecção de cães e gatos por nemátodes pulmonares constitui um verdadeiro desafio a nível de diagnóstico. Clinicamente não é fácil fazê-lo, uma vez que diversas outras condições patológicas devem ser consideradas nos diagnósticos diferenciais e podem ocorrer infecções sub-clínicas ou atípicas (Traversa et al, 2010). Além disso, o facto de estas parasitoses estarem subestimadas e surgirem em zonas previamente livres, condiciona a preparação dos veterinários clínicos para as identificar (Traversa, 2009).

A angiostrongilose canina é caracterizada por um vasto espectro de manifestações clínicas, podendo constituir uma doença ligeira ou bastante severa e potencialmente fatal. Na infecção por *A. abstrusus*, o gato apresenta sinais clínicos essencialmente do foro respiratório, podendo estar presentes em muitas outras doenças respiratórias. Assim, o clínico deve considerar diversos processos nos diagnósticos diferenciais: infecção viral, bacteriana ou fúngica, doença inflamatória não infecciosa (como pólipos nasofaríngeos e bronquite alérgica), corpo estranho e neoplasia do sistema respiratório (Traversa, 2009). Outros helmintes pulmonares, como *Crenosoma vulpis* ou *Eucoleus aerophilus*, devem ser também incluídos no caso do cão (Koch & Willeßen 2009).

Além disso, os achados radiográficos e hematológicos frequentemente são inespecíficos, não permitindo um diagnóstico etiológico e definitivo. Para o alcançar são necessários métodos de diagnóstico próprios, ou seja, a detecção directa do agente em amostras biológicas (Willard, Roberts, Allison, Grieve & Escher, 1988; Traversa & Guglielmini, 2008; Helm, Morgan, Jackson, Wotton & Bell, 2010).

Assim, quer a infecção por *A. vasorum* no cão quer por *A. abstrusus* no gato pode ser identificada através de técnicas coprológicas, pois estes parasitas eliminam L1 nas fezes. Com o objectivo de as detectar, várias técnicas podem ser utilizadas, como esfregaço fecal directo, flutuação ou Baermann (Traversa et al, 2010). Contudo, esta última constitui a técnica de eleição ou *gold standard* para o diagnóstico destes parasitas, uma vez que as suas L1 vivas exibem hidro e termotropismo positivos (Willard et al, 1988; Conboy, 2009).

A técnica de Baermann foi inicialmente descrita em 1917, como um método de extracção de larvas de ancilostomídeos do solo. Uma modificação da técnica foi desenvolvida em 1922 e tem sido amplamente utilizada para recolher nemátodes do solo, erva e fezes (Beane & Hobbs, 1983).

O facto de existir eliminação de L1 nas fezes, quer no caso de *A. abstrusus* quer no de *A. vasorum*, permite a utilização de técnicas coprológicas para detectar estes parasitas. Dado

que estas larvas apresentam grande mobilidade devido aos seus hidrotropismo e termotropismo positivos, a técnica de Baermann constitui a mais indicada para esse propósito (Willard et al, 1988; Conboy, 2009). As larvas, incapazes de nadar contra a gravidade, descem até ao fundo do copo cónico, onde podem depois ser recolhidas. É um método qualitativo, sendo pretendido avaliar apenas a presença ou ausência das larvas (Madeira de Carvalho, Silva Meireles & Pereira da Fonseca, 2009).

A identificação das L1 deve reger-se por determinados parâmetros métricos e morfológicos: as larvas de *A. abstrusus*, de comprimento entre 300 e 390µm, apresentam a extremidade posterior em forma de “S” com um entalhe dorsal e uma terminação tipo botão, extremidade anterior cónica e conteúdo granular (fig. 16 e 17) (Scott, 1972; Thienpont, Rochette & Vanparijs, 1986; Jefferies, Vrhovec, Wallner & Catalan, 2010); as de *A. vasorum*, comprimento de 310 a 400µm, exibem uma extremidade posterior com uma curva de onda sinusoidal, também com um entalhe nítido na superfície dorsal (fig. 18 e 19) (Rosen et al, 1970; Conboy, 2000). Ambas possuem esófago não rabadiforme que ocupa um terço a metade do comprimento da larva (Scott, 1972; Conboy, 2009). Durante o exame microscópico, estas características podem não ser facilmente reconhecidas devido à actividade das larvas, pelo que a utilização de Lugol para as fixar e corar pode ser benéfica (Rosen et al, 1970). As larvas destes parasitas necessitam ser diferenciadas de outras menos comuns e das pertencentes a outros nemátodes pulmonares, nomeadamente de *Oslerus rostratus* no caso dos gatos e de *Crenosoma vulpis*, *Filaroides* spp. e *Oslerus osleri*, assim como do parasita intestinal *Strongyloides stercoralis*, no caso dos cães (Conboy, 2009). A presença de L1 de *Filaroides* spp. e *Oslerus* spp. é pouco provável em amostras analisadas através da técnica de Baermann, pois sendo letárgicas não migram para fora do conteúdo fecal. Também é importante a distinção de larvas de ancilostomídeos que possam estar presentes em amostras que puderam incubar e de larvas de nemátodes de vida livre ou de plantas, que possam aparecer em amostras recolhidas do solo (Traversa et al, 2010).

Figura 16: L1 de *Aelurostrongylus abstrusus* (Tort, 2010).



Figura 17: Pormenor da cauda da L1 de *Aelurostrongylus abstrusus* (Jefferies et al, 2010).

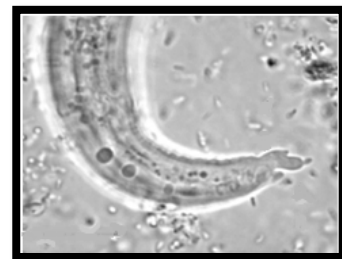
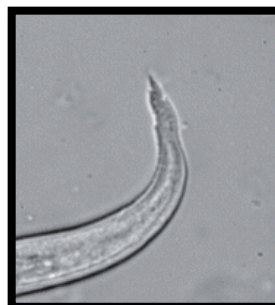


Figura 18: L1 de *Angiostrongylus vasorum* (Brennan et al, 2004).



Figura 19: Pormenor da cauda da L1 de *Angiostrongylus vasorum* (Simpson, 2010).



Mesmo sendo o método *gold standard* para a detecção de aelurostrongilose e angiostrongilose, a técnica de migração de Baermann apresenta algumas desvantagens: é dispendiosa a nível de tempo (demora cerca de 24 horas), requer experiência do operador na observação microscópica e podem ocorrer falsos negativos. Esta última devido a não ser possível diagnosticar as infecções durante o período pré patente e quando as larvas não estão a ser eliminadas, mesmo na presença de sintomatologia severa (Traversa & Guglielmini, 2008; Koch & Willesen, 2009). Como já anteriormente referido, os períodos pré patentes de *A. abstrusus* e de *A. vasorum* são longos e variáveis, podendo ir de um a dois meses (Ribeiro & Lima, 2001) e um a quatro meses (Rosen et al, 1970; Oliveira-Júnior et al, 2006), respectivamente. Também em ambas as parasitoses, a eliminação de larvas afigura-se irregular e intermitente (Ribeiro & Lima, 2001; Oliveira-Júnior et al, 2006), pelo que é aconselhável a recolha de fezes para o diagnóstico se efectuar por três dias consecutivos (Koch & Willesen, 2009 citando Willesen, Moller, Koch, Jensen & Kristensen, 2004<sup>1</sup>). Ribeiro & Lima (2001) observaram o pico máximo de produção larvar entre os dias 60 e 120 pós infecção, para *A. abstrusus*, assim como a possibilidade de ocorrência de re-infecção, apresentando um período pré-patente mais prolongado. No caso do *A. vasorum*, Oliveira-Júnior et al (2006) registaram dois picos, aproximadamente aos 90 e aos 270 dias pós infecção; a ocorrência de re-infecção é também possível para este parasita.

Apesar destes factores, a técnica de Baermann constitui o exame coprológico mais sensível para a detecção de infecção por estes nemátodes. A menor sensibilidade encontrada na técnica de esfregaço fecal directo (61% quando comparada com o método de Baermann) relaciona-se com a dimensão inadequada da amostra, e apenas são detectados os casos em que a excreção de larvas nas fezes é elevada (Traversa & Guglielmini, 2008; Humm & Adamantos, 2010). Ainda assim, esta análise pode ser uma ajuda no diagnóstico, uma vez

<sup>1</sup> Willesen, J. L., Moller, J., Koch, J., Jensen, A. L. & Kristensen, A. T. (2004). Tidlig diagnostik af *Angiostrongylus vasorum* (fransk hjerteorm) og *Crenosoma vulpis* (raevens lungeorm) hos hunde er mulig ved hjælp af modificeret Baermann test. *Dansk Veterinær Tidsskrift*, 87, 6-10.

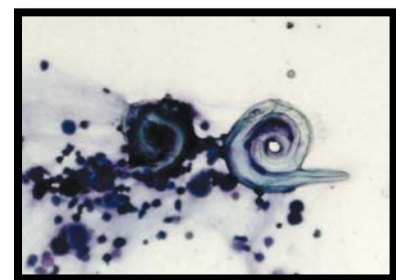
que constitui uma opção não invasiva, requer uma quantidade muito reduzida de amostra fecal (enquanto que no Baermann é recomendado um mínimo de 5 g), com resultados rápidos e de custos muito baixos, apresentando uma boa especificidade e razoável sensibilidade (Humm & Adamantos, 2010).

Do mesmo modo, as técnicas por flutuação apresentam menor sensibilidade que a de Baermann, devido não só ao tamanho inadequado da amostra mas também aos efeitos danosos que podem provocar nas larvas. O tipo de solução utilizada e o tempo de duração da flutuação influenciam a análise, pois podem levar à desidratação da larva e conseqüente alteração morfológica, comprometendo ou mesmo impossibilitando a sua identificação, especialmente no caso de operadores pouco experientes. Em particular, as soluções concentradas de açúcar ou de sal tendem a induzir alterações osmóticas nas larvas, por terem gravidade específica elevada. (Scott, 1972; Conboy, 2000; Traversa et al, 2008c). O uso de sulfato de zinco na flutuação fecal parece ser mais fiável, contudo ainda 40-90% dos animais positivos poderão não ser detectados (Conboy, 2004).

Uma nova técnica copromicroscópica multivalente, denominada FLOTAC, foi recentemente avaliada na detecção de L1 de *A. vasorum* em amostras fecais caninas. Este método baseia-se na contagem de formas parasitárias (ovos ou larvas) em câmaras, após flutuação numa centrífuga e translação da porção apical da suspensão. Ao ser comparada com as técnicas de McMaster, de flutuação em tubo e de Baermann-Wetzel, a de FLOTAC (utilizando sulfato de zinco na flutuação) obteve uma média de larvas por grama superior a qualquer das outras três. Assim, esta nova técnica poderá contribuir para melhorar o diagnóstico de nemátodes pulmonares, representando uma alternativa em situações em que a viabilidade da larva esteja comprometida, por exemplo após transporte ou armazenamento prolongados, e não se possam utilizar técnicas de migração de larvas (Schnyder et al, 2011).

Em alternativa às técnicas coprológicas, outros métodos de detecção de L1 têm sido utilizados no diagnóstico de ambas as parasitoses, embora com menor frequência. O mais comum consiste em lavagem traqueal ou broncoalveolar (fig. 20), embora implique alguns inconvenientes, uma vez que constitui um procedimento invasivo, tem potenciais riscos e pode não detectar as L1, quer devido a factores relacionados com a doença (envolvimento pulmonar pouco significativo, baixa carga parasitária ou infecção pré-patente) quer relacionados com uma recolha de amostra insuficiente (Chapman et al, 2004).

Figura 20: Larvas de *A. vasorum* (L1) em citologia de lavado broncoalveolar (Chapman et al, 2004).



O diagnóstico de angiostrongilose foi também já descrito por punção aspirativa de agulha fina pulmonar (Tebb et al, 2007) e citologia a partir do hemotórax, com coloração May Grunwald Giemsa (Sasanelli et al, 2008), assim como por exame microscópico de sedimento urinário, em urianálise de rotina (Koch & Willesen, 2009).

De modo a melhorar e ultrapassar as limitações habituais dos métodos tradicionais de diagnóstico destas parasitoses, novas abordagens têm sido estudadas e desenvolvidas, particularmente a nível da serologia e técnicas moleculares.

A nível serológico, vários estudos realizados nos anos 70 permitiram constatar algumas limitações, sobretudo relacionadas com reactividade cruzada entre antigénios de outros endoparasitas e a fraca distinção entre infecções antigas e recentes (Traversa & Guglielmini, 2008). O único efectuado para detecção de aelurostrongilose pretendia avaliar um teste de imunofluorescência indirecta, utilizando antigénios da L3, mas embora permitisse detectar anticorpos a partir da terceira semana pós-infecção, a sua longa presença em circulação não possibilitava diferenciar a infecção antiga da recente e activa (Hamilton & Roberts, 1968).

Já no que respeita a angiostrongilose, o crescente interesse resultou em diversos estudos. A avaliação das técnicas ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) e WB (*western blot*) demonstrou a existência de resposta humoral resultante da infecção experimental com *A. vasorum*, e revelou as três principais proteínas imunogénicas (proteínas de peso molecular 28, 102 e 115 kDa). Comparativamente, o segundo teste revelou ter maior sensibilidade na detecção de anticorpos específicos. Contudo, não foram testados soros de cães infectados com outros helmintes, servindo de controlo, de modo a verificar a existência de reacções cruzadas (Cury, Guimarães, Lima & Vitor, 2002).

Um outro ensaio, com o objectivo de identificar antigénios específicos das L1 e dos adultos de *A. vasorum*, através de *immunoblotting*, revelou que embora o extracto bruto de adultos apresentasse antigénios em comum com outros helmintes, resultando em reacções cruzadas, quatro proteínas do parasita adulto foram reconhecidas especificamente pelas IgG de cães infectados com *A. vasorum* (proteínas de peso molecular 51, 63, 92 e 209 kDa). Assim, estas proteínas poderão futuramente ser utilizadas em testes serológicos, embora primeiro seja necessária a sua purificação (Vasconcelos, Vitor & Lima, 2008).

Recentemente foi desenvolvido um *sandwich*-ELISA, um teste idêntico ao utilizado no diagnóstico de *Dirofilaria immitis*, com o objectivo de detectar antigénios de *A. vasorum* em circulação. Inicialmente os autores tentaram utilizar um método de ELISA para detectar anticorpos contra o parasita, mas registaram reacção cruzada significativa com antigénios de *Crenosoma vulpis*. O *sandwich*-ELISA apresentou uma sensibilidade de 92% e especificidade de 100%. Posteriormente, 239 cães com sintomatologia cardio-pulmonar foram examinados através desta técnica e da de Baermann, obtendo-se 10% (24/239) de

positivos pelo método tradicional e 18.8% (45/239) pelo teste serológico. Isto sugere que possivelmente a técnica de Baermann teve maior número de falsos negativos, ou seja, menor sensibilidade, e que o *sandwich*-ELISA poderá ser útil no diagnóstico desta parasitose, embora ainda sejam necessários mais estudos (Verzberger-Epshtein et al, 2008).

Também vários estudos moleculares têm sido desenvolvidos recentemente no intuito de ultrapassar as falhas dos métodos convencionais. Um *nested* PCR, baseado no uso de marcadores genéticos do ADN ribossomal, foi desenvolvido para o *A. abstrusus*, utilizando diferentes amostras biológicas. As amostras recolhidas por zangaratoa a nível da faringe parecem ser as mais adequadas, pois a extracção de ADN fecal é mais complicada e a quantidade pode ser insuficiente para amplificação por PCR. Além de apresentar 100% de especificidade, o método revelou 96.6% de sensibilidade, valor superior ao alcançado pelos métodos tradicionais, devido provavelmente à amplificação específica de moléculas de ADN hidrossolúveis nas amostras biológicas, pelo que pode ser de grande utilidade no diagnóstico deste parasita (Traversa, Iorio & Otranto, 2008).

Marcadores genéticos de ADN mitocondrial e ribossomal foram estabelecidos para o *A. vasorum*, permitindo diferenciá-lo de outras espécies próximas (*Angiostrongylus cantonensis* e *Angiostrongylus costaricensis*) através de PCR-RFLP (*PCR-restriction fragment length polymorphism*) (Caldeira et al, 2003). Mais recentemente foi desenvolvido um “real-time” PCR específico para regiões ribossomais do *A. vasorum*, capaz de amplificar ADN do parasita a partir de diversas amostras biológicas (sangue EDTA, tecido pulmonar, fluido da lavagem bronco-alveolar, muco endotraqueal, zangaratoa da faringe e amostra fecal). A técnica demonstrou ser rápida e altamente eficiente utilizando sangue EDTA, conseguindo detectar consistentemente uma única molécula de ADN do parasita e não amplificando ADN de outros nemátodes ou do próprio hospedeiro definitivo (Jefferies, Morgan, Helm, Robinson & Shaw, 2011). Além disso, os mesmos autores avaliaram a eficácia do real-time PCR e ELISA testando sangue EDTA e soro de cães com suspeita de angiostrongilose e comparando com a técnica de Baermann utilizando amostras fecais. Dos animais revelados positivos em pelo menos um dos testes, foram detectados pelo método tradicional 65% deles, por PCR 58% e por ELISA 77%, obtendo-se 90% ao conjugar os dois últimos. Assim, esta combinação poderá melhorar a detecção de *A. vasorum* e futuramente ser proveitosa no diagnóstico clínico e na investigação epidemiológica (Jefferies et al, 2011).

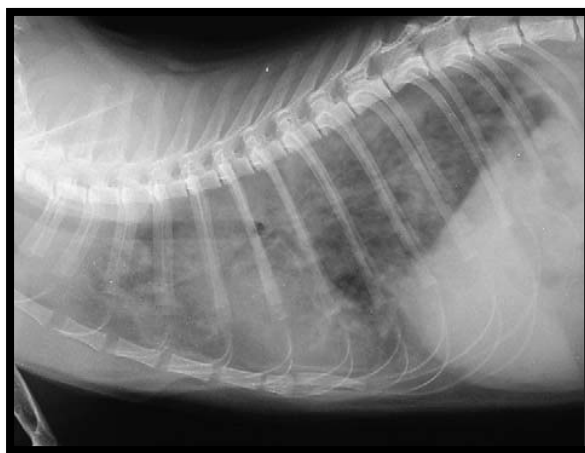
Diversos meios complementares de diagnóstico, embora não permitam obter um diagnóstico definitivo, podem ser úteis no processo e ajudar a avaliar a gravidade da infecção parasitária. A nível da imagiologia, apesar de não serem encontradas lesões patognomónicas, a realização de radiografias torácicas pode ser bastante proveitosa,



apresentando características diferentes de acordo com a cronicidade da doença (Traversa & Guglielmini, 2008; Koch & Willesen, 2009).

As primeiras alterações radiológicas observadas em gatos com aelurostrongilose incluem espessamento dos brônquios e pequenos nódulos dispersos pelo pulmão, com maior incidência nos lobos caudais. Mais tarde, poderá surgir um padrão alveolar generalizado, sobretudo nos casos com sinais clínicos mais manifestos, e os padrões brônquico (fi. 21) e intersticial, comuns após resolução parcial do anterior (Losonsky, Thrall & Prestwood, 1983). Também distensão da artéria pulmonar e derrame pleural já foram descritos (Hamilton, 1963; Losonsky et al, 1983; Miller, Roudebush & Ward, 1984), ao contrário do que se verifica com hipertensão pulmonar e distensão do ventrículo direito (Rawlings, Losonsky, Lewis, Hubble & Prestwood, 1980).

Figura 21: Radiografia torácica de um gato com aelurostrongilose, onde se observa um padrão brônquico (Grandi et al, 2005).

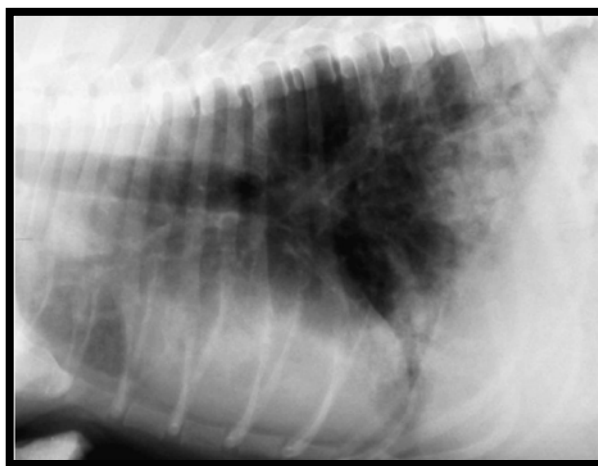


O recurso a TAC (tomografia axial computadorizada) permite obter imagens com melhor resolução, apresentando maior definição das lesões nodulares e das paredes brônquicas, contudo, à semelhança do que sucede com o exame radiográfico, a distinção entre aelurostrongilose e outros processos pulmonares inflamatórios ou infecciosos é difícil (Payo-Puente et al, 2005).

No caso da angiostrongilose, a realização de radiografias torácicas pode ser ainda mais relevante, especialmente em zonas endêmicas, uma vez que a presença de padrão alveolar periférico ou multifocal num cão jovem é fortemente sugestiva desta doença (Chapman et al, 2004; Boag, Lamb, Chapman & Boswood, 2004). As alterações mais precoces incluem padrão brônquico e intersticial, com pequenas áreas focais de infiltrados alveolares, geralmente a partir das sete semanas pós-infecção. Com a evolução da doença e a grande produção de L1, múltiplas densidades alveolares e intersticiais surgem no pulmão, sobretudo na periferia e parte caudal dos lobos, as últimas devido a consolidação e fibrose

pulmonar (fig. 22). Nos casos crônicos, o mais habitual é encontrar-se os padrões intersticial e brônquico (Boag et al, 2004). Ainda, o número de larvas no pulmão influencia a gravidade da doença e das lesões encontradas (Cury, Lima, Guimarães, Muzzi & Bregunci, 2001).

Figura 22: Radiografia torácica lateral direita de um cão com angiostrongilose, onde se pode observar um padrão alveolar periférico e um aumento marcado do lado direito da silhueta cardíaca (Chapman et al, 2004).



Outras alterações já reportadas incluem distensão cardíaca direita (Cury et al, 2001), dilatação do tronco pulmonar (Boag et al, 2004) e ainda pneumotórax (Martin, Ashton, Simpson & Neal, 1993). Nos casos moderados a severos, após o tratamento, foi notada a subsistência de alterações radiológicas residuais por um longo período, acompanhadas de tosse e intolerância ao exercício, em cerca de 40% dos cães (Koch & Willesen, 2009).

De forma similar ao que sucede na aelurostrongilose, também para a angiostrongilose a TAC possibilita uma melhor avaliação e definição das lesões que lhe estão associadas, evidenciando áreas de consolidação e opacidades multifocais, especialmente nas zonas periféricas dos lobos pulmonares caudais. Nos casos moderados a severos, pode ser observado um aumento difuso da atenuação do pulmão devido a edema, acompanhado de congestão e infiltração por células inflamatórias (Koch & Willesen, 2009).

A ressonância magnética (RM) tem sido um exame de grande utilidade no caso de cães que apresentam sintomatologia neurológica associada a infecção por *A. vasorum*, ao permitir a detecção de hemorragias a nível cerebral e na medula espinhal (Garosi et al, 2005; Wessmann et al, 2006). Este exame pode também revelar meningite associada à infecção pelo parasita (Negrin et al, 2008).

Nos casos crônicos de angiostrongilose, uma possível complicação a ter em atenção é a hipertensão pulmonar, que pode ser demonstrada através dum exame ecocardiográfico. Embora seja pouco frequente na prática clínica comum (menos de 5% dos casos), num hospital de referência em Copenhaga foi registada hipertensão pulmonar ligeira a moderada

em mais de um terço dos cães afectados, sendo geralmente reversível (Koch & Willesen, 2009). Já nos casos severos, o prognóstico é reservado, embora esteja reportado um caso de evolução favorável e reversível (Nicolle et al, 2006). As alterações encontradas na ecocardiografia incluem hipertrofia ventricular direita, aplanamento do septo durante a sístole, dilatação do ventrículo e átrio direitos, assim como do tronco pulmonar, redução do tamanho do ventrículo esquerdo, alteração do fluxo pulmonar e insuficiência das válvulas tricúspide e pulmonar (Nicolle et al, 2006). Nenhuma destas alterações é específica de angiostrongilose (Traversa & Guglielmini, 2008).

A nível hematológico e bioquímico também poderão ser observadas algumas alterações, contudo o diagnóstico de angiostrongilose, tal como o de aelurostrongilose, não deve ser excluído com base nestes parâmetros (Willesen, Jensen, Kristensen & Koch, 2009).

A análise de gases sanguíneos em gatos infectados por *A. abstrusus* pode indicar hipoventilação, provavelmente causada por obstrução da via aérea por larvas e adultos nos bronquíolos e ductos alveolares, assim como acidose respiratória. Dois meses após o tratamento, os níveis sanguíneos dos gases parecem aproximar-se dos níveis fisiológicos (Yildiz, Duru & Gokpınar, 2011).

No caso de angiostrongilose, eosinofilia poderá estar presente, assim como um aumento da contagem total de leucócitos e neutrofilia, embora estas sejam menos comuns. Mesmo em cães sem aumento significativo das contagens celulares sanguíneas, uma leve resposta inflamatória pode estar presente. As alterações bioquímicas incluem aumento das globulinas e diminuição da fructosamina (Willesen et al, 2009). Esta última parece ser bastante consistente em cães com angiostrongilose (Willesen et al, 2006), pelo que em zonas onde o parasita é endémico, uma concentração baixa de fructosamina em combinação com trombocitopenia, hiperglobulinemia ou eosinofilia pode indiciar a infecção por *A. vasorum* (Willesen et al, 2009).

Também a hipercalcemia foi já associada a angiostrongilose, possivelmente devido a granuloma pulmonar provocado pelo parasita, através de um mecanismo semelhante ao que acontece na doença granulomatosa em humanos, em que se observa um aumento desregulado da produção de 1,25-dihidroxicolecalciferol por macrófagos activados (Boag, Murphy & Connolly, 2005).

A concentração sanguínea de glucose, albumina e proteínas parece não sofrer alterações dignas de registo (Willesen et al, 2006).

De acordo com o conhecimento actual, o diagnóstico de aelurostrongilose felina e angiostrongilose canina no contexto da prática clínica deve incluir informação epidemiológica local, sinais clínicos apresentados pelo animal e informação obtida através de meios complementares de diagnóstico, como análises hematológicas e bioquímicas e

radiologia (Morgan & Shaw, 2010). Em caso de suspeita, é crucial que a técnica de Baermann se torne rotineira (Traversa & Guglielmini, 2008).

## 6. Tratamento

Se por um lado o diagnóstico pode ser um verdadeiro desafio, o tratamento geralmente é bastante simples. Diversas opções de tratamento são conhecidas para a aelurostrongilose felina e para a angiostrongilose canina, tendo sido vários os protocolos já utilizados e reportados como eficazes. Contudo, grande parte desta informação baseia-se em casos reportados ou pequenos estudos retrospectivos com diferentes fármacos, concentrações, via de administração e duração do tratamento (Willesen, 2009).

Os benzimidazóis e as lactonas macrocíclicas constituem os grupos de fármacos que mais amplamente têm sido utilizados no tratamento destas parasitoses. Relativamente à aelurostrongilose, o febendazol mostrou-se eficaz quando administrado diariamente durante cinco dias na dosagem de 20 mg/kg (Hamilton, Weatherley & Chapman, 1984), durante 15 dias a 50 mg/kg (Grandi et al, 2005) e ainda durante três dias a 50 mg/kg, em formulações orais (Barrs, Swinney, Martin & Nicoll, 1999). Outros anti-helmínticos foram testados mas com resultados pouco satisfatórios, quer por eficácia controversa, problemas relativos a palatibilidade, dosagens inconvenientes, toxicidade ou efeitos secundários (Scott, 1972; Miller et al, 1984). Por exemplo a ivermectina, além de apresentar actividade limitada pode ter efeitos secundários possivelmente fatais em gatos jovens (Blagburn, Hendrix, Lindsay & Vaughan, 1987; Lewis, Merchant & Neer, 1994; Grandi et al, 2005). Mais recentemente foi avaliada a eficácia e segurança de dois anti-parasitários, um contendo imidaclopride 10% e moxidectina 1% e outro com emodepside 2.1% e praziquantel 8.6%, em formulação *spot-on* e administrados uma única vez, sendo comparados com a pasta oral de febendazol (18.75%) administrada três dias consecutivos. Todas as formulações demonstraram ser seguras e efectivas no tratamento de gatos infectados naturalmente por *A. abstrusus*, tendo a pasta de febendazol e o *spot-on* de emodepside 2.1% e praziquantel 8.6% eficácia idêntica e o *spot-on* imidaclopride 10% e moxidectina 1% ligeiramente superior aos outros (Traversa et al, 2009).

Também no tratamento da angiostrongilose tem sido bastante utilizado o febendazol, em diferentes protocolos, variando de 20 a 50 mg/kg durante 5 a 21 dias (Chapman et al, 2004; Garosi et al, 2005; Whitley et al, 2005). Assim substituiu o levamisol e a ivermectina como escolha preferencial, uma vez que o primeiro, apesar de ter elevada eficácia, aparenta aumentar o risco de choque anafilático devido à rápida libertação de antígenos do parasita na circulação (Soland & Bolt, 1996), e a ivermectina constitui um potencial risco no tratamento de colíes e raças relacionadas (Hopper, Aldrich & Haskins, 2002). Mais recentemente, o risco de toxicidade da ivermectina foi contornado com novas formulações

do grupo das lactonas macrocíclicas, como a selamectina, a milbemicina oxima e a moxidectina (Bishop et al, 2000; Novotny et al, 2000; Paul, Tranquilli & Hutchens, 2000). Num estudo sobre a eficácia da milbemicina oxima, administrada semanalmente durante quatro semanas na dosagem de 0.5 mg/kg, que decorreu em 16 cães infectados naturalmente, observou-se que em 87.5% (14/16) dos animais os sinais clínicos foram resolvidos e a excreção de larvas cessou (Conboy, 2004). Da mesma forma, o febendazol (25 mg/kg *per os* durante 20 dias) e uma formulação *spot-on* de imidaclopride 10% e moxidectina 2.5% (0.1 ml/kg em aplicação única) foram alvos de avaliação, revelando eficácias de 91.3% e 85.2%, respectivamente (Willesen, Kristensen, Jensen, Heine & Koch, 2007).

A utilização de determinados fármacos tem assim ganho evidência científica nos últimos anos, comprovando a sua adequação e surgindo alternativas nas formulações, nomeadamente o *spot-on*, que pode tornar a administração mais simples e prática (Koch & Willesen, 2009).

Geralmente, no final do tratamento ou da resolução dos sinais clínicos é aconselhado fazer um teste de Baermann de três dias consecutivos, de modo a certificar que a excreção de L1 já não ocorre (Chapman et al, 2004). No caso de ser utilizado febendazol, habitualmente a testagem é realizada ao fim de três semanas. Se nesta altura o resultado do teste for positivo, é provável que o tratamento tenha falhado e não que se trate de uma re-infecção. Como as re-infecções podem de facto ocorrer, alguns clínicos recomendam testar novamente o animal após três meses e depois duas vezes no ano; se todos os resultados forem negativos, então só será necessário novo exame no caso de o animal apresentar algum sinal clínico suspeito, como tosse (Koch & Willesen, 2009). Esta abordagem cautelosa tem provavelmente maior importância em zonas endémicas.

Embora sem bases científicas, o tratamento de suporte para pacientes com estas parasitoses pode adequar-se ao quadro clínico do animal (Helm et al, 2010). A utilização de corticosteróides está indicada para prevenir reacções anafiláticas aos antígenos dos parasitas mortos e no caso de trombocitopenia imunomediada (Gould & McInnes, 1999; Soland & Bolt, 1996), assim como se acredita que possam ser benéficos na redução da inflamação e fibrose a nível pulmonar (Koch & Willesen, 2009). Apesar de raramente reportado, o uso de outros fármacos como a adrenalina ou anti-histamínicos pode ser considerado em determinados casos de reacções anafiláticas (Koch & Willesen, 2009). Os antibióticos não são indicados de forma rotineira (Morgan & Shaw, 2010).

O repouso em jaula durante os primeiros dias de tratamento é recomendado nos casos mais severos, como por exemplo se o animal se apresentar dispneico, podendo também beneficiar da administração de oxigénio, diuréticos e broncodilatadores (Koch & Willesen,

2009). É importante que na fase inicial do tratamento o paciente seja vigiado, uma vez que já foram reportadas complicações, como pneumotórax (Willesen et al, 2007).

De modo a estabilizar os cães que apresentem alterações de coagulação que ponham em risco a sua vida, a transfusão de plasma fresco congelado ou sangue total é o aconselhado, não sendo possível fazer recomendações mais específicas uma vez que os mecanismos destas alterações não estão totalmente esclarecidos (Koch & Willesen, 2009; Morgan & Shaw, 2010). Aparentemente, os problemas de coagulação resolvem-se 24 a 48 horas após o início do tratamento anti-helmíntico, contudo os mecanismos que levam a esta reversão também não são conhecidos (Koch & Willesen, 2009).

O prognóstico para os animais afectados depende da gravidade da doença, sendo que os casos ligeiros e moderados têm excelente prognóstico, como demonstrou um estudo com 53 cães nesta situação, em que todos sobreviveram (Willesen et al, 2007). Os casos severos, em que geralmente está presente alguma alteração na coagulação e/ou dispneia intensa, podem ter uma evolução pouco favorável e contribuir para a elevada mortalidade reportada na literatura, sendo a maioria das mortes devida a coagulopatia (Koch & Willesen, 2009). Naturalmente, quanto mais precoce for a instituição da terapêutica maior é a probabilidade de recuperação (Morgan & Shaw, 2010). Factores como a duração da infecção e a carga parasitária podem influenciar a recuperação, que pode ser completa ou não, contudo não é fácil aceder a estes parâmetros em animais infectados naturalmente (Koch & Willesen, 2009).

## 7. Profilaxia

Em áreas endémicas, uma das medidas profiláticas a considerar é a utilização de anti-helmínticos. Num estudo já anteriormente referido, em que foi testada a eficácia da milbemicina oxima no tratamento e prevenção da infecção por *A. vasorum*, registou-se uma diminuição de 57% na contagem do parasita com apenas uma aplicação de 0,5 mg/kg no dia 30 pós-infecção, e uma eficácia de 85% quando administrada também no dia 60 (Willesen, 2009 citando Conboy, Schenker & Strehlau, 2004<sup>2</sup>). Mais recentemente, também a eficácia profilática e segurança da formulação *spot-on* imidaclopride 10%/ moxidectina 2.5% foram avaliadas em cães experimentalmente infectados com 200 L3 de *A. vasorum*. Com uma única aplicação, no dia quatro pós-infecção num dos grupos e no dia 32 no outro, nenhum parasita adulto foi detectado posteriormente nas necrópsias (56 a 59 dias pós-infecção). Assim, o uso desta formulação no período pré-patente parece realmente evitar, ou

---

<sup>2</sup> Conboy, G., Schenker, R. & Strehlau, G. (2004). Efficacy of Milbemax® (milbemycin / praziquantel) for the treatment and prevention of *Angiostrongylus vasorum* infection in dogs. *Proceedings of the 49th American Association of Veterinary Parasitologists Meeting, Philadelphia, USA, July 24–28, p 92.*

pelo menos minimizar, o estabelecimento do parasita adulto e o desenvolvimento de lesões pulmonares que pode acontecer nesta altura (Schnyder et al, 2009).

Na prática, continua a ser um pouco difícil fazer recomendações para a prevenção da infecção ou da doença clínica, embora logicamente quanto mais regular for o tratamento com um fármaco eficaz, menor será o risco. O nível de eficácia necessária dos anti-helmínticos para conferirem ao animal protecção clínica não é conhecido. Assim, os veterinários devem manter-se atentos a infecções mesmo em cães tratados regularmente com anti-helmínticos. Contudo, as recomendações para o seu uso devem também adequar-se à situação epidemiológica da zona, pois uma profilaxia intensa onde o parasita é raro ou ausente pode não ser favorável e contribuir para o desenvolvimento de resistência aos fármacos, embora não haja registo desta situação com *A. vasorum* (Morgan & Shaw, 2010). Outras medidas profiláticas incluem a prevenção da contaminação do ambiente com L1, sendo recomendado que os donos apanhem as fezes dos seus animais e se desfaçam delas de forma apropriada, com o intuito de quebrar o ciclo de vida do parasita (Koch & Willesen, 2009). Evitar a ingestão de hospedeiros intermediários também contribui para diminuir o risco de infecção, contudo não é algo fácil de concretizar. O uso de moluscidas não é aconselhado, pois além da possível toxicidade para os cães, estando mortos torna-se mais fácil o seu acesso (Morgan & Shaw, 2010), e as L3 libertas podem sobreviver alguns dias no meio ambiente (Barçante, Barçante, Dias & Lima, 2003). Outros métodos de controlo não farmacológicos, como armadilhas com isco, podem também aumentar a sua exposição e provavelmente têm pouco ou nenhum impacto na população de lesmas e caracóis (Morgan & Shaw, 2010).

De qualquer forma, tendo em consideração a ubiquidade dos hospedeiros intermediários, o recurso a anti-helmínticos é provavelmente a melhor hipótese em zonas endémicas (Morgan & Shaw, 2010). Também nessas zonas, a informação transmitida pelos veterinários locais pode ainda aumentar o número de testes de Baermann realizados a cães assintomáticos (Koch & Willesen, 2009); nomeadamente, pode ser considerado antes de o animal viajar para uma zona livre do parasita, assim como a realização de tratamento profilático (Tebb et al, 2007).

#### **IV. Estudo: Infecção por *Aelurostrongylus abstrusus* e *Angiostrongylus vasorum* (Nematoda: Angiostrongylidae) em gatos e cães no distrito de Lisboa, Portugal**

##### **1. Objectivos**

Com o intuito de melhor conhecer a situação epidemiológica dos nemátodes *Aelurostrongylus abstrusus* e *Angiostrongylus vasorum* nos animais de companhia do nosso país, mais concretamente da zona de Lisboa, foi elaborado um estudo que envolveu a colheita de amostras fecais de gatos e cães, assim como de pulmão proveniente de necrópsias, e a sua posterior análise parasitológica, através da técnica de Baermann, de modo a poder detectar L1 destes parasitas.

##### **2. Material e métodos**

###### **2.1. Caracterização das amostras**

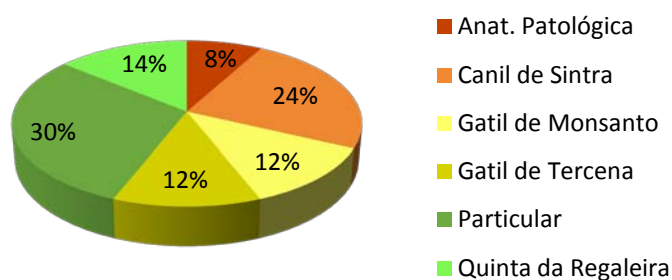
A colheita de amostras fecais e pulmonares e subsequente análise decorreu entre os meses de Junho e Dezembro de 2011 e no mês de Março de 2012. As amostras fecais foram provenientes de canis (públicos e privados) e de particulares, enquanto as amostras pulmonares foram obtidas através do Sector de Anatomia Patológica da FMV-UTL. Os concelhos abrangidos na colheita de amostras foram Arruda dos Vinhos, Lisboa, Loures, Mafra, Oeiras e Sintra, todos pertencentes ao distrito de Lisboa. No total foram analisadas 100 amostras para este estudo, pertencendo 50 a gatos e as outras 50 a cães.

###### **2.1.1. Gatos**

As amostras fecais relativas a felinos foram recolhidas de gatis (Canil/gatil Municipal de Sintra, quer de gatos localizados nas instalações quer de gatos residentes na Quinta da Regaleira, Gatil da União Zoófila em Tercena e Gatil Municipal de Lisboa, em Monsanto) e de particulares, todos localizados no distrito de Lisboa. No caso dos particulares, a maioria dos gatos vivia em moradias com acesso ao exterior (67%); os outros viviam actualmente em apartamentos sem acesso ao exterior mas foram recolhidos da rua ou adoptados em gatil ou através de veterinário. Foram também analisadas quatro amostras pulmonares pertencentes a felinos, provenientes de necrópsias realizadas na FMV (Gráfico 1).



Gráfico 1: Distribuição das amostras felinas, por local ou origem da recolha (n=50).



A idade variou aproximadamente entre os três meses e os 15 anos, sendo a maioria constituída por gatos adultos (66%; considerados a partir dos dois anos de idade). Relativamente ao sexo, as fêmeas representaram 44% da amostra e os machos 56%. A maioria dos felinos era de raça indeterminada, vulgarmente designada de Europeu comum, sendo apenas três da raça Persa e um outro cruzado dessa mesma raça (Tabela 1).

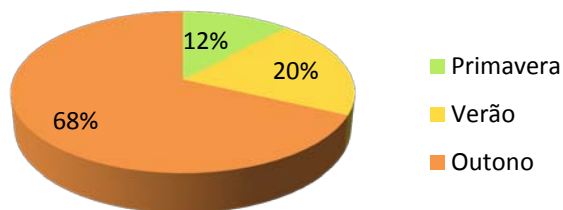
Tabela 1: Distribuição das amostras felinas segundo as características idade, sexo e raça (n=50).

Idade		Sexo		Raça	
Jovens	Adultos	Machos	Fêmeas	Persa	Indeterminada
34%	66%	56%	44%	6%	94%

De um modo geral, a desparasitação encontrava-se em atraso ou não era efectuada de todo. Apenas seis dos gatos analisados apresentavam sintomas respiratórios no momento da análise, contudo um outro apresentou espirros e corrimento nasal mais tarde, ainda no período do estudo.

A análise destas amostras foi realizada maioritariamente durante a estação do Outono (68%), apenas seis foram analisadas durante a Primavera (duas no final da estação em 2011 e quatro no início em 2012) e dez durante o Verão (Gráfico 2). A recolha das amostras não seguiu uma calendarização prévia, sendo realizada de acordo com a sua procura e disponibilidade.

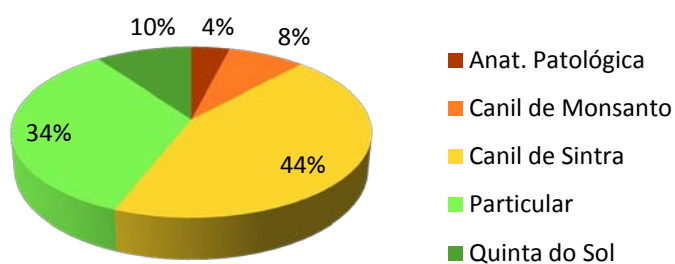
Gráfico 2: Distribuição das amostras felinas, segundo a estação do ano em que foram analisadas (n=50).



### 2.1.2. Cães

As amostras fecais pertencentes a caninos foram recolhidas de canis municipais (Canil Municipal de Sintra e Canil Municipal de Lisboa, em Monsanto), de canil privado (hotel para cães “Quinta do Sol”) e de particulares, também localizados no distrito de Lisboa. No caso dos particulares, todos os cães viviam em moradia com acesso permanente ou temporário ao exterior; encontra-se aqui incluído o canil de um colégio em Sintra, que alberga cinco cães. Foram ainda analisadas duas amostras pulmonares de cães, igualmente provenientes de necrópsias realizadas na FMV (Gráfico 3).

Gráfico 3: Distribuição das amostras caninas, por local ou origem da recolha (n=50).



A idade variou aproximadamente entre os cinco meses e os 10 anos, sendo também a maioria composta por adultos (90%). Quanto ao sexo, 30% dos canídeos analisados eram fêmeas e 70% machos. De um modo geral, a raça dos cães era indeterminada (76%), contudo estão incluídos um Caniche, um Doberman, um Labrador, dois Leões da Rodésia, um Pastor Alemão, dois Pitt Bull, um Rafeiro Alentejano, um São Bernardo, um Schnauzer e um Serra da Estrela (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição das amostras caninas segundo as características idade, sexo e raça (n=50).

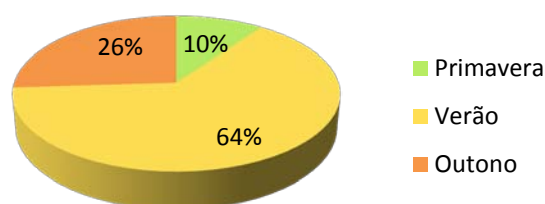
Idade		Sexo		Raça	
Jovens	Adultos	Machos	Fêmeas	Várias (*)	Indeterminada
10%	90%	70%	30%	24%	76%

(\*) Em “várias” estão incluídas as raças: Caniche (n=1), Doberman (n=1), Labrador (n=1), Leão da Rodésia (n=2), Pastor Alemão (n=1), Pitt Bull (n=2), Rafeiro Alentejano (n=1), São Bernardo (n=1), Schnauzer (n=1) e Serra da Estrela (n=1).

A nível de desparasitação, tal como sucedia no caso dos felinos, os cães englobados no estudo tinham-na em atraso ou não era de todo realizada. Nenhum dos cães apresentava sintomas respiratórios no momento da análise, contudo podia-se notar magreza em alguns deles.

As amostras começaram a ser recolhidas e analisadas no final da Primavera, tendo a maioria sido examinada durante o Verão (64%) e as restantes durante o Outono (26%) (Gráfico 4). Tal como anteriormente referido no caso dos gatos, também a recolha das amostras de canídeos não seguiu uma calendarização prévia, sendo realizada de acordo com a procura de amostras e sua disponibilidade.

Gráfico 4: Distribuição das amostras caninas, segundo a estação do ano em que foram analisadas.



## 2.2. Métodos

As amostras fecais foram recolhidas do solo ou caixa de areia nos diversos locais já mencionados e acondicionadas em sacos de plástico, sendo transportadas à temperatura de refrigeração numa mala térmica no próprio dia para o Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV-UTL. Geralmente o processo de análise era iniciado nesse mesmo dia, salvo poucas exceções que ficaram para o dia seguinte por uma questão de logística no

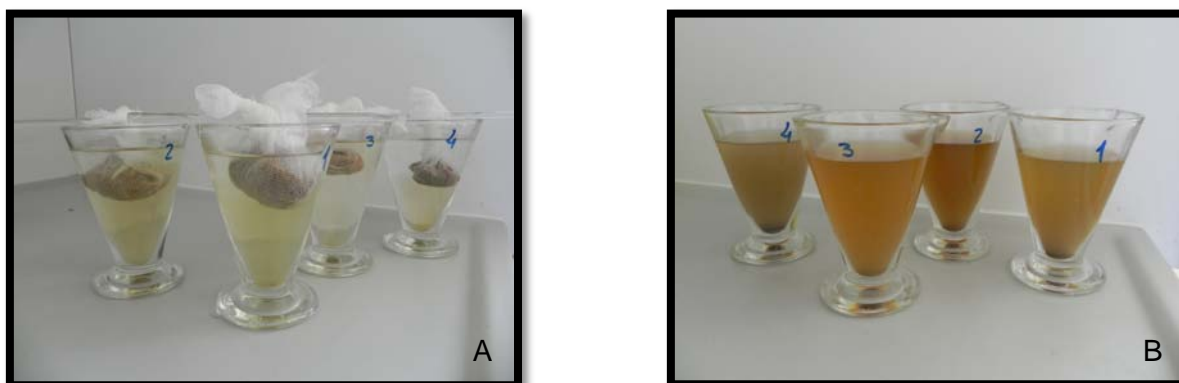
laboratório. Essas foram conservadas no frigorífico (a 4°C) até serem analisadas, de forma a evitar o desenvolvimento de ovos, larvas ou oocistos. De cada animal foram submetidas a pesquisa dos parasitas apenas as fezes de um dia.

A pesquisa de larvas L1 de *Aelurostrongylus abstrusus* e *Angiostrongylus vasorum* nas amostras foi realizada através da técnica de Baermann, com posterior observação ao microscópio óptico.

### 2.2.1. Técnica de Baermann

Uma vez que o material empregue nesta técnica não é padronizado, geralmente cada laboratório adapta o seu procedimento. Neste caso, o material necessário para o processamento de cada amostra consistiu apenas em uma compressa ou gaze, um copo cônico e uma pipeta de Pasteur descartável. De início, uma pequena porção de fezes homogêneas (cerca de 20g) deve ser envolvida por uma compressa de modo a formar uma “boneca”, a qual será colocada no copo cônico, previamente cheio com água tépida. A “boneca” deve ficar totalmente embebida e suspensa na água, pelo que será útil uma vareta de vidro (ou outro instrumento que possa cumprir a função) apoiada no topo do copo, onde ela possa ser presa (fig. 19). O dispositivo deve permanecer assim por aproximadamente 24 horas, à temperatura ambiente. Findo esse tempo, a boneca deve ser retirada e o conteúdo do copo deve sedimentar durante cerca de 20 minutos (fig. 20). Por fim, o sobrenadante deve ser eliminado de modo a ficar apenas o sedimento, do qual se aspiram algumas gotas com uma pipeta para serem analisadas.

Figura 23: Copos cónicos com as amostras preparadas e submersas (A) e passadas 24 horas, após remoção das bonecas (B) (originais).



As gotas devem ser colocadas numa lâmina e cobertas com uma lamela, de modo a serem submetidas a exame ao microscópio óptico. As lamelas utilizadas tinham a dimensão de 22x44 mm. O exame microscópico foi efectuado a três lâminas de cada amostra na

ampliação de 100x, sendo por vezes analisada uma quarta vez, em ampliação de 40x, no caso de pertencer a um indivíduo suspeito (como sintomatologia respiratória presente).

No caso das amostras pulmonares o processo é muito idêntico, sendo apenas necessário cortar a amostra em pequenas porções e envolvê-las com a compressa, de modo a formar a boneca.

### **2.2.2. Técnica de flutuação de Willis**

Além da técnica de Baermann, utilizada para a pesquisa de L1 de angiostrongilídeos pulmonares, as amostras que se revelaram positivas nesse exame foram também submetidas a uma flutuação de Willis, de modo a detectar a possível presença de outras formas parasitárias no material fecal, como ovos de nemátodes ou oocistos de coccídeos. É também um método qualitativo (Madeira de Carvalho et al, 2009b).

O material necessário para cada amostra incluiu um pequeno copo de vidro ou plástico, vareta de vidro, funil, passador de rede metálica, tubo de ensaio e lamela, sendo a sacarose o soluto utilizado. No copo de vidro ou plástico foi efectuada uma emulsão de fezes, utilizando uma pequena quantidade de solução saturada de sacarose e o auxílio da vareta de vidro. A emulsão foi depois vertida para a rede metálica, apoiada no funil e tubo de ensaio, até que este fique cheio e se forme um menisco convexo, altura em que é aí colocada uma lamela e se aguardam 10 a 20 minutos. Findo o tempo, a lamela é assente sobre uma lâmina e proceder-se ao exame microscópico, em ampliação de 100X.

### **2.3. Análise estatística**

Os dados obtidos foram armazenados através do programa *Microsoft Office Excel 2007*, sendo posteriormente realizada a sua análise estatística através das plataformas de cálculo *Epitools* e *R* (versão 2.14.2). A primeira permitiu calcular a prevalência dos parasitas em estudo, assim como o intervalo de confiança, segundo os limites de Blaker (Reiczigel, Foldi & Ózsvári, 2010). De modo a realizar o seu cálculo, os parâmetros sensibilidade e especificidade da técnica de Baermann foram considerados de valor igual a um, pois embora possam ocorrer falsos negativos, este é considerado o método *gold standard* no diagnóstico destas parasitoses.

A utilização do *software R Commander* permitiu determinar a eventual existência de associações estatísticas entre as prevalências e certos factores, concretamente a idade, sexo e raça do animal, a proveniência da amostra e a estação do ano em que foi realizada a análise da amostra. Para isso foram elaboradas tabelas de contingência e utilizado o teste

exacto de Fisher, sendo os resultados considerados significativos no caso do valor de p (significância) ser inferior a 0,05.

### 3. Resultados

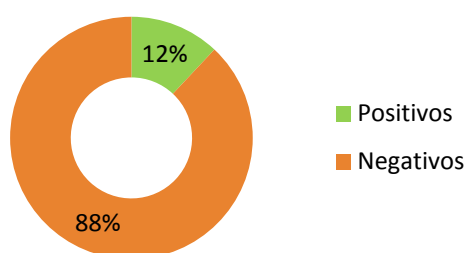
No âmbito deste estudo foram analisadas um total de 100 amostras através da técnica de Baermann, pertencentes a gatos e cães, com o objectivo de detectar a presença de L1 de *Aelurostrongylus abstrusus* e *Angiostrongylus vasorum* nas amostras.

#### 3.1. *Aelurostrongylus abstrusus*

##### 3.1.1. Prevalência

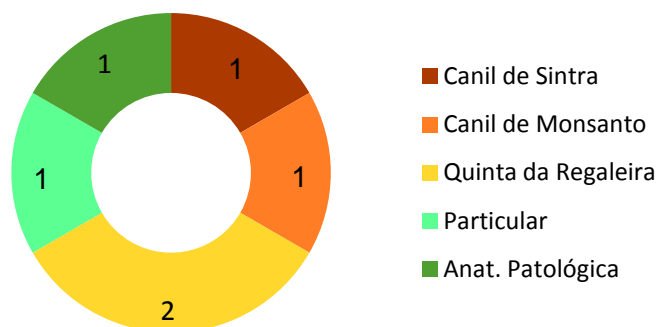
Relativamente à pesquisa de *A. abstrusus* em amostras fecais e pulmonares de felinos, num total de 50 amostras foram encontradas L1 em seis delas. A sua presença permite considerar o animal positivo na pesquisa deste nemátode pulmonar e, portanto, determinar a sua prevalência: 12%, com intervalo de confiança [5,4% - 23,6%] (Gráfico 5).

Gráfico 5: *A. abstrusus*: resultados (em percentagem) das análises através da técnica de Baermann.



A origem das amostras positivas foi bastante diversificada: um gato proveniente do Canil de Sintra, um do Canil de Monsanto, dois da Quinta da Regaleira (um do gatil denominado “Maternidade” e outro do gatil geral), um de particular e um da secção de Anatomia patológica (Gráfico 6). O gato pertencente a um particular reside em Arruda dos Vinhos, enquanto o gato necropsiado foi enviado por uma clínica veterinária de Benfica.

Gráfico 6: Distribuição das seis amostras positivas, segundo a sua origem.



Relativamente à idade dos felinos positivos, foi constatado que dois eram jovens (um com cerca de cinco meses e o outro com aproximadamente um ano) e os outros quatro eram adultos. Quanto ao sexo, uma era fêmea e os restantes cinco eram machos; a nível de raça, todos eram de raça indeterminada. Apenas um apresentava sintomatologia respiratória no momento da colheita e análise da amostra, no entanto um outro iniciou mais tarde um quadro respiratório (ainda no período de análises), nomeadamente espirros e corrimento nasal, que foi reportado pelo dono (Tabela 3).

Tabela 3: Quadro resumo com as características das amostras/gatos positivos.

Origem	Idade	Sexo	Raça	Sintomatologia respiratória	Data da análise
Anat. Patológica	Adulto	Macho	Indeterminada	Ausente	15.06.2011
Particular	Adulto	Macho	Indeterminada	Presente	29.06.2011
Gatil de Sintra	Jovem	Macho	Indeterminada	Presente	18.10.2011
Quinta da Regaleira	Adulto	Fêmea	Indeterminada	Ausente	15.11.2011
Quinta da Regaleira	Adulto	Macho	Indeterminada	Ausente	16.11.2011
Gatil de Monsanto	Jovem	Macho	Indeterminada	Ausente	19.12.2011

De seguida são apresentadas algumas fotografias das amostras positivas à pesquisa de *A. abstrusus*, obtidas através do microscópio óptico, Olympus BX 50, onde se podem observar as L1.

Figura 25: L1 de *A. abstrusus*, ocular 10x e objectiva 40x (original).



Figura 24: Pormenor da cauda de uma L1 de *A. abstrusus*, ocular 10x e objectiva 40x (original).



Figura 27: Várias L1 de *A. abstrusus*, ocular 10x e objectiva 10x (original).



Figura 26: L1 de *A. abstrusus*, com o corpo enrolado em forma de espiral, ocular 10x e objectiva 40x (original).



### 3.1.2. Teste exacto de Fisher

Os factores idade, sexo, raça e localização geográfica do animal, assim como a presença ou não de sintomatologia respiratória e a estação do ano em que a amostra foi analisada, foram avaliados pelo teste de Fisher de modo a determinar a possibilidade de associação estatística com a prevalência encontrada. Nenhum destes factores revelou uma eventual influência sobre a prevalência, uma vez que o valor de  $p$  foi superior a 0,05 em todos os casos (Tabela 4).

Tabela 4: Amostras felinas: resultados do teste exacto de Fisher.

	Idade	Sexo	Raça	Localização	Estação	Sinais respiratórios
Valor de $p$	1	0,21	1	0,31	0,30	0,37



### 3.1.3. Técnica de flutuação de Willis

Além da técnica de Baermann, estas amostras foram ainda analisadas através da técnica de flutuação de Willis, com excepção da amostra pulmonar. Das cinco submetidas à flutuação, duas (40%) revelaram a presença de parasitas gastrointestinais (GI), mais especificamente de *Toxocara cati* (fig. 28), *Cystoisospora felis* (fig. 29), *Ancylostoma tubaeforme* (fig. 30) e *Uncinaria stenocephala* (fig. 31). O primeiro encontrava-se presente em ambos os casos, enquanto *C. felis* foi encontrado apenas no gato proveniente do Canil de Sintra e *A. tubaeforme* e *U. stenocephala* num dos gatos da Quinta da Regaleira.

A análise fecal, através desta técnica, da amostra pertencente a este gato da Quinta da Regaleira permitiu ainda detectar a presença de uma larva de *A. abstrusus* (fig. 32), ovos de ácaro (fig. 33) e também formas vegetais.

Figura 28: Ovo de *Toxocara cati*, ocular 10x e objectiva 40x (original).



Figura 29: Oocisto de *Cystoisospora felis* e L1 de *A. abstrusus*, ocular 10x e objectiva 20x; lâmina obtida pela técnica de Baermann (original).



Figura 30: Ovo de *Ancylostoma tubaeforme*, ocular 10x e objectiva 40x (original).



Figura 31: Ovo de *Uncinaria stenocephala*, ocular 10x e objectiva 40x (original).



Figura 32: Larva de *A. abstrusus*, com pormenor da cauda, encontrada na técnica de flutuação de Willis; ocular 10x e objectivas 20x e 40x (original).

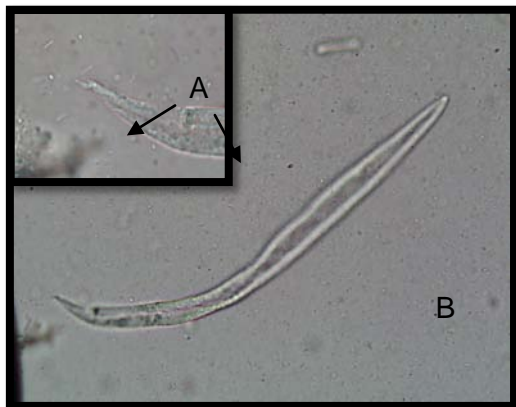


Figura 33: Ovos de ácaro (A) e o de *U. stenocephala* (B), ocular 10x e objectiva 10x (original).

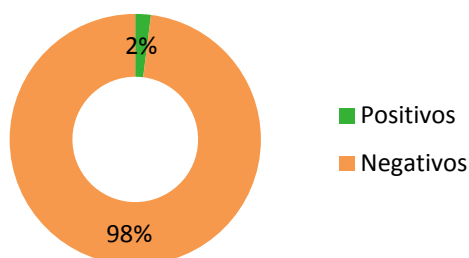


### 3.2. *Angiostrongylus vasorum*

#### 3.2.1. Prevalência

No caso de *A. vasorum*, a sua pesquisa num total de 50 amostras fecais e pulmonares de canídeos domésticos revelou uma prevalência menor, sendo detectadas L1 numa única amostra. Estes dados permitiram obter uma prevalência de 2% para este parasita pulmonar, com o intervalo de confiança [0,1% - 10,3%] (Gráfico 7).

Gráfico 7: *A. vasorum*: resultados (em percentagem) das análises através da técnica de Baermann.



O cão identificado como positivo na pesquisa de *A. vasorum* era proveniente do Canil de Sintra, constando de um macho de idade adulta e raça indeterminada. No animal podia ser notada alguma magreza, contudo não apresentava sintomatologia cardiorespiratória, neurológica ou hematológica. A análise desta amostra foi realizada no mês de Junho de 2011, no final da Primavera.

De seguida encontram-se fotografias relativas à amostra positiva de *A. vasorum*, obtidas através do microscópio óptico.

Figura 34: L1 de *A. vasorum*, ocular 10x e objectivas 10x (à esquerda) e 40x (à direita) (originais).

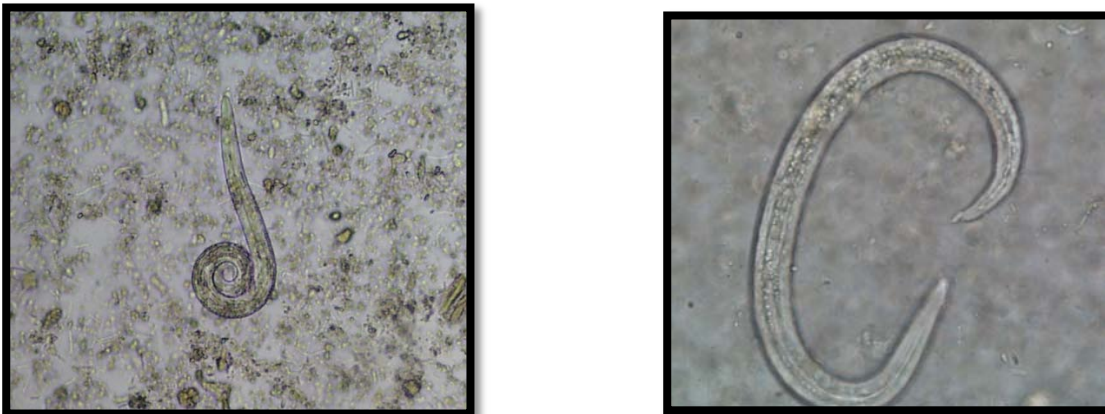
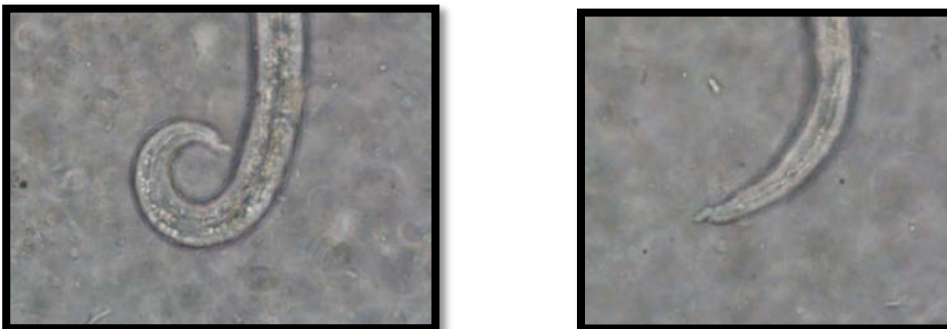


Figura 35: Pormenor da cauda de L1 de *A. vasorum*, ocular 10x e objectiva 40x (originais).



### 3.2.2. Teste exacto de Fisher

Tal como no caso de *A. abstrusus*, também no de *A. vasorum* alguns factores foram avaliados pelo teste de Fisher de forma a determinar a sua eventual influência na prevalência encontrada. Nenhum dos factores testados (idade, sexo, raça e localização geográfica do animal, assim como a estação do ano em que a amostra foi analisada) demonstrou ter influência, pois o valor de  $p$  foi sempre superior a 0,05 (Tabela 5).

Tabela 5: Amostras caninas: resultados do teste exacto de Fisher.

	Idade	Sexo	Raça	Localização	Estação
Valor de $p$	1	1	1	1	0,1

### 3.2.3. Técnica de flutuação de Willis

Também esta amostra foi submetida à técnica de flutuação de Willis, o que permitiu constatar a presença de parasitas GI, concretamente de *Toxocara canis* (fig. 36) e *Cystoisospora canis* (fig.37).

Figura 37: Ovo de *Toxocara canis*, ocular 10x e objectiva 20x (original).



Figura 36: Oocisto de *Cystoisospora canis*, ocular 10x e objectiva 40x (original).



Assim, analisando globalmente as amostras de felinos e caninos positivas na técnica de Baermann, com excepção da amostra pulmonar de gato, através da técnica de flutuação de Willis, observou-se a presença de formas parasitárias em 50% delas (3/6). Oocistos de coccídeas *Cystoisospora* spp foram encontradas em duas amostras, uma de cão e outra de gato, assim como ovos de nemátodes *Toxocara* spp. se encontraram em três amostras, uma de cão e duas de felinos. Os restantes, *Ancylostoma* sp. e *Uncinaria* sp, foram identificados apenas em uma das amostras, como se pode observar na tabela 6.

Tabela 6: Parasitas gastrointestinais identificados pela técnica de flutuação de Willis.

	<i>Toxocara</i> spp.	<i>Ancylostoma</i> sp.	<i>Uncinaria</i> sp	<i>Cystoisospora</i> spp.
Cão	+	-	-	+
Gato 1	-	-	-	-
Gato 2	+	-	-	+
Gato 3	+	+	+	-
Gato 4	-	-	-	-
Gato 5	-	-	-	-

Legenda: Identificação das amostras de gato, segundo a localização dos animais: 1- Particular; 2- Canil Municipal de Sintra; 3- Quinta da Regaleira, gatil 1; 4- Quinta da Regaleira, gatil 2; 5- Gatil Municipal de Monsanto.

## V. Discussão

A pesquisa de nemátodes pulmonares em cães e gatos, concretamente de *Angiostrongylus vasorum* e *Aelurostrongylus abstrusus*, constitui um procedimento pouco frequente na prática clínica. É por isso pertinente colocar a questão “serão parasitas raros ou raramente diagnosticados?”. De facto, nos últimos anos o número de casos reportados tem aumentado em diversas zonas, incluindo países europeus, pelo que estes parasitas assumem uma importância cada vez maior.

Assim, um estudo que ajude a melhor compreender a situação epidemiológica destes nemátodes a nível nacional pareceu adequado e desafiador. Para isso foram analisadas um total de 100 amostras fecais e pulmonares de cães e gatos, da zona de Lisboa, através da técnica de Baermann. Esta constitui, actualmente, a técnica de eleição na pesquisa destes parasitas, o que, aliado ao facto de a sua execução ser bastante simples e de baixo custo, fundamentou a sua escolha para este trabalho. A posterior análise estatística dos resultados aí obtidos permitiu então determinar a prevalência de *A. abstrusus* e *A. vasorum*.

A pesquisa de *A. abstrusus* em amostras felinas revelou uma prevalência de 12%, uma vez que foram encontrados seis positivos no total de 50 amostras. Este resultado é muito similar ao registado por Waap & Gomes (2011), que determinaram uma prevalência de 11,8% numa pesquisa que decorreu na cidade de Lisboa. Neste caso, a identificação do parasita foi realizada por observação microscópica de raspagens do parênquima pulmonar e árvore brônquica, em gatos recolhidos pela Câmara Municipal de Lisboa e necropsiados no Laboratório Nacional de Investigação Veterinária. Também realizaram análises coprológicas a conteúdo intestinal, contudo não efectuaram a técnica de Baermann, mas sim as de flutuação de Willis e sedimentação, obtendo uma prevalência menor (4,6%). Comparativamente à prevalência determinada no Porto (17,4%), no presente trabalho foi encontrado um valor menor, em Lisboa. A técnica de Baermann foi também a escolhida para realizarem a pesquisa, em amostras fecais, contudo a população em estudo foi constituída apenas por gatos errantes, que constitui um factor de risco na aquisição de aelurostrongilose, uma vez que vivem no exterior (Payo-Puente et al, 2008). Embora os estudos tenham sido efectuados em diferentes áreas geográficas do país, é possível que este facto exerça alguma influência no valor da prevalência, superior ao encontrado no presente trabalho.

Dados da FMV-UTL mostraram uma prevalência global de *A. abstrusus* de 1,5%, no período de 1999-2000 (Madeira de Carvalho et al, 2009). Este valor, substancialmente inferior a qualquer um dos encontrados actualmente, sugere de facto um aumento da prevalência deste parasita nos últimos anos.

A prevalência de 12% encontra-se num valor intermédio ao verificado noutros países europeus, sendo os valores mais elevados registados na Croácia (22%) e sul de Itália (18,5%) e os mais baixos em Espanha (1%), Roménia (5,6%) e Alemanha (5,6%).

Determinados factores, concretamente a idade, sexo, raça e localização geográfica (a nível de concelho) do animal, assim como a presença ou ausência de sintomatologia respiratória e a estação do ano em que a amostra foi realizada, foram avaliados pelo teste exacto de Fisher, de modo a determinar a existência de eventual associação estatística com a prevalência. Nenhum dos factores demonstrou ter associação, pois o valor de  $p$  foi sempre superior a 0,05. Contudo, quer a idade jovem quer a presença de sintomatologia respiratória são considerados factores de risco nesta parasitose (Headley, 2005; Traversa & Guglielmini, 2008; Mircean et al, 2010), facto que não foi possível verificar neste estudo.

No momento da análise, apenas um dos seis gatos positivos à pesquisa de *A. abstrusus* apresentava sintomatologia respiratória, nomeadamente espirros. Este gato, um macho com cerca de cinco meses de idade e raça indeterminada, encontrava-se nas instalações do Canil de Sintra e tinha sido recentemente (cerca de uma/duas semanas) recolhido da rua, onde certamente adquiriu a parasitose, uma vez que no canil se encontrava numa jaula sem acesso a hospedeiros intermediários ou paraténicos e o período pré-patente da doença varia entre um e dois meses (Ribeiro & Lima, 2001). Não foram observados outros sinais respiratórios, como tosse ou dispneia, nem sinais gerais, como letargia. Ainda assim, este gato apresentava todos os factores de risco da doença: idade jovem, vida no exterior e presença de sintomatologia respiratória (Headley, 2005; Traversa & Guglielmini, 2008; Mircean et al, 2010).

Embora não apresentasse qualquer sintomatologia no momento da análise, o gato positivo pertencente a particular iniciou um quadro respiratório pouco tempo depois, facto reportado pelo dono. Os sinais observados consistiram em espirros e corrimento nasal. O animal, um macho adulto de quatro anos e raça indeterminada, residia em moradia com acesso ao exterior, em Arruda dos Vinhos.

Nos restantes quatro gatos positivos não foi registada sintomatologia respiratória, contudo foi notada magreza no gato necropsiado pelo departamento de Anatomia Patológica. Sinais gerais, como perda de peso, letargia ou depressão, estão também descritos em felinos com aelurostrongilose (Grandi et al, 2005). Este animal, enviado por uma clínica em Benfica, era um macho adulto de aproximadamente quatro anos e de raça indeterminada, que tinha história de magreza progressiva. Pertencia a uma colónia residente num bairro e alimentada pelos moradores, pelo que apresentava um dos factores de risco da doença, a vida no exterior.

As outras três amostras de felinos parasitados por *A. abstrusus* eram provenientes do Gatil Municipal de Lisboa, em Monsanto, e da Quinta da Regaleira, em Sintra. O primeiro, de Monsanto, era um macho jovem com cerca de um ano de idade e raça indeterminada. Uma

vez que se encontrava em jaula sem acesso ao exterior, a infecção pelo nemátode certamente ocorreu antes de ir para aquelas instalações, provavelmente enquanto gato errante. Os outros dois, um macho e uma fêmea adultos, também de raça indeterminada, encontravam-se em gatis localizados na Quinta da Regaleira, pertencentes ao Canil Municipal de Sintra. A possibilidade de contacto com hospedeiros intermediários e paraténicos é, neste caso, mais difícil de determinar, pois estes gatis encontram-se no exterior. Aparentemente, nenhum dos três felinos apresentava sinais respiratórios.

No que respeita ao nemátode cardiopulmonar do cão, *A. vasorum*, a sua pesquisa revelou apenas um positivo no total de 50 amostras, resultando numa prevalência de 2%. A informação relativa a este parasita em Portugal é bastante escassa a nível de canídeos domésticos, registando-se apenas uma prevalência global, que inclui *A. vasorum* e *Eucoleus aerophilus*, de 0,3% entre 1999 e 2008, segundo dados da FMV/UTL (Madeira de Carvalho et al, 2009). Nota-se portanto um ligeiro aumento, semelhante ao que se verificou noutros países europeus, como Alemanha, em que registaram uma prevalência de 1,2% entre 2003 e 2007 e mais tarde, em 2008, elevou-se para 1,8% (Taubert et al, 2009). O valor determinado no presente trabalho é também semelhante ao da Dinamarca (2,4%) e do Reino Unido (1,8%) (Hermosilla et al, 2009).

Por outro lado, o valor de 2% é bastante inferior ao encontrado em canídeos silvestres, nomeadamente em raposas, nas quais uma pesquisa demonstrou uma prevalência de *A. vasorum* de 16,1%, em Portugal (Eira et al, 2006). Geralmente, a prevalência deste parasita nas raposas é bastante superior àquela encontrada nos cães (Koch & Willesen, 2009), facto que foi também aqui verificado. Em zonas partilhadas por ambos deve ser tomada especial atenção, uma vez que a população de raposas constitui um potencial reservatório da infecção para os cães domésticos (Bolt et al, 1992).

Com o intuito de avaliar a possível associação estatística entre a prevalência de *A. vasorum* obtida e determinados factores, foi novamente utilizado o teste exacto de Fisher. Os factores avaliados foram a idade, sexo, raça e localização geográfica do animal, e ainda a estação do ano em que foi realizada a colheita e análise da amostra. Nenhum destes factores demonstrou exercer influência, uma vez que o valor de  $p$  foi sempre superior a 0,05. De facto, nunca foi encontrada predisposição a nível de sexo (Koch & Willesen, 2009) e, relativamente à raça, os dados são divergentes, pois alguns autores não encontraram predisposição rácica (Koch & Willesen, 2009) mas outros sugerem Cavalier King Charles Spaniels e Staffordshire Bull Terriers como raças mais propensas a esta doença (Chapman et al, 2004). De qualquer forma, nenhuma destas duas raças se encontrava na amostra avaliada no presente trabalho.

Por outro lado, à semelhança do que se sucede com a aelurostrongilose felina, a idade jovem constitui um factor de risco na angiostrongilose canina (Brennan, 2009). Neste estudo



não foi possível verificar essa predisposição, assim como a aparente sazonalidade da doença, com maior número de casos diagnosticados entre Setembro e Dezembro, em França (Bourdeau & Laboure, 2009).

A amostra positiva à pesquisa de *A. vasorum* pertencia a um canídeo adulto, macho e de raça indeterminada, que se encontrava nas instalações do Canil Municipal de Sintra. Embora a nível de condição corporal se apresentasse um pouco magro, não havia sinais de doença cardiorespiratória, neurológica ou de coagulopatia.

Actualmente, a técnica de Baermann constitui o método de eleição para o diagnóstico de *A. abstrusus* e *A. vasorum*, uma vez que as suas L1 vivas exibem hidro e termotropismo positivos. Ainda assim, esta técnica apresenta alguns inconvenientes, como a eventual ocorrência de falsos negativos. Esta situação é devida à impossibilidade de diagnosticar as infecções durante o período pré-patente e, posteriormente, nas alturas em que as larvas não estão a ser eliminadas (Traversa & Guglielmini, 2008; Koch & Willesen, 2009). Uma vez que os períodos pré-patentes destes parasitas são longos e variáveis, podendo ir de um a dois meses no caso de *A. abstrusus* e de um a quatro meses no caso de *A. vasorum*, e a eliminação de larvas é irregular e intermitente (Rosen et al, 1970; Ribeiro & Lima, 2001; Oliveira-Júnior et al, 2006), a ocorrência de falsos negativos deve ser tida em consideração na pesquisa de ambos os nemátodes. Ou seja, os valores de prevalência encontrados no presente trabalho, 12% para *A. abstrusus* e 2% para *A. vasorum*, poderão subestimar a real prevalência destes parasitas. Assim, a recolha de fezes de três dias consecutivos é aconselhada, de modo a minimizar o efeito da eliminação intermitente de larvas, contudo isso não foi realizado neste estudo.

A técnica de Baermann apresenta ainda outros inconvenientes: é morosa, pois demora cerca de 24 horas, e requer experiência do operador na observação microscópica (Traversa & Guglielmini, 2008; Koch & Willesen, 2009). Se por um lado o primeiro não exerce influência nos resultados, desde que seja respeitado o tempo de espera, por outro lado a experiência do operador pode de facto condicioná-los. Assim, é possível que a relativa pouca experiência do operador neste estudo tenha exercido influência nos resultados obtidos.

O exame microscópico foi realizado com ampliação de 100x e, após a detecção de larvas L1, com ampliação de 400x, de modo a melhor observar as suas características. A identificação das larvas foi efectuada com base nas suas características morfológicas, com especial destaque para o formato da cauda, a qual apresenta um entalhe dorsal distinto, quer no caso de *A. abstrusus* (fig. 22), quer de *A. vasorum* (fig. 33 e 34), como descrito por Scott (1972) e Rosen et al (1970), entre outros. Devido à elevada actividade das larvas vivas, por vezes foi necessária a utilização de Lugol para as fixar, e assim proceder a uma

avaliação mais calma e eficaz. Foi notada, de forma consistente, uma movimentação típica e enrolar do corpo em forma de espiral (fig. 27).

Como as amostras fecais foram colhidas do solo, era importante a diferenciação destes nemátodes pulmonares em relação a nemátodes de vida livre, de modo a evitar falsos positivos. Os nemátodes de vida livre são geralmente maiores e frequentemente têm cauda pontiaguda, assim como o tracto gastrointestinal bem desenvolvido (Koch & Willesen, 2008). As larvas devem também ser diferenciadas das pertencentes a outros nemátodes pulmonares, como por exemplo de *Crenosoma vulpis*, no caso dos cães, o qual apresenta cauda pontiaguda (sem entalhe dorsal) e menor dimensão, além de geralmente ser menos activo (Koch & Willesen, 2008). Neste aspecto, a experiência do operador pode ser uma importante condicionante, pelo que, neste estudo, em caso de dúvida foi solicitado auxílio a um operador mais experiente.

Independentemente dos inconvenientes que a técnica de Baermann apresente, actualmente constitui o método de diagnóstico *gold standard* na pesquisa de *A. abstrusus* e *A. vasorum*, o que, aliado à sua execução simples e baixo custo, poderá incentivar a sua instituição na prática clínica.

A realização da técnica de flutuação de Willis nas amostras que se revelaram positivas no teste de Baermann, com excepção da amostra pulmonar, permitiu a detecção de outras formas parasitárias em algumas delas. Num total de seis amostras fecais analisadas (cinco de gato e uma de cão), três delas (50%) demonstraram a presença de ovos ou oocistos, pertencentes a quatro géneros diferentes de parasitas: *Toxocara* spp. (fig. 28 e 36), *Ancylostoma* sp. (fig. 30), *Uncinaria* sp. (fig. 31) e *Cystoisospora* spp. (fig. 29 e 37), como se pode observar na tabela 6. A amostra de cão continha ovos do nemátode *Toxocara canis* e oocistos da coccídea *Cystoisospora canis*, enquanto as de gatos apresentavam *Toxocara cati*, *Ancylostoma tubaeforme*, *Uncinaria stenocephala* e *Cystoisospora felis*.

Qualquer um dos parasitas encontrados apresenta uma distribuição cosmopolita, pelo que não é surpreendente a sua presença em várias amostras. Além disso, nenhum destes animais era regularmente desparasitado, facilitando esta situação. Um estudo realizado em gatos errantes da área metropolitana de Lisboa revelou uma prevalência global de parasitas gastrointestinais de 31,1% (23/74), incluindo as quatro espécies identificadas no presente trabalho (Duarte et al, 2010). Neste estudo, dos cinco gatos analisados, dois revelaram-se positivos à pesquisa de parasitas GI (40%).

Em relação aos parasitas GI de cães, os dados disponíveis na literatura são semelhantes: 28,2% num estudo realizado nas áreas de Ribatejo-Oeste e Vale do Tejo (Crespo et al, 2006) e 24,6% num estudo realizado em canis de Lisboa, em que *Cystoisospora* spp e *Toxocara canis* apresentaram as prevalências 10,1% e 2,8%, respectivamente (Lebre, 2011).

Os resultados obtidos neste estudo contribuem então para uma melhor compreensão da actual situação epidemiológica de *A. abstrusus* e *A. vasorum* em Portugal. Quer a infecção de gatos por *A. abstrusus* quer a de cães por *A. vasorum* mostra-se presente, embora a prevalência seja mais elevada no primeiro caso. Assim, estas parasitoses devem ser consideradas na prática clínica e respectivamente incluídas na lista de diagnósticos diferenciais de felídeos com sintomatologia respiratória e de canídeos com sinais cardiopulmonares, neurológicos e/ou alterações da coagulação.

A realização de outros estudos sobre estes parasitas, assim como sobre outros nemátodes pulmonares que afectam os nossos animais de companhia, em território nacional, poderá ser interessante e esclarecedora. Outras zonas do país poderão ser abordadas, de modo a compreender melhor a sua distribuição a nível nacional, e não só na zona de Lisboa, especialmente no caso da angiostrongilose canina. Ainda, uma abordagem mais concreta dos factores de risco, com uma selecção cuidada dos animais para amostragem, poderá ser reveladora e apresentar resultados interessantes.

## VI. Conclusão

O objectivo primordial do presente trabalho consistia em determinar a prevalência dos nemátodes *Aelurostrongylus abstrusus* e *Angiostrongylus vasorum* nos nossos animais de companhia, o qual pode ser considerado cumprido. Os resultados obtidos foram 12% para a aelurostrongilose felina e 2% no caso da angiostrongilose canina. Estes dados contribuem para elucidar a actual situação epidemiológica destes parasitas no nosso país, mais concretamente na zona de Lisboa. Foi possível constatar aquilo que, cada vez mais, é referido na bibliografia: um aumento da prevalência destas parasitoses tem sido verificado nos últimos anos.

No caso de *A. abstrusus*, o valor obtido é consistente com os resultados dos estudos mais actuais em Portugal, sendo muito semelhante ao encontrado em Lisboa e um pouco inferior ao determinado no Porto. Comparativamente aos valores encontrados noutros países europeus, a prevalência de 12% assume uma posição intermédia.

No que respeita à prevalência de *A. vasorum* em canídeos domésticos, em Portugal, a informação é muito escassa, sendo difícil efectuar uma comparação. A sua detecção numa amostra permitiu confirmar a sua actual presença em cães, em território nacional, e foi também possível verificar que a prevalência determinada é bastante inferior àquela encontrada em canídeos silvestres, concretamente em raposas. O valor determinado é semelhante a resultados obtidos em outros países europeus, como Dinamarca ou Reino Unido, e tudo indica que parece estar a aumentar relativamente a trabalhos prévios.

A técnica de Baermann, embora actualmente considerada o método de diagnóstico de eleição para *A. abstrusus* e *A. vasorum*, apresenta alguns inconvenientes que podem levar a subestimar a prevalência real destes parasitas. Assim, a impossibilidade de detectar a infecção no período pré-patente ou, posteriormente, quando as larvas não estão a ser eliminadas, aliada ao facto de requerer um operador experiente na observação microscópica, poderá ter influenciado o valor obtido.

Neste estudo não foi encontrada influência de determinados factores, como a idade ou a raça do animal, na prevalência das parasitoses. Contudo, estes parâmetros foram pouco visados na selecção dos animais, tornando mais difícil uma avaliação consistente.

A realização da técnica de flutuação de Willis nas amostras fecais positivas à pesquisa de *A. abstrusus* e *A. vasorum*, permitiu notar que 50% delas apresentavam outras formas parasitárias, concretamente ovos de *Toxocara* spp, *Ancylostoma* sp e *Uncinaria* sp, assim como oocistos de *Cystoisospora* spp.

Assim, os resultados obtidos neste trabalho vêm realçar a presença de *A. abstrusus* e *A. vasorum* em Portugal, nemátodes passíveis de afectar a saúde dos nossos animais de companhia. Desta forma, a aelurostrongilose felina e a angiostrongilose canina devem ser

consideradas pelos médicos veterinários na prática clínica, assim como a utilização rotineira da técnica de Baermann, em animais com sintomatologia compatível com estas parasitoses.

## VII. Bibliografia

- Adamantos, S. (2009). Coagulopathy in angiostrongylosis: what do we actually know?. *Bayer angiostrongylosis forum, Porto, Portugal, 9 September 2009*, pp. 8-10. Leverkusen, Germany: Bayer Animal Health GmbH.
- Anderson, R. C. (2000). *Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission*. (2<sup>nd</sup> ed.). UK: CABI Publishing.
- Bank, R. A. (2011). *Fauna Europaea Project: Checklist of the land and freshwater Gastropoda of the Iberian peninsula (Spain, Portugal, Andorra, Gibraltar)*. Acedido em Jan. 5, 2012, disponível em [http://www.nmbe.ch/sites/default/files/uploads/pubinv/fauna\\_europaea\\_-\\_gastropoda\\_of\\_iberian\\_peninsula.pdf](http://www.nmbe.ch/sites/default/files/uploads/pubinv/fauna_europaea_-_gastropoda_of_iberian_peninsula.pdf)
- Barçante, T. A., Barçante, J. M. P., Dias, S. R. C. & Lima, W. S. (2003). *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905: emergence of third-stage larvae from infected *Biomphalaria glabrata* snails. *Parasitology Research*, 91, 471-475. Acedido em Jan. 20, 2012, disponível em <http://www.springerlink.com/content/0derd9pwerubga8k/>
- Barrs, V. R., Swinney, G. R., Martin, P. & Nicoll, R. G. (1999). Concurrent *Aelurostrongylus abstrusus* infection and salmonellosis in a kitten. *Australian Veterinary Journal*, 77 (4), 229-232. Acedido em Jan. 11, 2012, disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-0813.1999.tb11707.x/pdf>
- Barutzki, D. & Schaper, R. (2009). Natural infections of *Angiostrongylus vasorum* and *Crenosoma vulpis* in dogs in Germany (2007-2009). *Bayer angiostrongylosis forum, Porto, Portugal, 9 September 2009*, p. 29. Leverkusen, Germany: Bayer Animal Health GmbH.
- Beane, R. D. & Hobbs, N. (1983). The Baermann technique for estimating *Protostrongylus* infection in Bighorn sheep: effect of laboratory procedures. *Journal of Wildlife Diseases*, 19 (1), 7-9. Acedido em Fev. 28, 2012, disponível em <http://www.jwildlifedis.org/content/19/1/7.full.pdf+html>
- Bertelsen, M. F., Meyland-Smith, F., Willesen, J. L., Jefferies, R., Morgan, E. R. & Monrad, J. (2009). *Angiostrongylus* sp. and other metastrongyloid parasites in the red panda (*Ailurus fulgens*). *Bayer angiostrongylosis forum, Porto, Portugal, 9 September 2009*, p. 25. Leverkusen, Germany: Bayer Animal Health GmbH.
- Bertelsen, M. F., Meyland-Smith, F., Willesen, J. L., Jefferies, R., Morgan, E. R. & Monrad, J. (2010). Diversity and prevalence of metastrongyloid nematodes infecting the red panda (*Ailurus fulgens*) in European zoos. *Veterinary parasitology*, 172, 299-304.
- Bishop, B. F., Bruce, C. I., Evans, N. A., Goudie, A. C., Gration, K. A. F., Gibson, S. P., Pacey, M. S., Perry, D.A., Walshe, N. D. A. & Witty, M. J. (2000). Selamectin: a novel broad-spectrum endectocide for dogs and cats. *Veterinary Parasitology*, 91 (3-4), 163-176. Acedido em Jan. 16, 2012, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401700002892>
- Blagburn, B. L., Hendrix, C. M., Lindsay, D. S. & Vaughan, J. L. (1987). Anthelmintic efficacy of ivermectin in naturally parasitized cats. *American Journal of Veterinary Research*, 48 (4), 670-672.
- Boag, A. K., Lamb, C. R., Chapman, P. S. & Boswood, 2004. Radiographic findings in 16 dogs infected with *Angiostrongylus vasorum*. *Veterinary Record*, 154, 426-430.

- Boag, A. K., Murphy, K. F. & Connoly, D. J. (2005). Hypercalcaemia associated with *Angiostrongylus vasorum* in three dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 46, 79-84.
- Bolt, G., Monrad, J., Henriksen, P., Dietz, H. H., Koch, J., Bindseil, E. & Jensen, A. L. (1992). The fox (*Vulpes vulpes*) as a reservoir for canine angiostrongylosis in Denmark: Field survey and experimental infections [abstract]. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 33(4), 357-362. Acedido em Maio 5, 2011, disponível em <http://ukpmc.ac.uk/abstract/MED/1488951>
- Bolt, G., Monrad, J., Koch, J. & Jensen, A. L. (1994). Canine angiostrongylosis: a review. *Veterinary Record*, 135, 447-452.
- Bourdeau, P. & Laboure, L. (2009). Current situation of canine angiostrongylosis in France: results from a nacional survey with veterinary clinics. *Bayer angiostrongylosis forum, Porto, Portugal, 9 September 2009*, p. 30. Leverkusen, Germany: Bayer Animal Health GmbH.
- Bourque, A. C., Conboy, G., Miller, L. M. & Whitney, H. (2008). Pathological findings in dogs naturally infected with *Angiostrongylus vasorum* in Newfoundland and Labrador, Canada. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20, 11-20. Acedido em Maio 12, 2011, disponível em <http://vdi.sagepub.com/content/20/1/11.full>
- Bowman, D. D., Lynn, R. C., Eberhard, M. L. & Alcaraz, A. (2003). *Georgis' parasitology for veterinarians*. (8<sup>th</sup> ed.). USA: Elsevier.
- Brennan, S. (2009). Canine angiostrongylosis – the clinical picture. *Bayer angiostrongylosis forum, Porto, Portugal, 9 September 2009*, pp. 6-7. Leverkusen, Germany: Bayer Animal Health GmbH
- Brennan, S. F., McCarthy, G., McAllister, H., Basset, H. & Jones, B. R. (2004). Clinical signs, diagnosis and treatment of three dogs with angiostrongylosis in Ireland. *Irish Veterinary Journal*, 57, 103-109. Acedido em Jan. 25, 2011, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3113816/>
- Caldeira, R., Carvalho, O. S., Mendonça, C. L. F. G., Graeff-Teixeira, C., Silva, M. C. F., Bem, R., Maurer, R., Lima, W. S. & Lenzi, H. L. (2003). Molecular differentiation of *Angiostrongylus costaricensis*, *A. cantonensis* and *A. vasorum* by polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98 (8), 1039-1043. Acedido em Jan. 5, 2012, disponível em [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762003000800011&script=sci\\_arttext&tIng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762003000800011&script=sci_arttext&tIng=es)
- Carvalho-Varela, M.; Crespo, M.V.M. (1993). A helmintofauna da Raposa (*Vulpes vulpes sillace*, Miller, 1907) em Portugal. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 1, 73-79.
- Chapman, P. S., Boag, A. K., Guitian, J. & Boswood, A. (2004). *Angiostrongylus vasorum* infection in 23 dogs (1999-2002). *Journal of Small Animal Practice*, 45 (9), 435-440. Acedido em Jan. 5, 2012, disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.2004.tb00261.x/pdf>
- Conboy, G. A. (2000). Canine angiostrongylosis (French heartworm). In D. D. Bowman (Ed.), *Companion and Exotic Animal Parasitology*. Internacional Veterinary Information Service ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)).

- Conboy, G. A. (2004). Natural infections of *Crenosoma vulpis* and *Angiostrongylus vasorum* in dogs in Atlantic Canada and their treatment with milbemycin oxime. *Veterinary Record*, 155, 16-18.
- Conboy, G. A. (2009). Helminth parasites of the canine and feline respiratory tract. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 39, 1109-1126.
- Crespo, M., Rosa, F., Morgado, M., Ferreira, D., Cerejo, A. & Madeira, M. (2006). Intestinal parasites in dogs from the center-west of Portugal. *Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Congress of Parasitology, ICOPA XI: Glasgow, Scotland, United Kingdom, August 6-11, 2006*, International Congress of Parasitology, 11. Pianoro, Italy: MEDIMOND.
- Cury, M. C., Guimarães, M. P., Lima, W. S. & Vitor, R. W. A. (2002). Western blot analysis of the humoral response of dogs experimentally infected with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). *Veterinary Parasitology*, 106, 83-87. Acedido em Jan. 5, 2012, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401702000316>
- Cury, M. C. & Lima, W. S. (1996). Rupture of femoral artery in a dog infected with *Angiostrongylus vasorum*. *Veterinary Parasitology*, 65 (3-4), 313-315. Acedido em Jun. 20, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401796009910>
- Cury, M. C., Lima, W. S., Guimarães, M. P. & Carvalho, M. G. (2002b). Hematological and coagulation profiles in dogs experimentally infected with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). *Veterinary Parasitology*, 104 (2), 139-149. Acedido em Maio 12, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401701006161>
- Cury, M. C., Lima, W. S., Guimarães, M. P., Muzzi, R. A. L. & Bregunci, G. C. (2001). Radiology, electrocardiography and echocardiography for the diagnosis of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) infection in dogs. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 152 (2), 153-156. Acedido em Jun. 20, 2011, disponível em [http://www.revmedvet.com/2001/RMV152\\_153\\_156.pdf](http://www.revmedvet.com/2001/RMV152_153_156.pdf)
- Denk, D., Matiassek, K., Just, F. T., Hermanns, W., Baiker, K., Herbach, N., Steinberg, T. & Fischer, A. (2009). Disseminated angiostrongylosis with fatal cerebral haemorrhages in two dogs in Germany: a clinical case study. *Veterinary Parasitology*, 160, 100-108. Acedido em Jun. 20, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401708006018>
- Devine, C. (2011). Angiostrongylosis in dogs: where are we now?. *BSAVA Congress: Veterinary programme scientific proceedings, (The ICC/ NIA) Birmingham, UK, 31 March – 3 April 2011*, pp. 327-328. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Duarte, A., Castro, I., Pereira da Fonseca, I. M., Almeida, V., Madeira de Carvalho, L. M., Meireles, J., Fazendeiro, M. I., Tavares, L. & Vaz, Y. (2010). Survey of infectious and parasitic diseases in stray cats at the Lisbon Metropolitan Area, Portugal *Journal of feline medicine and surgery*, 12 (6), 441-446. Acedido em Abril 27, disponível em <http://jfm.sagepub.com/content/12/6/441.long>
- Eira, C., Vingada, J., Torres, J., Miquel, J. (2006). The helminth community of the red fox, *Vulpes vulpes*, in Dunas de Mira (Portugal) and its effect on host condition. *Wildlife Biology in Practice*, 2, 26-36.



- Epe, C., Ising-Volmer, S. & Stoye, M. (1993). Parasitological fecal studies of equids, dogs, cats and hedgehogs during the years 1984-1991 [abstract]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 100 (11), 426-428. Acedido em Maio 3, 2011, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8261912>
- Ferreira da Silva, J. M., Pereira da Fonseca, I. M., Madeira de Carvalho, L. M., Meireles, J. A. F. S. & Fazendeiro, I. (2005). Pneumonia em gato por *Aelurostrongylus abstrusus* – necessidade de um diagnóstico precoce. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 100, 103-106.
- Garosi, L. S., Platt, S. R., McConnell, J. F., Wray, J. D. & Smith, K. C. (2005). Intracranial haemorrhage associated with *Angiostrongylus vasorum* infection in three dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 46, 93-99.
- Gortazár, C., Villafuerte, R., Lucientes, J. & Fernández-de-Luco, D. (1998). Habitat related differences in helminth parasites of red foxes in the Ebro valley. *Veterinary Parasitology*, 80 (1), 75-81. Acedido em Maio 3, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401798001927>
- Gould, S. M. & McInnes, E. L. (1999). Immune-mediated thrombocytopenia associated with *Angiostrongylus vasorum* infection in a dog. *Journal of Small Animal Practice*, 40, 227-232.
- Grabarevic, Z., Curic, S., Tustonja, A., Artukovic, B., Šimec, Z., Ramadan, K. & Zivicnjak, T. (1999). Incidence and regional distribution of the lungworm *Aelurostrongylus abstrusus* in cats in Croatia. *Veterinarski arhiv*, 69, 279-287. Acedido em Maio 3, 2011, disponível em <http://www.vet.unizg.hr/vetarhiv/papers/69-5/graba.htm>
- Grandi, G., Calvi, L. E., Venco, L., Paratici, C., Genchi, C., Memmi, D. & Kramer, L. H. (2005). *Aelurostrongylus abstrusus* (cat lungworm) infection in five cats from Italy. *Veterinary Parasitology*, 134, 177-182. Acedido em Maio 12, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401705003262>
- Gredal, H., Willesen, J. L., Jensen, H. E., Nielsen, O., Kristensen, A. T., Koch, J., Kirk, R. K., Pors, S. E., Skerritt, G. C. & Berendt, M. (2011). Acute neurological signs as the predominant clinical manifestation in four dogs with *Angiostrongylus vasorum* infections in Denmark. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53, 43-50. Acedido em Jan. 18, 2012, disponível em <http://www.actavetscand.com/content/53/1/43>
- Grewal, P. S., Grewal, S. K., Tan, L. & Adams, B. J. (2003). Parasitism of Molluscs by Nematodes: Types of Associations and Evolutionary Trends. *Journal of Nematology*, 35, 146-156.
- Hamilton, J. M. (1963). *Aelurostrongylus abstrusus* infestation of the cat. *Veterinary Record*, 75, 417-422.
- Hamilton, J. M. & Roberts, A. J. (1968). Immunofluorescence as a diagnostic procedure in lungworm disease of the cat. *Veterinary Record*, 83, 401-403.
- Hamilton, J. M., Weatherley, A. & Chapman, A. J. (1984). Treatment of lungworm disease in the cat with fenbendazole. *Veterinary Record*, 114, 40-41.
- Headley, S. A. (2005). Pneumonia induzida por *Aelurostrongylus abstrusus* em gatos: achados patológicos e epidemiológicos de 38 casos (1987-1996). *Semina: Ciências Agrárias*, 26 (3), 373-380. Acedido em 23 Junho, 2011, disponível em <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/2313/1991>

- Helm, J. R., Morgan, E. R., Jackson, M. W., Wotton, P. & Bell, R. (2010). Canine angiostrongylosis: an emerging disease in Europe. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 20, 98-109. Acedido em Jun. 20, 2011, disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-4431.2009.00494.x/full>
- Hermosilla, C., Taubert, A., Globokar Vrhovec, M., Bauer, C., Fox, M. & Pantchev, N. (2009). Current data on the prevalence of *Angiostrongylus vasorum* in dogs in Denmark, Germany and the United Kingdom in 2008. *Bayer angiostrongylosis forum, Porto, Portugal, 9 September 2009*, p. 26. Leverkusen, Germany: Bayer Animal Health GmbH.
- Hobmaier, M. & Hobmaier, A. (1935). Intermediate hosts of *Aelurostrongylus abstrusus* of the cat. *Experimental Biology and medicine*, 32, 1641-1647.
- Hopper, K., Aldrich, J. & Haskins, S. C. (2002). Ivermectin toxicity in 17 Collies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16, 89-94. Acedido em Jan. 16, 2012, disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2002.tb01611.x/pdf>
- Humm, K. & Adamantos, S. (2010). Is evaluation of a faecal smear a useful technique in the diagnosis of canine pulmonary angiostrongylosis?. *Journal of Small Animal Practice*, 51, 200-203. Acedido em Jun. 20, 2011, disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.2009.00905.x/full>
- Jefferies, R., Morgan, E. R., Helm, J. Robinson, M. & Shaw, S. E. (2011). Improved detection of canine *Angiostrongylus vasorum* infection using real-time PCR and indirect ELISA. *Parasitology Research*, 109, 1577-1583. Acedido em Jan. 5, 2012, disponível em <http://www.springerlink.com/content/k250106qj029158j/>
- Jefferies, R., Shaw, S. E., Viney, M. E. & Morgan, E. R. (2009). *Angiostrongylus vasorum* from South America and Europe represent distinct lineages [abstract]. *Parasitology* (Cambridge Journals), 136, 107-115. Acedido em Maio 5, 2011, disponível em <http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract;jsessionid=FB2EDC431CB159C86E30A063F100C5AA.journals?fromPage=online&aid=3260468>
- Jefferies, R., Shaw, S. E., Willeesen, J., Viney, M. E. & Morgan, E. R. (2010). Elucidating the spread of the emerging canid nematode *Angiostrongylus vasorum* between Palearctic and Nearctic ecozones. *Infection, Genetics and Evolution*, 10, 561-568.
- Jefferies, R., Vrhovec, M. G., Wallner, N. & Catalan, D. R. (2010b). *Aelurostrongylus abstrusus* and *Troglostrongylus* sp. (Nematoda: Metastrongyloidea) infections in cats inhabiting Ibiza, Spain. *Veterinary Parasitology*, 173, 344-248. Acedido em Nov. 21, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401710003651>
- Jenkins, E. J., Kutz, S. J., Hoberg, E. P. & Polley, L (2006). Bionomics of larvae of *Parelaphostrongylus odocoilei* (Nematoda: Protostrongylidae) in experimentally infected gastropod intermediate hosts. *Journal of Parasitology*, 92, 298-305. Acedido em Jan. 16, 2012, disponível em <http://www.journalofparasitology.org/doi/full/10.1645/GE-629R.1>
- King, M. C. A., Grose, R. M. R. & Startup, G. (1994). *Angiostrongylus vasorum* in the anterior chamber of a dog's eye. *Journal of Small Animal Practice*, 35 (6), 326-328.
- Koch, J. & Willeesen, J. L. (2009). Canine pulmonary angiostrongylosis: an update. *The Veterinary Journal*, 179, 348-359. Acedido em Jan. 16, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023307003954>

- Lautenslager, J. F. (1976). Internal helminths of cats. *The Veterinary Clinics of North America*, 6, 353-365.
- Lebre, F.L.M.C.R. (2011). *Rastreo de parasitas gastrintestinais e seu impacto zoonótico em cães de canil da cidade de Lisboa*. Dissertação de Mestrado integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Lewis, D. T., Merchant, S. R. & Neer, T. M. (1994). Ivermectin toxicosis in a kitten. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 205 (4), 584-586.
- Losonsky, J. M., Thrall, D. E. & Prestwood, A. K. (1983). Radiographic evaluation of pulmonary abnormalities after *Aelurostrongylus abstrusus* inoculation in cats. *American Journal of Veterinary Research*, 44 (3), 478-482.
- Madeira de Carvalho, L. M., Pereira da Fonseca, I. M., Gomes, L. & Meireles, J. M. (2009). Lungworms in domestic and wild carnivores in Portugal: rare parasites or rarely diagnosed. *Bayer angiostrongylosis forum, Porto, Portugal, 9 September 2009*, p. 28. Leverkusen, Germany: Bayer Animal Health GmbH.
- Madeira de Carvalho, L.M., Silva Meireles, J.A.F. & Pereira da Fonseca, I.M.S. (2009b). Unidades Curriculares de Parasitologia I e II - Notas de Apoio às Aulas Práticas. Edição dos autores, 150 pp.
- Manning, S. P. (2007). Ocular examination in the diagnosis of angiostrongylosis in dogs. *Veterinary Record*, 160, 625-627.
- Martin, M. W. S., Ashton, G., Simpson, V. R. & Neal, C. (1993). Angiostrongylosis in Cornwall: clinical presentations of eight cases [abstract]. *Journal of Small Animal Practice*, 34 (1), 20-25. Acedido em Jun. 20, 2011, disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.1993.tb02570.x/abstract>
- Miller, B. H., Roudebush, P. & Ward, H. G. (1984). Pleural effusion as a sequel to aelurostrongylosis in a cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 185, 556-557.
- Mircean, V., Titilincu, A. & Vasil, C. (2010). Prevalence of endoparasitas in household cat (*Felis catus*) populations from Transylvania (Romania) and association with risk factors. *Veterinary Parasitology*, 171, 163-166. Acedido em Maio 3, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401710001627>
- Miró, G., Montoya, A., Jiménez, S., Frisuelos, C., Mateo, M. & Fuentes, I. (2004). Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and intestinal parasites in stray, farm and household cats in Spain. *Veterinary Parasitology*, 126 (3), 249-255. Acedido em Maio 3, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401704004121>
- Morgan, E. R., Jefferies, R., Krajewski, M., Ward, P. & Shaw, S. E. (2009). Canine pulmonary angiostrongylosis: the influence of climate on parasite distribution. *Parasitology International*, 58 (4), 406-410. Acedido em Maio 10, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383576909001020>
- Morgan, E. & Shaw, S. (2010). *Angiostrongylus vasorum* infection in dogs: continuing spread and development in diagnosis and treatment. *Journal of Small Animal Practice*, 51, 616-621. Acedido em Jan. 13, 2011, disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.2010.01000.x/full>

- Morgan, E. R., Shaw, S. E., Brennan, S. F., De Waal, T. D., Jones, B. R. & Mulcahy, G. (2005). *Angiostrongylus vasorum*: a real heartbreaker. *Trends in Parasitology*, 21 (2), 49-51.
- Morgan, E. R., Tomlinson, A., Hunter, S., Nichols, T., Roberts, E., Fox, M. T. & Taylor, M. A. (2008). *Angiostrongylus vasorum* and *Eucoleus aerophilus* in foxes (*Vulpes vulpes*) in Great Britain. *Veterinary Parasitology*, 154, 48-57. Acedido em Maio, 3, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401708001179>
- Naylor, J. R., Hamilton, J. M. & Weatherley, A. J. (1984). Changes in the ultrastructure of feline pulmonary arteries following infection with the lungworm *Aelurostrongylus abstrusus*. *British Veterinary Journal*, 140 (2), 181-190.
- Negrin, A., Cherubini, G. B. & Steeves, E. (2008). *Angiostrongylus vasorum* causing meningitis and detection of parasite larvae in the cerebrospinal fluid of a pug dog. *Journal of Small Animal Practice*, 49, 468-471.
- Nicolle, A. P., Chetboul, V., Tessier-Vetzel, D., Sampedrano, C. C., Aletti, E. & Pouchelon, J. (2006). Severe pulmonary arterial hypertension due to *Angiostrongylus vasorum* in a dog. *The Canadian Veterinary Journal*, 47 (8), 792-795. Acedido em Maio 12, 2011, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1524835/>
- Nijse, R. & van Doorn, D. (2009). Autochthonous *Angiostrongylus vasorum* infection in The Netherlands. *Bayer angiostrongylosis forum, Porto, Portugal, 9 September 2009*, p. 27. Leverkusen, Germany: Bayer Animal Health GmbH.
- Novotny, M. J., Krautmann, M. J., Ehrhart, J. C., Godin, C. S., Evans, E. I., McCall, J. W., Sun, F., Rowan, T. G. & Jernigan, A. D. (2000). Safety of selamectina in dogs. *Veterinary Parasitology*, 91 (3-4), 377-391. Acedido em Jan. 16, 2012, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440170000306X>
- Oliveira-Júnior, S. D., Barçante, J. M. P., Barçante, T. A., Dias, S. R. C. & Lima, W. S. (2006). Larval output of infected and re-infected dogs with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1886) Kamensky, 1905. *Veterinary Parasitology*, 141, 101-106. Acedido em Jan. 17, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706002858>
- Oliveira-Júnior, S. D., Barçante, J. M. P., Barçante, T. A., Ribeiro, V. M. & Lima, W. S. (2004). Ectopic location of adult worms and first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum* in a infected dog. *Veterinary Parasitology*, 121, 293-296. Acedido em Jun. 20, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401704000950>
- Paul, A. J., Tranquilli, W. J. & Hutchens, D. E. (2000). Safety of moxidectina in avermectin-sensitive Collies. *American Journal of Veterinary Research*, 61, 482-483. Acedido em Jan. 16, 2012, disponível em <http://www.2ndchance.info/heartwormMedResist-moxidectinCollie.pdf>
- Payo-Puente, P., Botelho-Dinis, M., Urueña, A. M. C., Payo-Puente, M., Gonzalo-Orden, J. M. & Rojo-Vázquez, F. A. (2008). Prevalence study of lungworm *Aelurostrongylus abstrusus* in stray cats of Portugal. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10, 242-246.
- Payo-Puente, P., Diez, A., Gonzalo-Orden, J. M., Notomi, M. K., Rodríguez-Altónaga, J. A., Rojo-Vázquez, F. A. & Orden, A. M. (2005). Computed tomography in cats infected

with *Aelurostrongylus abstrusus*: 2 clinic cases. *The Internacional Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 3, 339-343.

- Perry, A. W., Hertling, R. & Kennedy, M. J. (1991). Angiostrongylosis with disseminated larval infection associated with signs of ocular and nervous disease in an imported dog. *The Canadian Veterinary Journal*, 32 (7), 430-431. Acedido em Jun. 20, 2011, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1480994/pdf/canvetj00068-0048.pdf>
- Poli, A., Arispici, M., Mancianti, F & Abramo, F. (1991). Pathology of naturally acquired *Angiostrongylus vasorum* infection in the red fox (*Vulpes vulpes*) [abstract]. *Angewandte Parasitologie*, 32 (3), 121-126. Acedido em Maio 3, 2011, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1928794>
- Ramsey, I. K., Littlewood, J. D., Dunn, J. K. & Herrtage, M. E. (1996). Role of chronic disseminated intravascular coagulation in a case of canine angiostrongylosis [abstract]. *Veterinary Record*, 138, 360-363. Acedido em Maio 12, 2011, disponível em <http://veterinaryrecord.bmj.com/content/138/15/360.abstract>
- Rawlings, C. A., Losonsky, J. M., Lewis, R. E., Hubble, J. J. & Prestwood, A. K. (1980). Response of the feline heart to *Aelurostrongylus abstrusus*. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 16, 573-578.
- Reiczigel, J., Földi, J. & Ózsvári, L. (2010). Exact confidence limits for prevalence of a disease with an imperfect diagnostic test. *Epidemiology and Infection*, 138, 1674-1678.
- Ribeiro, V. M. & Lima, W. S. (2001). Larval production of cats infected and re-infected with *Aelurostrongylus abstrusus* (Nematoda: Protostongylidae). *Revue de Médecine Vétérinaire*, 152, 815-820. Acedido em Jan. 17, 2011, disponível em [http://www.revmedvet.com/2001/RMV152\\_815\\_820.pdf](http://www.revmedvet.com/2001/RMV152_815_820.pdf)
- Rosen, L., Ash, L. R. & Wallace, G. D. (1970). Life history of canine lungworm *Angiostrongylus vasorum* (Baillet). *American Journal of Veterinary Research*, 31, 131-141.
- Rosenlund, P., Boserup, F. & Monrad, J. (1993). *Angiostrongylus vasorum* in the anterior chamber of the eye in dogs. *European Journal of Companion Animal Practice*, 3, 31-33.
- Sasanelli, M., Paradies, P., Otranto, D., Lia, R. P. & De Caprariis, D. (2008). Haemothorax associated with *Angiostrongylus vasorum* infection in a dog. *Journal of Small Animal Practice*, 49, 417-420. Acedido em Maio 12, 2011, disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.2008.00551.x/full>
- Schelling, C. G., Greene, C. E., Prestwood, A. K. & Tsang, V. C. (1986). Coagulation abnormalities associated with acute *Angiostrongylus vasorum* infection in dogs [abstract]. *American Journal of Veterinary Research*, 47 (12), 2669-2673. Acedido em Maio 12, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3800129>
- Schnyder, M., Fahrion, A., Ossent, P., Webster, P., Heine, J. & Deplazes, P. (2009). Prophylactic use of imidacloprid/moxidectina spot-on solution in dogs experimentally infected with *Angiostrongylus vasorum*. *Bayer angiostrongylosis forum, Porto, Portugal, 9 September 2009*, p. 33. Leverkusen, Germany: Bayer Animal Health GmbH.

- Schnyder, M., Fahrion, A., Riond, B., Ossent, P., Webster, P., Kranjc, A., Glaus, T. & Deplazes, P. (2010). Clinical, laboratory and pathological findings in dogs experimentally infected with *Angiostrongylus vasorum*. *Parasitology Research*, 107 (6), 1471-1480.
- Schnyder, M., Maurelli, M. P., Morgoglione, M. E., Kohler, L., Deplazes, P., Torgerson, P., Cringoli, G. & Rinaldi, L. (2011). Comparison of faecal techniques including FLOTAC for copromicroscopic detection of first stage larvae of *Angiostrongylus vasorum*. *Parasitology Research*, 109, 63-69. Acedido em Dez. 20, 2011, disponível em <http://www.springerlink.com/content/mm393wn0043257t8/>
- Scott, D. W. (1972). Current knowledge of *Aelurostrongylus abstrusus* in the cat. *The Cornell veterinarian*, 63, 483-500.
- Segovia, J. M., Torres, J., Miquel, J., Llana, L. & Feliu, C. (2001). Helminths in the wolf, *Canis lupus*, from north-western Spain [abstract]. *Journal of Helminthology*, 75, 183-192. Acedido em Maio 3, 2011, disponível em <http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=708576>
- Simpson, V. (2010). *Angiostrongylus vasorum* infection in a stoat. *Veterinary Record*, 166. Acedido em Fev. 9, 2011, disponível em <http://veterinaryrecord.bmj.com/content/166/6/182.1/F2.expansion.html>
- Soland, J. & Bolt, G. (1996). Hypovolaemic shock after anthelmintic treatment of canine angiostrongylosis. *Journal of Small Animal Practice*, 37 (12), 594-6.
- Taubert, A., Pantchev, N., Vrhovec, M. G., Bauer, C & Hermosilla, C. (2009). Lungworm infections (*Angiostrongylus vasorum*, *Crenosoma vulpis*, *Aelurostrongylus abstrusus*) in dogs and cats in Germany and Denmark in 2003-2007. *Veterinary Parasitology*, 159, 175-180.
- Tebb, A. I., Johnson, V. S. & Irwin, P. J. (2007). *Angiostrongylus vasorum* (French heartworm) in a dog imported into Australia. *Australian Veterinary Journal*, 85, 23-28. Acedido em Maio 10, 2011, disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-0813.2006.00085.x/full>
- Thienpont, D., Rochete, F. & Vanparijs, O. F. J. (1986). *Diagnóstico de las helmintiasis por medio del examen coprológico*. (2ª edición). Beerse, Bélgica: Janssen Research Foundation.
- Tort, G. P. (2010). Doenças respiratórias parasitárias. *Veterinary focus*, 20, 44-48.
- Traversa, D. (2009). Companion animal lungworms – diagnostic challenges. *Bayer angiostrongylosis forum, Porto, Portugal, 9 September 2009*, pp. 11-15. Leverkusen, Germany: Bayer Animal Health GmbH.
- Traversa, D., Di Cesare, A. & Conboy, G. (2010). Canine and feline cardiopulmonary parasitic nematodes in Europe: emerging and underestimated. *Parasites & Vectors*, 3, 1-22. Acedido em Jan. 6, 2011, disponível em <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1756-3305-3-62.pdf>
- Traversa, D., Di Cesare, A., Milillo, P., Lohr, B., Pampurini, F., Schaper, R. & Heine, J. (2009). Efficacy and safety of imidacloprid 10%/moxidectin1% and emodepside 2.1%/praziquantel 8.6% spot-on formulations in the treatment of feline aelurostrongylosis. *Bayer Angiostrongylosis Forum, Porto, Portugal, 9 September 2009*, p. 34. Leverkusen, Germany: Bayer Animal Health GmbH.

- Traversa, D. & Guglielmini, C. (2008). Feline aelurostrongylosis and canine angiostrongylosis: A challenging diagnosis for two emerging verminous pneumonia infections. *Veterinary Parasitology*, 157, 163-174. Acedido em Jan. 6, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401708003774>
- Traversa, D., Iorio, R., Milillo, P., Di Cesare, A., Avolio, S., Bartolini, R. & Paoletti, B. (2009b). Canine and feline lungworms in Italy. *Bayer Angiostrongylosis Forum, Porto, Portugal, 9 September 2009*, pp. 11-15. Leverkusen, Germany: Bayer Animal Health GmbH.
- Traversa, D., Iorio, R. & Otranto, D. (2008). Diagnostic and clinical implications of a nested PCR specific for ribosomal DNA of the feline lungworm *Aelurostrongylus abstrusus* (Nematoda, Strongylida). *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (5), 1811-1817. Acedido em Jan. 5, 2012, disponível em <http://jcm.asm.org/content/46/5/1811.full>
- Traversa, D., Lia, R. P., Iorio, R., Boari, A., Paradies, P., Capelli, G., Avolio, S. & Otranto, D. (2008c). Diagnosis and risk factors of *Aelurostrongylus abstrusus* (Nematoda, Strongylida) infection in cats from Italy. *Veterinary Parasitology*, 153, 182-186. Acedido em Maio 3, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401708000332>
- Tüzer, E., Toparlak, M., Gargili, A., Keles, V. & Ulutas Esatgil, M. (2002). A case of *Aelurostrongylus abstrusus* infection in a cat in Istanbul, Turkey and its treatment with moxidectin and levamisole. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 26, 411-414. Acedido em Maio 12, 2011, disponível em <http://mistug.tubitak.gov.tr/bdyim/abs.php?dergi=vet&rak=0009-7>
- Urquhart, G. M., Armour, J., Duncan, J. L., Dunn, A. M. & Jennings, F. W. (1998). *Parasitologia Veterinária*. (2ª edição). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.
- Vasconcelos, V. O., Vitor, R. W. A. & Lima, W. S. (2008). Identification of stage-specific proteins of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky. *Parasitology Research*, 102, 389-395. Acedido em Jan. 5, 2012, disponível em <http://www.springerlink.com/content/xq77247847802786/>
- Verzberger-Epshtein, I., Markham, R. J. F., Sheppard, J. A., Stryhn, H., Whitney, H. & Conboy, G. A. (2008). Serologic detection of *Angiostrongylus vasorum* infection in dogs. *Veterinary Parasitology*, 151, 53-60. Acedido em Jun. 20, 2012, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401707005328>
- Waap, H. & Gomes, J. (2011). Detecção de *Aelurostrongylus abstrusus* e *Ollulanus tricuspis* em gatos da cidade de Lisboa. *Congresso Ciências Veterinárias 2011, INRB IP/ L-INIA Fonte Boa, Vale de Santarém, 13 a 15 de Outubro de 2011*, Congresso Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias, 5, p. 94. Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias.
- Wessmann, A., Lu, D., Lamb, C. R., Smyth, B., Mantis, P., Chandler, K., Boag, A., Cherubini, G. B. & Cappello, R. (2006). Brain and spinal cord haemorrhages associated with *Angiostrongylus vasorum* infection in four dogs. *Veterinary Record*, 158, 858-863.
- Whitley, N. T., Corzo-Menendez, N., Carmichael, N. G. & McGarry (2005). Cerebral and conjunctival haemorrhages associated with von Willebrand factor deficiency and canine angiostrongylosis. *Journal of Small Animal Practice*, 46 (2), 75-78. Acedido em Maio 12, 2011, disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.2005.tb00296.x/pdf>

- Willard, M. D., Roberts, R. E., Allison, N., Grieve, R. B. & Escher, K. (1988). Diagnosis of *Aelurostrongylus abstrusus* and *Dirofilaria immitis* infections in cats from a human shelter. *Journal of the American Veterinary Association*, 192 (7), 913-916.
- Willesen, J. L. (2009). Companion animal lungworms – treatment options. *Bayer Angiostrongylosis Forum, Porto, Portugal, 9 September 2009*, pp. 16-19. Leverkusen, Germany: Bayer Animal Health GmbH.
- Willesen, J. L., Bjornvad, C. R. & Koch, J. (2008). Acute haemoabdomen associated with *Angiostrongylus vasorum* infection in a dog: a case report. *Irish Veterinary Journal*, 61 (9), 591-593. Acedido em Maio 12, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3113881/>
- Willesen, J.L., Kristensen, A. T., Jensen, A. L., Heine, J. & Koch, J. (2007). Efficacy and safety of imidacloprid/moxidectin spot-on solution and fenbendazole in the treatment of dogs naturally infected with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). *Veterinary Parasitology*, 147, 258-264. Acedido em Jan. 16, 2012, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401707002385>
- Willesen, J. L., Jensen, A. L., Kristensen, A. T., Kjelgaard-Hansen, M., Jessen, R. & Koch, J. (2006). Serum fructosamine concentrations in 59 dogs naturally infected with *Angiostrongylus vasorum* [abstract]. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 53 (5), 266-269. Acedido em Jun. 21, 2011, disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0442.2006.00828.x/full>
- Willesen, J. L., Jensen, A. L., Kristensen, A. T. & Koch, J. (2009). Haematological and biochemical changes in dogs naturally infected with *Angiostrongylus vasorum* before and after treatment. *The Veterinary Journal*, 180, 106-111. Acedido em Jun. 21, 2011, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023307003735>
- Willingham, A. L., Ockens, N. W., Kapel, C. M. O. & Monrad, J. (1996). A helminthological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the metropolitan area of Copenhagen [abstract]. *Journal of Helminthology*, 70, 259-263. Acedido em Maio 3, 2011, disponível em <http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?jsessionid=22F727598DAED6037117EE514EDE37D1.journals?fromPage=online&aid=1728152>
- Yildiz, K., Duru, S. Y. & Gokpinar, S. (2011). Alteration in blood gases in cats naturally infected with *Aelurostrongylus abstrusus*. *Journal of Small Animal Practice*, 52 (7), 376-379. Acedido em Jan. 5, 2012, disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.2011.01076.x/full>