



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

RASTREIO DE DIROFILARIOSE E DE LEISHMANIOSE EM
GATOS DA ÁREA METROPOLITANA DE LISBOA

NATANIEL JOÃO GONÇALVES CLETO ROSA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho
Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio
Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles
Dr.^a Maria João Dinis da Fonseca

ORIENTADORA

Dr.^a Maria João Dinis da Fonseca

CO-ORIENTADORA

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio

2009

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

RASTREIO DE DIROFILARIOSE E DE LEISHMANIOSE EM
GATOS DA ÁREA METROPOLITANA DE LISBOA

NATANIEL JOÃO GONÇALVES CLETO ROSA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho
Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio
Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles
Dr.^a Maria João Dinis da Fonseca

ORIENTADORA

Dr.^a Maria João Dinis da Fonseca

CO-ORIENTADORA

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio

2009

LISBOA

Aos meus pais, por toda a dedicação e toda a confiança ao longo
da minha vida e do meu percurso académico.

Agradecimentos

À Dr.^a Maria João Dinis da Fonseca, minha orientadora, por me ter acolhido no Hospital Veterinário do Restelo (HVR), pelo auxílio manifestado durante o estágio e durante a realização desta dissertação.

À Doutora Isabel Pereira da Fonseca, minha co-orientadora e professora da Faculdade de Medicina Veterinária (Universidade Técnica de Lisboa), pelo empenho manifestado no acompanhamento e na revisão desta dissertação.

Ao Dr. Jorge Cid, director clínico do HVR, por me ter acolhido amavelmente no seu hospital.

À Dr.^a Marina Coelho e à Dr.^a Paula Santos, pelos enormes ensinamentos sobre ecografia abdominal.

À Dr.^a Ana Rita Figueiredo, pela sabedoria transmitida sobre a realização das técnicas laboratoriais de diagnóstico.

À Dr.^a Catarina Archer, pelo apoio e pela amizade demonstrada.

Ao Dr. Diogo Magno, pela transmissão de conhecimentos de oftalmologia e de clínica de animais exóticos.

Ao Dr. Hugo Pereira, pela sabedoria partilhada sobre ortopedia e neurologia.

À Dr.^a Marta Cipriano e ao Dr. Rui Máximo, pela transmissão de conhecimentos de cardiologia.

À Dr.^a Ana Valença e ao Dr. Simão Nabais, pela transmissão de conhecimentos sobre animais exóticos.

À Dr.^a Rita Bonhorst, à Dr.^a Sofia Zamith e ao Dr. Marco Simões, pela forma prestável com que me acolheram no internamento do HVR.

À Dr.^a Cátia Barneto, à Dr.^a Elisabete Capitão, à Dr.^a Maria Andrade e ao Dr. Miguel Ramos, por toda a ajuda e disponibilidade.

Às minhas colegas estagiárias Sofia Costa, Diana Leal e Marta Ramos, por todo o companheirismo.

A todas as enfermeiras e auxiliares do HVR, pela amabilidade.

À Prof.^a Doutora Lenea Campino e à Doutora Carla Maia, investigadoras do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Universidade Nova de Lisboa), pela gentileza na partilha de informação sobre leishmaniose.

À Prof.^a Doutora Cáriss Maroni Nunes, à Prof.^a Doutora Katia Denise Saraiva Bresciani, ao Doutor Willian Marinho Dourado Coelho e à Dr.^a Anna Claudia Marques Serrano, investigadores da Faculdade de Odontologia (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”), pela transmissão de informação sobre casos de leishmaniose felina de Araçatuba (Brasil).

Ao Doutor Fabiano Borges Figueiredo, investigador do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (Fundação Oswaldo Cruz), pela partilha de dados sobre os casos de leishmaniose felina do Rio de Janeiro (Brasil).

Ao Dr. Ricardo Marcos, assistente de Histologia e Embriologia Animal do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (Universidade do Porto), pela amável cedência de um artigo sobre leishmaniose felina.

À Dr.^a Lúcia Gomes, por todo o auxílio na execução dos protocolos de imunofluorescência indirecta.

À Lia Duro, à Mariana Lobo e a todos os meus amigos pelo incentivo na realização deste curso e desta dissertação.

RESUMO

Rastreo de dirofilariose e de leishmaniose em gatos da Área Metropolitana de Lisboa

A dirofilariose e a leishmaniose são duas doenças parasitárias transmitidas por vectores e são zoonoses emergentes. Na Área Metropolitana de Lisboa, os cães são os principais hospedeiros de *Dirofilaria immitis* e de *Leishmania infantum*, porém, a importância destes parasitas na população felina é pouco conhecida. O gato parece ser um bom hospedeiro de *Leishmania infantum* mas não de *Dirofilaria immitis*.

Nesta dissertação, foram compilados todos os 49 casos clínicos conhecidos de leishmaniose felina e foi efectuada a análise dos estudos epidemiológicos destas duas doenças. Foi, ainda, efectuada um rastreio de dirofilariose e de leishmaniose felinas. A amostra foi constituída por 70 gatos provenientes da Área Metropolitana de Lisboa que se apresentaram à consulta no Hospital Veterinário do Restelo.

Utilizando o teste para a detecção de antígenos Witness[®] *Dirofilaria*, a prevalência obtida foi de 1,43% (1/70 gatos). Não foram observadas microfírias no exame de sangue a fresco nem com a técnica de Knott modificada. O rastreio efectuada veio documentar, pela primeira vez, a existência de infecção felina por *Dirofilaria immitis* na Área Metropolitana de Lisboa. Nenhum dos 70 gatos apresentou anticorpos anti-*Leishmania infantum* utilizando a técnica de imunofluorescência indirecta. Os resultados foram discutidos.

A dirofilariose e a leishmaniose felinas devem ser incluídas nas listas de diagnósticos diferenciais das doenças de gatos provenientes da Área Metropolitana de Lisboa. Os proprietários devem ser alertados para o risco de infecção dos gatos por ambos os parasitas, devendo ser tomadas medidas de profilaxia com vista a salvaguardar a Saúde Animal e a Saúde Pública.

Palavras-chave: gato, *Dirofilaria immitis*, *Leishmania infantum*, dirofilariose, leishmaniose, Área Metropolitana de Lisboa, rastreio

ABSTRACT

Survey of cats from the Metropolitan Area of Lisbon for dirofilariosis and leishmaniosis

Dirofilariosis and leishmaniosis are two vector-borne parasitic diseases and emergent zoonosis. In Metropolitan Area of Lisbon, dogs are the main hosts for *Dirofilaria immitis* and *Leishmania infantum*. However, the importance of these parasites among the feline population is not well known. Cat seems to be a good host for *Leishmania infantum* but not for *Dirofilaria immitis*.

This dissertation contains a compilation of the 49 reported cases of feline leishmaniosis and an analysis of the epidemiological studies of both diseases.

A survey for feline dirofilariosis and leishmaniosis was carried on 70 cats from Metropolitan Area of Lisbon assisted at the Veterinary Hospital of Restelo.

Using Witness[®] *Dirofilaria* antigen test kits, the prevalence obtained was 1.43% (1/70 cats). None microfilaria was found neither on direct smears nor with Knott's Modified Test. This survey documented, for the first time, the existence of feline dirofilariosis in Metropolitan Area of Lisbon. None of these cats showed anti-*Leishmania infantum* antibodies using indirect immunofluorescence test. These results were discussed.

In Metropolitan Area of Lisbon feline dirofilariosis and leishmaniosis should be added to the differential diagnosis list for cat's diseases. The owners should be warned of cats infection risk for both parasites. Prophylactic measures should be taken to defend Animal and Public Health.

Keywords: cat, *Dirofilaria immitis*, *Leishmania infantum*, dirofilariosis, leishmaniosis, Metropolitan Area of Lisbon, survey

Tudo que existe existe talvez porque outra coisa existe.
Nada é, tudo coexiste.

Fernando Pessoa, Livro do Desassossego

Índice geral

Introdução	1
I. Descrição das actividades efectuadas no estágio curricular	2
1. Casuística observada na área clínica	2
2. Casuística observada na área cirúrgica	3
3. Meios complementares de diagnóstico observados	3
II. Monografia sobre dirofilariose felina (DFel) e leishmaniose felina (LFel)	4
II.A. Dirofilariose felina.....	4
1. Etiopatogenia	4
1.1. Taxonomia e referência histórica.....	4
1.2. Morfologia e fisiologia do parasita	4
1.3. O endossimbionte <i>Wolbachia</i>	5
1.4. Ciclo biológico do parasita.....	5
1.4.1. Características dos hospedeiros invertebrados	5
1.4.2. O parasita no hospedeiro invertebrado	7
1.4.3. <i>D. immitis</i> no hospedeiro vertebrado	7
1.4.3.1. Microfilarémia	9
1.4.3.2. Migrações erráticas	10
2. Prevalência e incidência clínica de dirofilariose felina	10
2.1. Distribuição geográfica e endemicidade da infecção por <i>D. immitis</i> em gatos.....	11
2.2. Factores de susceptibilidade dos gatos à infecção por <i>D. immitis</i>	11
2.2.1. Factores intrínsecos: o sexo, a idade, a raça e o tamanho da pelagem	11
2.2.2. Factores extrínsecos: o modo de vida, o ambiente e as doenças concomitantes	11
2.2.2.1. A importância do clima na transmissão de dirofilariose felina	12
3. Resposta imunitária	12
3.1. Diminuição da imunidade do hospedeiro mediada por <i>D. immitis</i>	13
3.2. Importância de <i>Wolbachia</i> na resposta imunitária do gato.....	14
4. Patogenia e sinais clínicos de dirofilariose felina.....	14
4.1. Fase 1 – Dirofilariose larvar pulmonar.....	15
4.2. Fase 2 – Doença associada à morte das dirofilárias adultas	16
4.3. Doença respiratória crónica após a eliminação de <i>D. immitis</i>	18
5. Diagnóstico	18
5.1. Anamnese e exame físico	18
5.1.1. Sinais crónicos	18
5.1.2. Sinais agudos	19
5.1.3. Diagnósticos diferenciais	19
5.2. Diagnóstico laboratorial	20
5.2.1. Alterações hematológicas e bioquímicas	20
5.2.2. Testes para a detecção de microfílarias	20
5.2.3. Serologia	21
5.2.3.1. Testes para a detecção de antígenos de <i>D. immitis</i>	21
5.2.3.2. Testes para a detecção de anticorpos anti- <i>D. immitis</i> em gatos	22
5.3. Diagnóstico imagiológico	23
5.3.1. Radiografia torácica.....	23
5.3.2. Ecocardiografia.....	24
5.3.3. Angiografia não-selectiva	26
5.4. Necrópsia.....	26
6. Tratamento.....	26
6.1. Tratamento médico.....	26
6.1.1. Tratamento sintomático de suporte	26
6.1.2. Tratamento adulticida	27
6.1.3. Tratamento microfilaricida	28
6.1.4. Tratamento anti- <i>Wolbachia</i>	28
6.2. Tratamento cirúrgico.....	29
7. Seguimento dos gatos infectados.....	30

8.	Profilaxia	30
8.1.	A importância dos testes serológicos antes da profilaxia	31
8.2.	Fármacos utilizados para a profilaxia da dirofilariose felina	31
8.2.1.	Ivermectina	32
8.2.2.	Milbemicina oxima	32
8.2.3.	Selamectina	32
8.2.4.	Moxidectina.....	33
9.	Controlo dos hospedeiros intermediários.....	33
10.	Evolução da doença	33
11.	Epidemiologia da dirofilariose felina	34
11.1.	Prevalências obtidas nos estudos epidemiológicos.....	34
11.2.	Dirofilariose canina e felina em Portugal	35
12.	Importância em Saúde Pública do gato como hospedeiro de <i>D. immitis</i>	36
13.	Perspectivas futuras para o tratamento e a profilaxia da dirofilariose felina	37
II.B.	Leishmaniose felina (LFel)	38
1.	Etiopatogenia	38
1.1.	Os agentes etiológicos: <i>Leishmania</i> spp.	38
1.2.	Zimodemes de <i>Leishmania</i> encontrados na espécie felina	39
1.3.	Morfologia de <i>Leishmania</i>	39
1.4.	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	39
1.4.1.	Características dos hospedeiros invertebrados.....	39
1.4.1.1.	Desenvolvimento de <i>Leishmania</i> no hospedeiro invertebrado	40
1.4.2.	Hospedeiro vertebrado	40
1.4.2.1.	Desenvolvimento de <i>Leishmania</i> no hospedeiro vertebrado	41
1.4.3.	Formas de transmissão independentes do vector flebotomíneo	41
2.	Factores de virulência de <i>Leishmania</i>	43
2.1.	Glicoproteína 63.....	43
2.2.	Lipofosfoglicano	43
3.	Resposta imunitária	43
4.	Estudo dos casos clínicos de leishmaniose felina	44
4.1.	Prevalência e incidência clínica de leishmaniose felina	44
4.2.	Distribuição geográfica dos casos clínicos de leishmaniose felina.....	45
4.3.	Susceptibilidade dos gatos à infecção por <i>Leishmania</i> spp.	45
4.3.1.	Factores intrínsecos: o sexo, a idade, a raça e o tamanho da pelagem	45
4.3.2.	Factores extrínsecos: o modo de vida, o ambiente e as doenças concomitantes	46
4.4.	Disseminação visceral da infecção por <i>Leishmania</i> em gatos	46
4.5.	Sinais clínicos de leishmaniose felina.....	46
4.5.1.	Lesões cutâneas.....	46
4.5.1.1.	Localização das lesões cutâneas	46
4.5.1.2.	Tipos de lesões cutâneas observadas.....	47
4.5.2.	Sinais oculares	48
4.5.3.	Sinais gerais	48
4.6.	Diagnóstico laboratorial de leishmaniose felina	48
4.6.1.	Alterações hematológicas e bioquímicas	48
4.6.2.	Métodos de diagnóstico	49
4.6.2.1.	Métodos parasitológicos directos: histopatologia e citopatologia	49
4.6.2.2.	Isolamento de <i>Leishmania in vitro</i> – cultura.....	49
4.6.2.3.	Técnicas moleculares	50
4.6.2.4.	Técnicas serológicas.....	51
a)	Técnica da imunofluorescência indirecta (IFI)	52
b)	“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay” (ELISA).....	52
c)	Outros métodos utilizados no diagnóstico de leishmaniose felina.....	52
4.7.	Tratamento e evolução do estado clínico dos animais com leishmaniose felina.	52
4.7.1.	Moléculas activas sobre as leishmanias.....	52
4.7.2.	Evolução do estado clínico dos animais com leishmaniose felina.....	53
4.7.2.1.	Gatos não tratados com fármacos anti- <i>Leishmania</i>	53

4.7.2.2.	Gatos em que foi efectuada a exérese do tecido cutâneo lesionado	53
4.7.2.3.	Gatos tratados contra a leishmaniose	53
5.	Profilaxia	54
5.1.	Controlo dos vectores.....	54
5.2.	Perspectivas futuras para o tratamento e a profilaxia da leishmaniose felina	54
6.	Epidemiologia da leishmaniose felina.....	55
6.1.	Prevalências obtidas pelos métodos parasitológicos directos: histopatologia e citopatologia	55
6.2.	Prevalências obtidas pelos métodos moleculares.....	55
6.3.	Prevalências obtidas pelos diferentes métodos serológicos	55
6.4.	Resultados importantes obtidos através dos estudos epidemiológicos	56
6.4.1.	Susceptibilidade dos gatos à infecção por <i>Leishmania</i>	56
6.4.1.1.	Factores intrínsecos	56
6.4.1.2.	Factores extrínsecos	56
6.5.	Conclusões obtidas a partir dos estudos epidemiológicos	56
7.	Contributo dos estudos experimentais na compreensão da leishmaniose felina	57
7.1.	Experiências de inoculação com <i>Leishmania</i> em gatos	57
7.1.1.	Experiência de Anjili & Githure	57
7.1.2.	Experiência de Kirckpatrick <i>et al.</i>	57
7.1.3.	Experiência de Simões-Mattos <i>et al.</i>	58
7.2.	Inoculação de isolados de leishmanias de origem felina em animais de laboratório	58
7.3.	Infecção experimental de invertebrados a partir de gatos com LFel	59
7.4.	Futuros estudos experimentais.....	59
8.	Leishmaniose em Portugal	60
8.1.	Leishmaniose felina em Portugal.....	60
8.1.1.	Casos clínicos de leishmaniose felina em Portugal	60
8.1.2.	Estudos epidemiológicos de leishmaniose felina em Portugal	61
9.	Leishmaniose felina e a importância das co-infecções por FIV e FeLV	62
10.	A leishmaniose felina e o papel epidemiológico do gato	63
10.1.	Atractividade dos gatos para os flebotómíneos.....	63
10.2.	O gato como hospedeiro reservatório de <i>Leishmania</i>	64
III. Rastreo de dirofilariose e de leishmaniose em gatos da Área Metropolitana de Lisboa (AML)		66
1.	Objectivos	66
2.	Material e métodos	66
2.1.	Área geográfica do estudo.....	66
2.1.1.	O clima da Área Metropolitana de Lisboa	67
2.2.	Caracterização da amostra.....	68
2.2.1.	Sexo dos gatos da amostra	68
2.2.2.	Idade dos gatos da amostra	68
2.2.3.	Raça dos gatos da amostra.....	68
2.2.4.	Origem dos gatos da amostra	68
2.2.5.	Motivo de apresentação à consulta segundo a área clínica.....	69
2.2.6.	Infecções por FIV, FeLV e Vírus da Peritonite Infecciosa Felina (PIF).....	69
2.2.7.	Habitat e contacto com outros animais	70
2.3.	Anamnese e exame físico	70
2.4.	Colheita e processamento do sangue periférico	71
2.4.1.	Técnicas para a detecção de <i>D. immitis</i>	71
2.4.1.1.	Exame de sangue a fresco para a detecção de microfilárias	71
2.4.1.2.	Técnica de Knott modificada para a detecção de microfilárias	72
2.4.1.3.	Pesquisa de antígenos de <i>D. immitis</i> (kit Witness® Dirofilaria, Synbiotics Europe, Lyon, França)	72
2.4.1.3.1.	Sensibilidade e especificidade do teste Witness® Dirofilaria	73
2.4.2.	Pesquisa de anticorpos anti- <i>L. infantum</i> pela técnica da imunofluorescência indirecta (IFI).....	73
2.4.2.1.	Limiar de positividade para a técnica da IFI	74

3. Resultados	75
3.1. Rastreio de dirofilariose em 70 gatos da AML	75
3.1.1. Resultados obtidos na anamnese e no exame físico	75
3.1.2. Resultados obtidos na pesquisa de microfilárias pelo exame de sangue a fresco e pela técnica de Knott modificada	75
3.1.3. Resultados obtidos na pesquisa de antígenos de fêmeas adultas de <i>D. immitis</i> utilizando um teste comercial de imunomigração rápida (Witness® <i>Dirofilaria</i>).....	75
3.2. Rastreio de leishmaniose por <i>L. infantum</i> em 70 gatos da AML	76
3.2.1. Resultados obtidos na anamnese e no exame físico	76
3.2.2. Resultados obtidos pela técnica da imunofluorescência indirecta (IFI)	77
4. Discussão.....	77
4.1. Rastreio de dirofilariose por <i>D. immitis</i> em 70 gatos da AML	77
4.2. Rastreio de leishmaniose por <i>L. infantum</i> em 70 gatos da AML	82
5. Conclusões	85
Bibliografia	86

Índice de tabelas

Tabela 1	–	Frequência relativa dos animais observados nas consultas por espécie.....	2
Tabela 2	–	Frequência relativa das consultas observadas por especialidade	2
Tabela 3	–	Frequência relativa das consultas de tratamento e reavaliação	3
Tabela 4	–	Frequência relativa das pequenas cirurgias.....	3
Tabela 5	–	Frequência relativa das cirurgias de tecidos moles.....	3
Tabela 6	–	Frequência relativa dos meios complementares de diagnóstico observados ...	3
Tabela 7	–	Espécies de <i>Leishmania</i> identificadas até 2009 e responsáveis por casos de LFel	38
Tabela 8	–	Distribuição geográfica dos casos clínicos de LFel.....	45

Índice de gráficos

Gráfico 1	–	Percentagem de animais da amostra por sexo	68
Gráfico 2	–	Percentagem de animais da amostra por raça.....	68
Gráfico 3	–	Área clínica do motivo de apresentação à consulta	69
Gráfico 4	–	Habitat dos animais da amostra	70
Gráfico 5	–	Contacto com outros animais	70

Índice de figuras

Figura 1	– Ciclo biológico de <i>D. immitis</i>	9
Figura 2	– Mapa com os países onde foram documentadas infecções por <i>D. immitis</i> em gatos.....	10
Figura 3	– Preparações histopatológicas das arteríolas pulmonares, alvéolos e broquíolos de gatos experimentalmente infectados e submetidos a profilaxia, a tratamento larvicida contra L5 e gatos não tratados infectados por adultos.....	17
Figura 4	– Radiografia torácica dorsoventral de um gato com DFel	24
Figura 5	– Ecocardiografia de um gato com um adulto de <i>D. immitis</i> na artéria pulmonar	25
Figura 6	– Angiograma não-selectivo lateral de um gato com DFel.....	25
Figura 7	– Fórceps aligátor.....	29
Figura 8	– Fórceps de preensão endoscópica	29
Figura 9	– Catéter de recolha tipo cesto.....	29
Figura 10	– Catéter de laço pescoço de ganso	29
Figura 11	– Mapa contendo a compilação dos dados de vários autores sobre as prevalências de dirofilariose canina em Portugal.....	36
Figura 12	– Ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	42
Figura 13	– Mapa de distribuição dos casos mundiais de LFel documentados e dos estudos epidemiológicos de LFel na região mediterrânica até 2009	44
Figura 14	– Lesão ulcerosa de um gato com leishmaniose felina.....	47
Figura 15	– Lesão nodular de um gato com LFel	47
Figura 16	– Pústulas e crostas do interior do pavilhão auricular de um gato com LFel	47
Figura 17	– Crostas, pústulas, despigmentação e eritema da trufa de um gato com LFel	47
Figura 18	– Dermatite ulcerativa periocular.....	47
Figura 19	– Uveíte e coágulo de fibrina dentro da câmara anterior dos olhos de um gato com LFel.....	47
Figura 20	– Formas amastigotas de <i>Leishmania chagasi</i>	49
Figura 21	– Mapa contendo a compilação de dados de diversos autores sobre a distribuição de leishmaniose canina e felina em Portugal.....	62
Figura 22	– Mapa com o número de animais da amostra distribuído pelo concelho de origem.....	69
Figura 23	– Fotografia do animal (n.º 9) que apresentou o resultado positivo para o teste Witness® Dirofilaria.....	76
Figura 24	– Aspecto do resultado negativo obtido pela técnica de Knott modificada para o animal n.º 9.....	76
Figura 25	– Aspecto do teste Witness® Dirofilaria para o animal n.º 9 (código 012) com resultado positivo e respectiva repetição	76
Figura 26	– Aspecto da técnica da IFI do controlo positivo	77
Figura 27	– Aspecto de um resultado negativo pela técnica da IFI.....	77

Índice de anexos

Anexo 1	– Estudos epidemiológicos sobre dirofilariose felina (<i>D. immitis</i>).....	114
Anexo 2	– Estudos epidemiológicos sobre leishmaniose felina utilizando métodos parasitológicos e moleculares.....	116
Anexo 3	– Estudos epidemiológicos sobre leishmaniose felina utilizando métodos serológicos.....	117
Anexo 4	– Compilação dos 49 casos clínicos de LFel relatados na literatura científica mundial.....	118
Anexo 5	– Casos clínicos de LFel: doenças e infecções concomitantes.....	120
Anexo 6	– Casos clínicos de LFel: localização e tipo das lesões cutâneas.....	121
Anexo 7	– Casos clínicos de LFel: sinais oculares e sinais gerais.....	122
Anexo 8	– Casos clínicos de LFel: alterações hematológicas e bioquímicas.....	123
Anexo 9	– Casos clínicos de LFel: exames citopatológicos/histopatológicos e serologia.....	124
Anexo 10	– Casos clínicos de LFel: cultura e PCR.....	125
Anexo 11	– Casos clínicos de LFel: xenodiagnóstico.....	126
Anexo 12	– Casos clínicos de LFel: tratamento e evolução.....	127
Anexo 13	– Análise dos dados obtidos a partir dos 49 casos clínicos de LFel.....	128
Anexo 13.a	– Distribuição das idades de diagnóstico da doença nos animais com LFel ..	128
Anexo 13.b	– Incidência de LFel a nível mundial entre as décadas de 1910 a 2000.....	128
Anexo 13.c	– Tamanho da pelagem dos gatos com LFel (%).....	128
Anexo 13.d	– Sexo dos gatos com LFel (%).....	128
Anexo 13.e	– Raça dos gatos com LFel.....	128
Anexo 13.f	– Habitat dos gatos com LFel.....	128
Anexo 13.g	– Co-infecções por FIV e por FeLV nos gatos com LFel.....	129
Anexo 13.h	– Outras co-infecções dos gatos com LFel.....	129
Anexo 13.i	– Doenças concomitantes nos gatos com LFel.....	129
Anexo 13.j	– Sinais cutâneos, oculares e gerais nos gatos com LFel.....	130
Anexo 13.l	– Localização das lesões cutâneas nos gatos com LFel.....	131
Anexo 13.m	– Tipos de lesões cutâneas nos gatos com LFel.....	131
Anexo 13.n	– Tipos de lesões oculares nos gatos com LFel.....	132
Anexo 13.o	– Sinais gerais dos gatos com LFel.....	132
Anexo 13.p	– Alterações hematológicas relatadas nos gatos com LFel.....	133
Anexo 13.q	– Alterações bioquímicas séricas relatadas nos gatos com LFel.....	133
Anexo 13.r	– Tipos de técnicas serológicas utilizadas nos gatos com LFel.....	133
Anexo 13.s	– Tecidos e órgãos que foram alvo de exames citológicos ou histológicos nos casos de LFel.....	133
Anexo 13.t	– Casos clínicos e estudos epidemiológicos de LFel em que foi utilizada a técnica da imunofluorescência indirecta para a detecção de <i>L. infantum</i> e de <i>L. chagasi</i>	134
Anexo 13.u	– Tecidos utilizados para cultura parasitológica de <i>Leishmania</i>	134
Anexo 13.v	– Tecidos utilizados na técnica da PCR (detecção de ADN de <i>Leishmania</i>).....	134
Anexo 13.x	– Possível influência de tratamento específico para leishmaniose na evolução do estado clínico do animal.....	135
Anexo 13.z	– Agentes de tratamento etiológico para leishmaniose e a evolução do estado clínico do animal.....	135
Anexo 14	– Caracterização da amostra do rastreio para dirofilariose e leishmaniose em 70 gatos da Área Metropolitana de Lisboa.....	136
Anexo 15	– Sinais clínicos compatíveis com LFel e DFel dos 70 gatos do rastreio.....	140
Anexo 16	– Pesquisa de microfilárias e antígenos de <i>Dirofilaria immitis</i> em 70 gatos da Área Metropolitana de Lisboa.....	142
Anexo 17	– Protocolo do teste Witness® Dirofilaria.....	143
Anexo 18	– Técnica da imunofluorescência indirecta para a detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania infantum</i> em 70 gatos da Área Metropolitana de Lisboa	145

Índice de abreviaturas e símbolos

°C	graus Celsius
=	igual
≥	maior ou igual
≤	menor ou igual
%	percentagem
μL	microlitro
μm	micrómetro
Ac	anticorpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	antigénio
ALT	Alanina aminotransferase
AML	Área Metropolitana de Lisboa
ASDi	Antigénios somáticos de adultos de <i>D. immitis</i>
BID	duas vezes ao dia
BUN	ureia sanguínea (“blood urea nitrogen”)
C3	proteína do complemento C3 (“Complement Component C3”)
CD	glicoproteína de superfície de linfócitos e outras células imunitárias (“cluster of differentiation”)
CR3	receptor de complemento 3 (“Complement Receptor 3”)
DAT	teste de aglutinação directa (“Direct Agglutination Test”)
DCan	dirofilariose canina
DFel	dirofilariose felina
DHum	dirofilariose pulmonar humana
dL	decilitro
e.g.	por exemplo (<i>exempli gratia</i>)
EUA	Estados Unidos da América
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FeLV	Vírus da Leucemia Felina (“Feline Leukemia Virus”)
FIV	Vírus da Imunodeficiência Felina (“Feline Immunodeficiency Virus”)
GP63	Glicoproteína 63
HVR	Hospital Veterinário do Restelo
ID	intradérmica
ICAM	Molécula de Adesão Inter-Cellular (“Inter-Cellular Adhesion Molecule”)
i.e.	isto é (<i>id est</i>)
IFI	Imunofluorescência indirecta
IFN	Interferão
IgG	Imunoglobulina G
IHA	hemaglutinação indirecta
IHMT	Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Universidade Nova de Lisboa)
IL	interleucina
IM	intramuscular
IRC	insuficiência renal crónica
IV	intravenosa
kg	quilograma
km ²	quilómetros quadrados

L1	primeiro estado larvar
L2	segundo estado larvar
L3	terceiro estado larvar
L4	quarto estado larvar
L5	quinto estado larvar
LCan	leishmaniose canina
LFel	leishmaniose felina
LPG	Lipofosfoglicano
LVHum	leishmaniose visceral humana
mg	miligrama
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade (“Major Histocompatibility Complex”)
MIP	Macrófagos Intravasculares Pulmonares
mL	mililitro
mm	milímetros
n.º	número
nm	nanómetros
PBS	Tampão fosfato-salino (“Phosphate buffered saline”)
PCAM	Molécula de adesão celular plaquetária (“Platelet endothelial cell adhesion molecule”)
PCR	Reacção em cadeia da polimerase (“Polymerase chain reaction”)
PIF	Peritonite Infecciosa Felina
PO	via oral
PSW	Proteína de Superfície Maior da <i>Wolbachia</i>
QOD	dia sim, dia não
RFLP	Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição (“Restriction Fragment Length Polymorphism”)
rPSW	forma recombinante da Proteína de Superfície Maior da <i>Wolbachia</i>
SC	subcutâneo
SID	uma vez ao dia
SPI	semanas pós-infecção
Th	células T efectoras (T helper cell)
TID	três vezes ao dia
TNF	Factor de Necrose Tumoral (“tumor necrosis factor”)
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
WB	Western Blot

Introdução

Na finalização do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, o autor efectuou um estágio curricular no Hospital Veterinário do Restelo (HVR), nas áreas de clínica e de cirurgia de animais de companhia, sob a orientação científica da Dr.^a Maria João Dinis da Fonseca. Os objectivos principais deste estágio foram a preparação do autor para a vida profissional, com a aplicação prática dos conhecimentos adquiridos ao longo do curso, e a realização de um trabalho prático científico.

O estágio foi efectuado num horário rotativo diário, que abrangeu períodos diurnos, nocturnos, fins-de-semana e feriados, de modo a possibilitar o acompanhamento de todo o tipo de situações clínicas, incluindo urgências. O autor participou nas consultas, nas cirurgias e no internamento. Nas consultas das várias especialidades, houve o acompanhamento do clínico veterinário na realização da anamnese, do exame físico e dos exames complementares. No internamento, foi possível acompanhar, monitorizar e administrar medicação a cada animal. No bloco cirúrgico, o autor acompanhou os pacientes antes, durante e após as cirurgias, realizando os exames pré-anestésicos, a monitorização da anestesia, o auxílio durante a cirurgia e no recobro desta.

O tema inicial de dissertação foi a leishmaniose felina (LFel) tendo sido escolhido com a ajuda da Dr.^a Maria João Dinis da Fonseca e da Prof.^a Doutora Isabel Pereira da Fonseca (Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa). Posteriormente, e devido à importância da dirofilariose felina (DFel) noutros países, esta doença foi adicionada como um novo tema de dissertação. Tanto a LFel como a DFel são doenças parasitárias zoonóticas transmitidas por vectores de elevada prevalência e importância na população canina da Área Metropolitana de Lisboa (AML) estando, no entanto, pouco estudadas na população felina.

A presente dissertação encontra-se dividida em três partes. A primeira parte consiste na descrição das actividades efectuadas durante o estágio curricular, que decorreu de 1 de Setembro de 2008 a 1 de Março de 2009, e que excedeu largamente as 500 horas previstas no regulamento. A segunda parte inclui uma monografia sobre a DFel e a LFel. Esta monografia teve como objectivo principal a actualização e a compilação do conhecimento sobre essas duas doenças, permitindo uma melhor compreensão da sua importância em Medicina Veterinária e em Saúde Pública. Para a LFel, doença em que a informação é muito limitada, foram revistos e compilados todos os 49 casos existentes na literatura científica mundial. A terceira parte desta dissertação corresponde à análise dos resultados obtidos do rastreio de DFel e de LFel efectuado em 70 gatos da AML, durante o período de estágio no HVR. O objectivo foi determinar, pela primeira vez na AML e em Portugal, a prevalência de infecção por *Dirofilaria immitis* em gatos e confirmar as prevalências de exposição a *Leishmania infantum* obtidas em estudos prévios.

I. Descrição das actividades efectuadas no estágio curricular

1. Casuística observada na área clínica

De entre os animais que compareceram às consultas (Tabela 1), a espécie canina foi a que apresentou maior frequência relativa (53,5%), seguida da espécie felina (42,8%) e dos animais exóticos (3,7%).

Tabela 1 – Frequência relativa dos animais observados nas consultas por espécie			
Cães (<i>Canis lupus familiaris</i>)	53,5%	Tartarugas (<i>Trachemys scripta</i>)	0,3%
Gatos (<i>Felis catus</i>)	42,8%	Caturras (<i>Nymphicus hollandicus</i>)	0,3%
Coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	1,1%	Iguanas verdes (<i>Iguana iguana</i>)	0,2%
Chinchilas (<i>Chinchilla lanigera</i>)	0,7%	Papagaios (<i>Amazona</i> sp. e <i>P. erithacus</i>)	0,2%
Hamsters anões (<i>P. sungorus</i>)	0,3%	Piriquitos-comuns (<i>M. undulatus</i>)	0,2%
Porcos-da-índia (<i>C. porcellus</i>)	0,3%	Ratazanas (<i>Rattus norvegicus</i>)	0,1%

Durante o estágio, assistiram-se a diferentes tipos de consultas, que se dividiram em consultas de patologia clínica (72%), reavaliações/tratamentos (19%) e imunoprofilaxia/desparasitação (9%). Do total das consultas de imunoprofilaxia/desparasitação, 67% foram efectuadas em cães e 28% em gatos. Como o HVR é um hospital de referência em diversas especialidades clínicas, não foi de surpreender que a área de patologia clínica tenha sido a que apresentou maior número de animais nas consultas. Na Tabela 2, foram listadas as frequências relativas das consultas observadas por especialidade. De referir que, os cães apresentaram-se com elevada frequência a consultas de gastroenterologia e os gatos a consultas de nefrologia e de urologia. É de salientar que cada animal pode apresentar mais do que uma doença, sendo por isso observado em mais do que uma especialidade.

Tabela 2 – Frequência relativa das consultas observadas por especialidade			
Gastroenterologia	18%	Reprodução	5%
Nefrologia/urologia	14%	Neurologia	4%
Dermatologia	12%	Endocrinologia	4%
Hematologia/Infecçiology	10%	Toxicologia	4%
Cardiologia	8%	Oftalmologia	3%
Pneumologia	8%	Odontologia	2%
Oncologia	6%	Outros	2%

As consultas de tratamento e reavaliação (Tabela 3) incluíram a revisão ou tratamento dos animais após intervenções cirúrgicas ou consultas prévias. Neste grupo também se incluíram algumas intervenções que não foram realizadas durante a consulta propriamente dita, mas que estão relacionadas com ela, como por exemplo as necrópsias, transfusões e eutanásias.

Tabela 3 – Frequência relativa das consultas de tratamento e reavaliação			
Pensos	43%	Eutanásia	10%
Remoção de pontos/agrafos	16%	Necrópsia	6%
Cateterização vesical	10%	Transfusão	5%
Fluidoterapia subcutânea	10%		

2. Casuística observada na área cirúrgica

A área de cirurgia incluiu três tipos de intervenções: cirurgia de tecidos moles (65%), pequenas cirurgias (25%) e cirurgia ortopédica (10%) Nas pequenas cirurgias (Tabela 4), foram incluídas aquelas em que o animal, salvo raras exceções, apenas necessitou de uma anestesia local ou de uma sedação ligeira.

Tabela 4 – Frequência relativa das pequenas cirurgias			
Suturas	28%	Remoção de cavilhas	6%
Cistocentese	26%	Destartarização	6%
Abdominocentese	14%	Biópsia	4%
Toracocentese	12%	Pericardiocentese	4%

A cirurgia de tecidos moles (Tabela 5) foi o tipo de cirurgia observado com maior frequência durante o período de estágio, podendo ser dividido consoante a região em que se interveio.

Tabela 5 – Frequência relativa das cirurgias de tecidos moles			
Aparelho reprodutor feminino	30%	Aparelho ocular	6%
Aparelho reprodutor masculino	16%	Aparelho urinário	4%
Glândulas mamárias (neoplasias)	15%	Aparelho auditivo	2%
Aparelho digestivo	12%	Outras localizações	15%

3. Meios complementares de diagnóstico observados

Os exames complementares são muitas vezes necessários para a realização de um diagnóstico definitivo e para a monitorização de um paciente em tratamento (Tabela 6). De notar que, o mesmo animal pode ser sujeito a diferentes exames de diagnóstico complementares.

Tabela 6 – Frequência relativa dos meios complementares de diagnóstico observados			
Ecografia abdominal	27,0%	Determinação da pressão arterial	2,0%
Radiografia	20,0%	Punção da medula óssea	1,0%
Hematologia e bioquímica	17,0%	Pesquisa de dermatófitos	0,7%
Punção aspirativa com agulha fina	9,0%	Eletrorretinografia	0,7%
Urianálise	6,0%	Biópsia de pele	0,6%
Electrocardiograma	6,0%	Raspagem de pele	0,5%
Testes rápidos de diagnóstico	5,0%	Mielografia	0,3%
Ecocardiografia	4,0%	Endoscopia	0,1%

II. Monografia sobre dirofilariose felina (DFel) e leishmaniose felina (LFel)

II.A. Dirofilariose felina

1. Etiopatogenia

1.1. Taxonomia e referência histórica

Dirofilaria immitis (Leidy, 1856) é um nemátodo parasita pertencente à superfamília *Filarioidea* e à família *Onchocercidae* (UniProt, 2009). Este agente é há muito tempo reconhecido como o causador de dirofilariose canina (DCan). Em Itália, Birago (1626, citado por Genchi, Rinaldi, Cascone, Mortarino, & Cringoli, 2005a) publicou um tratado de caça onde referia a observação do parasita no coração direito de um cão. No Brasil, Travassos (1921, citado por Labarthe, Ferreira, Guerrero, Newcomb, & Paes-de-Almeida, 1997) relatou o primeiro caso de dirofilariose felina num gato doméstico (*Felis catus*).

1.2. Morfologia e fisiologia do parasita

Os adultos de *D. immitis* são filiformes e encontram-se sobretudo no ventrículo direito e nas artérias pulmonares dos seus hospedeiros. Eles alimentam-se de plasma e podem viver vários anos. Apresentam uma abertura oral terminal sem lábios e rodeada por duas papilas laterais e seis papilas mediais pequenas. Nos cães, a fêmea adulta mede entre 250 e 310 mm de comprimento e 1 a 1,3 mm de largura e o macho mede entre 120 e 200 mm de comprimento e 0,7 a 0,9 mm de largura (Manfredi, Cerbo, & Genchi, 2007). Nos gatos, apresentam tamanhos menores, as fêmeas adultas medem em média 220 mm e os machos 150 mm de comprimento (Hayasaki, Okajima, Song, & Shiramuzi, 2003). Os adultos possuem cordões laterais largos, um intestino pouco volumoso e uma cutícula lisa, espessa e com múltiplas camadas (Bowman, Lynn, Eberhard, & Alcaraz, 2003).

O macho apresenta a extremidade caudal em espiral com duas asas laterais curtas. A face ventral apresenta as papilas pré-anais, per-anais e pós-anais. As espículas são alargadas na extremidade proximal e afiladas na extremidade distal, sendo ligeiramente assimétricas. Não possuem gubernáculo. Apresentam uma cutícula lisa, sendo que as pregas e as estriações estão apenas presentes na face ventral da última espiral da cauda do macho (Uni & Takada, 1986, Lichtenfels *et al.*, 1987, citados por Manfredi *et al.*, 2007).

As fêmeas apresentam a terminação caudal obtusa, o ânus é subterminal e a abertura vulvar localiza-se posterior à junção do esófago com o intestino. Elas apresentam um par de úteros. As fêmeas são ovovivíparas libertando as larvas (microfilárias) já descapsuladas na corrente sanguínea (Manfredi *et al.*, 2007). As microfilárias medem, em média, 315 µm de comprimento e 6 a 7 µm de largura (Dillon, 2007). A extremidade cefálica é afunilada e a cauda é recta e pontiaguda. As microfilárias chegam a viver dezoito meses na corrente sanguínea dos canídeos (Manfredi *et al.*, 2007).

1.3. O endossimbionte *Wolbachia*

A maioria dos nemátodos filarídeos, incluindo *D. immitis*, hospeda bactérias intracelulares obrigatórias Gram-negativas, endossimbiontes, pertencentes ao género *Wolbachia* (ordem *Rickettsiales*). Estas bactérias são encontradas em todos os estados de desenvolvimento do parasita e são muito abundantes na hipoderme, nos órgãos reprodutores femininos, nos oócitos e nos embriões. As bactérias do género *Wolbachia* são transmitidas verticalmente pelas fêmeas, através do citoplasma do ovo. A natureza simbiótica destes agentes é apoiada pelos seguintes factos: a prevalência de *Wolbachia* é de 100% em *D. immitis*, os estudos filogenéticos comprovam uma co-evolução da bactéria com o nemátodo, ocorre sempre transmissão vertical das fêmeas para a descendência, a eliminação de *Wolbachia* leva à esterilidade das fêmeas e em alguns casos à morte dos adultos (Kramer, 2006). O nemátodo hospedeiro supre as necessidades da bactéria em aminoácidos. Por outro lado, *Wolbachia* sintetiza várias moléculas importantes para o hospedeiro como glutathione (antioxidante) e heme (essencial à síntese de hormonas do nemátodo responsáveis pela embriogénese) (Foster *et al.*, 2005). As bactérias do género *Wolbachia* são libertadas em quantidades consideráveis do corpo do parasita durante as mudas, na produção de microfírias e quando os parasitas morrem (Bandi, Trees & Brattig, 2001) e, possivelmente, através do sistema excretor tanto do macho como da fêmea (Kozek, 2005).

1.4. Ciclo biológico do parasita

D. immitis é um parasita com um ciclo de vida heteroxeno, ocorrendo parte do seu desenvolvimento num hospedeiro invertebrado, um mosquito culicídeo.

1.4.1. Características dos hospedeiros invertebrados

Os culicídeos são dípteros com 2 a 10 mm de comprimento. Somente as fêmeas são hematófagas. As suas peças bucais são constituídas por uma probóscide saliente adaptada à perfuração e à sucção. Apresentam um ducto salivar produtor de anticoagulante (Urquhart, Armour, Duncan, Dunn, & Jennings, 1996) e utilizam o fototropismo, estímulos químicos (dióxido de carbono e feromonas) e térmicos para encontrar um hospedeiro onde efectuem a refeição de sangue (Cancrini & Gabrielli, 2007). Depois de se alimentarem de sangue, as fêmeas põem até 300 ovos na superfície da água. A eclosão e a maturação larvar dependem da temperatura. Todos os quatro estados larvares são aquáticos e alimentam-se de matéria orgânica. As pupas são aquáticas, móveis e em forma de vírgula. Os adultos emergem através de uma fenda no tegumento pupal e normalmente voam apenas algumas centenas de metros dos criadouros, podendo, no entanto, dispersar-se por longas distâncias auxiliados pelo vento. Em algumas espécies de regiões temperadas, os ovos, as larvas e até os adultos podem sobreviver ao Inverno (Urquhart *et al.*, 1996).

Para servirem de vectores para *D. immitis*, os mosquitos devem sobreviver à infecção e viver tempo suficiente que permita o desenvolvimento das dirofilárias (Gomes, Serrão, Duarte, Bendas, & Labarthe, 2007). Factores que afectam a transmissão de *D. immitis* incluem a densidade da população, as espécies de vectores, a fecundidade dos mosquitos (Ludlam *et al.*, 1970, citados por Lai, Tung, Ooi & Wang, 2000), a exposição a predadores e o comportamento alimentar do insecto (Cancrini & Gabrielli, 2007). As diferentes espécies de mosquitos apresentam comportamentos alimentares distintos, com picos de actividade em momentos específicos do dia, sendo mais ou menos exo/endofágicos e endo/exofílicos. Uns são zoofílicos estritos (limitando a sua alimentação a hospedeiros específicos) ao passo que outros são zoofílicos amplos (ampla variedade de hospedeiros). A idade da fêmea e o período de privação de sangue a que esteve sujeita influenciam a sua actividade (Nayar & Sauerman, 1973, Klowden, 1996, citados por Cancrini & Gabrielli, 2007). Sabe-se que espécies de mosquitos que necessitem efectuar mais do que duas refeições de sangue são epidemiologicamente mais importantes (Cancrini & Gabrielli, 2007).

Os hábitos alimentares dos vectores têm sido uma razão para as baixas taxas de infecção dos gatos. Para que ocorra transmissão de *D. immitis* para esta espécie, o vector deve alimentar-se primeiro em canídeos pois estes são os principais hospedeiros reservatórios do parasita (McCall *et al.*, 1992, citados por Gomes *et al.*, 2007). As preferências alimentares dos vectores devem-se principalmente às feromonas, ao tamanho e ao comportamento dos hospedeiros. Sabe-se que o cão repousa nas horas nocturnas, ao passo que o gato se encontra mais activo nesse período. O tamanho do cão é também superior ao do gato (Cancrini & Gabrielli, 2007). Demonstrou-se que quando mosquitos *Aedes* encontram cães e gatos lado a lado, são mais atraídos para os cães do que para os gatos (Labarthe, Serrão, Melo, Oliveira, & Lourenço-de-Oliveira, 1998). Apesar disso, os gatos podem ser também uma importante fonte de refeições de sangue para estes mosquitos. Os mosquitos *Culex* spp., que são os mais comuns em muitas áreas urbanas, alimentam-se tanto no cão como no gato sem qualquer preferência (Nelson *et al.*, 2007). Num estudo efectuado no Brasil, mosquitos dos géneros *Culex*, *Aedes*, *Coquillettidia*, *Psorophora* e *Mansonia* alimentaram-se tanto em cães como em gatos (Gomes *et al.*, 2007). Aproximadamente 60 espécies de mosquitos testadas em laboratório mostraram-se capazes de suportar o completo desenvolvimento larvar (até L3) de *D. immitis* (Ludlam *et al.*, 1970, citados por Lai *et al.*, 2000). Na Coreia do Sul, Lee, Kim, Chong, Klein e Lee (2007) encontraram mosquitos dos géneros *Anopheles*, *Aedes*, *Culex* e *Armigeres* infectados com *D. immitis*. Outros estudos, realizados em Itália, provaram que as espécies *Aedes albopictus*, *Culex pipiens*, *Anopheles maculipennis* e *Coquillettidia richiardii* são vectores de *D. immitis* (Rossi *et al.*, 2002, Cancrini *et al.*, 2003a, 2003b, 2004, 2006, citados por Cancrini & Gabrielli, 2007).

1.4.2. O parasita no hospedeiro invertebrado

A fêmea adulta de *D. immitis* liberta microfilárias na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. Posteriormente, os mosquitos infectam-se com as microfilárias enquanto realizam uma refeição de sangue. As microfilárias ingeridas atravessam a faringe e alcançam o intestino médio onde se mantêm por 24 horas, migrando depois para as células distais dos túbulos de Malpighi onde se tornam intracelulares. Durante 10 a 14 dias, transformam-se no primeiro estado larvar L1 (70 µm de comprimento), depois em L2 e finalmente em L3 (1.100 µm de comprimento) (Cancrini & Gabrielli, 2007). As larvas em desenvolvimento destroem as células dos túbulos de Malpighi, desregulando a excreção de água e iões dos mosquitos. Um pequeno número de larvas pode não afectar muito o processo de excreção, mas grandes cargas parasitárias, aumentam a possibilidade de destruição do sistema excretor (Palmer *et al.*, 1986, citados por Lai *et al.*, 2000) resultando na morte do mosquito. Por essa razão, algumas espécies possuem mecanismos de defesa para bloquear o desenvolvimento larvar e consequentemente controlar a carga larvar infectante. Um dos mecanismos mais importantes é a presença de armadura bucofaríngea (estrutura que promove a destruição da cutícula das microfilárias quando estas atravessam a faringe) (Coluzzi & Trabucchi, 1968, citados por Cancrini & Gabrielli, 2007). As espécies que possuem essa armadura são vectores pouco eficientes de *D. immitis* (Manfredi *et al.*, 2007). No máximo, 10 a 12 L3 podem ser transmitidas por um único mosquito (Dillon, 2007). As L3 deixam os túbulos de Malpighi, migram através do hemocélio e alcançam o *labium* no aparelho bucal do mosquito (Cancrini & Gabrielli, 2007). Enquanto o insecto pica o vertebrado, as L3 infectantes emergem do *labium* e ficam na pele do hospedeiro imersas numa gota de hemolinfa. Penetram depois através da abertura feita durante a picada do mosquito (Nelson, 1959, Nelson *et al.*, 1962, citados por Cancrini & Gabrielli, 2007). De notar que, a larva mantém-se coberta com hemolinfa e só assim consegue evitar a desidratação, manter a sua mobilidade, ou caso contrário, a infecção falhará (Fülleborn, 1908, Ewert, 1967, Ewert & Ho, 1967, McGreevy *et al.*, 1974, citados por Theis, 2005). Devido a este facto, cerca de 45% das larvas infectantes perdem-se na superfície da pele, sendo que o processo de transmissão do mosquito para o hospedeiro vertebrado é pouco eficiente (Ewert & Ho, 1967, citados por Theis, 2005).

1.4.3. *D. immitis* no hospedeiro vertebrado

As L3 entram na solução de continuidade originada pela picada e penetram nos tecidos conjuntivos. Algumas morrem nos tecidos subcutâneos onde são incorporadas em granulomas pequenos e clinicamente inaparentes (Orihel, 1961, Wong, 1974, citados por Theis, 2005). Depois as L3 migram até aos músculos, transformam-se em L4 (8,29 a 13,2 mm de comprimento) e posteriormente em L5. Esta migração dura cerca de 60 a 90 dias (Kume & Itagaki, 1955, Lichtenfels *et al.*, 1985, citados por Manfredi *et al.*, 2007). No início

do quinto estado larvar, as larvas entram nas veias periféricas, alcançam o coração e o ventrículo direito de onde são enviadas para os ramos distais das artérias pulmonares, encontrando aí resistência mecânica à sua progressão. Se uma larva entrar numa artéria, não alcançará o lado venoso da circulação e desenvolver-se-á no ramo arterial. Já foram encontradas dirofilárias na aorta, nas artérias femorais, ilíacas, esplênicas, renais, hepáticas, carótidas e cerebrais dos cães (Theis, 2005).

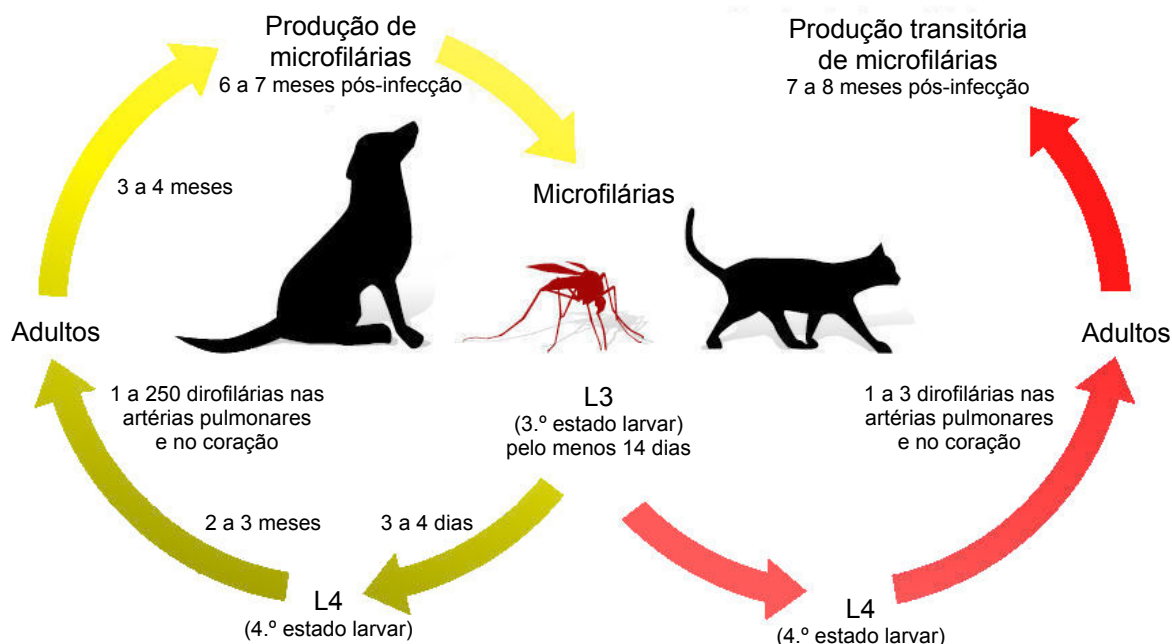
Entre 90 a 100 dias pós-infecção, ocorre a chegada das L5 (10 a 20 mm de comprimento) às artérias pulmonares distais caudais, e nos 2 a 3 meses seguintes desenvolvem-se em adultos sexualmente maduros, migrando em direcção ao ventrículo direito (Dillon, 2007). Os gatos são mais resistentes à infecção por adultos de *D. immitis* do que os cães (Atkins, 2007a). Nos cães, a maioria das L5 que chegam aos pulmões sobrevivem e desenvolvem-se em adultos. Nos gatos, existe uma alta mortalidade das L5 iniciais, sendo frequente que todas elas morram durante os meses seguintes. Logo, nos 6 a 7 meses pós-infecção é comum não existirem adultos de *D. immitis* nos gatos (Dillon, 2007).

Quando cães não previamente expostos a dirofilárias são injectados com 100 larvas L3, aproximadamente 75 dirofilárias adultas desenvolvem-se em quase 100% desses animais. Ao invés, nos gatos, 3 a 10 dirofilárias adultas desenvolvem-se em 75% dos animais (Nelson *et al.*, 2007). No estudo efectuado por McTier *et al.* (2000a), a inoculação de 50 larvas de *D. immitis* em cães resultou em 100% de infecções por adultos com uma média de 18,7 adultos por cão, ao passo que uma inoculação com o mesmo número de larvas em gatos, resultou em 88% de infecções por adultos com uma média de 1,1 parasitas adultos por gato.

Em infecções experimentais com larvas L3, em gatos, a percentagem que se desenvolveu em adultos foi baixa (0% a 25%) comparada com os cães (40% a 90%) (AHS, 2009).

No estudo realizado por C. Genchi, Venco, Ferrari, Mortarino, e M. Genchi (2008) com 364 gatos naturalmente infectados e com anticorpos anti-*D. immitis* apenas 131 apresentaram parasitas adultos. O número baixo de adultos de *D. immitis* (um a três) encontrado tanto nas infecções experimentais (Genchi *et al.*, 2004) como nas infecções naturais dos gatos (Genchi *et al.*, 1992, Guerrero *et al.* 1992, citados por Genchi *et al.*, 2004; Roncalli, Yamane & Nagata, 1998) é característico da DFel. Nos gatos, os parasitas adultos também não alcançam um tamanho comparável com o alcançado nos cães (Hayasaki *et al.*, 2003). Porém, devido ao seu tamanho em relação ao corpo dos gatos, mesmo um número reduzido de dirofilárias é, de igual forma, considerado como uma infecção importante devido à biomassa do parasita (Nelson *et al.*, 2007). Para além disso, o tempo de vida médio do parasita adulto nos gatos é de dois a três anos, o que é consideravelmente menor que o tempo de vida médio (de cinco a sete anos) nos cães (Donahoe, 1975, McCall *et al.*, 1994, citados por Miller, 1998a). Finalmente, nos gatos, aproximadamente um terço das infecções por adultos são constituídas por dirofilárias de um único sexo (Nelson *et al.*, 2007).

Figura 1 – Ciclo biológico de *D. immitis*
(adaptado de <http://www.heartwormsociety.org/download/HeartwormLifeCycle.pdf>; Mai 2, 2009)



1.4.3.1. Microfilarémia

Quando existem infecções com adultos de ambos os sexos pode ocorrer a cópula e as fêmeas produzem microfilárias que libertam na circulação (Manfredi *et al.*, 2007). Nos gatos, mesmo quando ambos os sexos estão presentes nem sempre ocorre microfilarémia (Levy, 2007a). Nesta espécie, *D. immitis* tem uma maturação mais lenta que nos cães (McCall *et al.*, 1994, Genchi *et al.*, 1995, citados por Prieto, Venco, Simón, & Genchi, 1997), o ciclo de vida é mais prolongado, sendo que a microfilarémia, quando observada, não ocorre antes de 7 a 8 meses pós-infecção comparado com 5,5 a 6 meses nos cães (Donahoe, 1975, McCall *et al.*, 1994, citados por Miller, 1998a). Os gatos não desenvolvem com frequência microfilarémia, sendo que as microfilárias circulantes são encontradas em menos de 20% dos gatos infectados naturalmente (Miller, 1998a). Quando existente, a microfilarémia é transitória (Nogami *et al.*, 2000) não durando mais que dois meses e com baixas concentrações de microfilárias no sangue (Donahoe, 1975, McCall *et al.*, 1994, citados por Miller, 1998a). Quando a microfilarémia se desenvolve nos gatos, surge pelo menos uma semana depois relativamente aos cães (195 dias pós-infecção), mas raramente persiste para lá dos 228 dias pós-infecção (Nelson *et al.*, 2007).

A concentração de microfilárias no sangue periférico parece apresentar um padrão sub-periódico noturno semelhante ao que ocorre nos cães, com um pico de concentração às 21:00 horas, segundo Hayasaki *et al.* (2003) ou às 22:00 horas, segundo Nogami *et al.* (2000). Esta variação de concentração de microfilárias no sangue periférico pode depender de factores endógenos das microfilárias ou até de fototaxia (Hayasaki *et al.*, 2003).

Pensa-se que as infecções felinas por *D. immitis* não apresentam frequentemente microfilarémia devido à eliminação imunomediada das microfilárias pelo gato ou à supressão da fertilidade dos adultos de *D. immitis* (Nelson *et al.*, 2007; Levy, 2007a). Dirofilarías adultas provenientes de gatos, que não apresentavam microfilarémia, já foram transplantadas em cães onde esses parasitas foram capazes de produzir microfilárias circulantes (Nelson *et al.*, 2007).

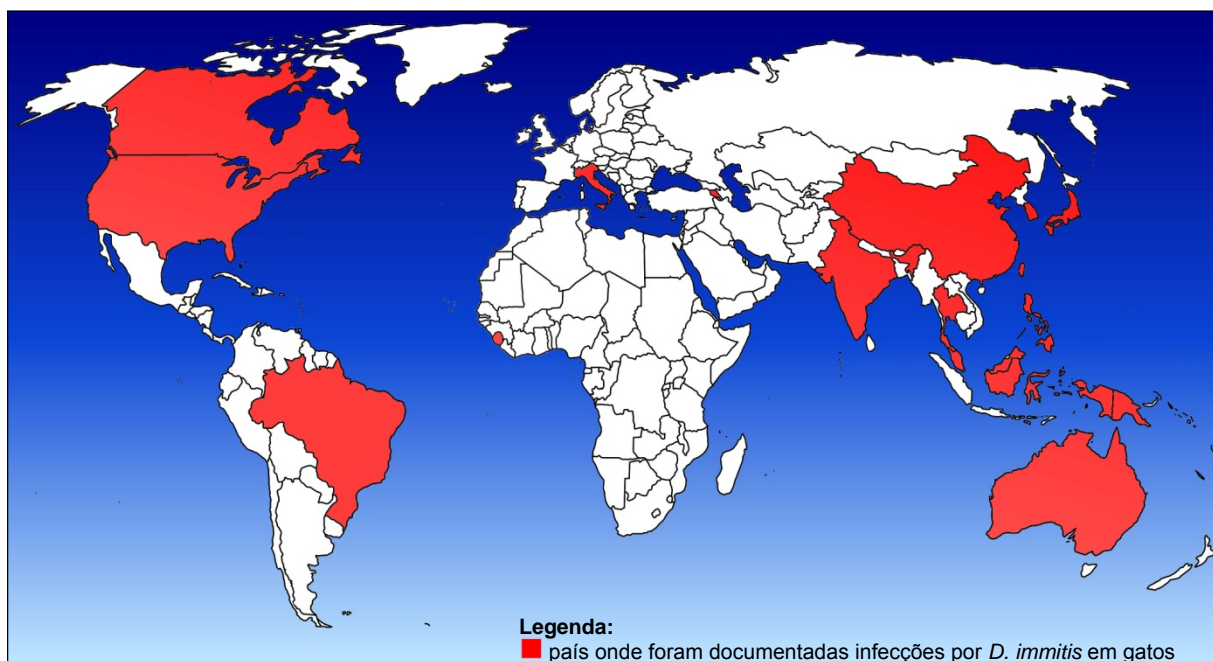
1.4.3.2. Migrações erráticas

Uma indicação de que o gato é um hospedeiro aberrante para *D. immitis* é a ocorrência de migrações erráticas mais frequentes do que nos cães. Os parasitas ectópicos são encontrados com maior frequência nas cavidades corporais, artérias sistêmicas e sistema nervoso central dos gatos (Miller, 1998a; Nelson *et al.*, 2007). Existem vários casos relatados onde adultos de *D. immitis* foram retirados do encéfalo de gatos durante as necrópsias (Ader, 1979, Cusick *et al.*, 1976, Donahoe & Holzinger, 1974, Fukushima *et al.*, 1984, Lindquist & Winters, 1981, citados por Bowman, Hendrix, Lindsay & Barr, 2002).

2. Prevalência e incidência clínica de dirofilariose felina

Em tempos tida como uma doença rara nos gatos, a DFel é diagnosticada cada vez com maior frequência (Labarthe *et al.*, 1997), tanto devido à possível ocorrência de maior número de infecções, como à existência de melhores capacidades de diagnóstico e de maior atenção por parte dos médicos veterinários (Lister & Atwell, 2008b).

Figura 2 – Mapa com os países onde foram documentadas infecções por *D. immitis* em gatos
(mapa original)



2.1. Distribuição geográfica e endemidade da infecção por *D. immitis* em gatos

As infecções por *D. immitis* já foram relatadas em todos os continentes, sobretudo em regiões tropicais e temperadas (Lee *et al.*, 2007). As infecções por *D. immitis* em gatos já foram documentadas nos Estados Unidos da América (EUA), Filipinas, Tahiti, Nova Guiné, Indonésia, China, Austrália, Índia, Taiwan (Kendall *et al.*, 1991, Patnaik, 1989, Fei & Mo, 1997, citados por Bowman *et al.*, 2002), Japão (Roncalli *et al.*, 1998), Tailândia (Nuchprayoon *et al.*, 2006), Brasil (Labarthe *et al.*, 1997), Itália (Kramer & Genchi, 2002), República da Coreia do Sul (Liu *et al.*, 2005), Malásia, Serra Leoa, Arménia e Canadá (Ryan & Newcomb, 1995, citados por Litster & Atwell, 2008b).

2.2. Factores de susceptibilidade dos gatos à infecção por *D. immitis*

2.2.1. Factores intrínsecos: o sexo, a idade, a raça e o tamanho da pelagem

Baseado em estudos clínicos serológicos e estudos retrospectivos não existe predisposição para sexo, idade ou raça para a infecção por *D. immitis* em gatos (Miller, Zoran, & Relford, 1998, Atkins, DeFrancesco, & Coats, 1998, citados por Miller, 1998a). Infecções experimentais e alguns estudos seroepidemiológicos sugeriram que os gatos machos fossem mais susceptíveis à infecção (Kramer & Genchi, 2002; Levy *et al.*, 2003; Atkins, Moresco & Litster, 2005b). No entanto, em vários estudos, não houve diferenças significativas na prevalência de infecção entre machos e fêmeas quer em infecções naturais (Genchi *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2005) quer em estudos experimentais (McCall *et al.*, 1992, citados por Genchi *et al.*, 2008).

2.2.2. Factores extrínsecos: o modo de vida, o ambiente e as doenças concomitantes

Os gatos com exposição ao exterior apresentam um risco aumentado de infecção (Atkins & Paul, 2006). No entanto, é importante salientar que a DFel foi diagnosticada em gatos que viviam exclusivamente no interior de habitações. No estudo de Atkins *et al.* (2000, citados por Litster & Atwell, 2008b), observou-se que 27% dos gatos infectados viviam apenas no interior de habitações.

No estudo de Nelson e Young (1998, citados por Miller, 1998a) observou-se que os gatos infectados com o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) tinham uma incidência significativamente maior de anticorpos circulantes anti-*D. immitis* que a população em geral, sugerindo que os gatos com risco de exposição a FIV também apresentam um maior risco de exposição a *D. immitis*. No entanto, em estudos posteriores não houve associação entre infecção por *D. immitis* e co-infecções por FIV ou por Vírus da Leucemia Felina (FeLV) (Levy *et al.*, 2003; Levy, 2007a).

2.2.2.1. A importância do clima na transmissão de dirofilariose felina

O calor é o factor fundamental para o desenvolvimento das larvas infectantes (L3) no hospedeiro intermediário. O período durante o qual a transmissão é possível é definido por alterações sazonais de temperatura nas regiões temperadas (Knight & Lok, 1998). O denominador crítico é a quantidade cumulativa de calor requerida para se completar a incubação. Este pode ser expresso em graus-dias, também referido como unidades de desenvolvimento de *D. immitis* (UDD) (Fortin & Slocombe, 1981, Slocombe *et al.*, 1989, citados por Genchi *et al.*, 2005a). Em média, é necessário um total de 234 UDD (130 °C) para suportar o desenvolvimento das microfilárias até larvas L3 infectantes, podendo ser alcançado num período tão curto como oito dias, quando a temperatura diária média é de cerca 30 °C, mas pode levar tanto tempo como um mês quando é tão baixa quanto 18 °C (McTier, McCall, & Dzimianski, 1992, citados por Knight & Lok, 1998). Para que o desenvolvimento se inicie, o limite de 14 °C deve ser excedido (Knight & Lok, 1998). Os meses pico de transmissão de dirofilariose no Hemisfério Norte são Julho e Agosto. (Montoya, Morales, Juste, & Corbera, 2007). Em áreas tropicais os mosquitos encontram-se activos todo o ano. Nos climas temperados, os adultos são activos apenas na Primavera e no Verão, e apresentam diferentes ritmos sazonais de actividade. Alterações ambientais e climáticas, em particular, a subida média da temperatura prevista (+0,2 °C em 10 anos) (Genchi *et al.*, 2005a), estão agora a influenciar fortemente os padrões de actividade dos mosquitos nas regiões temperadas (Cancrini & Gabrielli, 2007). A prevalência de DCan tem aumentado dramaticamente nos últimos anos. A doença tem-se estendido desde países tropicais e subtropicais a outros com um clima mais temperado (Montoya *et al.*, 2007). A existência de maiores populações de vectores e a existência de maior número de cães infectados com *D. immitis* fazem aumentar o risco de infecção para a espécie felina.

3. Resposta imunitária

Em contraste com os cães, os gatos desenvolvem uma resposta imunitária mais intensa à presença do parasita (Calvert *et al.*, 1994, citados por McTier *et al.*, 2000a). Até um pequeno número de dirofilárias é potencialmente ameaçador da vida (Nelson *et al.*, 2007). Basta uma dirofilária para causar doença grave a fatal no gato (McCall *et al.*, 1994, Genchi *et al.*, 1995, citados por Prieto *et al.*, 1997).

Os gatos desenvolvem uma forte resposta por IgG contra antígenos de *D. immitis* em infecções naturais (Prieto *et al.*, 1997) e experimentais (Prieto, Simón, Genchi, McCall & Venco, 1999). Esta resposta é capaz de impedir o desenvolvimento da maioria das larvas e de destruir parte dos parasitas adultos (Morchón *et al.*, 2004).

A infecção por *D. immitis* influencia a produção de eicosanóides¹ intravasculares em gatos. No estudo efectuado por Morchón *et al.* (2007b), gatos infectados naturalmente apresentaram níveis de prostaglandina E2, tromboxano B2 e leucotrieno B4 significativamente maiores do que gatos não infectados.

Os antígenos somáticos de adultos de *D. immitis* (ASDi) estimularam a produção das enzimas ciclooxigenase-2 e 5-lipoxigenase e a expressão da molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) e molécula de adesão celular endotelial plaquetária-1 (PECAM-1) (Simón *et al.*, 2008). Logo, os ASDi estão implicados na migração leucocitária transcelular através do citoplasma da célula endotelial bem como na migração dos monócitos e neutrófilos, células-chave na resposta imune desenvolvida pelos hospedeiros contra as dirofírias (Imhof & Aurrand-Loins, 2004, O'Connor *et al.*, 2000, Bratting *et al.*, 2000, 2001, citados por Simón *et al.*, 2008).

A produção de óxido nítrico durante a infecção por *D. immitis* pode também induzir imunotolerância às dirofírias devido à apoptose de células T específicas para os seus antígenos (O'Connor, Jenson, Osborne & Devaney, 2003).

3.1. Diminuição da imunidade do hospedeiro mediada por *D. immitis*

Diferenças acentuadas nas propriedades da superfície das L3 e L4 podem atrasar respostas imunitárias potencialmente destrutivas desses estados larvares no hospedeiro (Grieve, 1990, citado por Litster & Atwell, 2008b). Investigações clínicas e laboratoriais sugerem que a natureza acelular da cutícula de *D. immitis* e as propriedades da superfície trombo-resistentes permitem que o parasita iluda a resposta imune do hospedeiro e aumente a sobrevivência a longo termo (Kadipasaoglu *et al.*, 1993, citados por Litster & Atwell, 2008b). Após a chegada das L5 ao coração (75 a 90 dias pós-infecção), uma marcada resposta brônquica e periarterial é observada nos três meses seguintes. Depois dos adultos se terem desenvolvido, o padrão de inflamação do parênquima pulmonar frequentemente diminui e as artérias pulmonares caudais ingurgitadas, visíveis nas radiografias, podem até diminuir de tamanho (Brawner *et al.*, 2000, citados por Dillon, Warner, Brawner, Hudson & Tillson, 2008). A diminuição da imunidade do hospedeiro mediada pelos nemátodos adultos foi sugerida como sendo uma consequência dos produtos secretados em que os alvos são os macrófagos (Schonemeyer *et al.*, 2001; Loke, MacDonalds, Maizels, Robb & Allen, 2000) e os linfócitos (W. Harnett & M. Harnett, 2006). No gato, os pulmões são órgãos com grande actividade fagocitária. A atenuação da fagocitose dos macrófagos intravasculares pulmonares (MIP) diminui o grau de lesão pulmonar aguda. Os adultos vivos de *D. immitis* parecem diminuir significativamente a actividade desses macrófagos pela libertação de substâncias directamente para o leito capilar (Dillon *et al.*, 2008).

¹ Os eicosanóides são mediadores lipídicos derivados do metabolismo do ácido araquidónico, envolvido na regulação da resposta imune e nas reacções inflamatórias.

3.2. Importância de *Wolbachia* na resposta imunitária do gato

Alguns estudos demonstraram que a Proteína de Superfície Maior de *Wolbachia* (PSW) induz uma resposta específica por IgG no hospedeiro infectado por *D. immitis* (Bazzochi *et al.*, 2003). Essa resposta é forte e duradoura em gatos infectados não tratados e ainda mais acentuada em gatos infectados tratados com compostos larvicidas (Morchón *et al.*, 2004). A morte das dirofilárias resulta numa resposta inflamatória exacerbada devido à libertação de *Wolbachia* (McCall *et al.*, 2008). Pode ser sugerido que a forte e duradoura reacção imunitária dos gatos a *Wolbachia* pode ter um papel na resistência natural destes hospedeiros à infecção por *D. immitis* (Kramer, 2006). Vários autores já demonstraram que a resposta imunitária a *Wolbachia* é predominantemente do tipo Th1 (Marcos-Atxutegi *et al.* 2003; Morchón *et al.*, 2007a) com produção de IFN- γ (Morchón *et al.*, 2007b). Já foi demonstrada a capacidade das moléculas associadas a *Wolbachia* para estimularem a produção de citocinas pró-inflamatórias (Bazzochi *et al.*, 2003), podendo levar o hospedeiro exposto a eliminar as larvas que libertam o endossimbionte (Morchón *et al.*, 2004).

Considera-se que a PSW contribua para a inflamação pulmonar e renal (Nelson *et al.*, 2007). Vários estudos indicam que a PSW aumenta a produção de Ciclooxygenase-2 e 5-Lipoxigenase, enzimas relacionadas com a produção de eicosanóides (Morchón *et al.*, 2007b). Para além dessas enzimas, a forma recombinante da PSW (rPSW) estimulou a produção de várias moléculas capazes de estimular a migração leucocitária transcelular e paracelular bem como a migração dos monócitos e neutrófilos (Simón *et al.*, 2008).

4. Patogenia e sinais clínicos de dirofilariose felina

Na DFel, a maioria dos sinais clínicos e das lesões que colocam o animal em risco da vida estão relacionados com a função pulmonar (Dillon, 2007). Os gatos podem apresentar desde sinais agudos a sinais crónicos (Miller, 1998a). Muitos animais são assintomáticos ou apresentam sinais clínicos inespecíficos e transitórios (Prieto *et al.*, 1997). Quando os sinais clínicos são evidentes, normalmente, desenvolvem-se durante duas fases da doença. A primeira coincide com a chegada das L5 às artérias pulmonares três a seis meses pós-infecção. A segunda fase da doença corresponde à morte das dirofilárias adultas (Prieto *et al.*, 1997; Nelson *et al.*, 2007). Finalmente, após a eliminação do parasita adulto pode permanecer uma doença respiratória crónica (Nelson, 2008).

Os sinais clínicos associados com a morte das larvas L5 ou com a presença de adultos nas artérias pulmonares de gatos infectados com *D. immitis* é denominada “Doença Respiratória Associada à Dirofilariose” (Nelson *et al.*, 2007).

4.1. Fase 1 – Dirofilariose larvar pulmonar

No período de três a seis meses pós-infecção, as L5 alcançam as artérias pulmonares caudais direita e esquerda. Neste estado larvar ocorre uma elevada taxa de mortalidade o que pode justificar a patogenia e os sinais clínicos observados nesta fase. Nos pulmões gera-se uma resposta inflamatória aguda dos vasos e do parênquima (Dillon, 2007). A DFel é caracterizada pela formação de trombos e reacções inflamatórias intensas (McCall *et al.*, 1994, Rawlings & Calvert, 1995, citados por Morchón *et al.*, 2007b). As lesões histológicas mais importantes incluem a endarterite vilosa e a hipertrofia muscular da túnica média das artérias pulmonares. De notar que, estas lesões já foram documentadas em gatos livres de *D. immitis* e logo não são patognomónicas de DFel (Rogers, Bishop, & Rohovsky, 1971, citados por Miller, 1998a). As grandes artérias musculares associadas aos brônquios parecem ser as mais severamente afectadas (Rawlings, Farrell, & Mahood, 1990). Ocasionalmente, existe uma pneumonia granulomatosa e eosinofílica focal no parênquima pulmonar que rodeia as artérias envolvidas (Dillon, 2007). Tipicamente, a citologia broncoalveolar revela uma reacção eosinofílica. Porém, a eosinofilia periférica pode ou não estar presente (Dillon, 2007; Atkins, 2007b).

As alterações alveolares e brônquicas associadas com esta forma inicial de doença são clínica e radiograficamente semelhantes à asma felina ou à bronquite alérgica (Dillon, 2007; Nelson, 2008). Os gatos irão desenvolver lesões brônquicas radiográficas sem alterações arteriais pulmonares, e os sinais clínicos de tosse e/ou dispneia intermitentes responderão ao tratamento com corticosteróides (Dillon, 2007).

À medida que as dirofilárias aumentam de tamanho e crescem em direcção ao coração, as lesões da superfície arterial tornam-se mais evidentes. A inflamação estende-se para o parênquima pulmonar. No leito capilar distal, os septos alveolares desenvolvem edema. A demonstração de antigénio de *D. immitis* nas áreas intersticiais distais devido à presença física dos parasitas explica a disseminação da resposta inflamatória a todo o parênquima pulmonar. Estas alterações são significativamente agravadas quando associadas com a morte dos parasitas (Dillon, 2007).

As infecções felinas por *D. immitis* são frequentemente mais leves que nos cães, sendo as suas lesões localizadas e normalmente insuficientes para causar uma obstrução capaz de produzir hipertensão pulmonar significativa. Consequentemente, a hipertrofia ventricular direita e a insuficiência cardíaca direita são menos comuns que nos cães (Knight, 1987, Doi *et al.*, 1982, citados por Labarthe *et al.*, 1997; Nelson *et al.*, 2007).

Ao longo do tempo, todas as L5 presentes nas artérias pulmonares distais podem morrer, não alcançando a forma adulta. Embora esta forma de dirofilariose possa ser considerada “auto-limitante”, as lesões foram induzidas e os sinais clínicos podem desenvolver-se (Dillon, 2007). As lesões pulmonares caracterizadas por hipertrofia oclusiva das artérias pulmonares são comuns nos gatos com dirofilárias adultas (80%) mas não em gatos livres do parasita e

sem anticorpos anti-*D. immitis* (10%). No estudo de Levy (2007a) verificou-se que 50% dos gatos com anticorpos anti-*D. immitis*, mas sem adultos, tinham estas lesões pulmonares, sugerindo que mesmo infecções transitórias por larvas deixam os gatos com doença inflamatória pulmonar de longa duração. Nos gatos, a existência de dirofilárias adultas não é necessária para que ocorra doença pulmonar clínica. Não se sabe se as lesões resultantes da “dirofilariose larvar pulmonar” são persistentes ou se podem até resultar em morte. No entanto, o gato poderá ter achados radiográficos e histológicos típicos de DFel, contudo não apresentando sinais clínicos (Atkins, 2007b).

4.2. Fase 2 – Doença associada à morte das dirofilárias adultas

À medida que as larvas L5 se transformam em adultos, a inflamação inicial intensa diminui. Segue-se um período subclínico (Litster & Atwell, 2008b). As artérias pulmonares caudais dilatadas nas radiografias ventrodorsais podem até diminuir de tamanho (Dillon, 2007). Foi sugerida uma diminuição da resposta imunitária do hospedeiro mediada pelos produtos secretados dos nemátodos adultos (Schonemeyer *et al.*, 2001; Loke *et al.*, 2000; W. Harnett & M. Harnett, 2006). O parasita parece ser capaz de suprimir a função dos MIP existentes nos leitos capilares pulmonares dos gatos (Dillon *et al.*, 2008).

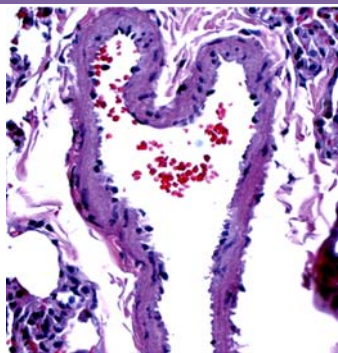
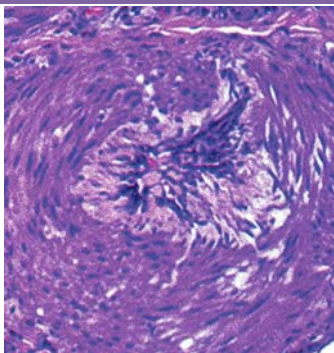
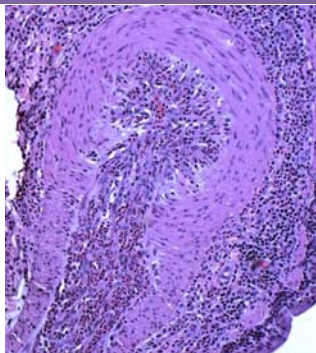

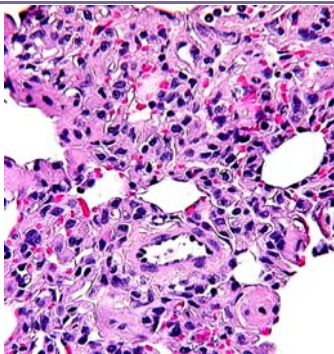
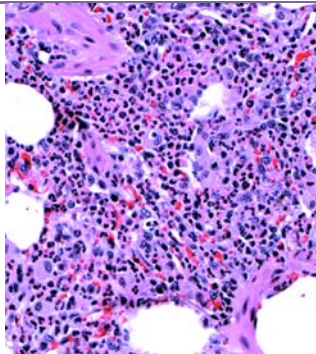
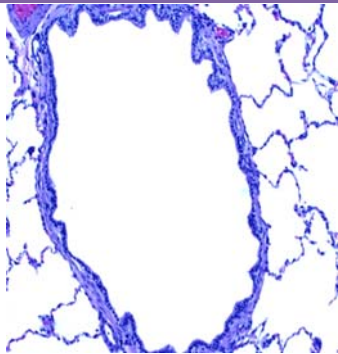
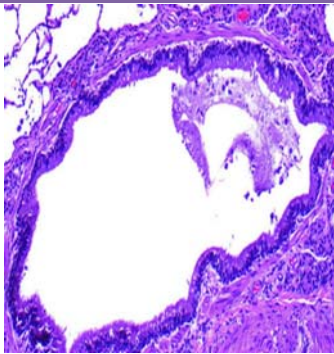
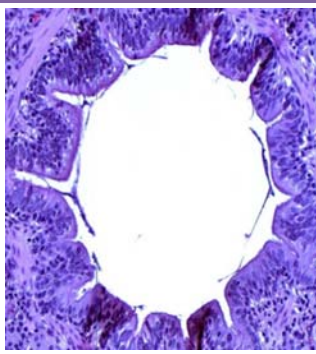
Quando ocorre a morte de um parasita adulto inicia-se a segunda fase da doença (Prieto *et al.*, 1997; Nelson *et al.*, 2007). A supressão da função macrofágica dos MIP é diminuída e ocorre intensa inflamação pulmonar. As lesões microvasculares são severas quando os parasitas estão vivos, mas tornam-se exageradas quando eles morrem. Os pneumócitos do tipo 1 são afastados das células endoteliais deixando muitos sacos alveolares como vias aéreas desprotegidas (Dillon, 2007). Tanto a formação de edema pulmonar como a proliferação de pneumócitos tipo II dificultam a difusão do oxigénio (Atkins, 2005a). Os pulmões desenvolvem periarterite severa, doença intersticial inflamatória aguda e edema intersticial. O epitélio colunar ciliado brônquico pode também ser danificado e sofrer necrose. Os parasitas mortos estão associados com uma doença parenquimatosa pulmonar severa. O resultado é uma síndrome de dificuldade respiratória aguda. A morte espontânea dos gatos com DFel é mais rara comparativamente com a sintomatologia da “dirofilariose larvar pulmonar”. Normalmente, a dispneia severa associada com a DFel é uma consequência da destruição de um adulto de *D. immitis* (Dillon, 2007).

Embora mais severos nos lobos onde as dirofilárias morrem, lesões similares podem ser demonstradas em outros lobos pulmonares. Produziram-se lesões histológicas similares com extractos de *D. immitis* sem células. A lesão pulmonar resultante originou uma síndrome de dificuldade respiratória aguda (Dillon, 2007).

Apesar de se produzir uma endarterite, a embolização e a oclusão vascular total são raras quando os vermes estão vivos (Dillon, 2007). Como a árvore arterial pulmonar dos gatos é

mais pequena que a dos cães e tem menor circulação contralateral, a embolização (mesmo por pequenos números de parasitas) resulta em enfarte e até em morte (Atkins, 2005a). Nos cães, a Síndrome da Veia Cava resulta da deslocação de elevado número de dirofilárias para as veias cavas e a junção atrioventricular direita, interferindo com a função da valva tricúspide. Apesar de já descrita em gatos (Strickland, 1998), esta síndrome raramente ocorre porque estes animais estão com frequência infectados com um número reduzido de parasitas. Apesar disso, mesmo um ou dois parasitas adultos podem causar regurgitação tricúspide e resultar em sopro cardíaco (Nelson *et al.*, 2007).

Figura 3 – Preparações histopatológicas das arteríolas pulmonares, alvéolos e bronquíolos de gatos experimentalmente infectados por *D. immitis* e submetidos a profilaxia, a tratamento larvicida contra L5 e gatos não tratados infectados por adultos (adaptado de http://www.heartwormsociety.org/article_47.html)

Preparação histológica	Gato infectado experimentalmente submetido a profilaxia mensal	Gato submetido a tratamento larvicida contra L5	Gato com infecção por adultos de <i>D. immitis</i> não submetido a tratamento larvicida
Arteríolas pulmonares			
Alvéolos			
Bronquíolos			

4.3. Doença respiratória crónica após a eliminação de *D. immitis*

Se o gato sobreviver à morte dos parasitas (larvas e adultos) poderá continuar a manifestar sinais clínicos decorrentes de lesões pulmonares permanentes. Um exemplo é a hiperplasia dos pneumócitos do tipo II que promove a substituição dos pneumócitos de tipo I (Dillon, Warner & Brawner, 1995, citados por Nelson, 2008).

5. Diagnóstico

A verdadeira prevalência de infecção por *D. immitis* está provavelmente subestimada devido às limitações de diagnóstico, e à maior tendência dos gatos exibirem apenas sinais clínicos transitórios ou morrerem subitamente (Nelson *et al.*, 2007). A incidência clínica global de dirofilariose nos gatos é baixa, logo o índice de suspeita é muitas vezes minorado, a eosinofilia é transitória ou ausente, os achados electrocardiográficos são raros, e a maioria dos gatos não apresentam microfilarémia (Atkins, 2007b). O diagnóstico deve ser realizado com uma combinação de vários testes devido às baixas cargas parasitárias e baixos títulos de antígenos nos gatos (Atkins, 1999, citado por Litster & Atwell, 2008b). As diferenças temporais no desenvolvimento do parasita, a resposta imunitária do hospedeiro e a doença orgânica, assim como a regressão espontânea das lesões, podem levar a discrepâncias entre os achados clínicos, serológicos e radiográficos (Nelson *et al.*, 2007).

5.1. Anamnese e exame físico

5.1.1. Sinais crónicos

Os sinais clínicos associados com a DFel podem ser inespecíficos: letargia, anorexia, perda de peso (Atkins, DeFrancesco & Miller, 1998, Hawkins, 1989, citados por Miller, 1998a; Nelson *et al.*, 2007) e podem comprometer predominantemente o sistema respiratório e gastrointestinal (Miller, 1998a). São frequentes sinais de doença respiratória crónica como uma taquipneia persistente, tosse intermitente e dispneia.

Um sopro cardíaco sistólico pode estar presente quando os parasitas se encontram na junção atrioventricular direita interferindo com a função valvular tricúspide.

O vômito intermitente não relacionado com as refeições é frequentemente reportado e em zonas endémicas quando outras causas não são evidentes pode levantar suspeitas de uma infecção por *D. immitis* (Malik *et al.*, 1998, citados por Bowman *et al.*, 2002; Nelson *et al.*, 2007), no entanto, a sua patogenia permanece desconhecida (Litster & Atwell, 2008b).

Outras anormalidades, como o pneumotórax (Smith, Scott-Moncrieff & Rivers, 1998), o hidrotórax, o quilotórax, a ascite, a ataxia, as convulsões e a síncope já foram relatadas mas são raras (Venco, C. Genchi, M. Genchi, Grandi & Kramer, 2008a; Nelson *et al.*, 2007). Apesar de rara, a insuficiência cardíaca direita e a *cor pulmonale* podem ser associadas a uma DFel crónica e podem manifestar-se através de derrame pleural (hidrotórax ou quilotórax), ascite ou ambos (Atkins, 2005a).

Os parasitas podem alcançar localizações ectópicas como a pele (Dillon *et al.*, 1987, citados por Bowman *et al.*, 2002) ou o encéfalo. Nesses casos, os sinais associados com a infecção estão relacionados com o sistema de órgãos danificado pelas larvas em migração (Bowman *et al.*, 2002).

5.1.2. Sinais agudos

Uma síndrome hiperaguda, consistindo em sinais como dispneia, ataxia, colapso, convulsões, hemoptise, ou, por vezes, morte súbita, pode surgir sem aviso prévio (Nelson *et al.*, 2007). Até à ocorrência desta síndrome, o gato pode ser totalmente assintomático (Genchi *et al.*, 1995, citados por Liu *et al.*, 2005). Na Austrália foi relatado que 47% dos gatos com DFel exibiram morte súbita (Court *et al.*, 2000, citados por Litster *et al.*, 2008a).

O colapso agudo é uma apresentação clínica muito mais frequente na DFel que na DCan (Ralston *et al.*, 1998, citados por Litster, Atkins & Atwell, 2008a). A morte súbita em gatos infectados com *D. immitis* tem sido atribuída ao colapso circulatório e à insuficiência respiratória quer devido a um enfarte arterial pulmonar agudo (Atkins, DeFrancesco & Miller, 1998, Hawkins, 1989, citados por Miller, 1998a) causado por tromboembolismo resultante da morte das dirofilárias adultas (Dvorak, 2000, citado por Litster *et al.*, 2008a) quer a uma reacção anafiláctica precipitada pela morte do parasita (Litster *et al.*, 2008a).

Procedimentos de extracção cirúrgica em que ocorra a dissecação acidental das dirofilárias resultaram numa reacção semelhante a choque agudo e à morte do gato. Sugeriu-se que a destruição da cutícula da dirofilária causa a súbita libertação de grandes quantidades de antigénios, resultando em anafilaxia sistémica aguda (Dvorak, 2000, citado por Litster *et al.*, 2008a). Litster *et al.* (2008a) injectaram antigénios de *D. immitis* IV em gatos, e estes desenvolveram uma reacção semelhante ao choque agudo. A severidade da reacção estava relacionada com a forma e a quantidade dos antigénios administrados.

Apesar de rara, outra causa de morte súbita pode ser a Síndrome da Veia Cava. Esta foi descrita pela primeira vez em gatos por Takehashi *et al.* (1988, citados por Strickland, 1998) e está associada com uma mortalidade elevada e um prognóstico reservado. Venco *et al.* (2008a) relataram a morte de um gato devida a Síndrome da Veia Cava.

5.1.3. Diagnósticos diferenciais

As doenças que apresentam sinais respiratórios semelhantes à DFel e que devem constar da lista de diagnósticos diferenciais incluem asma felina, cardiomiopatia, pneumonia (bacteriana, viral, fúngica ou por protozoários), neoplasias pulmonares (primárias ou metastáticas) e infecções por *A. abstrusus* e *P. kellicotti*. As lesões parenquimatosas pulmonares observadas em todas estas doenças são similares àsquelas observadas na DFel, mas as alterações das artérias pulmonares descritas são únicas desta última doença. Gatos com doença cardíaca primária e insuficiência cardíaca congestiva podem ter alargamento da

artéria pulmonar mas as artérias não ficam tortuosas ou arredondadas e estão normalmente associadas com dilatação pulmonar venosa concorrente. Quando os parasitas adultos alcançam as artérias pulmonares podem causar pneumonite e sinais radiográficos semelhantes aos verificados na asma felina. Nesta fase da doença os títulos de anticorpos serão muito provavelmente positivos, mas o resultado do teste para detecção de antígenos será quase invariavelmente negativo. Estes gatos respondem favoravelmente à administração de corticoesteróides, assim como os gatos com asma, tornando a diferenciação das duas doenças bastante dificultada (Miller, 1998a).

5.2. Diagnóstico laboratorial

Este diagnóstico implica a utilização de distintos métodos, alguns dos quais necessitam de ser repetidos múltiplas vezes. Os métodos mais úteis são a serologia, a radiografia torácica e a ecocardiografia (Nelson *et al.*, 2007). Não existe um teste único capaz de eliminar a suspeita de DFel (Carleton & Tolbert, 2004).

5.2.1. Alterações hematológicas e bioquímicas

As anormalidades detectadas nas análises sanguíneas de rotina são muitas vezes inespecíficas. Um achado frequente é uma anemia não regenerativa e aumento do número de eritroblastos. A eosinofilia é um achado inconstante, mesmo em amostras seriadas. Experimentalmente, a eosinofilia periférica ocorre mais frequentemente quatro a sete meses pós-infecção e depois de forma intermitente. Se ocorrer basofilia periférica associada com eosinofilia, um diagnóstico de DFel deve ser investigado. A hiperglobulinémia é uma das poucas anormalidades bioquímicas frequentemente observadas (Dillon, 1984, citado por Miller, 1998a).

5.2.2. Testes para a detecção de microfilárias

Embora os testes para a detecção de microfilárias tenham um valor baixo de sensibilidade, um teste positivo estabelece um diagnóstico definitivo (Miller, 1998a).

De notar que, em algumas regiões podem ser encontradas microfilárias de *D. repens* (Nelson *et al.*, 2007) sendo necessário proceder à sua distinção relativamente às pertencentes a *D. immitis*, podendo utilizar-se a coloração da fosfatase ácida. As microfilárias de *D. immitis* apresentam uma coloração intensa do poro excretor e do poro anal, enquanto o resto do corpo permanece descorado (Nuchprayoon *et al.*, 2006), as microfilárias de *D. repens* apresentam apenas um local de actividade da fosfatase ácida ao passo que nas microfilárias de *Acantocheilonema* todo o corpo fica corado (Genchi, Venco & Genchi, 2007). Peribáñez *et al.* (2001) propôs a utilização de um teste comercial (Leucognost-SP[®]) pela sua rapidez e simplicidade na distinção das espécies de microfilárias.

Também, técnicas como PCR permitem identificar as várias espécies de microfilárias (Mar, Yang, Chang & Fei, 2002; Nuchprayoon *et al.*, 2006; Rishniw *et al.*, 2006).

5.2.3. Serologia

Desde que haja L5 e adultos capazes de causar sinais clínicos de doença no gato, tanto o teste para a detecção de anticorpos quanto o teste para a detecção de antígenos são ferramentas úteis e quando usados em conjunto aumentam a probabilidade de fazer um diagnóstico apropriado (Nelson *et al.*, 2007). Os estudos de Snyder *et al.* (2000) e de Berdoulay *et al.* (2004) compararam vários testes para a detecção de antígenos e de anticorpos. Estes investigadores concluíram que se obtém uma maior sensibilidade e uma maior especificidade quando há associação de um teste para a detecção de antígenos de *D. immitis* com um teste para a detecção de anticorpos anti-*D. immitis*.

5.2.3.1. Testes para a detecção de antígenos de *D. immitis*

Os testes para a detecção de antígenos disponíveis actualmente detectam antígenos provenientes dos úteros das fêmeas adultas (Weil, 1987; Miller, 1998a). Os testes para a detecção de antígenos aprovados para cães também podem ser utilizados em gatos (Berdoulay *et al.*, 2004). Infecções com baixas cargas parasitárias (uma ou duas fêmeas adultas), constituídas só por machos ou por formas imaturas podem resultar em falsos negativos (Datz, 2003). De notar, que mesmo cães microfilarémicos já obtiveram resultados negativos nos testes para a detecção de antígenos (Vezzani, Fontanarrosa & Eiras, 2008). Um resultado negativo não exclui DFel, mas um resultado positivo dá uma forte evidência de infecção. Estudos efectuados recorrendo a necrópsias demonstraram que 50 a 70% dos gatos infectados apresentam pelo menos um parasita fêmea (Nelson *et al.*, 2007).

Em gatos infectados experimentalmente a antigenémia detectável desenvolveu-se entre os 5,5 e os 6 meses pós-infecção (Dzimianski, J. McCall & C. McCall, 1986, citados por Goodwin, 1998). Os resultados de vários estudos (ecocardiográficos, experimentais e de necrópsia) sugerem que aproximadamente 40% dos gatos infectados por adultos de *D. immitis* apresentam resultados positivos nos testes para a detecção de antígenos (Atkins, DeFrancesco & Coats, 1998, Atkins, DeFrancesco & Miller, 1998, Genchi, Kramer & Venco, 1998, citados por Miller, 1998a).

A maioria dos testes utiliza a técnica de ELISA (em micropoços ou em membrana) ou a técnica de imunocromatografia (Berdoulay *et al.*, 2004).

A sensibilidade dos testes disponíveis no mercado tem aumentado (Vezzani *et al.*, 2008) e estes são altamente eficazes na detecção de infecções com pelo menos uma fêmea adulta (Nelson *et al.*, 2007). Nos EUA, estão aprovados vários testes rápidos, realizáveis nas clínicas ("in-clinic"), que permitem a detecção de antígenos de *D. immitis* a partir de sangue felino. Os laboratórios IDEXX comercializam, desde 2002, o teste "IDEXX's SNAP® Feline

Heartworm” (IDEXX, 2002) (com uma sensibilidade de 79,3%, segundo Berdoulay *et al.*, 2004) e desde 2008, o teste “IDEXX’s SNAP® Feline Triple™” (que além de detectar antígenos de *D. immitis*, detecta antígenos de FeLV e anticorpos de FIV) (IDEXX, 2008). Segundo o fabricante, este último teste apresenta uma sensibilidade de 86,7% e uma especificidade de 100% na detecção do parasita (IDEXX, 2009). A Synbiotics Corporation comercializa o teste DiroCHECK® (Synbiotics, 2009a) (sensibilidade de 86,2% segundo Berdoulay *et al.*, 2004) e o teste Witness® HW (Synbiotics, 2009b).

5.2.3.2. Testes para a detecção de anticorpos anti-*D. immitis* em gatos

Os testes para a detecção de anticorpos anti-*D. immitis* têm a vantagem de serem capazes de detectar a exposição a larvas ou adultos de ambos os sexos que estimulem uma resposta imunitária detectável tão cedo como um a dois meses pós-infecção (McCall, Guerrero, & Supakorndej, 1998, citados por Miller, 1998a; Nelson *et al.*, 2007). Mesmo após a eliminação das larvas, numa infecção imatura, os testes podem manter-se positivos por nove a doze meses (Miller, 1998a). Para os testes felinos de anticorpos anti-*D. immitis* já foi relatada uma sensibilidade tão elevada como 98% e uma igual elevada especificidade (Nelson *et al.*, 2007). Embora, estudos em que foram realizadas necrópsias de gatos naturalmente infectados tenham indicado um intervalo de sensibilidade variando desde 32% a 89% (Nelson *et al.*, 2007), no estudo efectuado por Berdoulay *et al.* (2004) em 380 gatos foram obtidos valores de sensibilidade de 62,1% e 72,4% e de especificidade de 98,6% e 80,9% para os testes “Synbiotics Witness Ab” e “Antech Diagnostics Ab”, respectivamente. Os gatos que apresentem anticorpos específicos e sinais clínicos ou achados radiográficos consistentes com DFel têm grande probabilidade de estarem infectados com *D. immitis* (Goodwin, 1998). Os gatos infectados que possuam sinais clínicos apresentam maior probabilidade de obterem resultados positivos para o teste de detecção de anticorpos que os gatos infectados assintomáticos (Nelson *et al.*, 2007).

Os gatos com resultados negativos nos testes para detecção de anticorpos anti-*D. immitis* podem estar livres da infecção ou podem ter estado expostos apenas recentemente (um a dois meses). Os gatos com sintomatologia que apresentem resultados negativos nos testes para a detecção de anticorpos e que noutros exames complementares (e.g. radiografia) obtenham o suporte ao diagnóstico de DFel, devem merecer uma avaliação posterior. Esta avaliação deve incluir um ecocardiograma, um teste para a detecção de antígenos, um teste adicional para a detecção de anticorpos (usando um laboratório alternativo) e, em casos seleccionados, angiografia não-selectiva (Green, Lord, & Grieve, 1983, Rawlings, 1990, citados por Miller, 1998a).

A detecção de anticorpos de larvas L3 e L4 (que podem ser eliminadas antes de alcançarem as artérias pulmonares) e a presença de anticorpos devida a infecções anteriores por *D. immitis* diminuem a especificidade deste teste (Snyder *et al.*, 2000). De notar que, um

resultado positivo pode ser também obtido em infecções ectópicas (Goodwin, 1998). Além disso, os anticorpos nem sempre foram detectados em gatos infectados por este parasita (McCall, Dzimirsky, & McTier, 1992, citados por Berdoulay *et al.*, 2004). Em dois estudos, observou-se que 14% dos gatos infectados apresentaram resultados negativos na detecção de anticorpos (Atkins, DeFrancesco, & Coats, 1998, Genchi *et al.*, 1998, citados por Litster & Atwell, 2008b). Num estudo efectuado com 1348 gatos assintomáticos, Kalkstein, Kaiser, & Kaneene (2000) relataram que mais de 20% dos animais infectados e com antígenos para *D. immitis* obtiveram resultados negativos nos testes para a detecção de anticorpos.

Existem diferentes testes para a detecção de anticorpos no mercado, cada um dos quais com diferentes sensibilidades para cada estado de desenvolvimento larvar, por isso, resultados discordantes de testes são comuns (Nelson *et al.*, 2007).

É comercializado um teste rápido, realizável nas clínicas (“in-clinic”), para a detecção de anticorpos felinos anti-*D. immitis*: Heska™ Solo Step™ FH (Heska, 2009).

5.3. Diagnóstico imagiológico

5.3.1. Radiografia torácica

A radiografia torácica permite observar alterações sugestivas de DFel e permite verificar a severidade da doença e monitorizar a sua progressão (Nelson *et al.*, 2007).

Os achados radiográficos mais característicos de DFel são a dilatação e a tortuosidade da artéria pulmonar e dos seus ramos caudais (Miller, 1998a). Estas características vasculares são melhor visualizadas na incidência ventrodorsal e podem ser visíveis apenas na artéria pulmonar caudal direita, onde os parasitas são encontrados mais frequentemente. A morfologia característica das artérias pulmonares em gatos infectados, ao contrário dos cães, tende a normalizar e pode desaparecer completamente, não deixando nenhuma evidência de infecção. A dilatação da artéria pulmonar principal pode ocorrer em gatos infectados massivamente mas não é um marcador fiável, uma vez que a maioria dos gatos não desenvolve hipertensão pulmonar significativa e essa artéria encontra-se obscurecida pela silhueta cardíaca (Nelson *et al.*, 2007). Normalmente, o padrão inflamatório do parênquima pulmonar é peribronquico. No entanto, pode haver um padrão alveolar difuso em casos de maior gravidade (Dillon, 2007). Esse padrão pulmonar pode desaparecer dentro de poucos meses, sendo uma característica secundária comum, sugestiva mas não patognomónica de DFel. Outros achados pulmonares menos comuns incluem radiodensidades focais parenquimatosas, lobos pulmonares consolidados, derrame pleural ou pneumotórax (Nelson *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 1998). A avaliação das artérias pulmonares pode ser dificultada pela presença de alterações pulmonares parenquimatosas significativas (Dillon, 2007). Os gatos com dirofilariose podem apresentar uma silhueta cardíaca aumentada nas radiografias torácicas (Litster, Atkins, Atwell, & Buchanan, 2005), se bem que este achado seja considerado raro (Nelson *et al.*, 2007). Vencho, C. Genchi, M.

Genchi, Grandi, & Kramer (2008a) realizaram um estudo em 34 gatos assintomáticos infectados com *D. immitis*. Estes investigadores verificaram que os achados radiográficos mais frequentes foram o padrão parenquimatoso broncointersticial focal ($n = 4$) ou difuso ($n = 4$). As alterações vasculares ($n = 2$) e o derrame pleural ($n = 1$) foram pouco frequentes.

Todos os gatos que mostraram alterações broncointersticiais focais recuperaram dos sinais clínicos. A morte ocorreu em dois dos quatro gatos com padrão broncointersticial difuso, em um dos dois gatos que apresentou alterações vasculares e no único gato que apresentou derrame pleural.

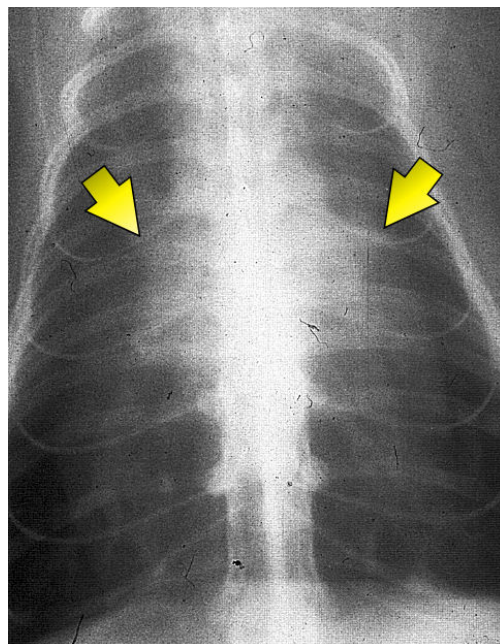
Segundo Vencho *et al.* (2008a), a avaliação da silhueta cardíaca não é uma ferramenta de diagnóstico fiável para a DFel. Também, Schafer & Berry (1995, citados por Litster & Atwell, 2008b) demonstraram que o critério radiográfico mais sensível (artéria pulmonar caudal esquerda num rácio médio maior que 1,6 vezes a nona costela, no nono espaço intercostal e na projecção ventrodorsal) apenas detectou 53% dos casos (Schafer & Berry, 1995, citados por Litster & Atwell, 2008b; Litster *et al.*, 2005).

Já foi demonstrado que os achados radiográficos são frequentemente transitórios. As alterações radiográficas também foram encontradas em gatos que não estavam infectados por adultos de *D. immitis* (Selcer, Newell, Mansour, & McCall, 1996, citados por Atkins, 2007a). Em alguns gatos,

a radiografia torácica não fornece evidências da doença (Schafer & Berry, 1995, citados por Litster & Atwell, 2008b; Nelson *et al.*, 2007), mas não deve ser excluído um diagnóstico de DFel apenas com base neste exame complementar.

Figura 4 – Radiografia torácica dorsoventral de um gato com DFel.

Esta projecção é frequentemente a melhor para apreciar o alargamento subtil das artérias lobares caudais. Uma proporção maior que 1,6:1 entre a largura da artéria pulmonar quando atravessa a nona costela (setas) e a largura da própria costela é sugestiva de um importante aumento arterial (Miller, 1998a).



5.3.2. Ecocardiografia

A ecocardiografia em gatos é muito útil no diagnóstico de DFel (Atkins *et al.*, 2008). A sensibilidade deste método é dependente da perícia do operador e com alguns investigadores foi reportada uma sensibilidade de 100% (Genchi *et al.*, 1998, citados por Litster & Atwell, 2008b).

Tem sido relatado um intervalo de sensibilidades desde 34% até 100%, sugerindo que em mais de 50% dos casos, os adultos de *D. immitis* podem ser visualizados dentro das câmaras cardíacas ou das artérias pulmonares (Miller, 1998a). As câmaras do lado direito

do coração felino podem ser investigadas por ecocardiografia 2D e um acesso à artéria pulmonar principal, e a um segmento relativamente longo das artérias pulmonares direitas e uma pequena porção das artérias pulmonares esquerdas ainda que limitado pode ser conseguido (Miller, 1998a; Nelson *et al.*, 2007). Os adultos de *D. immitis* apresentam-se como estruturas hiperecogénicas paralelas (Atkins, 2007a) com cerca de 0,7 a 1,2 mm de espessura, separadas aproximadamente por 0,5 a 1,0 mm e são comumente descritos como se assemelhando ao “sinal de igual (=)”. O comprimento é variável reflectindo o ângulo, no qual as dirofilárias estão alinhadas relativamente ao plano de imagem ecocardiográfica (Miller, 1998a). Por vezes, parasitas adultos mortos podem ser reconhecidos pelo colapso dos lados paralelos da parede do corpo (Nelson *et al.*, 2007).

A ecocardiografia, para a detecção de dirofilárias, é considerada mais sensível em gatos do que em cães (Atkins, 2007a) visto que uma dirofilária adulta é relativamente mais longa comparativamente com o comprimento das artérias pulmonares dos gatos, estendendo-se desde os ramos distais até aos segmentos proximais onde elas podem ser visualizadas. Geralmente, em casos suspeitos de DFel, a elevada especificidade deste exame permite a confirmação de infecção por *D. immitis* com uma duração de pelo menos cinco meses (Nelson *et al.*, 2007). A quantificação da carga parasitária é difícil devido aos parasitas adquirirem uma forma em espiral. Esse facto permite que os ecos interceptem as dirofilárias em múltiplos locais, originando imagens ecográficas múltiplas que potencialmente promovem uma sobrestimação do número de parasitas (Miller, 1998a; Nelson *et al.*, 2007; Atkins *et al.*, 2008). De salientar, que também é possível obter resultados falso-positivos devido à presença ocasional de densidades lineares da parede arterial pulmonar (Atwell *et al.*, 2001, citados por Litster & Atwell, 2008b).

Figura 5 – Ecocardiografia de um gato com um adulto de *D. immitis* na artéria pulmonar (seta)
(adaptado de <http://www.vetmed.auburn.edu/distance/cardio/home.html>; acedido em Mai 2, 2009)

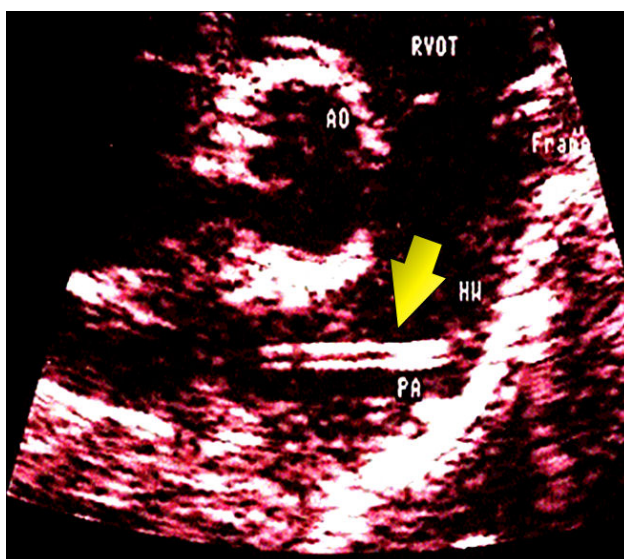
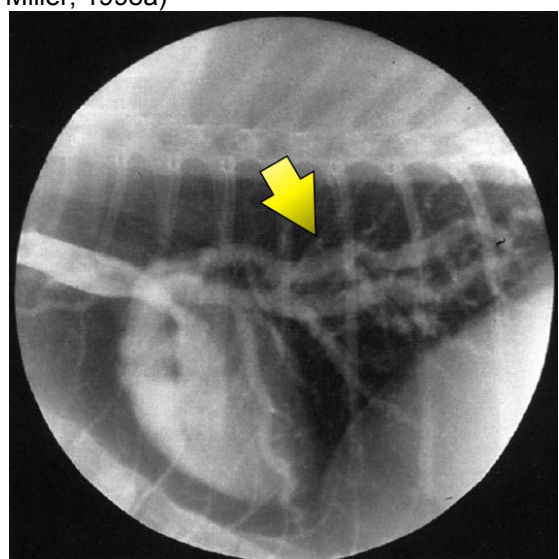


Figura 6 – Angiograma não-selectivo lateral de um gato com DFel.

Observar o alargamento e a tortuosidade das artérias pulmonares (seta) (adaptado de Miller, 1998a)



5.3.3. Angiografia não-selectiva

A angiografia não-selectiva é útil no diagnóstico de DFel. Este método permite a avaliação do tamanho e da morfologia das artérias pulmonares mesmo quando está presente doença pulmonar parenquimatosa grave. Anormalidades angiográficas associadas com DFel incluem artérias pulmonares tortuosas e dilatadas, obstrução arterial pulmonar e defeitos de preenchimento lineares (Miller, 1998a; Atkins, 2007a). O uso da angiografia não-selectiva deve ser limitado a casos em que o diagnóstico definitivo não possa ser alcançado por meios menos invasivos, como a ecocardiografia (Miller, 1998a).

5.4. Necrópsia

Numa área endémica de dirofilariose, qualquer gato suspeito de ter DFel ou que morra subitamente de causa desconhecida deve ser submetido a uma necrópsia meticulosa (Miller, 1998a; Nelson *et al.*, 2007). É imprescindível uma boa observação da Veia Cava, do lado direito do coração e das artérias pulmonares, visto que a presença de um ou dois parasitas pode ser facilmente negligenciada, em particular, se estiverem localizados nas artérias pulmonares caudais, se forem imaturos e se estiverem mortos (e fragmentados). Porque as dirofilárias ocasionalmente se restringem a locais ectópicos, as artérias sistémicas e as cavidades corporais devem ser bem examinadas. Se ocorrerem sinais neurológicos, o cérebro e a medula espinhal devem também ser bem examinados (Nelson *et al.*, 2007).

6. Tratamento

6.1. Tratamento médico

Actualmente, é apenas recomendado o tratamento sintomático dos gatos infectados (Strickland, 1998; Miller, 1998a; Nelson *et al.*, 2007). O tratamento adulticida (Tiacetarsamida ou Melasormina) coloca o gato em risco de morte súbita como resultado de colapso circulatório e de insuficiência respiratória (Dillon, 1984, Calvert *et al.*, 1989, citados por Atwell & Lister, 2002).

6.1.1. Tratamento sintomático de suporte

No caso de um gato assintomático mas com evidências radiográficas de DFel, é prudente esperar até que ocorra uma cura espontânea (Genchi *et al.*, 2008). Os gatos que apresentem tosse ou dispneia podem responder à administração de corticosteróides e broncodilatadores (Miller, 1998a). A Prednisolona em doses progressivamente diminuídas providencia um tratamento médico eficaz para gatos infectados, com evidência radiográfica de doença pulmonar, que aparentem ou não estar doentes. Este tratamento também deve ser iniciado sempre que os testes para a detecção de anticorpos e/ou antígenos

apresentem resultados positivos e que os gatos demonstrem sinais clínicos (Nelson *et al.*, 2007). Um regime oral de 2 mg/kg/dia de Prednisolona, durante duas semanas, realizando progressivamente uma redução da dose até 0,5 mg/kg QOD. Nesse tempo, os efeitos do tratamento devem ser reavaliados com base na resposta clínica e nas radiografias torácicas. Este tratamento deve ser repetido em gatos com sinais clínicos recorrentes (Nelson *et al.*, 2007). A Teofilina pode ser administrada na dose de 25 mg/kg PO SID (Miller, 1998a). Os diuréticos não são adequados, mesmo em gatos infectados com padrões pulmonares alveolares ou intersticiais severos (Nelson *et al.*, 2007). Experimentalmente, o Ácido Acetilsalicílico não apresentou benefícios significativos na redução da inflamação causada pelo parasita, pelo que não é recomendado (Rawlings *et al.*, 1990).

Os gatos que apresentem sinais agudos da doença devem ser estabilizados prontamente. Dependendo das circunstâncias, devem ser administrados corticosteróides intravenosos, soluções hidroelectrolíticas, broncodilatadores e oxigénio (Nelson *et al.*, 2007; Atkins, 2005a). Em caso de choque (devido à embolização e à destruição de *D. immitis* mortas) são recomendadas altas doses de corticoesteróides: 1 a 2 mg/kg TID (Venco, 2007) ou 50 a 100 mg IV/gato (Atkins, 2005a) de Prednisolona ou 1 mg/kg IV ou IM de Dexametasona (Atkins, 2005a). Devem ser administrados broncodilatadores (Aminofilina 6,6 mg/kg IM BID ou, Teofilina de libertação prolongada 25 mg/kg PO ou, Terbutalina 0,01 mg/kg SC) e oxigénio (Atkins, 2005a).

Frequentemente, o tratamento de suporte é bem sucedido na melhoria da sintomatologia dos animais que apresentam DFel. No entanto, a ocorrência de morte súbita em gatos infectados é imprevisível (Atwell & Litster, 2002). A evolução da infecção nos casos subclínicos pode ser monitorizada periodicamente com intervalos de seis a doze meses por repetição dos testes para a detecção de anticorpos e de antígenos, bem como das radiografias torácicas. A regressão dos sinais radiográficos e a não detecção de antígenos pelos testes fornecem evidências que o período de maior risco, provavelmente, já passou (Nelson *et al.*, 2007).

6.1.2. Tratamento adúlticida

O tratamento adúlticida não é recomendado devido ao elevado risco associado, à falta de benefícios claros, e ao curto período de vida de *D. immitis* nos gatos (Atkins, 2005a; Nelson *et al.*, 2007). Este tratamento não é aconselhado uma vez que a morte dos parasitas aumenta as reacções inflamatórias e o risco de desenvolvimento de reacções anafiláticas (Nelson *et al.*, 2007).

A Tiacetarsamida não é recomendada pois os gatos apresentam complicações tromboembólicas graves após o tratamento. A taxa de mortalidade encontrada foi de 30% dos pacientes (Dillon, 1984, Atkins, DeFrancesco, & Coats, 1998, citados por Miller, 1998a).

Além disso, a Tiacetarsamida é um adulticida menos eficaz nos gatos que nos cães (eficácia relatada <70%) (Turner *et al.*, 1989, citados por Lister & Atwell, 2007)

Ainda existe uma experiência insuficiente com a administração de Melarsomina, não sendo pois recomendada para gatos. Dados preliminares sugerem que a Melarsomina é tóxica numa dose maior que 3,5 mg/kg IM (Nelson *et al.*, 2007).

No estudo retrospectivo efectuado por Atkins, DeFrancesco e Coats (1998, citados por Miller, 1998a) que tentava comparar os resultados em animais tratados com adulticida *versus* não tratados com adulticida (e recebendo apenas tratamento sintomático) observou-se não haver diferença significativa na sobrevivência a longo-termo.

6.1.3. Tratamento microfilaricida

O tratamento microfilaricida é raramente necessário uma vez que mais de 80% dos gatos não apresentam microfilarémia. Administradas mensalmente, tanto a Ivermectina (24 µg/kg PO) como a Milbemicina (2 mg/kg PO) são microfilaricidas eficazes e devem promover a ausência de microfilarémia três a doze meses após o início do tratamento (Miller, 1998a).

6.1.4. Tratamento anti-*Wolbachia*

As tetraciclina inibem o desenvolvimento inicial das dirofilárias e bloqueiam a embriogénese de *D. immitis*, presumivelmente pela eliminação de *Wolbachia* do parasita (Taylor, Bandi, Hoerauf & Lazdins, 2000; Taylor *et al.*, 2005; Kramer, 2006; McCall *et al.*, 2008). As espécies de filarídeos que não albergam *Wolbachia* (e.g. *Acanthocheilonema viteae*) não são afectadas pelas tetraciclina (McCall *et al.*, 1999; Hoerauf *et al.*, 1999). No estudo de McCall *et al.* (2008), o tratamento com Doxiciclina em cães resultou na infertilidade das dirofilárias fêmeas e na supressão da microfilarémia. Além disso, larvas L3 recolhidas de mosquitos que se alimentaram em sangue de cães microfilarémicos tratados com Doxiciclina eram normais em aparência e motilidade mas não eram capazes de se desenvolver nos cães (McCall *et al.*, 2008). Logo, o tratamento com Doxiciclina em cães previne posterior transmissão da doença mesmo quando as microfilárias estão presentes. Em cães, foi sugerido que a administração de Doxiciclina com Ivermectina, por vários meses antes da administração de Melarsomina (ou possivelmente sem a administração desta), poderia eliminar as dirofilárias adultas. Este tratamento permitiria um menor potencial de tromboembolismo que o tratamento associado apenas à administração de Melarsomina, além de impedir a transmissão do parasita. McCall *et al.* (2008) encorajaram a administração da associação Doxiciclina com Ivermectina como um tratamento adulticida alternativo para gatos, em especial, porque nestes animais o tratamento com Melarsomina apresenta risco elevado de vida.

6.2. Tratamento cirúrgico

A remoção cirúrgica de adultos de *D. immitis* é praticável e é eficaz em gatos sintomáticos. No entanto, as dirofilárias devem ser previamente localizadas por ecografia, tendo de se encontrar em localizações acessíveis aos instrumentos cirúrgicos (Nelson *et al.*, 2007; Litster & Atwell, 2008b). Este tipo de tratamento é atractivo por minimizar o risco de tromboembolismo (Atkins, 2005a). Mesmo que não seja possível retirar todos os parasitas, é uma alternativa razoável nos gatos com elevadas cargas parasitárias e em estado crítico (Nelson *et al.*, 2007). A cirurgia está especialmente indicada nos casos da Síndrome da Veia Cava (Venco, 2007).

A cateterização transjugular e a remoção das dirofilárias utilizando fórceps aligátor (Figura 7), fórceps de preensão endoscópica (“endoscopy grasping fórceps”) (Figura 8) ou catéteres de recolha tipo cesto (“basket-type retrieval catheters”) (Figura 9) foram descritos na literatura (Glaus *et al.*, 1995, Borgarelli *et al.*, 1997, Atwell, 1998, McIntosh, Bright, & Daniel, 1999, Brown *et al.*, 1999b, Atwell & Litster, 2002, citados por Litster & Atwell, 2008b). Small *et al.* (2008) utilizaram um catéter de laço pescoço de ganso em nitinol (“nitinol gooseneck snare catheter”) (Figura 10) para a remoção de *D. immitis* adultas de dois gatos. Estes autores consideraram-na uma técnica segura e eficaz para a remoção dos parasitas do átrio direito e do ventrículo direito (Small *et al.*, 2008). Outras técnicas cirúrgicas mais invasivas incluem o acesso pelo átrio direito e a arteriotomia da pulmonar principal (Brown *et al.*, 1999b, citados por Litster & Atwell, 2008b). Em 13 gatos, Atwell & Lister (2002) obtiveram uma taxa de sucesso de 96% na extracção de *D. immitis* adultas por venotomia da jugular.

Figura 7 – Fórceps aligátor (adaptado de <http://www.cordismedicine.eu/Q1011%20Alligator%20forceps.jpg>; Set 23, 2009)



Figura 8 – Fórceps de preensão endoscópica (adaptado de <http://www.cookmedical.com/esc/dataSheet.do?id=723>; Set 23, 2009)



Figura 9 – Catéter de recolha tipo cesto (adaptado de <http://www.carencureindia.com/alton.html>; Set 23, 2009)

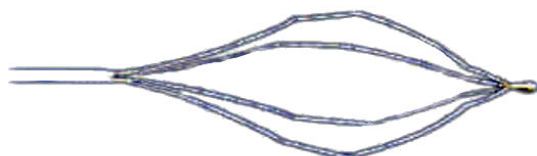


Figura 10 – Catéter de laço pescoço de ganso (adaptado de <http://www.ev3.net/peripheral/us/procedural-support/amplatz-goose-ne>; Set 23, 2009)



Frequentemente, a extracção das dirofilárias resulta numa melhoria clínica. Small *et al.* (2008) relataram que a remoção dos parasitas adultos resolveu os sinais clínicos de insuficiência cardíaca direita congestiva e de quilotórax. Para além disso, num gato não foi necessária a remoção de todos os adultos de *D. immitis* para a resolução dos sinais clínicos. De notar, que a remoção cirúrgica implica riscos. Os danos acidentais provocados nos parasitas durante a extracção podem resultar em choque e em morte (Sisson, 1998, Brown *et al.*, 1999b, citados por Litster & Atwell, 2008b), possivelmente devido a uma reacção anafiláctica causada pela libertação massiva de antígenos do parasita.

7. Seguimento dos gatos infectados

Nelson *et al.* (2007) recomendam a repetição dos testes serológicos de todos os gatos infectados com intervalos de seis a doze meses com o propósito de monitorizar a evolução da infecção, tenham ou não sinais clínicos, e quer tenham recebido tratamento sintomático, adulticida ou cirúrgico. A repetição dos testes serológicos deve incluir tanto os testes para a detecção de antígenos como os testes para a detecção de anticorpos anti-*D. immitis*.

O intervalo de repetição dos testes deve ser consistente com as circunstâncias clínicas. Para gatos assintomáticos, uma repetição dos testes serológicos anual pode ser adequada. Os gatos que apresentem resultados positivos nos testes para a detecção de antígenos de *D. immitis* devem repetir os testes serológicos com intervalos de quatro a cinco meses até ao desaparecimento da antigenémia detectável (como resultado da provável eliminação do parasita). Uma vez que os gatos apresentem resultados negativos no teste para a detecção de antígenos e estejam clinicamente normais, as repetições adicionais dos testes para a detecção de anticorpos tornam-se opcionais. Na realidade, os anticorpos podem persistir por um período indeterminado de tempo após a eliminação dos parasitas. Mesmo que os gatos sejam submetidos a profilaxia, se houver exposição continuada ao parasita podem apresentar resultados positivos nos testes para a detecção de anticorpos (Nelson *et al.*, 2007).

8. Profilaxia

Devido ao elevado risco de infecção, à elevada taxa de mortalidade e ao resultado imprevisível da infecção felina, a profilaxia é o único meio efectivo e seguro de proteger os gatos que vivem em áreas endémicas de dirofilariose canina (Genchi *et al.*, 2008; Tuzio *et al.*, 2005). Mesmo os animais mantidos estritamente em casa podem ser infectados. Os proprietários devem ser avisados sobre o risco potencial de infecção de *D. immitis* nas suas comunidades (Nelson *et al.*, 2007).

8.1. A importância dos testes serológicos antes da profilaxia

As complicações associadas com a administração de fármacos profiláticos são raras e quase sem excepção encontram-se associadas a uma elevada concentração de microfilárias no sangue. Como raramente os gatos apresentam números elevados de microfilárias circulantes, a probabilidade de ocorrerem essas complicações é bastante reduzida (Miller, 1998a). A maioria dos gatos que apresenta resultados positivos nos testes para a detecção de anticorpos anti-*D. immitis* está apenas transitoriamente infectada com o quarto estado larvar. A detecção de anticorpos não permite distinguir a presença de larvas migrantes jovens e uma infecção por adultos. Além disso, efectuar os testes para a detecção de anticorpos em gatos que já recebem quimioprofiláticos não oferece mais-valias, pois a exposição frequente a larvas, mesmo quando são eliminadas por esses fármacos, também promove a produção de anticorpos (Nelson *et al.*, 2007).

8.2. Fármacos utilizados para a profilaxia da dirofilariose felina

Os fármacos profiláticos devem ser iniciados em gatinhos a partir das oito semanas de idade e devem ser administrados mensalmente a todos os gatos em áreas endémicas de dirofilariose durante o período sazonal de transmissão desta doença (Nelson *et al.*, 2007) ou durante todo o ano, segundo Atkins & Paul (2006).

Quando efectuada de forma sazonal, a profilaxia com macrólidos deve iniciar-se no mês seguinte ao início da época de transmissão. A última dose deve ser administrada no 1.º dia do mês imediatamente a seguir ao esperado fim de transmissão (Knight & Lok, 1998). A eficácia retroactiva dos endectocidas macrólidos torna desnecessário que o início da profilaxia coincida com o início da infecção. Mesmo que a infecção preceda a profilaxia mensal em seis semanas ainda é esperada protecção (McTier *et al.*, 2000).

Atkins & Paul (2006) defendem a utilização dos fármacos profiláticos todo o ano, ao invés de serem utilizados apenas durante a época de transmissão teórica. Entre as principais razões encontram-se a actividade contra outros parasitas não-sazonais, a maior cooperação por parte dos donos e a eficácia retroactiva para salvaguarda de doses omitidas.

A profilaxia é efectuada com macrólidos que são administradas em formulações orais (Ivermectina e Milbemicina oxima) ou tópicas (Selamectina e Moxidectina) (Nelson *et al.*, 2007). Estes compostos são agentes antiparasitários importantes porque possuem uma actividade de largo espectro, uma elevada potência e um modo único de acção (Krautmann, 2000). O risco de efeitos adversos devido à morte das microfilárias é pequeno devido a serem microfilaricidas de acção lenta (excepto a Milbemicina) (McCall *et al.*, 1996, citados por McCall *et al.*, 2007; Atkins & Paul, 2006) e porque a maioria dos gatos não apresenta microfilárias ou apresenta baixas cargas de microfilárias. Apesar disso, deve ter-se precaução após a administração da primeira dose de macrólidos em gatos que se saibam microfilarémicos (Atkins & Paul, 2006). No estudo efectuada em cães por McCall *et al.*

(1996, citados por McCall *et al.*, 2007), os macrólidos quando administrados mensalmente por pelo menos 13 meses, com início 3 meses após a infecção, são altamente eficazes na prevenção da maturação dos parasitas, sendo de supor efeitos similares em gatos.

8.2.1. Ivermectina

A dose profiláctica individual mensal de Ivermectina para gatos é 24 µg/kg PO de peso corporal (Nelson *et al.*, 2007). Nesta dose a Ivermectina é 100% eficiente na prevenção do desenvolvimento de *D. immitis* em gatos, mesmo quando administrada 30 ou 45 dias depois da inoculação com larvas infectantes (Paul, Acre, & Todd, 1994, citados por Miller, 1998a). Os gatos que recebem Ivermectina na dose preventiva e após exposição ao agente, podem desenvolver uma resposta detectável de anticorpos anti-*D. immitis* apesar de estarem completamente protegidos da infecção por adultos (Donoghue, Piché, & Radecki, 1998, citados por Miller, 1998a). As doses profiláticas mensais de Ivermectina prolongadas no tempo possuem acção contra *D. immitis* em desenvolvimento e criam um efeito de morte lenta nos adultos, com inibição precoce da embriogénese (McCall, 2005). Quanto mais precoce for o tratamento menor é o tempo de sobrevivência dos parasitas e menor será o seu desenvolvimento. As formas de *D. immitis* que já se encontrem completamente desenvolvidas no início do tratamento não reduzem o seu número mesmo após um tratamento mensal prolongado, mas a massa de parasitas é reduzida pelo menos em 20% devido à morte de todos os estados uterinos de microfilárias e à atrofia dos parasitas (McCall *et al.*, 2008).

8.2.2. Milbemicina oxima

Nos gatos, recomenda-se Milbemicina oxima numa dose mensal de 2 mg/kg de peso corporal PO (Nelson *et al.*, 2007). Nesta dose é extremamente eficaz e segura (Genchi *et al.*, 2004) e possui actividade contra outros endoparasitas (Schenker *et al.*, 2007).

8.2.3. Selamectina

Nos gatos, a dose profiláctica mensal de Selamectina, quando aplicada topicamente na pele, é de 6 a 12 mg/kg de peso corporal (Nelson *et al.*, 2007) sendo segura mesmo em gatos com seis semanas de idade, animais em idade reprodutiva e em gatos infectados por adultos de *D. immitis* (Krautmann *et al.*, 2000). Num estudo efectuado por McTier *et al.* (2000a), a Selamectina foi 100% eficaz contra infecções por *D. immitis* em gatos, quando administrada topicamente na pele da base do pescoço e na dose de 6 mg/kg, 30 dias após a inoculação experimental. Nos gatos, McTier *et al.* (2000b) e Six *et al.* (2000) demonstraram que a Selamectina apresenta um largo espectro de actividade antiparasitária endectocida.

8.2.4. Moxidectina

A combinação *spot-on* contendo 1% de Moxidectina e 10% de Imidaclopride (Advocate[®], Bayer) mostrou ser eficaz e segura na prevenção de dirofilariose e no tratamento contra pulgas, nemátodos intestinais (*Toxocara* e *Ancylostoma*) e *Otodectes cynotis* (Fourie, Kok & Heine, 2003; Arther, Charles, Ciszewski, Davis & Settje, 2005). De notar que, esta combinação não é adulticida (Venco *et al.*, 2008b). Essa formulação foi 100% eficaz na prevenção de infecções por adultos de *D. immitis* quando os gatos eram tratados 30 dias após a inoculação com larvas L3 (Arther *et al.*, 2005).

9. Controlo dos hospedeiros intermediários

Sempre que possível, deve ser efectuado o controlo dos vectores culicídeos. Algumas medidas incluem a eliminação dos criadouros (e.g. drenagem), o controlo biológico e o controlo químico (insecticidas) (USEPA, 2009). Existem redes mosquiteiras para a protecção das habitações (Sharma *et al.*, 2009). O isolamento e o desenvolvimento de agentes patogénicos para os mosquitos (Su, Zou, Guo, Huang, & Chen, 2001; Chen, Hsieh, Hu & Fu, 2005) e métodos genéticos de controlo (Terenius, Marinotti, Sieglaff & James, 2008; Rafikov, Bevilacqua & Wyse, 2009) também poderão ser úteis.

10. Evolução da doença

No estudo retrospectivo efectuado por Atkins, DeFrancesco, Coats, Sidley e Keene (2000), em 50 gatos naturalmente infectados por *D. immitis* estimou-se que apenas 18% estavam aptos a sobreviver à infecção. Cinco desses gatos morreram subitamente num curto período após o surgimento da sintomatologia. Na maioria dos sujeitos, o tempo de sobrevivência após o diagnóstico não excedeu os 1,5 anos (Atkins *et al.*, 2000). Nos estudos de Venco *et al.* (2008a) e Genchi *et al.* (2008) realizados em gatos assintomáticos naturalmente infectados com *D. immitis*, entre 79,0% e 82,4% obtiveram uma cura espontânea (ausência de parasitas observáveis à ecocardiografia e resultado negativo no teste para a detecção de antígenos) e entre 17,6% e 21,0% morreram. Entre 20,6% e 53,0% dos animais apresentaram sinais clínicos, sobretudo dispneia, vômito e morte súbita. No estudo de Genchi *et al.* (2008), 7% dos animais morreram subitamente de DFel. A probabilidade da ocorrência da morte aumentou significativamente com a idade em que foi efectuado o diagnóstico. Porém, não se detectaram associações significativas com o sexo dos animais, com o tempo de sobrevivência após o diagnóstico ou com a presença/ausência de sinais clínicos.

11. Epidemiologia da dirofilariose felina

Os gatos e os felídeos selvagens são susceptíveis à infecção por *Dirofilaria immitis* (Venco *et al.*, 2008b), mas apesar disso são hospedeiros atípicos (Atkins, 2007a) pois apresentam uma incapacidade de suportar um grande número de parasitas adultos e apresentam microfilarémia transitória ou ausência de microfilarémia.

11.1. Prevalências obtidas nos estudos epidemiológicos

Foram efectuados vários estudos de prevalência com base na observação de *D. immitis* em necrópsias de gatos (Anexo 1). No Japão, Roncalli *et al.* (1998) compilaram 20 desses estudos efectuados em várias regiões do país. Estes investigadores verificaram prevalências de 0,5% a 9,5% para gatos errantes e de 3,0% a 5,2% para gatos domésticos. No Rio de Janeiro, Labarthe *et al.* (1997) obtiveram uma prevalência de 0,80% (1/125 gatos). Já no Noroeste da Georgia, nos EUA, foi obtida uma prevalência de 2,1% (4/184 gatos) (Carleton & Tolbert, 2004).

Outros estudos foram efectuados com base na detecção de antigénios (Anexo 1). Na República da Coreia do Sul, Liu *et al.* (2005) obtiveram uma prevalência de 2,6% (4/155 gatos) confirmada por PCR.

Na Tailândia, Nuchprayoon *et al.* (2006) utilizaram métodos moleculares (PCR) e observaram uma prevalência de 1,9% (1/52 gatos).

Em Itália, um estudo seroepidemiológico revelou que 16% dos gatos apresentavam anticorpos anti-*D. immitis* (Kramer & Genchi, 2002). Nos EUA, Miller, Atkins, Stemme, Robertson-Plouch & Guerrero (1998b) realizaram um estudo para a detecção de anticorpos anti-*D. immitis* em 2000 gatos provenientes de todo o país. Foi observada uma prevalência de anticorpos de 12%. Na Califórnia, registou-se a maior prevalência, isto é, 33% (36/110 gatos) (Miller *et al.*, 1998b).

A prevalência de DFel aproxima-se ou até mesmo excede a de infecções por FeLV e por FIV em populações comparáveis (Atkins & Paul, 2006). Num estudo, a prevalência de antigénios FeLV e anticorpos FIV foi de 1,9% e 1% respectivamente, e a prevalência de antigénios de *D. immitis* obtida foi de 0,9% (Lorentzen & Caola, 2008). No estudo efectuado por Levy *et al.* (2007b), a seroprevalência de antigénios de *D. immitis*, infecção por FeLV e infecção por FIV em gatos foi de 4,0%, 2,6% e 3,6%, respectivamente.

A prevalência de infecção por *D. immitis* em gatos parece ser paralela à prevalência em cães numa dada área mas a um nível inferior. Nos EUA, foi estimada uma prevalência felina entre 5% a 20% da prevalência das populações de cães locais sem profilaxia (Ryan & Newcomb, 1995, citados por Carleton & Tolbert, 2004). No entanto, a verdadeira prevalência de infecção por *D. immitis* nos gatos é desconhecida devido ao facto destes animais serem

frequentemente assintomáticos, espontaneamente eliminarem o parasita e subitamente morrerem da infecção (Litster & Atwell, 2008b).

Na Europa, o parasita *D. immitis* é encontrado principalmente nos países do Sul (sobretudo Portugal, Espanha, França e Itália), existindo alguns canídeos infectados na Grécia, na Turquia e nos países do leste europeu (Genchi *et al.*, 2005a).

11.2. Dirofilariose canina e felina em Portugal

Portugal é considerado um país endémico para DCan, porém, até ao momento e ao que o autor tem conhecimento, não foram relatados casos de DFel. O primeiro estudo documentado sobre DCan foi efectuado por Cambournac & Pitta Simões (1943, citados por Clemente, 1996) em Águas de Moura, Palmela.

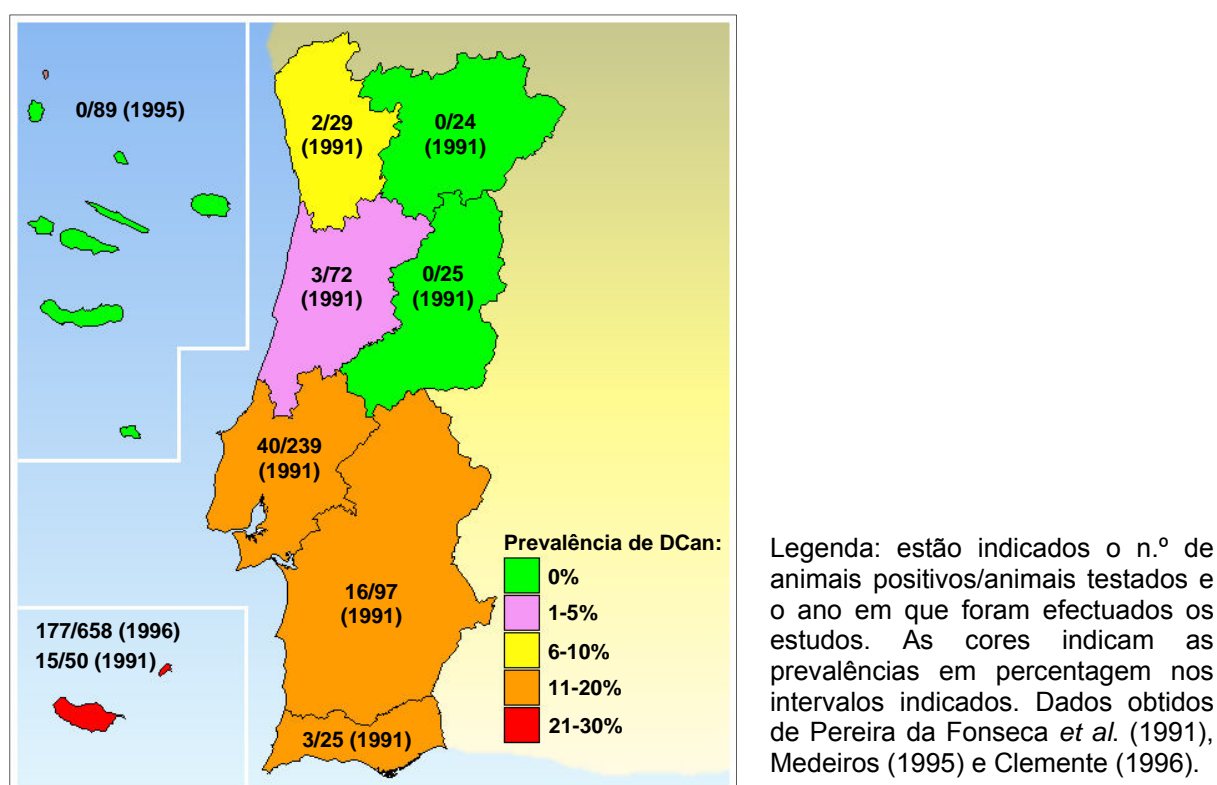
Nos Açores, na Ilha de S. Miguel, Medeiros (1995) obteve uma prevalência de 0% (0/89) de cães microfilarémicos. A mesma autora referiu não haver registo de qualquer caso de DCan apesar de nos Açores existem vectores como os mosquitos do género *Culex* (Capela, 1979, citado por Medeiros, 1995).

Pereira da Fonseca, Madeira de Carvalho, Carvalho, e Carvalho-Varela (1991) efectuaram um estudo epidemiológico de DCan em todas as áreas de actuação das Direcções Regionais de Agricultura (exceptuando a dos Açores). Foi encontrada uma prevalência nacional de microfilarémia (espécies não identificadas) de 14,1% (79/561 cães). Foram encontradas prevalências menores no Norte de Portugal continental e mais elevadas no Sul. A Região Autónoma da Madeira apresentou uma prevalência de 30% e a Região do Ribatejo e Oeste (em que se inclui actualmente a AML) apresentou uma prevalência de 16,7% (40/239 cães). Os grupos de animais mais infectados foram os cães mantidos no exterior das habitações, como os cães de guarda, cães de caça ou cães pastores.

Na Madeira, Clemente (1996) admitiu que a prevalência de microfilarémia na população canina era de pelo menos 22%, sendo que o parasita *D. immitis* era o principal responsável pelos casos de microfilarémia (89% das microfilárias). No Funchal, Santa-Ana, Khadem, e Capela (2006) observaram mosquitos da espécie *Culex theileri* infectados por *D. immitis*.

O modelo obtido por Genchi *et al.* (2005a) que utiliza um sistema de informação geográfica baseado em dados térmicos e nas características dos vectores estimou um período de transmissão do parasita em duas localidades de Portugal. Para Lisboa, foi obtido o período de 11 de Junho a 20 de Outubro e para Portalegre, foi obtido o período de 31 de Maio a 20 de Outubro.

Figura 11 – Mapa contendo a compilação dos dados de vários autores sobre as prevalências de dirofilariose canina em Portugal (mapa original)



12. Importância em Saúde Pública do gato como hospedeiro de *D. immitis*

Os humanos são um hospedeiro acidental de *D. immitis*. A dirofilariose pulmonar humana (DHum) é uma zoonose emergente cuja incidência tem vindo a aumentar. De 1965 até 1989, foram documentados 165 casos, a maioria nos EUA, Japão e Austrália. No entanto, nos 13 anos seguintes (1990 a 2003), pelo menos 130 casos foram relatados em 15 países (Genchi, Simón, & Kramer, 2005b). Além disso, a dificuldade de realizar um diagnóstico poderá indicar que a incidência é maior do que a relatada.

A DHum caracteriza-se por uma lesão nodular única com 1 a 3 cm, identificada na periferia do pulmão em radiografias de rotina (Simón, López-Belmonte, Marcos-Atxutegi, Morchón, & Martín-Pacho, 2005). Essa lesão nodular é um granuloma que incorporou uma larva L5 (Theis, 2005). Os pacientes com DHum são geralmente assintomáticos. Em regiões endémicas, populações humanas apresentaram seroprevalências similares às caninas, indicando que os humanos que habitam nessas áreas estão sujeitos a um elevado risco de exposição a *D. immitis*. Em Pavia (Itália) e em Salamanca (Espanha) foram encontradas seroprevalências de *D. immitis* em humanos de 32,3% e 10%, respectivamente (Prieto *et al.*, 2000, citados por Simón *et al.*, 2005).

O reconhecimento deste agente é importante para o diagnóstico diferencial com outros achados radiográficos pulmonares nodulares (Echeverri, Long, Check & Burnett, 1999) como doenças infecciosas e neoplasias. Estas lesões requerem um extenso trabalho clínico,

que frequentemente culmina numa toracotomia, desnecessária no caso de ser DHum (Theis, 2005). Na União Europeia, a distribuição geográfica da DHum acompanha a distribuição da DCan. A maioria dos casos relatados pertence ao Sul da Europa (Espanha, França, Itália e Grécia) (Muro, Genchi, Cordero, & Simón, 1999).

Apesar da maioria dos relatos de DHum serem sobre a transmissão a partir dos cães, a infecção a partir do gato já foi relatada (Narine, Brennan, Gilfillan & Hodge, 1999). A necessidade da transmissão pelo mosquito vector e o facto de os gatos raramente serem microfilarémicos sugere que eles possuem um papel pouco importante como reservatórios desta zoonose. Logo, os gatos infectados por *D. immitis* apresentam um risco reduzido para os humanos (Bowman *et al.*, 2002).

13. Perspectivas futuras para o tratamento e a profilaxia da DFel

Já foi sequenciado o genoma de *D. immitis* (Yin *et al.*, 2006). O estudo dos genes do agente resultou numa lista de genes específicos suspeitos de terem papéis importantes durante o parasitismo e a doença associada. Com base nestes dados, sugeriu-se a existência de um mecanismo de geração de energia na dirofilária adulta diferente do hospedeiro vertebrado. Esse mecanismo pode ser um alvo promissor para a próxima geração de filaricidas, tornando-os mais seguros para o hospedeiro (Yin *et al.*, 2006). A recente sequenciação do genoma de *Wolbachia* (Foster *et al.*, 2005) poderá também melhorar a compreensão sobre este endossimbionte e o seu papel na doença, além de fornecer novas pistas para medidas de profilaxia e tratamento da DFel. Simón, Kramer, Morchón, & Genchi (2007) sugeriram a utilização de testes para a detecção de anticorpos anti-*Wolbachia* com o objectivo de determinar os níveis de exposição não só a infecções por adultos como infecções por larvas típicas nos gatos.

Já foram feitos alguns estudos sobre a possibilidade de criar uma vacina para cães contra *D. immitis* (Fuller & Hurrell, 1989), mas até ao momento, ainda não foi possível criar uma vacina eficaz.

II.B. Leishmaniose felina (LFel)

1. Etiopatogenia

A leishmaniose canina (LCan) foi alvo de muitos estudos e é conhecido o papel epidemiológico do cão (Dantas-Torres, 2007). Porém, a LFel é uma doença pouco conhecida. A análise dos 49 casos clínicos relatados, dos 37 estudos epidemiológicos e dos estudos experimentais permite uma melhor compreensão da importância de *Leishmania* spp. na população felina e do papel epidemiológico do gato.

1.1. Os agentes etiológicos: *Leishmania* spp.

Todos os membros do género *Leishmania* (Ross, 1903) são parasitas de mamíferos. Este género pertence à ordem *Kinetoplastida* e à família *Trypanosomatidae*. Como diferentes espécies de *Leishmania* são indistinguíveis pela sua morfologia, têm sido utilizados outros critérios para a sua identificação. Actualmente, a caracterização isoenzimática é considerada a técnica de referência (“gold standard”), no entanto, as técnicas baseadas em ADN têm vindo a ser cada vez mais utilizadas (Leishdomus, 2005). Na Tabela 7, encontram-se listadas as espécies de *Leishmania* responsáveis por casos de LFel.

Tabela 7 – Espécies de *Leishmania* identificadas até 2009 responsáveis por casos de LFel

Espécie identificada	N.º casos de LFel	Autores e data de publicação	País
<i>L. infantum</i>	9	Ozon <i>et al.</i> (1998)	França
		Poli <i>et al.</i> (2002)	Itália
		Pennisi <i>et al.</i> (2002)	Itália
		Manciati (2003, citado por Manciati, 2004)	Itália
		Pratlong <i>et al.</i> (2004)	França
		Grevot <i>et al.</i> (2005)	França
		Maroli <i>et al.</i> (2007)	Itália
		Marcos <i>et al.</i> (2009)	Portugal
<i>L. chagasi</i>	2	Savani <i>et al.</i> (2004)	Brasil
		Serrano <i>et al.</i> (2008)	Brasil
<i>L. amazonensis</i>	1	Souza <i>et al.</i> (2005)	Brasil
<i>L. braziliensis</i>	2	Schubach <i>et al.</i> (2004)	Brasil
<i>L. mexicana</i>	1	Craig, Barton, Mercer, Droleskey, & Jones (1986); Barnes, Stanley & Craig (1993)	E.U.A
<i>L. venezuelensis</i>	4	Bonfante-Garrido <i>et al.</i> (1996)	Venezuela
<i>L. major</i>	1	Morsy & El Seoud (1994, citado por Rüfenach <i>et al.</i> , 2005)	Egipto
<i>L. tropica</i>	2	Machattie <i>et al.</i> (1931, citado por Simões-Mattos, Bevilacqua, Matos, & Pompeu, 2004)	Iraque

1.2. Zimodemes de *Leishmania* encontrados na espécie felina

A caracterização isoenzimática, através de electroforese enzimática multilocular, é o método de referência para a identificação das espécies. Após cultura, as enzimas solúveis do parasita são extraídas e separadas por electroforese sendo, seguidamente, coradas com corantes específicos para cada uma. A matriz contendo um conjunto de bandas coradas de isoenzimas é chamada zimograma. Os organismos que apresentam zimogramas semelhantes são classificados em zimodemes de uma dada espécie (OIE, 2008).

L. infantum foi subdividida em zimodemes MON pelo laboratório de referência em Montpellier para a Organização Mundial de Saúde (Hide, Bañuls, & Tibayrenc, 2001). Em Itália, foram encontrados os zimodemes MON-1, MON-72 e MON-201 (Pennisi, 2006, citado por Venet, 2007; Maroli *et al.*, 2007). Em França, *L. infantum* MON-1 foi identificado em três gatos (Ozon *et al.*, 1998; Pratlong *et al.*, 2004; Grevot *et al.*, 2005).

1.3. Morfologia de *Leishmania*

Os protozoários do género *Leishmania* apresentam duas formas distintas:

- No insecto vector encontra-se a forma promastigota. Esta forma é extracelular, fusiforme, tem cerca de 15 x 3 µm e possui, na sua região anterior, um flagelo livre que pode atingir 20 µm de comprimento.
- Nos macrófagos do hospedeiro mamífero encontra-se a forma amastigota. Esta forma é intracelular, ovóide, mede 2 x 4 µm e o flagelo é rudimentar.

1.4. Ciclo biológico de *Leishmania*

Os parasitas do género *Leishmania* apresentam um ciclo de vida heteroxeno, isto é, parte do seu desenvolvimento ocorre num hospedeiro invertebrado (vector), um flebotomíneo.

1.4.1. Características dos hospedeiros invertebrados

Os flebotomíneos ou “moscas da areia” são insectos dípteros da família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae*. Dois géneros apresentam importância em Medicina Humana e em Medicina Veterinária: o género *Phlebotomus* (Rondani & Berté, 1840), no Velho Mundo, e o género *Lutzomyia* (França, 1924), no Novo Mundo. Das 700 espécies conhecidas, 50 são espécies vectoras de *Leishmania*. As fêmeas são hematófagas e as responsáveis pela transmissão do parasita. A sua actividade é crepuscular ou nocturna, dependendo da espécie e da época do ano. Os flebotomíneos possuem biótopos diversificados, encontrando-se tanto no interior das habitações humanas (endófilos), como no exterior (exófilos). A duração do ciclo de vida é variável, em função da temperatura, humidade e fotoperíodo. Em função do clima, da região e da espécie flebotomínica poderá haver mais do que um período de eclosões (Afonso & Alves-Pires, 2008).

1.4.1.1. Desenvolvimento de *Leishmania* no hospedeiro invertebrado

A infecção do hospedeiro invertebrado ocorre quando o flebotomíneo fêmea efectua uma refeição sanguínea contendo macrófagos infectados com formas amastigotas de *Leishmania*. O tempo necessário para o desenvolvimento de *Leishmania*, em espécies flebotomínicas susceptíveis, é de cerca de 6 a 9 dias. Inicialmente, nas primeiras 24 a 48 horas, as formas amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicas e dá-se início à primeira multiplicação parasitária intravectorial. Ao fim de 48 a 72 horas, as formas procíclicas desenvolvem-se em formas nectomonas que migram da região posterior para a região anterior do intestino médio. Seguidamente (4 a 7 dias), desenvolvem-se as formas leptomonas que sofrem a segunda multiplicação intravectorial (Afonso & Alves-Pires, 2008). Na válvula estemodeal observam-se as formas haptomonas e as formas metacíclicas (5 a 7 dias). Estas últimas são as formas infectantes, apresentam um longo flagelo e estão adaptadas para a transmissão aos hospedeiros vertebrados (Afonso & Alves-Pires, 2008). As haptomonas fixam-se à válvula estemodeal e provocam a degenerescência da mesma, permitindo aos metacíclicos atingirem a cavidade oral e penetrarem num hospedeiro vertebrado aquando de uma nova refeição (Volf, Hajmova, Sadlova & Votypka, 2004; Bates, 2007). A perda da funcionalidade da válvula estemodeal, juntamente com a oclusão do lúmen intestinal causada pelos parasitas e por uma matriz de fosfoglicanos secretada pelos leptomonas, impedem o insecto de realizar refeições completas. Este facto obriga o vector a picar vários hospedeiros, na tentativa de obter a quantidade de sangue de que necessita (Rogers, Chance & Bates, 2002). Isso parece explicar que num determinado foco, se verifique uma elevada prevalência de leishmaniose apesar de uma baixa taxa de infecção flebotomínica (Afonso & Alves-Pires, 2008).

1.4.2. Hospedeiro vertebrado

Os parasitas do género *Leishmania* já foram encontrados em várias ordens de mamíferos: roedores, carnívoros (canídeos, felídeos, mustelídeos, viverrídeos), xenartros (preguiças), didelfimorfos (opossums), perissodáctilos (equídeos) e primatas (Ashford, 1996).

Na área mediterrânica, os canídeos constituem os hospedeiros reservatórios principais de *L. infantum* (Grevot *et al.*, 2005). O papel dos canídeos selvagens, em especial da raposa, ainda está pouco esclarecido. Em Espanha, Sobrino *et al.* (2008), encontrou ADN de *L. infantum* em lobos, raposas, mangustos, ginetas e lince ibérico. Os roedores também podem ser hospedeiros deste parasita (DiBella *et al.*, 2003). Na Arábia Saudita, foram detectados amastigotas de *Leishmania* no baço de quatro *Felis margarita* (Morsy, Al-Dakhil & El-Bahrawy, 1999). O gato doméstico pode ser infectado por *Leishmania* e até mesmo pode sofrer com a doença causada por este parasita. Já estão descritos 49 casos clínicos de LFel. Mais de três dezenas de estudos epidemiológicos confirmaram o contacto das populações de gatos com parasitas do género *Leishmania*.

1.4.2.1. Desenvolvimento de *Leishmania* no hospedeiro vertebrado

As principais áreas corporais atingidas pela picada do flebotomíneo são zonas com pouco pêlo, provavelmente, devido a ser mais fácil ao insecto obter o sangue de que precisa. (Tomás & Freitas Romão, 2008). Para penetrar as células hospedeiras, os promastigostas metacíclicos de *Leishmania* utilizam as capacidades de fagocitose das células dendríticas e macrófagos da pele (Love, Mentink-Kane & Mosser, 1998) e diferenciam-se em amastigotas. Inicialmente, também penetram em neutrófilos mas aí não se dividem e são depois apresentados aos fagócitos (Zandbergen *et al.*, 2004).

Os amastigotas são responsáveis pela disseminação da infecção no hospedeiro vertebrado. Nos macrófagos, os amastigotas replicam-se, libertam-se por lise celular ou exocitose e parasitam novas células. Em alguns hospedeiros, não ficam confinados à pele e são levados em macrófagos, através do sangue e da linfa, para outras regiões corporais, como a medula óssea, o baço e o fígado (Tomás & Freitas Romão, 2008). No interior dos fagolisossomas do macrófago, o amastigota encontra diversos nutrientes que são utilizados para a sua replicação (Burchmore & Barrett, 2001; Naderer, Wee & McConville, 2008).

1.4.3. Formas de transmissão independentes do vector flebotomíneo

Embora a transmissão por um vector flebotomíneo represente a mais frequente e a mais importante via de transmissão de *Leishmania*, já foram descritas outras vias de transmissão. Nuwayri-Salti e Khansa (1985), observaram que ratos BALB/c apresentaram infecção por *L. major* após contacto directo prolongado com animais infectados. No entanto, e até à data, não houve mais registos de infecções por esta via.

A infecção por via sexual já foi referida na literatura. Lessa Silva (2007) efectuou um estudo em que observou transmissão venérea de *L. infantum* entre cães. Foi detectado ADN do parasita no sêmen. Após cópula, 2 cadelas anteriormente livres da infecção efectuaram seroconversão para *Leishmania* (Lessa Silva, 2007). Num estudo utilizando ratos BALB/c, Rosypal e Lindsay (2005a) detectaram ADN de *L. infantum* num macho após cópula com uma fêmea infectada.

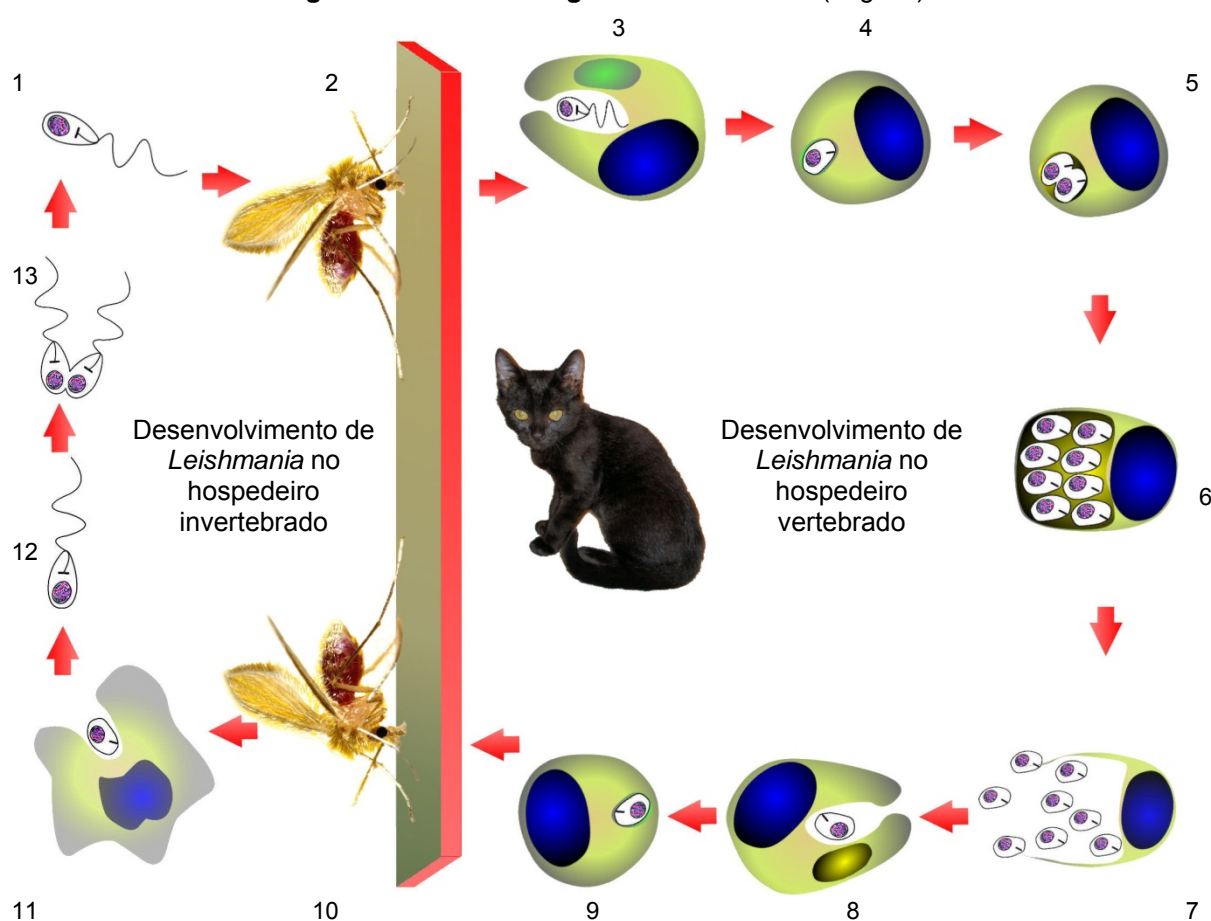
A transmissão vertical também já foi observada. Pangrazio *et al.* (2009, in press) encontraram ADN e amastigostas de *L. infantum* em fetos de cadelas infectadas. Rosypal *et al.* (2005b) provaram a transmissão de *L. infantum* à descendência por uma cadela experimentalmente infectada. A transmissão de fêmeas de ratos BALB/c gestantes experimentalmente infectadas com *L. major* (Nuwayri-Salti & Khansa, 1985) e com *L. infantum* (Rosypal & Lindsay, 2005a) para a sua descendência já foi documentada. Também, existem casos humanos documentados de transmissão vertical de *Leishmania* (Meinecke *et al.*, 1999; Figueiró-Filho, Duarte, El-Beitune, Quintana & Maia, 2004).

Owens *et al.* (2001) documentaram a existência de infecção por *Leishmania* em cães após transfusões de sangue.

Os ixodídeos *Rhipicephalus sanguineus* (Coutinho *et al.*, 2005) e as pulgas *Ctenocephalides felis* (Ferreira, Fattori, Souza & Lima, 2009) também poderão estar implicados na transmissão de *Leishmania*.

Até ao momento, não foram documentados estudos sobre formas de transmissão independentes do vector flebotomíneo em gatos. No entanto, pode ser extrapolado que os gatos em regiões endêmicas devam ser testados para *Leishmania* antes de serem seleccionados como reprodutores ou como dadores de sangue. O uso regular de desparasitantes externos poderá ser aconselhável.

Figura 12 – Ciclo biológico de *Leishmania* (original)



Legenda:

1 – promastigotas metacíclicos alcançam a cavidade oral do flebotomíneo; 2 – deposição dos promastigotas na solução de continuidade existente no vertebrado originada pela picada do flebotomíneo (fotografia adaptada de http://www.vectorbase.org/Image/organism_pictures/P.%20paptasi/Sandfly_17-04.jpg); 3 – internalização dos promastigotas pelos fagócitos; 4 – formação do fagolisossoma contendo o amastigota; 5 e 6 – multiplicação dos amastigotas; 7 – lise do fagócito e libertação dos amastigotas; 8 e 9 – internalização dos amastigotas por outros fagócitos; 10 – ingestão dos fagócitos contendo amastigotas pelo flebotomíneo durante a refeição no vertebrado infectado; 11 – libertação dos amastigotas no intestino do flebotomíneo; 12 – transformação em promastigotas procíclicos; 13 – multiplicações parasitárias intravectoriais.

2. Factores de virulência de *Leishmania*

Na sua superfície, o parasita expressa vários glicoconjugados que, para além de fixarem opsoninas, podem ligar-se directamente a proteínas do macrófago. Entre estes, destacam-se a Glicoproteína 63 (GP63) e o Lipofosfoglicano (LPG) (Tomás & Freitas Romão, 2008).

2.1. Glicoproteína 63

A GP63 transforma o factor C3b em C3bi, isto é, num componente incapaz de activar o complemento. Revestido pelo C3bi, o promastigota penetra nos macrófagos através da proteína CR3. GP63 pode ainda ligar directamente o macrófago através de outros receptores (Yao, Donelson & Wilson, 2003). A GP63 não serve apenas para ligar o parasita ao macrófago mas também é importante na sobrevivência intramacrofágica e na replicação (Chen *et al.*, 2000). Esta protease cinde múltiplas proteínas intracelulares e tem um papel importante em eventos moleculares da célula hospedeira (Hallé *et al.*, 2009).

2.2. Lipofosfoglicano

O LPG desempenha funções diversas no desenvolvimento do parasita no vector. Porém, em algumas espécies de *Leishmania*, nomeadamente em *L. donovoni*, participa também na penetração das células hospedeiras aceitando factores do complemento e ligando-se directamente a CR3 (Tomás & Freitas Romão, 2008).

3. Resposta imunitária

Existe uma ampla variedade de respostas imunes e manifestações clínicas descritas para a LCan. A infecção por *Leishmania* nos cães pode ser manifestada de forma subclínica, doença auto-limitante, doença não-auto-limitante e em doença grave (Solano-Gallego *et al.*, 2009, in press). Nos cães, os dois extremos do espectro clínico são caracterizados por: (1) imunidade protectora mediada pelas células T CD4, pela libertação de IFN- γ , IL-2 e TNF- α que induz actividade anti-*Leishmania* pelos macrófagos, e (2) susceptibilidade à doença associada a uma marcada resposta imunitária humoral não-protectora e uma fraca imunidade mediada por células com uma resposta mista de citocinas Th1 e Th2 (Baneth, Koutinas, Solano-Gallego, Bourdeau & Ferrer, 2008). Neste âmbito, a doença clínica pode manifestar-se desde uma ligeira dermatite papular associada à imunidade celular específica e baixa resposta humoral (Ordeix, Solano-Gallego, Fondevila, Ferrer & Fondati, 2005) a uma doença grave caracterizada por danos renais com glomerulonefrite devidos à deposição de complexos imunes associados com uma maciça resposta humoral e altas cargas parasitárias (Costa *et al.*, 2003).

Hervás *et al.* (2002) realizaram o único estudo efectuado em gatos sobre resposta imunitária local a *Leishmania*. Nesse estudo, foi efectuada uma caracterização imunohistoquímica do infiltrado celular e das citocinas associadas à infecção por *Leishmania* nas lesões cutâneas,

oculares e orais de um gato co-infectado por FIV. Nas lesões nodulares granulomatosas houve um número elevado de linfócitos CD3+ e células plasmáticas IgG+ associados a uma elevada expressão de Ag-MHC classe II por numerosos linfócitos e células macrofágicas, indicando uma boa resposta imunitária local (tipo IV) nestes animais. Esta resposta poderia ser responsável pelo controlo da infecção por *Leishmania* em gatos. O animal co-infectado por FIV demonstrou possuir uma boa resposta imunitária celular, que possivelmente, impediu o desenvolvimento sistémico da infecção.

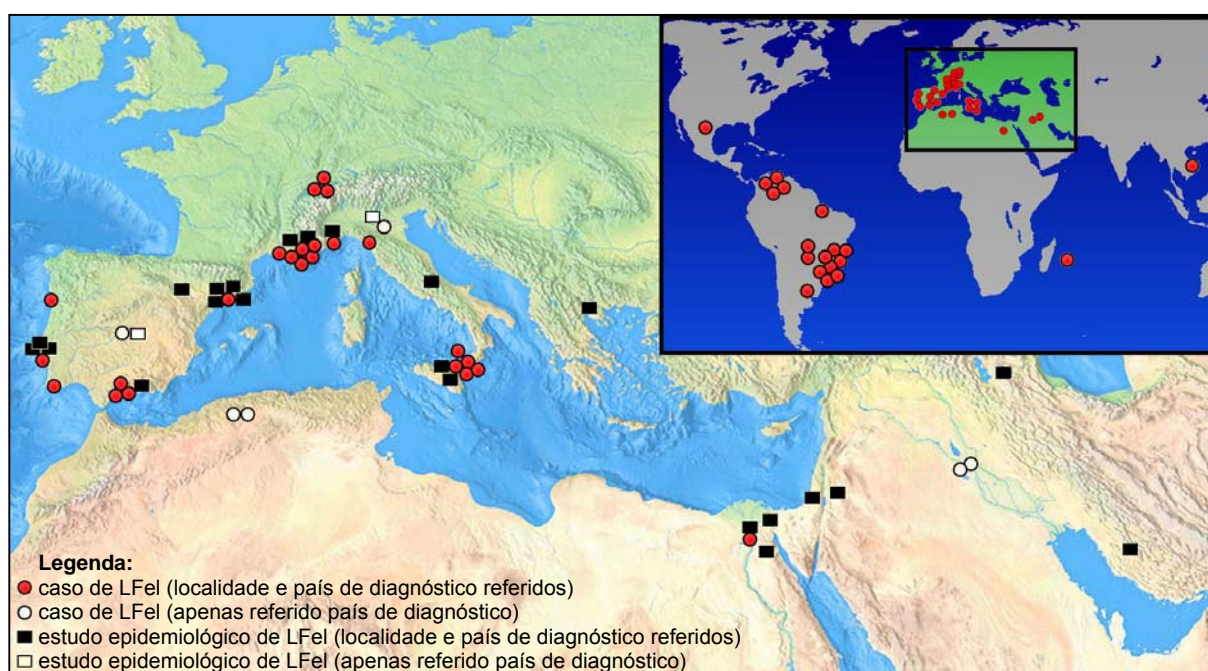
4. Estudo dos casos clínicos de leishmaniose felina

Nesta parte, foram compilados e analisados os dados de todos os casos clínicos de LFel relatados na literatura científica mundial (Anexo 4).

4.1. Prevalência e incidência clínica de leishmaniose felina

Desde 1912 até à actualidade, foram relatados 49 casos clínicos de LFel em todo o Mundo. A prevalência clínica da doença parece baixa, no entanto, a incidência parece estar a aumentar (Anexo 13.b): entre 1912 e 1989, foram documentados 12 (24%) casos. Na década de 1990, foram observados 13 (27%) casos e na presente década (2000 a 2009), foram diagnosticados 24 (49%) casos clínicos de LFel. O aumento da incidência pode dever-se ao aumento da pressão de infecção, ao aumento verificado da população de gatos e à melhoria dos métodos de diagnóstico e dos cuidados de saúde veterinários.

Figura 13 – Mapa de distribuição dos casos mundiais de LFel documentados e dos estudos epidemiológicos de LFel na região mediterrânica até 2009 (mapa original)



4.2. Distribuição geográfica dos casos clínicos de leishmaniose felina

Foram documentados 49 casos clínicos de LFel no Velho Mundo e no Novo Mundo (Figura 13; Tabela 8). A distribuição dos casos de LFel corresponde a zonas endêmicas onde a pressão parasitária é importante. Existem algumas exceções de casos não autóctones: os casos suíços (Schawalder, 1977, citado por Simões-Mattos, Bevilaqua, Mattos & Pompeu, 2004; Rüfenacht *et al.*, 2005) em que os animais eram provenientes de Espanha, o caso vietnamita e o caso da Ilha da Reunião (Bergeon, 1927, Denuzière, 1977, citados por Simões-Mattos *et al.*, 2004). No Brasil, Mello (1940) e Savani *et al.* (2004) relataram casos de gatos doentes e infectados por uma espécie de *Leishmania* não encontrada nos humanos e nos cães dessas regiões.

Tabela 8 – Distribuição geográfica dos casos clínicos de LFel

Continente	N.º de casos de LFel (%)	País	N.º de casos de LFel (%)	Continente	N.º de casos de LFel (%)	País	N.º de casos de LFel (%)
África	4 (8,2%)	Argélia	2 (4,1%)	Ásia	3 (6,1%)	Iraque	2 (4,1%)
		Egipto	1 (2,0%)			Vietname	1 (2,0%)
		Ilha da Reunião	1 (2,0%)	Europa	25 (51,0%)	Espanha	5 (10,2%)
América do Norte	1 (2,0%)	EUA	1 (2,0%)			França	6 (12,2%)
América do Sul	16 (32,7%)	Argentina	1 (2,0%)			Itália	8 (16,3%)
		Brasil	11 (22,4%)			Portugal	3 (6,1%)
		Venezuela	4 (8,2%)			Suíça	3 (6,1%)

4.3. Susceptibilidade dos gatos à infecção por *Leishmania* spp.

4.3.1. Factores intrínsecos: o sexo, a idade, a raça e o tamanho da pelagem

Em 39 dos 49 casos clínicos foi referido o sexo dos animais: 22 (56%) eram fêmeas e 17 (44%) eram machos (Anexo 13.d).

Em 30 casos clínicos foi referida a idade (Anexo 13.a). A idade mais baixa registada foi de quatro meses (Sergent, 1912, citado por Solano-Gallego *et al.*, 2007) e a maior foi de quinze anos (Laruelle-Magalon & Toga, 1996). A média de idades foi de seis anos e um mês. Vinte e um (70%) animais tinham idade inferior a sete anos. Quatro animais foram classificados como adultos e um como jovem mas as suas idades não foram precisadas.

A raça foi referida em onze casos (Anexo 13.e): três gatos eram siameses, quatro eram europeus e quatro não possuíam raça determinada. Para 15 animais foi documentado o tamanho da pelagem (Anexo 13.c): 12 animais apresentaram pelagem curta e três apresentaram pelagem comprida (Pennisi *et al.*, 1999, citado por Pennisi *et al.*, 2002; Barnes *et al.*, 1993; Laruelle-Magalon & Toga, 1996). De notar que, dois dos três animais com pelagem comprida apresentaram lesões na trufa e nas orelhas.

4.3.2. Factores extrínsecos: o modo de vida, o ambiente e as doenças concomitantes

Onze gatos foram descritos como animais errantes ou com acesso ao exterior (Anexo 13.f). Um gato coabitava com uma criança que sofria de leishmaniose visceral humana (LVHum) e um cão com LCan (Sergeant, 1912, citado por Solano-Gallego *et al.*, 2007) e um outro gato coabitava com cães (Grevot *et al.*, 2005). A maioria dos animais provinha de áreas endémicas de LCan ou possuía história de se ter encontrado nessas áreas. As excepções são os casos clínicos do Vietname, da Ilha da Reunião (Bergeon, 1927, Denuzière, 1976, citados por Simões-Mattos *et al.*, 2004) e dois casos do Brasil (Mello, 1940; Savani *et al.*, 2004).

Nos 49 casos clínicos de LFel relatados ocorreram diversas doenças concomitantes (Anexo 5, Anexo 13.i). Em 25 foram pesquisadas as co-infecções por FIV e por FeLV (Anexo 13.g). Desses, quatro (16%) animais apresentaram resultados positivos nos testes para a detecção de FIV e dois (8%) apresentaram resultados positivos nos testes para a detecção de FIV e de FeLV. Foram ainda detectadas co-infecções por Coronavírus (n = 1), Vírus da Peritonite Infecciosa Felina (PIF) (n = 1), *Bartonella henselae* (n = 2) e *Toxoplasma gondii* (n = 4) (Anexo 13.h).

4.4. Disseminação visceral da infecção por *Leishmania* em gatos

Em 22 casos clínicos de LFel ocorreu a disseminação visceral do parasita para a medula óssea, o baço, o fígado, e/ou os linfonodos (Anexos 13.s, 13.u, 13.v). Foi efectuada a identificação do agente em seis casos sendo que em cinco foi identificada a espécie *L. infantum* e num caso foi identificado *L. chagasi* (Savani *et al.*, 2004). O zimodeme MON-1 de *L. infantum* foi encontrado em dois animais (Ozon *et al.*, 1998; Grevot *et al.*, 2005).

4.5. Sinais clínicos de leishmaniose felina

4.5.1. Lesões cutâneas

Dos 44 casos de LFel em que foi possível analisar os sinais clínicos, 38 (86%) gatos apresentaram sinais cutâneos (Anexo 6). Em 16 animais os sinais cutâneos foram os únicos sinais e noutros 16 também se observaram sinais gerais. Cinco gatos apresentaram sinais cutâneos associados a sinais gerais e oculares e um animal apresentou sinais cutâneos e oculares (Anexo 13.j).

4.5.1.1. Localização das lesões cutâneas

As lesões cutâneas de LFel observaram-se principalmente na cabeça (79% dos animais que apresentaram sinais cutâneos): na trufa (50%), nos pavilhões auriculares (34%), na cavidade bucal e/ou nos lábios (16%), no canto medial do olho (8%) e nas pálpebras (11%).

Alguns apresentaram lesões nos membros (21%), no pescoço (8%), na região dorso-lombar (5%), no tórax (3%), no abdómen (3%) e na cauda (3%) (Anexo 13.I). De notar que, 23 (61%) dos 38 animais com lesões cutâneas apresentaram-nas na trufa e/ou pavilhões auriculares.

4.5.1.2. Tipos de lesões cutâneas observadas

As principais lesões observadas foram as úlceras e os nódulos hemorrágicos ou ulcerados principalmente localizados sobre o focinho (78% dos casos que apresentaram sinais cutâneos) (Anexo 13.m). Nove (24%) animais apresentaram alopecias localizadas ou difusas e sete (18%) apresentaram crostas. Em quatro gatos (11%) observou-se eritema, em dois (5%) observaram-se pápulas e outros dois (5%) apresentaram pústulas. Cinco animais (13%) apresentaram estomatites. Houve três (8%) gatos que apresentaram descamação e dois apresentaram seborreia. Em dois gatos observaram-se lesões vegetativas. De notar que, o único caso da dermatite miliar se deveu a uma dermatite alérgica à picada das pulgas.

Figura 14 – Lesão ulcerosa de um gato com LFel (seta)
(adaptado de <http://www2.vet-lyon.fr/ens/DPC/parasites/malleish.html>; acedido em Jul 2, 2009)

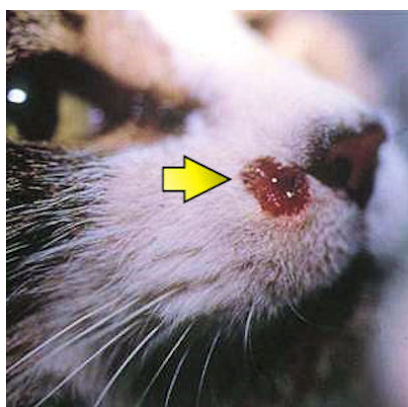


Figura 15 – Lesão nodular de um gato com LFel (seta) (adaptado de <http://www2.vetlyon.fr/ens/DPC/parasites/malleish.html>; acedido em Jul 2, 2009)

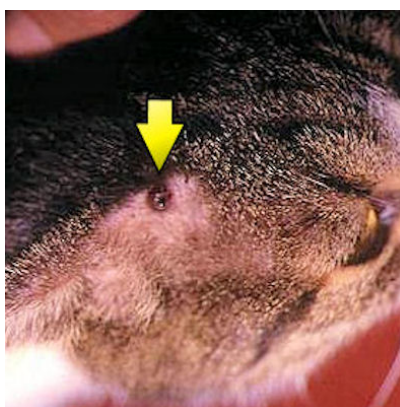


Figura 16 – Pústulas e crostas do interior do pavilhão auricular de um gato com LFel
(adaptado de Rüfenacht *et al.*, 2005)



Figura 17 – Crostas, pústulas, despigmentação e eritema da trufa de um gato com LFel
(adaptado de Rüfenacht *et al.*, 2005)



Figura 18 – Dermatite ulcerativa periocular (setas)
(adaptado de Laruelle-Magalon & Toga, 1996)

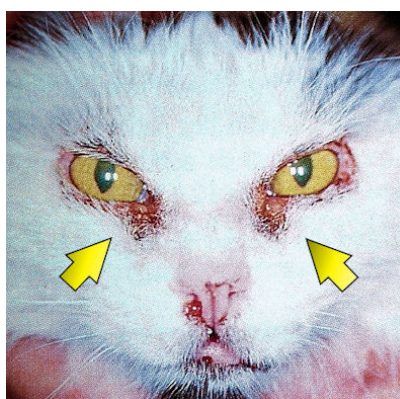
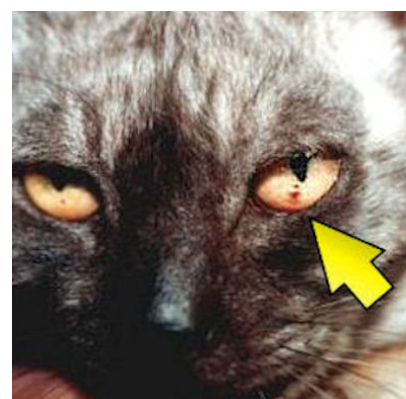


Figura 19 – Uveíte e coágulo de fibrina dentro da câmara anterior dos olhos de um gato com LFel (seta)
(adaptado de Pennisi, 2002)



4.5.2. Sinais oculares

Os sinais oculares foram observados em oito gatos (18% dos casos de LFel em que foram relatados os sinais clínicos) (Anexo 7; Anexo 13.n). A maioria destes animais (88%) apresentou uveítes uni ou bilaterais, por vezes, associadas a queratites (25%), coriorretinites (13%) e conjuntivites (13%).

4.5.3. Sinais gerais

Vinte e seis (59%) dos 44 casos relatados apresentaram sinais gerais (Anexo 7; Anexo 13.o). A LFel pode manifestar-se unicamente com sinais gerais (9%) ou sinais gerais associados a sinais cutâneos (36%) ou oculares (2%), ou associados a ambos (11%). A lista de sinais gerais é heterogénea e vasta, pelo que nenhum sinal é patognomónico desta doença. De referir a existência de mau estado geral ou caquécia em doze (46%) dos casos com sinais gerais, em sete (27%) houve depressão ou apatia, em seis (23%) observou-se anorexia. Quatro (15%) gatos demonstraram desidratação e quatro (15%) apresentaram dispneia. Em quatro (15%) animais verificou-se hepatomegália, em três (12%) observou-se esplenomegália e outros três (12%) apresentaram febre. De salientar que, doze (46%) gatos apresentaram adenomegália: sete (27%) generalizada e cinco (19%) localizada. Alguns sinais podem ter sido devidos a doenças concomitantes (e.g. dispneia nos animais com broncopneumonia ou com bronquite parasitária).

4.6. Diagnóstico laboratorial de leishmaniose felina

4.6.1. Alterações hematológicas e bioquímicas

Alguns gatos com leishmaniose felina não apresentaram alterações hematológicas ou bioquímicas (Schubach *et al.*, 2004; Figueiredo *et al.*, 2008) (Anexo 8; Anexo 13.p; Anexo 13.q). Porém, em 18 casos clínicos estas alterações foram relatadas: leucocitose (n = 6), neutrofilia (n = 6), anemia (n = 4), leucopénia (n = 4), eosinofilia (n = 3), neutropénia (n = 2), trombocitopénia (n = 2), linfocitose (n = 1), linfopénia (n = 1) e monocitose (n = 1). À electroforese das proteínas séricas, foi registada uma hiperglobulinémia em nove (50%) gatos e uma elevação das gamaglobulinas em oito (44%) gatos. Num estudo epidemiológico efectuado por Pennisi *et al.* (2000, citados por Pennisi, 2002) foi encontrada uma associação significativa ligeira entre o resultado positivo obtido pela técnica da PCR e a presença de hipergamaglobulinémia.

4.6.2. Métodos de diagnóstico

Existem vários tipos de métodos de diagnóstico: os métodos parasitológicos que permitem realizar um diagnóstico por observação directa do parasita mas que possuem uma baixa sensibilidade, e os métodos indirectos (serológicos e moleculares) que são mais sensíveis mas que não provam uma infecção activa, sendo apenas testemunhas de uma exposição a *Leishmania* (Venet, 2007). Os resultados destas técnicas devem ter em conta o contexto clínico e epidemiológico do animal.

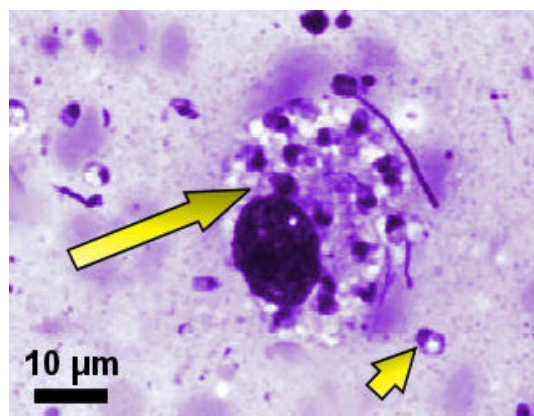
4.6.2.1. Métodos parasitológicos directos: histopatologia e citopatologia

Em 45 casos clínicos foram utilizados exames citológicos ou histológicos para a observação microscópica de formas amastigotas de *Leishmania* (Anexo 9; Anexo 13.s). O parasita foi observado nas lesões cutâneas de todos os 29 gatos em que foi procurado. Foram encontradas formas amastigotas de *Leishmania* nos linfonodos (n = 15), na medula óssea (n = 5), no fígado (n = 3), no baço (n = 3), nos olhos (n = 2), no sangue (n = 2) e no intestino e estômago (n = 1).

Nos casos de LFel em que foi efectuada histopatologia observaram-se lesões inflamatórias granulomatosas associadas ou não à presença de formas amastigotas de *Leishmania* visíveis nos macrófagos (Costa-Durão, Rebelo, Peleteiro, Correia, & Simões, 1994; Ozon *et al.*, 1998; Schubach *et al.*, 2004; Rufenacht *et al.*, 2005). A observação dessas lesões e a ausência de parasitas visíveis deve conduzir à realização de outros exames complementares mais sensíveis. A imunohistoquímica permite pôr em evidência parasitas não visíveis em coloração clássica. Este método foi utilizado em quatro gatos, sendo que em três foram visíveis os protozoários (Costa-Durão *et al.*, 1994; Leiva *et al.*, 2002; Poli *et al.*, 2002).

Figura 20 – Formas amastigotas de *Leishmania chagasi*

Observar amastigotas dentro (seta longa) e fora (seta curta) de um macrófago retirado de um nódulo cutâneo de um gato (adaptado de Savani *et al.*, 2004)



4.6.2.2. Isolamento de *Leishmania in vitro* – cultura

O isolamento *in vitro* oferece vantagens sobre os métodos *in vivo*: as culturas tornam-se positivas mais rapidamente (5 a 30 dias comparado com meses para o aparecimento de lesões num animal) e o material é menos dispendioso. Apesar disso, o isolamento *in vitro* exige uma execução em condições estéreis. Infelizmente, não existe um meio de cultura “universal” em que todas as leishmanias se multipliquem facilmente, é quase impossível prever qual o meio que se adequará a um particular isolado de *Leishmania*. Quando se

tenta fazer um isolamento primário de organismos desconhecidos, deve ser utilizado um meio do tipo agar-sangue (preferencialmente o meio Novy, McNeil e Nicolle), o meio de infusão cérebro-coração ou o meio de Tobie modificado por Evan (OIE, 2008). A amostra mistura-se com um meio de cultura, incuba-se e, depois, examina-se ao microscópio ao fim de uma semana para a detecção de formas promastigotas. Em caso de resultado negativo, procede-se a uma nova cultura por uma semana, e assim durante quatro semanas antes de se obter uma resposta definitiva (Maia & Campino, 2008b). Em alguns casos clínicos de LFel foi efectuada a cultura do parasita (Anexo 10; Anexo 13.u).

4.6.2.3. Técnicas moleculares

As técnicas baseadas na Reacção da Polimerase em Cadeia (PCR) já foram utilizadas para a identificação de *Leishmania* em 13 gatos (Anexo 10; Anexo 13.v).

A técnica da PCR consiste na extracção do ácido desoxirribonucleico (ADN), seguida da amplificação do material genético utilizando sequências oligonucleotídicas – “primers”. Os “primers” são seleccionados de uma pequena subunidade de um gene de ácido ribonucleico ribossómico, de minicírculos de ADN do cinetoplasto ou de sequências de ADN genómicas altamente repetitivas. Por fim, efectua-se a análise dos produtos amplificados (OIE, 2008).

Na LCan, a técnica da PCR é fiável, altamente sensível, relativamente rápida e reproduzível. A técnica da PCR é muito mais sensível que os métodos parasitológicos e serológicos, tanto em cães sintomáticos como assintomáticos, sendo capaz de detectar uma infecção por *L. infantum* mesmo quando aqueles testes não são capazes de a detectar. As amostras de medula óssea e de pele são ligeiramente mais sensíveis que o sangue (Quaresma *et al.*, 2009). Nos cães, a técnica da PCR, utilizando sangue, tem levantado algumas questões, nomeadamente, a duração, a constância e a intensidade da parasitémia são em grande medida desconhecidas (Maia & Campino, 2008b), originando falsos negativos em especial em cães assintomáticos. Por outro lado, durante a época de transmissão podem ocorrer falsos positivos devido às infecções transitórias (Maia & Campino, 2008b). No estudo epidemiológico realizado em Itália por Boari *et al.* (2005, citado por Venet, 2007), em 203 gatos errantes, 33 foram positivos pela técnica da imunofluorescência indirecta (IFI). Onze gatos seropositivos foram testados novamente dois a seis meses depois. Seis eram já seronegativos, no entanto, o ADN de *L. infantum* ainda foi detectado nos linfonodos dos 11 animais. Ao mesmo tempo, a técnica da PCR efectuada ao sangue só permitiu identificar ADN do parasita em 5 gatos. A técnica da PCR efectuada aos linfonodos e à medula óssea parece mais eficaz que a técnica da PCR efectuada ao sangue. No entanto, a obtenção de amostras destes dois tecidos é mais invasiva.

Nos casos clínicos de LFel, os tecidos utilizados na técnica da PCR foram o sangue (n = 5), o tecido cutâneo lesionado (n = 4), os linfonodos (n = 3), a medula óssea (n = 2) e o baço (n = 1). Em três gatos não foi especificado o tecido utilizado. O parasita *L. infantum* foi

identificado em quatro animais (Poli *et al.*, 2002, Savani *et al.*, 2004, Serrano *et al.*, 2008, Marcos *et al.*, 2009) e num gato foi identificado o subgénero *Viannia* (Passos, Lasmar, Gontijo, Fernandes, & Degrave, 1996).

4.6.2.4. Técnicas serológicas

As técnicas serológicas são as técnicas preferenciais para o diagnóstico de LCan e LVHum, mesmo durante as fases iniciais da doença. Nas formas subclínicas, os casos seropositivos devem ser confirmados por diagnóstico parasitológico ou pela técnica da PCR. A serologia tem menos valor na leishmaniose cutânea e na leishmaniose mucocutânea humana (OIE, 2008). Como o número de casos clínicos de LFel diagnosticados é reduzido, é difícil o estabelecimento de valores limites próprios a esta espécie bem como a obtenção de animais controlos positivos (Venet, 2007), no entanto, foram utilizadas várias técnicas serológicas (Anexo 9; Anexo 13.r).

Na LCan visceral, altos títulos de anticorpos indicam infecção activa e potencial transmissão do protozoário para os vectores (Quinnell *et al.*, 2003). No entanto, vários estudos demonstraram que o mesmo não ocorre nos casos de LFel.

Kirckpatrick *et al.* (1984, citados por Venet, 2007) efectuaram a inoculação intradérmica de formas promastigotas de *L. infantum* em seis gatos. Só ocorreu um aumento significativo da taxa de anticorpos (16 semanas pós-infecção) quando já nenhum parasita foi encontrado no sangue, na medula óssea, no baço e no fígado.

Martín-Sánchez *et al.* (2007) efectuaram um estudo epidemiológico em que verificaram que a frequência de resultados positivos para a técnica da PCR (ADN de *L. infantum*) em gatos com títulos ≤ 20 e títulos ≥ 40 pela técnica da IFI foram semelhantes. Além disso, a maior proporção de resultados positivos obtidos pela técnica da PCR foi observada em gatos com títulos de anticorpos iguais a 20 e a menor proporção de resultados positivos obtidos pela técnica da PCR foi apresentada pela população com maior título de anticorpos anti-*Leishmania* (≥ 160). Aqueles investigadores concluíram que os métodos serológicos convencionais não são eficazes para detectar a infecção activa em gatos. Os resultados obtidos por Martín-Sánchez *et al.* (2007), no seguimento dos gatos com resultados positivos, podem até sugerir a possibilidade da resposta imunitária humoral ter um papel protector em gatos infectados com *Leishmania*. Resultados semelhantes foram obtidos no estudo de Simões-Mattos *et al.* (2005), que após infectarem experimentalmente um gato com *L. braziliensis*, não obtiveram uma correlação entre as lesões activas contendo o parasita e o resultado positivo na técnica serológica. A emergência das lesões precedeu a produção de anticorpos, além disso, todos os gatos só apresentaram seropositividade quando as lesões já estavam em fase de resolução. Uchôa *et al.* (2001) já tinham detectado que não havia uma associação entre a infecção activa por *L. braziliensis* em cães e os resultados da sorologia pela técnica da IFI.

a) Técnica da imunofluorescência indirecta (IFI)

A técnica da IFI permite detectar anticorpos anti-*Leishmania* e é amplamente utilizada pela sua facilidade de execução. Esta técnica é específica do género, embora possam ocorrer reacções cruzadas com *Trypanosoma cruzi*. Em áreas livres de *T. cruzi*, a técnica da IFI para o diagnóstico clínico de LVHum ou LCan tem uma sensibilidade de 96% e uma especificidade de 98%. Embora os amastigotas possam ser utilizados como antígenos, os promastigotas representam a forma de antígeno mais frequentemente utilizada (OIE, 2008). A técnica da IFI foi utilizada em 13 estudos seroepidemiológicos de LFel e em 17 casos clínicos de LFel (Anexo 3; Anexo 13.r).

b) “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay” (ELISA)

A técnica de ELISA pode ser efectuada em soro ou em sangue. Após picada com uma agulha, o sangue é recolhido num papel absorvente apropriado e deixado a secar. A amostra é eluída e testada numa única diluição previamente determinada para fornecer uma sensibilidade e uma especificidade aceitáveis. Esta técnica pode ser utilizada em estudos seroepidemiológicos em condições de campo (OIE, 2008). A técnica de ELISA foi utilizada em nove estudos seroepidemiológicos de LFel e em nove casos clínicos de LFel (Anexo 3; Anexo 9; Anexo 13.r).

c) Outros métodos utilizados no diagnóstico de leishmaniose felina

Outros métodos laboratoriais de diagnóstico utilizados para detectar casos de LFel incluíram o teste de aglutinação directa (DAT) (Ozon *et al.*, 1998), o teste de hemaglutinação indirecta (IHA) (Morsy *et al.*, 1994; Marcos *et al.*, 2009), a imunoprecipitação (Laruelle-Magalon & Toga, 1996) e o Western-blot (WB) (Laruelle-Magalon & Toga, 1996; Ozon *et al.*, 1998; Grevot *et al.*, 2005).

4.7. Tratamento e evolução do estado clínico dos animais com leishmaniose felina

4.7.1. Moléculas activas sobre as leishmanias

Os principais compostos usados no tratamento das leishmanioses incluem os compostos antimoniais pentavalentes (Estibogluconato de Sódio e Antimoniato de Meglumina), a Aminosidina (antibiótico aminoglicósido), a Anfotericina B (antibiótico poliénico com elevada afinidade para o Ergosterol), a Pentamidina (diamidina aromática), a Miltefosina, o Alopurinol, as alilaminas (e.g. Terbinafina) e os derivados do Imidazol (e.g. Ketoconazol e Itraconazol) (Croft, Yardley & Kendrick, 2002; Croft & Coombs, 2003; Meireles, 2008)

4.7.2. Evolução do estado clínico dos animais com leishmaniose felina

Em 27 casos de LFel, a evolução do estado clínico do animal foi observada (Anexo 12; Anexo 13.x; Anexo 13.z). Como essa observação não foi padronizada, a comparação entre os casos ficou dificultada. Nove (33%) gatos alcançaram a cura clínica e 16 (59%) animais morreram ou foram eutanasiados. As mortes nem sempre foram devidas à LFel tendo sido, por vezes, originadas por doenças concomitantes.

4.7.2.1. Gatos não tratados com fármacos anti-*Leishmania*

Dos 27 gatos em que a evolução do estado clínico foi observada, 14 gatos não receberam nenhum tratamento específico contra a leishmaniose. Desses 14 gatos, 11 (79%) morreram ou foram eutanasiados. Dos 11 gatos que morreram, sete deles apresentaram disseminação visceral do parasita. Além disso, desses 11 animais alguns apresentaram doenças concomitantes graves: um animal apresentou uma infecção por FIV, uma insuficiência renal crónica (IRC) e uma broncopneumonia com piotórax (Pennisi *et al.*, 1999, citado por Pennisi *et al.*, 2002), um outro animal também apresentou IRC e infecção por FIV (Pennisi *et al.*, 2002) e outro apresentou um carcinoma espinocelular, uma co-infecção por FIV e por FeLV (Grevot *et al.*, 2005). Mais dois animais (dos 11 que morreram) apresentaram-se infectados por FIV.

4.7.2.2. Gatos em que foi efectuada a exérese do tecido cutâneo lesionado

Em seis gatos efectuou-se a exérese do tecido cutâneo lesionado. Em dois desses animais ocorreram recidivas da lesão (Costa-Durão *et al.*, 1994; Leiva, 2002), num ocorreu a cura clínica mesmo na ausência de qualquer tratamento adicional (Verneuil, 2006) e noutro animal, que não recebeu qualquer tratamento específico anti-*Leishmania*, ocorreu a morte (Poli *et al.*, 2002).

4.7.2.3. Gatos tratados contra a leishmaniose

Os ensaios terapêuticos foram realizados em 13 gatos, e a cura clínica foi obtida em sete (54%) desses animais. Vários tratamentos foram testados a partir de moléculas mais ou menos eficazes nos cães e no homem (Anexo 13.z).

O Antimoniato de Meglumina foi utilizado em três gatos: dois animais apresentaram cura clínica (num foi utilizada associação com Ketoconazol) e noutro houve melhoras significativas.

O Alopurinol foi administrado em seis gatos: a cura clínica foi obtida em quatro, um gato obteve melhoras significativas (houve associação com Itraconazol e Ketoconazol) e outro morreu.

A Pentamidina foi utilizada duas vezes: num animal ocorreu a cura clínica e noutra ocorreu a morte. O Fluconazole, o Clotrimazole, o Levamisole, a Aminosidina e o Metronidazol associado com Espiramicina também foram utilizados, porém, em todos os animais em que foram administrados não houve melhoras clínicas e ocorreu a morte.

No entanto, estes ensaios terapêuticos, não permitem tirar conclusões significativas de sucesso terapêutico com a administração de um fármaco específico, uma vez que o número de casos de LFel em que o tratamento foi efectuado foi muito baixo e os ensaios não foram padronizados. A existência de várias doenças concomitantes pode ter determinado a morte de alguns animais.

5. Profilaxia

5.1. Controlo dos vectores

Uma protecção eficaz contra os flebotómíneos deve incluir a permanência dos animais dentro da habitação durante o período de maior actividade dos vectores (em especial, do anoitecer ao amanhecer), a redução dos microhabitats favoráveis aos flebotómíneos, a utilização de pulverizações com soluções insecticidas e a utilização de insecticidas tópicos com actividade comprovada contra o vector. Os piretróides são insecticidas de acção residual eficazes contra as espécies flebotómicas. O uso de repelentes na pele e na roupa pode ser eficaz para os humanos. Como os locais de criadouros dos flebotómíneos são geralmente desconhecidos as medidas de controlo dos vectores imaturos são pouco eficazes (Alexander & Maroli, 2003; Amóra, Bevilaqua, Feijó, Alves & Maciel, 2009). Em algumas zonas da Índia, algumas espécies de flebotómíneos já apresentaram resistências ao DDT, à Dieldrina, ao Malatião e à Permetrina (Mittal, Wijeyaratne & Pandey, 2004). Já ficou demonstrado que a utilização de redes impregnadas com insecticidas nas janelas é muito eficaz na eliminação dos flebotómíneos endofílicos (Killick-Kendrick, 1999), pelo que poderia ser uma forma eficaz de evitar a infecção por *Leishmania* nos humanos e nos gatos domésticos. No cão, o principal reservatório de *L. infantum*, é aconselhado o uso de coleiras impregnadas de Deltametrina (Manzillo *et al.*, 2006) que possuem uma acção repelente sobre os flebotómíneos. Deve ter-se em conta que os piretróides, aconselhados nos cães, são tóxicos para os gatos (Sutton, Battes & Campbell, 2007).

5.2. Perspectivas futuras para o tratamento e a profilaxia da leishmaniose felina

Os genomas de *L. major* (Ivens *et al.*, 2005), de *L. infantum* e de *L. braziliensis* (Peacock *et al.*, 2007) já se encontram totalmente sequenciados. O conhecimento dos seus genes poderá melhorar a compreensão sobre estes parasitas, podendo levar à identificação de alvos para novas armas terapêuticas e medidas profiláticas mais seguras e eficazes.

Estão a ser testadas algumas vacinas para cães que demonstraram ter elevada eficácia. Uma delas, composta de antigénios de *L. infantum*, está a ser testada em França (Lemesre

et al., 2007). No Brasil, já existe uma vacina (Leishmune[®]) para a LCan, que demonstrou um efeito protector de 95% nos cães vacinados e uma eficácia vacinal de 80% (Borja-Cabrera *et al.*, 2002). Esta vacina bloqueia a transmissão do parasita pois promove o aumento dos anticorpos no sangue dos cães protegidos que impedem a ligação das leishmanias aos intestinos médios dos flebotomíneos. Foi demonstrada a diminuição da incidência da LVHum e LCan após a vacinação em áreas endémicas do Brasil (Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2009) Até ao momento não houve relatos de estudos de imunoprofilaxia em gatos, mas estes animais poderão beneficiar muito da imunização dos cães (os principais reservatórios de *L. infantum*).

6. Epidemiologia da leishmaniose felina

6.1. Prevalências obtidas pelos métodos parasitológicos directos: histopatologia e citopatologia (Anexo 2)

Dos sete estudos seroepidemiológicos efectuados recorrendo a histopatologia e citopatologia de fígado, baço, medula óssea ou tecido auricular as prevalências variaram entre 0% (Giordano, 1933, Alencar *et al.*, 1955, Deane *et al.*, 1956, citados por Venet, 2007) e 20,5% (16/78 animais) (Morsy *et al.*, 1980, citados por Venet, 2007). Recorrendo a estes métodos foi possível observar formas amastigotas de *Leishmania* em 19 (1%) dos 1304 animais testados em estudos epidemiológicos em todo o Mundo.

6.2. Prevalências obtidas pelos métodos moleculares (Anexo 2)

Dos quatro estudos efectuados recorrendo a técnica da PCR obtiveram-se prevalências de 0% (0/26 gatos) (Venet, 2007), de 25,7% (47/183 gatos) (Martín-Sánchez *et al.*, 2007), de 30,4% (7/23 gatos) (Maia *et al.*, 2008a) e de 61% (54/89 gatos) (Pennisi *et al.*, 2000, citados por Pennisi, 2002). Foi encontrado ADN de *Leishmania* em 108 (34%) dos 321 animais testados pela técnica da PCR a nível mundial.

6.3. Prevalências obtidas pelos diferentes métodos serológicos

Os estudos seroepidemiológicos (IFI, IHA, WB, ELISA, DAT) foram realizados no Egipto, Israel, Brasil, Portugal, Espanha, França, Itália e Grécia.

A técnica da IFI foi utilizada em 13 estudos, as prevalências variaram entre 0% (Sherlock *et al.*, 1996, citados por Venet, 2007; Faria, 2008; Figueiredo *et al.*, 2009) e os 68% (60/89 gatos) (Pennisi *et al.*, 2000, citados por Pennisi *et al.*, 2002).

A técnica de ELISA foi utilizada em nove estudos, as prevalências obtidas variaram entre os 1,7% (Portus *et al.*, 2002, citados por Pennisi, 2002) e os 40,5% (43/106) (Simões-Mattos *et al.*, 2002, citados por Venet, 2007).

O teste de aglutinação directa foi utilizado por Ramos *et al.* (2002) e permitiu obter uma prevalência de 42% (21/50 gatos com imunodisfunções).

O Western Blot foi utilizado em três estudos (Marechal, 1993, citados por Venet, 2007; Ozon *et al.*, 1999, citados por Venet, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2007) assim como a técnica da hemaglutinação indirecta (IHA) (Michael *et al.*, 1982, citados por Pennisi, 2002; Morsy *et al.*, 1988, citados por Pennisi, 2002; Morsy & El Seoud, 1994)

6.4. Resultados importantes obtidos através dos estudos epidemiológicos

6.4.1. Susceptibilidade dos gatos à infecção por *Leishmania*

6.4.1.1. Factores intrínsecos

Pennisi *et al.* (2000, citados por Pennisi, 2002) encontraram uma associação ligeira de resultados positivos pela técnica da PCR (ADN de *Leishmania*), o sexo (fêmeas) e a idade (≥ 2 anos), mas, não houve associação com a raça. Noutro estudo, Nasereddin, Salant, & Abdeen (2008) não encontraram diferenças significativas para o sexo nem para a idade em gatos que apresentaram anticorpos anti-*Leishmania*. Vita *et al.* (2005) detectaram anticorpos (IFI nas diluições $\geq 1:40$) em gatos desde os três meses aos 16 anos.

6.4.1.2. Factores extrínsecos

Vita *et al.* (2005) observaram que 85% (28/33) dos animais que tinham anticorpos eram animais errantes ou com acesso ao exterior. No estudo de Ozon *et al.* (1999, citados por Venet, 2007) observou-se que o número de gatos seropositivos que vivem dentro de habitações era muito inferior ao número de gatos seropositivos que viviam no exterior (não foi referido se os resultados eram significativos).

Nasereddin *et al.* (2008) encontraram uma correlação significativa entre uma altitude maior que 762 metros (Jerusalém) e a seropositividade para *Leishmania* e não encontrou uma associação significativa com a seropositividade para *T. gondii*.

Os resultados obtidos nos estudos epidemiológicos sobre as co-infecções por FIV e por FeLV serão referidos mais adiante (página 63).

6.5. Conclusões obtidas a partir dos estudos epidemiológicos

Os métodos parasitológicos directos demonstraram a existência de uma circulação de *Leishmania* na espécie felina (1% dos 1304 animais testados) e a técnica da PCR detectou a presença de ADN do parasita na mesma espécie (34% dos 321 animais testados). Os métodos serológicos detectaram que 16% dos 2881 gatos testados estiveram em contacto com *Leishmania* e desenvolveram uma resposta imunitária, no entanto, estes métodos não indicam a existência de circulação activa do parasita no animal.

As prevalências obtidas através dos métodos parasitológicos (entre 0% e 20,5%), moleculares (entre 0% e 61%) e serológicos (entre os 0% e os 68%) foram muito díspares e

isto ficou a dever-se a vários factores. Devem ser tidas em conta as distintas sensibilidades dos métodos utilizados bem como as diferentes pressões de infecção. Além disso, as distintas distribuições geográficas, em diferentes períodos de tempo, e no caso dos métodos parasitológicos e da técnica da PCR, os diferentes tecidos testados (sangue, fígado, baço, medula óssea, tecido auricular) são também factores relevantes na interpretação desses valores.

É difícil avaliar a importância da circulação de *Leishmania* nos gatos, porque os métodos serológicos e a técnica da PCR não indicam directamente uma circulação destes parasitas e os métodos parasitológicos directos são menos sensíveis. Também, as disparidades regionais e de pressões de infecção dos vários estudos devem ser levadas em consideração.

7. Contributo dos estudos experimentais na compreensão da leishmaniose felina

7.1. Experiências de inoculação com *Leishmania* em gatos

7.1.1. Experiência de Anjili & Githure (1993, citados por Venet, 2007)

No Quênia, doze gatos errantes foram infectados com *L. donovani*: seis gatos por via intravenosa (IV) e seis gatos por via intra-cardíaca. Um gato de cada grupo foi sacrificado aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias após a infecção. Para todos os gatos, as culturas e esfregaços de medula óssea, fígado, baço, rins e linfonodos apresentaram resultados negativos.

7.1.2. Experiência de Kirckpatrick *et al.* (1984, citados por Venet, 2007)

Foi efectuada uma inoculação IV de amastigotas de *L. donovani* e de *L. infantum* em gatos. Os amastigotas de *L. donovani* foram detectados no fígado, no baço e na medula óssea, nas oito primeiras semanas pós-infecção (SPI). As culturas de sangue foram positivas unicamente nas primeiras duas SPI. A taxa de anticorpos elevou-se significativamente cerca das oito SPI. O mesmo fenómeno foi observado após a infecção por *L. infantum*, com um atraso de 16 SPI, mas nenhuma cultura com sangue foi positiva. A inoculação intradérmica (ID) de formas promastigotas de *L. infantum* em seis gatos promoveu um aumento significativo da taxa de anticorpos quando já nenhum parasita foi encontrado no sangue, na medula óssea, no baço ou no fígado. Concluiu-se que os gatos domésticos eram menos sensíveis à infecção por *L. donovani* ou *L. infantum* por inoculação IV que os hamsters, os cães e algumas espécies de roedores. Observou-se que o gato foi mais sensível à infecção que os ratos e os coelhos de laboratório. Como apenas duas espécies de *Leishmania* foram inoculadas, foi sugerida a existência de “estirpes” mais virulentas para estes felinos. Os gatos produziram quantidades de anticorpos anti-*Leishmania* relativamente elevadas e detectáveis pela técnica da IFI, qualquer que tivesse sido a via de inoculação.

7.1.3. Experiência de Simões-Mattos *et al.* (2005)

Simões-Mattos *et al.* (2005) efectuaram a inoculação ID de 10^7 formas promastigotas de *L. braziliensis* na trufa e nas orelhas de 13 gatos errantes. Realizou-se a observação ao longo de 72 semanas. Às duas SPI, surgiu uma pápula na orelha seguida da emergência de pápulas-satélite à volta da lesão primária (cerca das quatro SPI). Duas semanas depois, as pápulas coalesceram e formaram um nódulo grande e irregular. Para além disso, ocorreu a disseminação da lesão (em 40% dos gatos) para a superfície externa e para margem do pavilhão auricular e, mais tarde, para a outra orelha. Na 10.^a SPI, alguns nódulos ulceraram. As lesões nasais apresentaram uma evolução semelhante. Em ambos os locais de inoculação, as lesões alcançaram o seu tamanho máximo na 10.^a SPI e começaram a decrescer na 12.^a SPI. Os nódulos das orelhas e da trufa desapareceram respectivamente na 32.^a e 40.^a SPI. Uma adenomegália regional foi observada na 11.^a SPI na maioria (92,3%) dos animais. No final da experiência, foi ainda detectada em dois dos oito gatos restantes. Apesar disso, a doença foi controlada e todos os animais aparentavam estar sãos. Nenhum dos gatos apresentou sinais de disseminação visceral, nem formas amastigotas na medula óssea, no fígado ou no baço. No decorrer da experiência, a pelagem dos gatos tornou-se seca e quebradiça, dez gatos apresentaram espirros e fluxo nasal e cinco apresentaram perda de peso. No final das 72 semanas, só um gato apresentou uma alopecia bilateral nos membros e um outro gato demonstrou episódios de espirros. Os títulos de anticorpos IgG específicos para *L. braziliensis* foram detectados às duas SPI em apenas três (23%) felinos. A seroconversão média do título de anticorpos ocorreu quando as lesões já estavam na fase de resolução. O título máximo de anticorpos ocorreu na 20.^a SPI, quando as lesões já estavam claramente diminuídas. Três animais continuaram a apresentar serologia positiva na 72.^a SPI. Até essa altura, nenhum gato apresentou recorrência da lesão.

7.2. Inoculação de isolados de leishmanias de origem felina em animais de laboratório

O hamster (*Mesocricetus auratus*) é o animal mais frequentemente utilizado para o isolamento *in vivo*. As suspensões de tecido ou os aspirados são inoculados ID na trufa ou nos membros para a detecção de parasitas dermatrópicos. Quando o material é suspeito de estar infectado com parasitas causadores de leishmaniose visceral a inoculação deve ser via intraperitoneal. A infecção resultante torna-se aparente, semanas ou meses depois, com o desenvolvimento de nódulos ou úlceras no local de inoculação e no caso de parasitas viscerotrópicos, a infecção torna-se aparente, meses depois, pela infecção dos órgãos internos. Os esfregaços dos tecidos do hamster são corados com Giemsa para pesquisa de amastigotas (OIE, 2008). A inoculação de material proveniente de gatos infectados foi várias vezes bem sucedida no hamster (Craig *et al.*, 1986; Bonfante-Garrido *et al.*, 1996; Souza,

Nunes, Borralho & Ishikawa, 2009). No entanto, esta técnica só é utilizada em investigação devido ao prolongado tempo de incubação.

Foram feitas inoculações em diversas espécies (cobaíes, ratos domésticos, ratos brancos, cães, gatos, sauiás) com material proveniente de gatos infectados porém os resultados obtidos foram negativos (Mello, 1940; Poli *et al.*, 2002) ou ainda não tinham sido obtidos à data de publicação (Souza *et al.*, 2005). No entanto, houve inoculações que resultaram em infecção dos animais experimentais (Anexo 11). Craig *et al.* (1986) propagaram *L. mexicana* proveniente de um gato infectado em macrófagos de bovino e em hamsters sírios. Bonfante-Garrido *et al.* (1996) isolaram *L. venezuelensis* de quatro gatos e realizaram a inoculação desse parasita em hamsters. Produziu-se inflamação semelhante a um grande tumor no ponto de inoculação com metástases generalizadas à pele (contendo histiócitos preenchidos com amastigotas). Souza *et al.* (2009) inocularam o material recolhido de nódulos de um gato infectado com *L. amazonensis* em dois hamsters. Os animais experimentais apresentaram lesões similares às do gato 15 dias após a inoculação.

7.3. Infecção experimental de invertebrados a partir de gatos com LFeI

Mello (1940), utilizou exemplares de *Triatoma brasiliensis* para sugar a pele lesionada do gato e encontrou promastigotas no intestino deste insecto 6 a 15 dias após a refeição.

Maroli *et al.* (2007) expuseram um gato naturalmente infectado com *L. infantum* MON-1, à picada de 100 fêmeas de *P. perniciosus* (principal vector do local de origem do animal). Após 90 minutos de exposição, 20 das 100 fêmeas alimentaram-se do sangue do gato. No aparelho digestivo de quatro fêmeas ingurgitadas foram encontrados promastigotas móveis.

7.4. Futuros estudos experimentais

A inoculação experimental em gatos já foi bem sucedida usando as vias intravenosa (Kirkpatrick *et al.*, 1984) e intradérmica (Simões-Mattos *et al.*, 2005), no entanto, seria interessante efectuar uma infecção experimental em gatos com a utilização de flebotomíneos infectados a partir de cães. A inoculação de leishmanias obtidas do gato em outros animais, apenas se tem revelado positiva em hamsters, o que levanta dúvidas sobre uma possível atenuação da virulência de *Leishmania* na passagem pelo gato. Logo, seria interessante tentar a infecção secundária de cães com isolados de *Leishmania* provenientes de gatos, podendo ser utilizados flebotomíneos infectados ou a inoculação experimental.

8. Leishmaniose em Portugal

A leishmaniose é uma zoonose endémica em Portugal. Entre 2000 e 2006, 144 casos de LVHum foram diagnosticados no laboratório da Unidade de Leishmanioses do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), a maioria dos quais eram casos de pessoas da Área Metropolitana de Lisboa (AML). Os cães são considerados como o hospedeiro reservatório principal deste parasita (Maia *et al.*, 2008a). Segundo um inquérito realizado a médicos veterinários de clínicas de animais de companhia por Pereira da Fonseca, Santos, Diaz & Oliveira (2008), a LCan está presente em todos os distritos de Portugal continental e na Madeira. No entanto, foram identificados três focos endémicos principais: o Alto Douro, a AML e o Algarve. Em algumas áreas da região do Alto Douro, a seroprevalência canina alcançou os 81,1% e no Algarve, foi observada uma seroprevalência média de 7,0% (Pereira, 2008). Entre 2002 e 2003, foi realizado um estudo epidemiológico na área urbana de Lisboa, em que 19,2% dos cães estudados eram seropositivos (Cortes *et al.*, 2007). Para além dos cães, já foi documentada a existência deste parasita em raposas na península de Setúbal, com uma prevalência de 5,6% (Pereira, 2008). Pereira da Fonseca *et al.* (2002) obtiveram prevalências bem mais elevadas através dos métodos parasitológicos (esfregaços de medula e linfonodos) e moleculares (PCR) em raposas vermelhas da Beira Interior (37,5% das 32 testadas) e do Alentejo (27,7% das 18 testadas).

Os flebotómíneos encontrados em Portugal foram *Phlebotomus perniciosus*, *P. ariasi*, *P. sergenti*, *P. papatasi* e *Sergentomyia minuta* (Pires, 2000). Em climas temperados, como é o caso de Portugal, as alimentações de *Phlebotomus* tendem a ocorrer de Maio a Outubro, principalmente ao crepúsculo e durante a noite (Tomás & Freitas Romão, 2008). A espécie *L. infantum* foi, até à data, a única espécie do parasita identificada em Portugal, tendo sido já encontrados quatro zimodemes de *L. infantum* em humanos (MON-1, MON-24, MON-29 e MON-80). Apenas o zimodeme MON-1 foi isolado em cães sendo, também, o predominante (96,7%) na população humana (Campino *et al.*, 2006).

8.1. Leishmaniose felina em Portugal

8.1.1. Casos clínicos de leishmaniose felina em Portugal

Em Portugal, foram diagnosticados três casos clínicos de leishmaniose felina (Costa-Durão *et al.*, 1994; Sanches *et al.*, 2009; Marcos *et al.*, 2009).

Costa-Durão *et al.* (1994) diagnosticaram LFel numa gata adulta proveniente de Sesimbra que possuía um nódulo cutâneo na região suborbital esquerda. Foram relatadas alopecias assimétricas e não-pruriginosas no dorso antes da emergência desta lesão. Achados histopatológicos do nódulo extirpado confirmaram a presença de amastigotas de *Leishmania*. Houve recorrência da lesão sobre o olho direito. O isolamento *in vitro* do agente permitiu identificar promastigotas ao fim de 60 dias. O animal apresentava valores de Alanina aminotransferase (ALT) aumentados. O tratamento específico de leishmaniose foi

efectuado com Antimoniato de N-metilglucamina (na dose de 1,25 mL IM, num total de 20 injeções em dias alternados). O tratamento instituído foi bem tolerado e ocorreu uma notável normalização do valor da ALT.

Sanches *et al.* (2009) diagnosticaram LFel num gato com sete anos de idade e com perda de pêlo excessiva, descamação e prurido generalizado. O animal apresentava uma conjuntivite bilateral, uma uveíte no olho esquerdo e uma lesão ulcerosa a nível do plano nasal. Confirmou-se uma demodicose por *Demodex cati*. Nos testes serológicos apresentou resultados negativos para a detecção de FIV e de FeLV e apresentou um resultado positivo para a detecção de *Leishmania* (título de anticorpos igual a 240). Posteriormente, foram observadas formas amastigotas numa citologia de um linfonodo. Como tratamento inicial foi aplicada uma pipeta de Advocate® (associação de Imidaclopride com Moxidectina), Alopurinol numa dose de 10 mg/Kg BID e Conjuntilone-S® (Neomicina, Polimixina B e Prednisolona). Duas semanas depois o paciente apresentava melhoras significativas.

Marcos *et al.* (2009) diagnosticaram LFel numa gata com quatro anos de idade, que tinha acesso ao exterior numa zona endémica de LCan (Covilhã). A gata apresentou resultados negativos nos testes para a detecção de FIV e de FeLV. Apresentou-se à consulta com anorexia e depressão. Para além disso, foi observada uma pancitopénia severa com autoaglutinação de eritrócitos. Em esfregaços de sangue, foram observados amastigotas de *Leishmania* no interior de neutrófilos. O parasita foi também observado na medula óssea. O animal apresentou um título de anticorpos igual a cem no teste de hemaglutinação indirecta para *Leishmania*. A técnica da PCR efectuada utilizando o sangue periférico confirmou a infecção por *Leishmania infantum*. Apesar do tratamento (transusão sanguínea e administração de Alopurinol e de Nandrolona), o estado clínico piorou e a gata foi eutanasiada. Na necrópsia, a disseminação visceral do parasita foi confirmada.

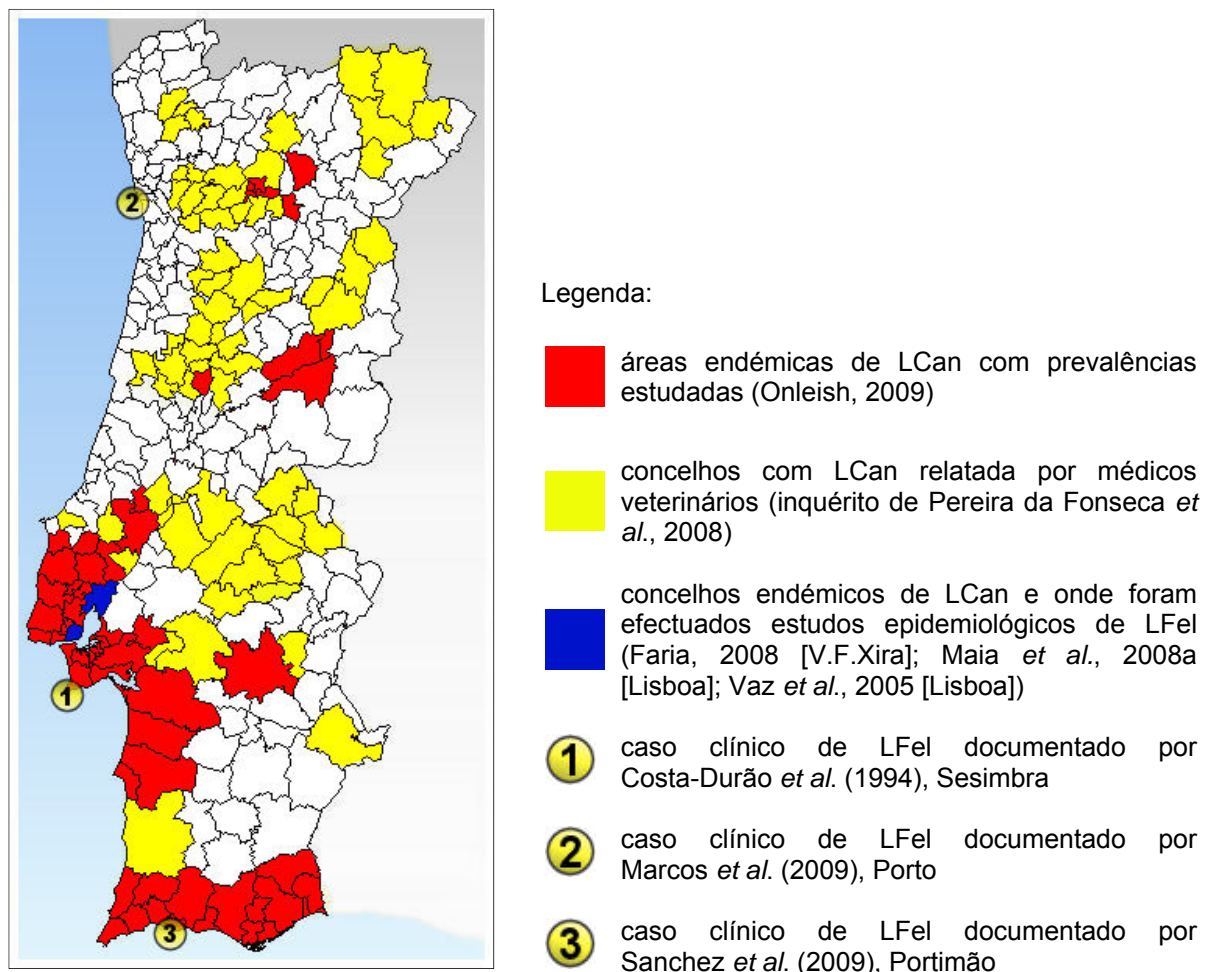
8.1.2. Estudos epidemiológicos de leishmaniose felina em Portugal

Vaz *et al.* (2005) realizaram uma pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* pela técnica da IFI em gatos errantes da região de Lisboa. Apenas um (1,03%) de 97 animais foi positivo (diluição de 1:160). O mesmo animal tinha cerca de três anos de idade, apresentava sinais respiratórios e lesões oculares. Apesar de apresentar um bom estado corporal, apresentou resultados positivos para a detecção de FIV, de *Mycoplasma* e de *Toxoplasma*.

Faria (2008) realizou um estudo epidemiológico no concelho de Vila Franca de Xira (AML). Nenhum dos 50 gatos apresentados na clínica e nenhum dos 25 gatos de gatil apresentou resultados positivos para anticorpos anti-*Leishmania* utilizando a técnica de IFI (diluições de 1:40 e 1:80). Na mesma área, no mesmo período de tempo e utilizando a mesma técnica, detectou-se que 46,88% (60/128) dos cães apresentaram anticorpos anti-*Leishmania* (diluição maior ou igual a 1:80).

Maia, Nunes, e Campino (2008a) realizaram um estudo epidemiológico em 23 gatos errantes assintomáticos da área urbana de Lisboa. Em sete (30,4%), foi identificado ADN de *Leishmania infantum* por PCR e por PCR-RFLP. A técnica da IFI foi realizada em amostras de soro de 20 gatos, quatro (15%) apresentaram resultados positivos: três animais apresentaram um título de anticorpos igual a 2 e um apresentou um título igual a 16. Três destes quatro gatos apresentaram resultados positivos na PCR e na Real Time-PCR.

Figura 21 – Mapa contendo a compilação de dados de diversos autores sobre a distribuição de leishmaniose canina e felina em Portugal até 2009 (mapa original)



9. Leishmaniose felina e a importância das co-infecções por FIV e FeLV

Na LVHum, o Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) é um importante factor de risco (Catorze, 2005). Nos gatos, os agentes imunossupressores, como o FIV e o FeLV, podem induzir disfunção imunológica com resposta celular diminuída, permitindo a multiplicação activa do parasita e a disseminação visceral do mesmo (Hervás *et al.*, 1999).

Segundo Poli *et al.* (2002), apenas a presença de FIV ou FeLV não são suficientes para demonstrar o estado de imunodeficiência. Logo, gatos infectados com *Leishmania* devem

ser submetidos a testes imunológicos apropriados (i.e. contagens de linfócitos CD4+ e CD8+, testes de blastogenia, etc.) para realmente avaliar a função do sistema imunitário. Para 25 dos 49 casos clínicos de LFel foram relatados os resultados dos testes para a detecção de FIV e de FeLV. Apenas quatro (16%) gatos apresentaram resultados positivos nos testes para a detecção de FIV e dois (8%) apresentaram resultados positivos nos testes para a detecção de FIV e de FeLV. Vários estudos epidemiológicos não encontraram associação significativa entre a presença destes retrovírus e a maior susceptibilidade à infecção por *Leishmania* (Pennisi *et al.*, 2000, citados por Pennisi, 2002; Vita *et al.*, 2005; Solano-Gallego *et al.*, 2007). No entanto, no estudo de Pennisi *et al.* (1998, citados por Pennisi, 2002) encontrou-se uma associação significativa entre infecção por FIV e o título de anticorpos anti-*Leishmania* (IFI) maior ou igual a 40, o que poderia indicar que a infecção por FIV seria um factor de susceptibilidade à infecção por *Leishmania*. Noutro estudo, Martín-Sánchez *et al.* (2007) encontraram uma associação negativa entre a seropositividade para *Leishmania* e a infecção por FeLV, o que poderia sugerir que a produção de anticorpos contra o parasita estivesse comprometida para gatos co-infectados por FeLV. Entretanto, são necessários mais estudos para compreender melhor a relação destes retrovírus com a infecção por *Leishmania* nos gatos.

10. A leishmaniose felina e o papel epidemiológico do gato

Um hospedeiro reservatório é uma espécie animal que sendo infectada por *Leishmania*, serve de fonte de infecção para os humanos e outras espécies. Segundo Bray (1982) e Nasereddin *et al.* (2008), um animal é um bom reservatório de *Leishmania* se os seguintes critérios forem cumpridos: contactar com o vector, ser uma fonte importante de sangue para o vector, possuir susceptibilidade à infecção, fazer uma boa apresentação do organismo causador da doença e a presença do parasita em animais infectados deve permitir-lhes que se mantenham vivos pelo menos até à próxima época de transmissão.

10.1. Atractividade dos gatos para os flebotomíneos

No Brasil, Deane (1956, citado por Simões-Mattos *et al.*, 2004) constatou, que no seu estudo, o gato foi a única espécie de mamífero em que *Lutzomyia longipalpis* não se alimentou. Porém, o mesmo autor observou um desses flebotomíneos alimentando-se num gato dentro de uma habitação. Também, Dias, Lorosa, e Rebêlo (2003) observaram que *L. longipalpis* não se alimentou de sangue de gato (apesar desta espécie representar 17,5% dos animais da área estudada). No Perú, Ogosuku *et al.* (1994, citado por Simões-Mattos *et al.*, 2004) observaram que a 3.^a fonte mais frequente de refeições de sangue para *Lutzomyia* foi o gato (a seguir ao homem e aos bovinos). Dos exemplares de *L. verrucarum* recolhidos no interior das habitações, muitos alimentaram-se tanto no gato como no homem. O sangue

de gato foi o mais encontrado em *L. peruensis* (Ogosuku *et al.*, 1994, citado por Simões-Mattos *et al.*, 2004).

No Egipto, Sawaf *et al.* (1989) observaram que *Phlebotomus papatasi* e *P. langeroni* se alimentaram predominantemente em humanos. Apenas um *P. langeroni* em 49 se alimentou de sangue de gato. No Quénia, Johnson, Ngumbi, Mwanyumba, e Roberts (1993) recolheram números significativamente superiores de *P. guggisbergi* alimentados de sangue de gatos que de coelhos e roedores. Johnson *et al.* (1993, citado por Simões-Mattos *et al.*, 2004) observaram que o *P. guggisbergi* era mais atraído por gatos que por cães. Em Espanha, Colmenares *et al.* (1995) consideraram *P. perniciosus* como um insecto oportunista, que se alimentou das espécies às quais teve mais fácil acesso. O sangue recolhido dos flebotomíneos provinha de cães (33%), humanos (25%), gatos (25%) e ratos (17%) (Colmenares *et al.*, 1995, citados por Simões-Mattos *et al.*, 2004). Noutro estudo, efectuado em Itália, Bongiorno, Habluetzel, Khoury, e Maroli (2003) não encontraram sangue de gato no intestino de *P. perfiliewi* nem de *P. papatasi*.

Em Portugal, foi identificado sangue de várias espécies (humanos, cães, lagomorfos, ovinos, aves, suínos, equídeos e bovinos) no intestino de *P. ariasi* e de *P. perniciosus*, no entanto, não foi referida a descoberta de sangue de gato (Azevedo, 1948, Alves-Pires *et al.*, 1992, Fernandes, 1993, Candeias, 1993, citados por Pires, 2000).

No Brasil, num estudo experimental efectuado com *Lutzomyia migonei*, cerca de 90% das fêmeas alimentaram-se num gato enjaulado (Oliveira-Lima, comunicação pessoal citada por Simões-Mattos *et al.*, 2005). Sánchez *et al.* (2000, citados por Simões-Mattos *et al.*, 2004) expuseram um gato às picadas de *P. perniciosus* e observaram uma taxa de ingurgitamento de 93% das fêmeas deste insecto. Num estudo efectuado por Maroli *et al.* (2007), 20% das fêmeas de *P. perniciosus* picaram um gato naturalmente infectado com *L. infantum*.

10.2. O gato como hospedeiro reservatório de *Leishmania*

Os estudos epidemiológicos e os casos clínicos de LFel confirmam que os gatos são susceptíveis à infecção por *Leishmania* e podem ser afectados pela doença causada por este parasita. Além disso, são capazes de transmitir o protozoário aos vectores (Maroli *et al.*, 2007).

Os factores de susceptibilidade à infecção são desconhecidos. As técnicas moleculares e as técnicas serológicas são apenas testemunhas do contacto entre o gato e o parasita, e não provam a existência de uma circulação significativa de *Leishmania*. Em muitas regiões, a importância numérica dos gatos portadores ainda é desconhecida. Deveriam ser efectuados mais estudos epidemiológicos simultâneos em populações caninas e felinas, nas mesmas áreas geográficas, no mesmo período temporal e utilizando as mesmas técnicas de amostragem e de diagnóstico (preferencialmente, técnicas moleculares). Isto permitiria avaliar o papel destas populações submetidas à mesma pressão de infecção. Faria (2008)

efectuou um desses estudos e encontrou anticorpos (IFI nas diluições iguais ou superiores a 1:80) em 47% dos cães mas em nenhum dos gatos testados (IFI nas diluições iguais ou superiores a 1:40). No entanto, as técnicas de diagnóstico mais úteis na espécie felina são as técnicas moleculares (Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Maia *et al.*, 2008a).

Martín-Sánchez *et al.* (2007) encontraram, no Sul de Espanha, uma elevada parasitémia (25,7%) associada a uma elevada seropositividade (60%), na combinação destes dados, 70,6% da população felina poderia estar infectada com *L. infantum*.

Ao que parece o gato age como bom hospedeiro reservatório (contribuindo para a manutenção do agente patogénico) (Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Maia *et al.*, 2008a) e não apenas como um mero reservatório accidental (responsável pela manutenção do agente patogénico de forma fortuita e sem um papel preponderante).

Maia *et al.* (2008a) verificaram que todos os gatos infectados encontrados no seu estudo eram assintomáticos e tinham uma baixa resposta de anticorpos anti-*Leishmania*. Estes investigadores sugeriram um grave desconhecimento do número real de animais infectados. Logo, a falta de um diagnóstico precoce de LFel nas zonas endémicas pode implicar que o animal continue a representar um risco potencial de transmissão de *Leishmania* aos insectos vectores.

São necessários mais estudos sobre a leishmaniose na espécie felina. O esclarecimento do papel epidemiológico do gato e do seu envolvimento no ciclo biológico de *Leishmania* é fundamental quer em Saúde Animal quer em Saúde Pública.

III. Rastreio de dirofilariose e de leishmaniose em gatos da Área Metropolitana de Lisboa (AML)

1. Objectivos

O rastreio de dirofilariose por *D. immitis* e de leishmaniose por *L. infantum* foi efectuado em 70 gatos da AML, observados no Hospital Veterinário do Restelo (HVR), no período de Novembro de 2008 a Fevereiro de 2009.

O rastreio de dirofilariose por *D. immitis* teve por objectivos:

- a. Detectar a presença de microfírias de *D. immitis* no sangue periférico pelo exame de sangue a fresco e pela técnica de Knott modificada;
- b. Detectar a presença de antígenos circulantes provenientes de fêmeas adultas de *D. immitis*, no soro dos gatos;
- c. Determinar a prevalência de infecção por *D. immitis* na população felina;
- d. Determinar a presença de doença clínica compatível com dirofilariose;
- e. Determinar e comparar factores de risco, como por exemplo o habitat, o contacto com cães, a origem do animal e a existência de doenças concomitantes (e.g. FIV e FeLV);
- f. Avaliar a importância da dirofilariose na população de gatos e o seu possível impacto em Saúde Pública.

O rastreio de leishmaniose por *L. infantum* teve por objectivos:

- a. Detectar a presença de anticorpos circulantes anti-*L. infantum* no soro dos gatos;
- b. Determinar a seroprevalência de *L. infantum*;
- c. Determinar a presença de doença clínica compatível com leishmaniose felina;
- d. Determinar e comparar factores de risco, como por exemplo o habitat, o contacto com cães, a origem do animal e a existência de doenças concomitantes (e.g. FIV e FeLV).
- e. Avaliar a importância da leishmaniose na população de gatos e o seu possível impacto em Saúde Pública.

2. Material e métodos

2.1. Área geográfica do estudo

O rastreio foi efectuado no Hospital Veterinário do Restelo (HVR), na freguesia de São Francisco Xavier, em Lisboa. Esta freguesia é um importante núcleo habitacional da zona ocidental da cidade de Lisboa, sendo constituída pelos bairros de Caselas e do Restelo. O HVR situa-se nas Torres do Restelo que foram erguidas durante os anos setenta, junto ao parque florestal de Monsanto (Henriques, 2009). O HVR é um hospital de referência na AML, pelo que a amostra foi constituída por animais provenientes não apenas do concelho de Lisboa, mas também, de seis outros concelhos dessa área.

Os dezoito concelhos da AML constituem um território fortemente integrado e marcado pela capacidade de polarização da cidade de Lisboa. Além de desempenhar funções de capital, Lisboa concentra população, infra-estruturas, equipamentos e actividades económicas que a tornam a maior cidade do País (Câmara Municipal de Lisboa, 2001).

A área ocupada pela AML constitui, no quadro da fachada ocidental portuguesa, um promontório que avança para o Atlântico. É constituída por duas penínsulas, a de Lisboa e a de Setúbal, separadas pelo estuário do rio Tejo, que desagua na enseada de Lisboa. No conjunto do País, a AML pode considerar-se uma área de relevo moderado. A disposição do relevo desde logo permite a existência de fachadas litorais soalheiras e abrigadas dos ventos frescos do Norte. A AML é, no conjunto, rica no recurso água. O território ribeirinho, plano e baixo, é constituído por aluviões. Esta constituição, bem como a sua posição deprimida face às áreas enquadrantes, permitem defini-la como uma área de bons solos e de aquíferos (Pereira, 2003).

A AML regista a maior concentração populacional e económica de Portugal. Nos seus dezoito concelhos, que constituem cerca de 3,3% da superfície do território nacional (AML, 2007), residiam em 2001, 2.661.850 pessoas (Instituto Nacional de Estatística, 2007), um pouco mais de um quarto da população portuguesa, relação que era somente de um sexto em 1960 (Soares & Domingues, 2003). A densidade populacional média da AML era, em 2001, de 929,2 habitantes/km² distribuída pelos seus 2934,79 km² (Instituto Nacional de Estatística, 2007).

As áreas florestais e de mata ocupam 17% da AML, sendo que 41% desta área é área agrícola. Nas últimas décadas, o crescimento da ocupação da AML não tem cessado. A partir dos anos noventa, o crescimento da edificação tem sido desmesurado. Os loteamentos têm ocupado todo o espaço intersticial, sem olhar a critérios de aptidão ecológica (Pereira, 2003).

2.1.1. O clima da Área Metropolitana de Lisboa

A AML, apesar de se situar numa fachada atlântica, é no conjunto uma região seca. A maior parte da sua área está contida na Região Pluviométrica do Sul, com precipitação inferior a 800 mm, repartidos por menos de 90 dias durante o ano (Pereira, 2003).

A repartição dos contrastes térmicos na AML revela a dicotomia litoral-interior e evidencia as vertentes soalheiras das costas do Estoril e da Arrábida. O interior, abrigado do ar marítimo moderador das temperaturas pelos relevos da península de Lisboa, revela-se como a área de maiores contrastes. É mais quente no Verão e mais fresco no Inverno, especialmente nos fundos de vale, pouco arejados no Verão, em que se atingem temperaturas até 35 °C. No Inverno, acumula-se aí o ar frio, registando-se 30 dias com temperaturas negativas. Porém, no conjunto do país os contrastes não são muito acentuados (Pereira, 2003).

2.2. Caracterização da amostra

Para cada gato foram registados: o sexo, a raça, a idade, a área de proveniência, o habitat (animal apenas doméstico, animal doméstico que tem acesso ao exterior ou animal errante), as espécies animais que contactaram com o gato, o motivo de apresentação à consulta e os sinais clínicos compatíveis com LFel e DFel (Anexo 14 e 15). Foi efectuado um registo fotográfico de cada animal e registaram-se os resultados dos seus exames complementares.

2.2.1. Sexo dos gatos da amostra

Da totalidade dos 70 felinos, 31 (44,29%) eram do sexo feminino, sendo 18 (58%) fêmeas inteiras e 13 (42%) fêmeas ovariectomizadas. Dos 39 machos (55,71% da totalidade da amostra), 25 (64%) gatos eram orquiectomizados e 14 (36%) gatos eram machos inteiros (Gráfico 1).

2.2.2. Idade dos gatos da amostra

A idade mínima foi de um ano e a idade máxima de 18 anos. A média das idades foi de oito anos e dez meses. A moda foi de dez anos. Em 16 animais não foi possível apurar a idade (e.g. animais errantes), mas possuíam características de adultos.

2.2.3. Raça dos gatos da amostra

A maioria (80%) dos gatos não possuía raça determinada, existindo apenas 9 (12,86%) animais de raça Siamesa, 3 (4,29%) de raça Persa e 2 (2,86%) de raça Bosque da Noruega.

Gráfico 1 – Percentagem de animais da amostra por sexo

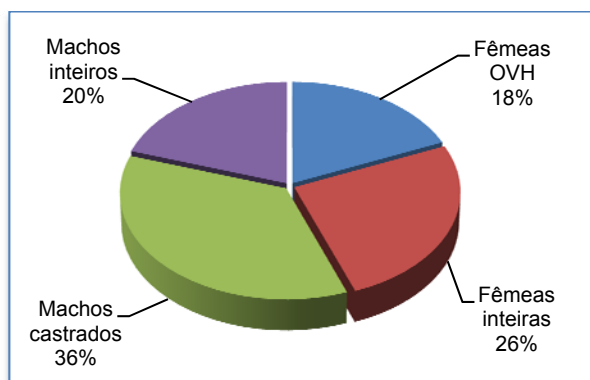
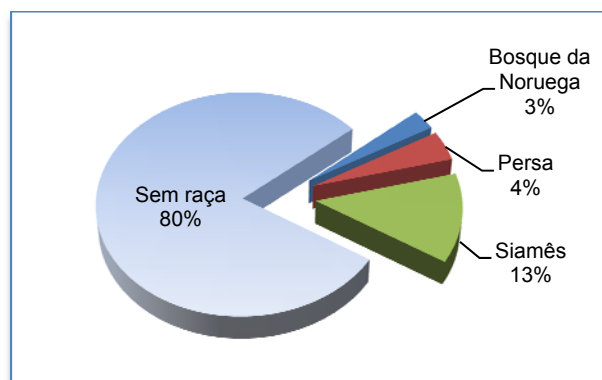


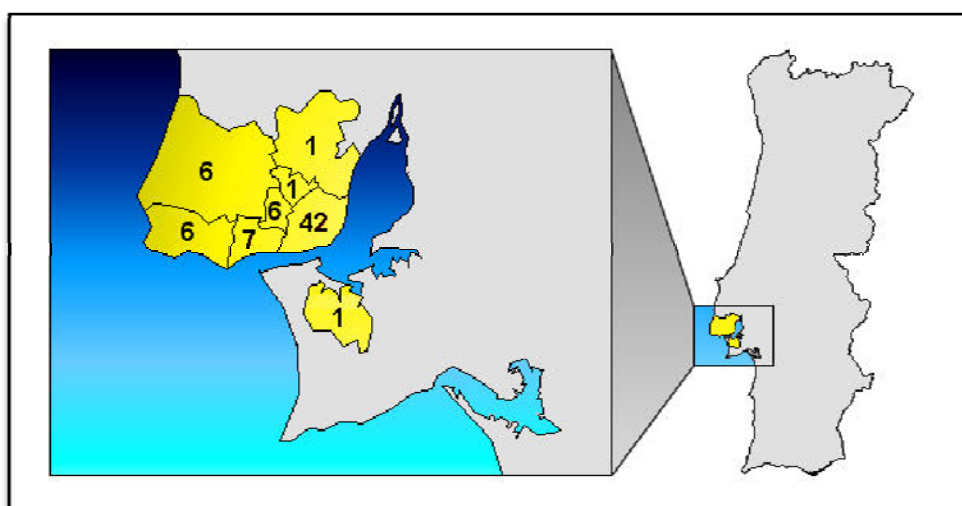
Gráfico 2 – Percentagem de animais da amostra por raça



2.2.4. Origem dos gatos da amostra

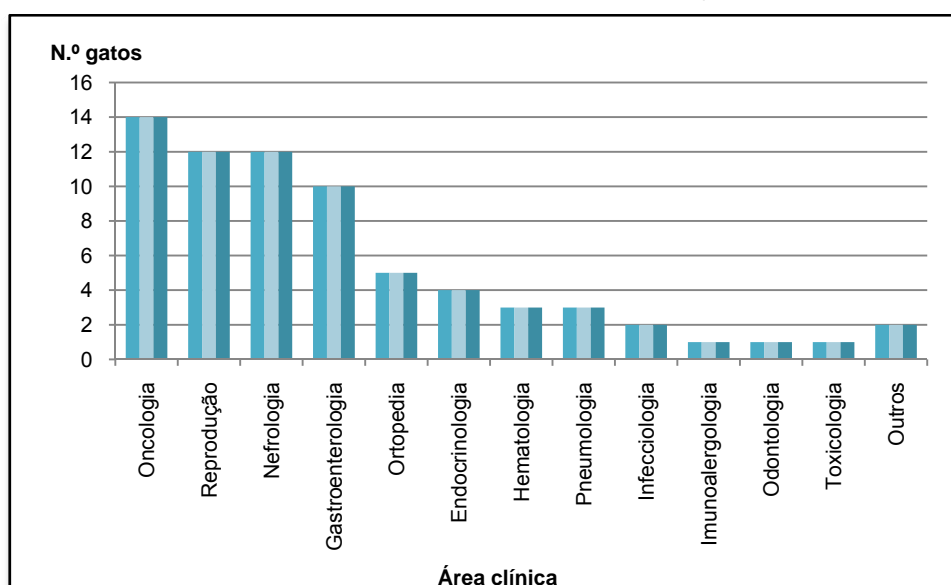
Quanto aos concelhos de origem, da AML Norte: 42 (60%) gatos provinham do concelho de Lisboa, sete (10%) do concelho de Oeiras, seis (8,57%) do concelho da Amadora, seis (8,57%) do concelho de Cascais, seis (8,57%) do concelho de Sintra e um (1,43%) do concelho de Odivelas. Apenas um animal (1,43%) era proveniente da AML Sul, concelho do Seixal.

Figura 22 – Mapa com o número de animais da amostra distribuído pelo concelho de origem
(mapa original)



2.2.5. Motivo de apresentação à consulta segundo a área clínica

Gráfico 3 – Área clínica do motivo de apresentação à consulta



2.2.6. Infecções por FIV, FeLV e Vírus da Peritonite Infecciosa Felina (PIF)

Dos 70 gatos incluídos no rastreio, 28 foram testados para a detecção de infecções por FIV e por FeLV. Estes testes foram realizados pelo Médico Veterinário aos gatos suspeitos de estarem infectados ou de terem contactado com gatos infectados. Três (10,71%) animais apresentaram resultados positivos para FeLV e um (3,60%) apresentou resultado positivo para FIV (DFV® Test FeLV-FIV).

Três animais foram testados para o vírus da peritonite infecciosa felina (PIF), sendo que dois deles apresentaram resultados positivos.

2.2.7. Habitat e contacto com outros animais

Relativamente ao habitat e ao contacto com outros animais, 42 (60%) eram gatos apenas mantidos dentro da habitação (22 dos quais não contactavam com nenhum animal, 18 apenas contactavam com outros gatos domésticos e dois coabitavam com cães). Catorze (20%) animais eram gatos domésticos que tinham acesso ao exterior e portanto contactavam com todo o tipo de animais que aí se podiam encontrar. Os restantes 14 (20%) gatos eram animais errantes apresentados à consulta no HVR por membros de associações de defesa dos animais.

Gráfico 4 – Habitat dos animais da amostra

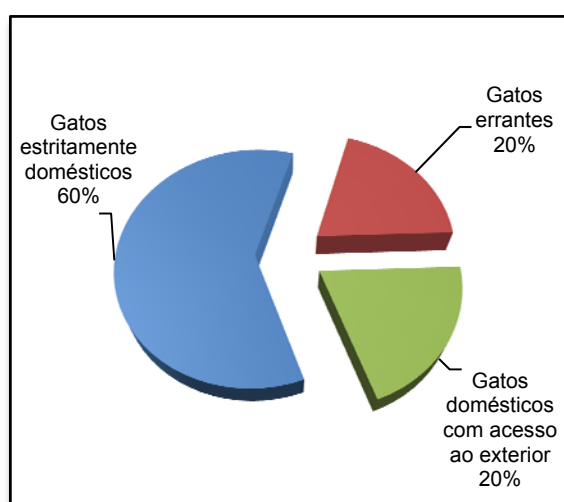
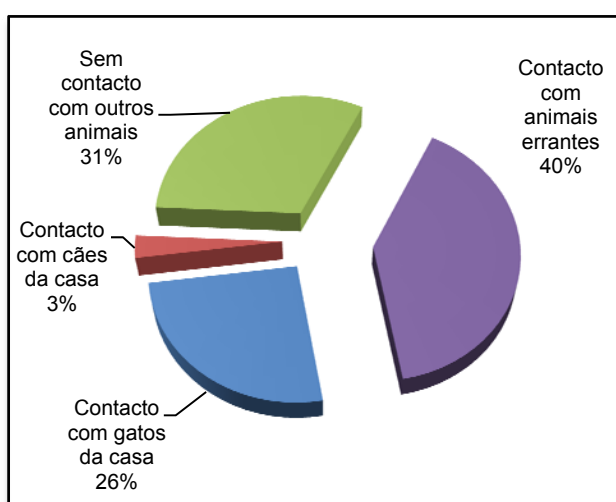


Gráfico 5 – Contacto com outros animais



Apesar de todos os animais viverem, à data do estudo, no espaço geográfico atrás referido, é impossível saber a proveniência exacta e a idade dos gatos errantes.

2.3. Anamnese e exame físico

Durante o processo de entrada no hospital e durante a consulta, os proprietários fizeram uma descrição breve do animal, local de origem, habitat e contacto com outros animais.

Cada animal foi submetido a um exame físico que incluiu uma observação do estado geral e avaliação de possíveis sinais clínicos ou lesões conciliáveis com as doenças em estudo (leishmaniose e dirofilariose). Todos os sinais clínicos e anamnese foram registados na ficha clínica do animal efectuada pelo Médico Veterinário, sendo mantidas na base de dados informática do hospital.

Para a dirofilariose felina os sinais considerados foram:

- Sinais mais frequentes de DFel: letargia, anorexia, perda de peso, vômito intermitente não relacionado com as refeições, taquipneia persistente, tosse intermitente e dispneia;

- Sinais mais raros de DFel: insuficiência cardíaca direita, *cor pulmonale*, sopro cardíaco sistólico, pneumotórax, hidrotórax, quilotórax, ascite, ataxia, convulsões, síncope e alterações neurológicas.

Para leishmaniose felina os sinais considerados foram:

- Sinais mais frequentes de LFel: úlceras e os nódulos hemorrágicos sobretudo ao nível da cabeça, trufa e orelhas, alopecias localizadas ou difusas, depressão, apatia, anorexia, adenomegália generalizada ou localizada, estomatites e uveítes uni ou bilaterais;
- Sinais mais raros de LFel: crostas, eritema, pápulas, pústulas, descamação, seborreia, lesões vegetativas, hepatomegália, esplenomegália e febre.

2.4. Colheita e processamento do sangue periférico

As amostras de sangue foram obtidas a partir de sangue recolhido para análises de rotina (e.g. testes para a detecção de FIV e FeLV, cirurgias) ou para análises de animais suspeitos de diversas doenças, independentemente de poderem estar infectados por *L. infantum* ou por *D. immitis*. A utilização deste método veio facilitar o processo de recolha de amostras e garantir a participação dos proprietários.

A colheita de sangue foi executada do seguinte modo: com o gato imobilizado, realizou-se a desinfecção da pele com álcool etílico a 70%, antes da punção da veia cefálica. Foram recolhidos cerca de dois mililitros de sangue por cada animal. Um mililitro de sangue foi utilizado para a realização da técnica de Knott modificada e para o exame de sangue a fresco. O restante sangue foi colocado num tubo seco para posterior obtenção de soro. O soro foi utilizado para a detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania* e para a detecção de antígenos de *D. immitis*. Os tubos foram identificados e congelados. Antes da realização dos testes, os tubos foram colocados à temperatura ambiente até à sua total descongelação.

2.4.1. Técnicas para a detecção de *D. immitis*

2.4.1.1. Exame de sangue a fresco para a detecção de microfilárias

(Genchi *et al.*, 2007)

- a. Colocar uma gota de sangue venoso (acabado de recolher) sobre uma lâmina de microscópio.
- b. Colocar uma lamela sobre a gota de sangue.
- c. Examinar a lâmina com uma baixa ampliação (100x).

Observação: quando este exame apresenta resultado positivo, as microfilárias são visualizadas movimentando-se entre os eritrócitos.

2.4.1.2. Técnica de Knott modificada para a detecção de microfilárias (Genchi *et al.*, 2007)

- a. Num tubo de centrífuga de fundo cónico, misturar 1 mL de sangue total e 9 mL de Formalina a 2%. Tapar o tubo e agitá-lo, invertendo o tubo diversas vezes até à homogeneização.
- b. Centrifugar a 1500 rotações por minuto durante 5 minutos.
- c. Eliminar o líquido sobrenadante
- d. Adicionar ao sedimento uma gota de Azul-de-metileno diluído na proporção de 1:1.000 em água destilada neutra. Transferir uma gota da mistura para uma lâmina e aplicar uma lamela.
- e. Examinar a preparação com uma ampliação de 100x.

2.4.1.3. Pesquisa de antígenos de *D. immitis* (kit Witness® Dirofilaria, Synbiotics Europe, Lyon, França)

O procedimento foi efectuado de acordo com as instruções do fabricante do kit (Anexo 17):

- a. Abrir o invólucro, retirar a pipeta e a placa de teste e colocá-las sobre uma superfície plana e horizontal.
- b. Colher a amostra com a pipeta fornecida e, mantendo-a na vertical, colocar uma gota na janela indicada. Verificar se a amostra penetrou bem na membrana.
- c. Tirar a tampa do frasco de solução tampão e, segurando-o sempre na vertical, colocar 3 gotas de solução na janela da amostra.
- d. Deixar em seguida a placa de teste, sempre na horizontal, durante todo o tempo da migração do complexo amostra/reagente sobre a banda reactiva.
- e. Observar ao fim de 10 minutos, a presença ou não de faixas cor-de-rosa nas janelas 2 e 3.
- f. O teste só é validado se uma faixa cor-de-rosa aparecer na janela de leitura correspondente à testemunha (3). O aparecimento somente de uma faixa cor-de-rosa ao nível da janela 3 não permite concluir o resultado do teste antes de decorrerem os 10 minutos. Com efeito, esta faixa de controlo (3) pode aparecer corada mais precocemente que a faixa de teste (2), nomeadamente no caso de amostras fracamente positivas.
- g. A ausência de uma faixa cor-de-rosa ao nível da janela 2 e o aparecimento de uma faixa cor-de-rosa ao nível da janela 3 indica ausência de antígenos de *D. immitis* (resultado negativo).
- h. A presença de uma faixa cor-de-rosa ao nível das janelas 2 e 3 indica a presença de antígenos de *D. immitis* (resultado positivo).

Observação do autor: quando os testes apresentam resultados positivos são efectuadas repetições de forma a confirmar esses resultados.

2.4.1.3.1. Sensibilidade e especificidade do teste Witness® Dirofilaria

Os laboratórios Synbiotics (2009c) indicam para o teste Witness® HW (sinónimo de Witness® *Dirofilaria*) uma sensibilidade de 94% para animais com três ou menos fêmeas adultas, uma sensibilidade de 100% para infecções com quatro ou mais fêmeas adultas e uma sensibilidade de 70% para infecções só com machos. A especificidade indicada foi de 98,5%.

No estudo efectuado por Courtney e Zeng (2001), o teste Witness® HW apresentou sensibilidades distintas para cães infectados com zero fêmeas adultas de *D. immitis* (com infecções larvares, machos ou parasitas mortos) (sensibilidade = 42%), uma a duas fêmeas adultas (sensibilidade = 69%) e mais que duas fêmeas adultas (sensibilidade = 92% [76-98]). A especificidade obtida para este teste foi de 98%.

Também, McCall *et al.* (2000) registaram para o teste Witness® HW sensibilidades distintas para cães com uma fêmea adulta de *D. immitis* (71,4%), com duas fêmeas adultas (90%) e com três ou mais fêmeas adultas (94,7%). Para infecções só com machos a sensibilidade foi de 0%. A especificidade obtida para este teste foi de 100%.

2.4.2. Pesquisa de anticorpos anti-*L. infantum* pela técnica da imunofluorescência indirecta (IFI)

Foi usado como controlo positivo soro de gato da seroteca do Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária (Universidade Técnica de Lisboa), previamente analisado, com títulos significativos de anticorpos anti-*Leishmania*. Como controlo negativo foi utilizado tampão fosfato-salino (PBS). Para a técnica da IFI, utilizou-se o Kit *Leishmania*-Spot IF (Laboratório bioMérieux, França, Ref. 75 931), de acordo com as seguintes indicações do fabricante:

1. Retirar as lâminas com antígeno do frigorífico e colocá-las à temperatura ambiente durante 15 minutos;
2. Preparar o PBS (BioMérieux, França, Ref. 75 511), diluindo-o em 1 litro de água destilada;
3. Preparar o PBS-Tween 80, através da junção de 1 mililitro de Tween 80 (Merck, Alemanha, Ref. 822 187) a 1 litro do preparado anterior;
4. Numa microplaca, depositar 195 µL de PBS nos poços da primeira coluna (coluna 1), correspondendo o número de poços ao número de soros que se pretende diluir;
5. Depositar 50 µL de PBS no poço da coluna seguinte (coluna 2);
6. Depositar 5 µL de soro a testar no primeiro poço da coluna 1;
7. Proceder de igual modo para os restantes soros a testar nos poços seguintes da coluna 1;
8. Com uma micropipeta contendo o volume de 50 µL:
 - a. Fazer a diluição na coluna 1;

- b. Passar 50 µL da coluna 1 para a coluna 2;
9. Com a micropipeta com o volume de 10 µL, fazer a diluição e retirar a respectiva diluição dos poços 1:40 e 1:80; no último poço de cada lâmina colocar 10 µL de controlo positivo (soro de gato positivo) e seleccionar outro poço para colocar 10 µL de controlo negativo (10 µL de PBS).
10. Incubar durante 30 minutos a 37 °C, em câmara húmida.
11. Lavar as lâminas da seguinte forma:
 - a. 1.^a lavagem: rápida com PBS/Tween 80;
 - b. 2.^a lavagem: 5 minutos mergulhadas num recipiente contendo PBS/Tween 80;
 - c. 3.^a lavagem: 5 minutos mergulhadas noutro recipiente contendo PBS/Tween 80;
 - d. Lavar as lâminas com água destilada;
 - e. Deixar secar bem as lâminas ao ar.
12. Depositar 10 µL do conjugado MegaScreen FLUO VET (MegaCor Diagnostik GmbH; anticorpos anti-IgG total de gato) em cada poço, incluindo no dos controlos.
13. Incubar durante 30 minutos a 37 °C em câmara húmida;
14. Lavagem igual ao passo 11.
15. Depois de secar muito bem as lâminas fazer a montagem definitiva colocando uma gota de glicerina tamponada (1:10) Fluoprep (BioMérieux, França, Ref. 75 521) em cada poço e cobrir com uma lamela de 50x24 mm.
16. Efectuar de imediato a leitura em microscópio de fluorescência (Olympus DP10, Modelo BX50F), no comprimento de onda de 425 nm.

2.4.2.1. Limiar de positividade para a técnica da IFI

O título de anticorpos corresponde ao inverso do valor de maior diluição de soro em que for observada fluorescência. Tendo em conta a inexistência de um protocolo universalmente aceite para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* pela técnica da imunofluorescência indirecta em gatos e tendo em conta o Anexo 13.t em que se mostram as diluições utilizadas e consideradas positivas para os casos clínicos e os estudos epidemiológicos prévios, considerou-se como significativo de infecção, títulos de anticorpos iguais ou superiores a 40. Foi efectuada também para cada amostra uma diluição do soro de 1:80.

Nos casos clínicos relatados, a menor diluição considerada positiva foi de 1:40 (Maroli *et al.*, 2007). A maioria dos animais clinicamente afectados com *Leishmania*, em que foi efectuada a técnica da IFI, apresentou títulos de anticorpos iguais ou superiores a 80 (Laruelle-Magalon & Toga, 1996; Hervás *et al.*, 1999; Poli *et al.*, 2002; Penissi, 2002; Savani *et al.*, 2004; Verneuil, 2006; Maroli *et al.*, 2007; Sanches *et al.*, 2009). A maior diluição considerada positiva relatada num caso clínico foi de 1:1.280 (Penissi *et al.*, 2002). No entanto, num estudo seroepidemiológico já foi detectado um título de anticorpos anti-*Leishmania* igual a 5.120.

3. Resultados

3.1. Rastreio de dirofilariose em 70 gatos da AML

3.1.1. Resultados obtidos na anamnese e no exame físico

Através da anamnese e do exame físico foi possível observar sinais compatíveis com DFel (Anexo 15), nomeadamente: anorexia (n = 21), perda de peso (n = 16), depressão ou apatia (n = 13), vômito (n = 12), dispneia (n = 5), taquipneia (n = 3), derrame torácico (n = 2) e tosse (n = 1). Dois animais apresentaram sintomatologia compatível com asma felina. Um animal apresentou ascite, outro apresentou convulsões e a síncope foi referida ainda noutro animal. No entanto, nenhum dos gatos foi suspeito de ter como doença primária dirofilariose felina. A maioria destes sinais deveu-se a causas identificadas como doenças oncológicas, gastrointestinais e renais.

3.1.2. Resultados obtidos na pesquisa de microfilárias pelo exame de sangue a fresco e pela técnica de Knott modificada

Não foram detectadas microfilárias pelo exame de sangue a fresco e pela técnica de Knott modificada (Anexo 16).

3.1.3. Resultados obtidos na pesquisa de antígenos de fêmeas adultas de *D. immitis* utilizando um teste comercial de imunomigração rápida (Witness® *Dirofilaria*)

Foi obtido um resultado positivo no teste de imunomigração rápida Witness® *Dirofilaria* (Anexo 16). Obteve-se uma prevalência de infecção por *Dirofilaria immitis* de 1,43% nesta população de gatos.

O animal n.º 9 cujo soro foi positivo para antígenos de *D. immitis*, era uma fêmea adulta, errante, apresentada à consulta por um membro de uma associação de defesa dos animais. O felino foi observado e avaliado para ser efectuada a vacinação, a desparasitação e a ovariectomia. A gata apresentava pelagem curta e lisa de coloração negra malhada de branco, com 3 kg de peso vivo e de carácter agressivo. Encontrava-se hidratada, com temperatura de 39,2 °C e apresentava bastante leite nas glândulas mamárias. Apresentou-se com dispneia (mais notória durante a manipulação). Após sedação foi avaliada. As radiografias torácicas não apresentaram alterações visíveis. Nas análises bioquímicas, apresentou valores de ureia (19 mg/dL) e creatinina (1,4 mg/dL) considerados normais (valores de referência: ureia < 21 mg/dL; creatinina < 2,2 mg/dL), apresentando resultados negativos nos testes para a detecção de FIV e de FeLV. Após estabilização, foi efectuada a ovariectomia e após recuperação da cirurgia foi devolvida à colónia de gatos original.

Figura 23 – Fotografia do animal (n.º 9) que apresentou o resultado positivo para o teste Witness® *Dirofilaria* (fotografia original)



Figura 24 – Aspecto do resultado negativo obtido pela técnica de Knott modificada para o animal n.º 9 (ampliação de 50x) (fotografia original)

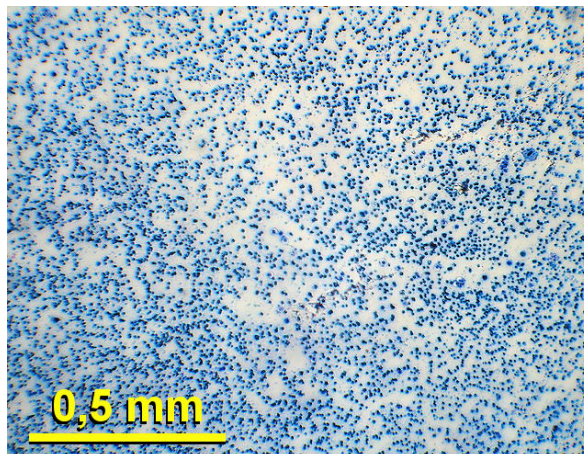
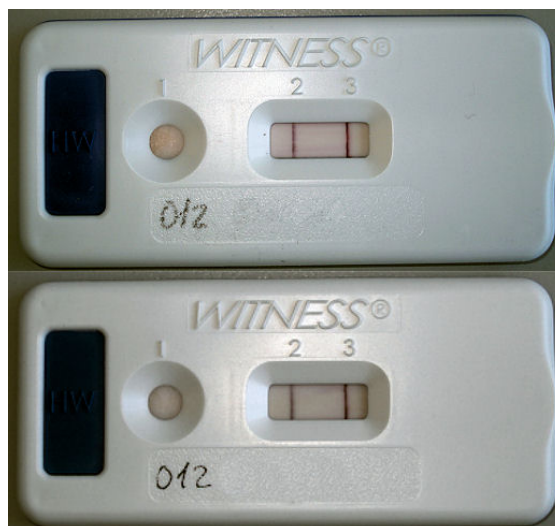


Figura 25 – Aspecto do teste Witness® *Dirofilaria* para o animal n.º 9 (código 012) com resultado positivo e respectiva repetição (fotografia original)



3.2. Rastreio de leishmaniose por *L. infantum* em 70 gatos da AML

3.2.1. Resultados obtidos na anamnese e no exame físico

Através da anamnese e do exame físico foi possível registar sinais compatíveis com LFel (Anexo 15) nomeadamente: anorexia (n = 21), perda de peso (n = 16), depressão ou apatia (n = 13), nódulos cutâneos (n = 2), alopecias (n = 2), adenomegália (n = 3), estomatite (n = 2), hepatomegália (n = 3), esplenomegália (n = 3) e febre (n = 5). No entanto, a maioria desses sinais estavam associados a diversas doenças diagnosticadas nesses animais. Nenhum gato apresentou lesões nodulares ou ulcerosas no focinho e nas orelhas, os locais mais frequentemente afectados nos gatos com LFel. Nenhum dos gatos foi suspeito de ter leishmaniose felina como doença primária.

3.2.2. Resultados obtidos pela técnica da imunofluorescência indirecta (IFI)

Todas as técnicas da IFI efectuadas para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania infantum* nas diluições de 1:40 e de 1:80 apresentaram resultados negativos (Anexo 18).

A prevalência de infecção por *L. infantum* obtida com esta técnica para esta população de gatos foi de 0% (0/70 gatos).

Figura 26 – Aspecto da técnica da IFI do controlo positivo (ampliação de 1000x) (fotografia original)

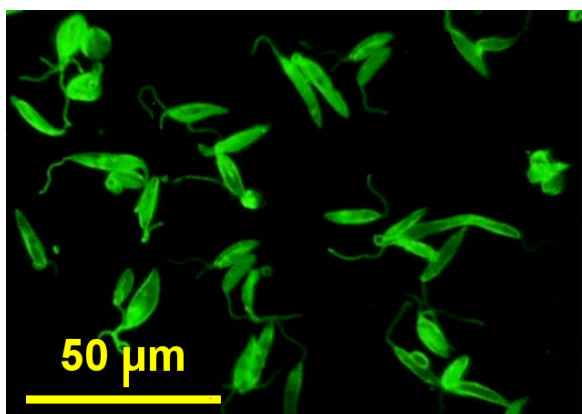
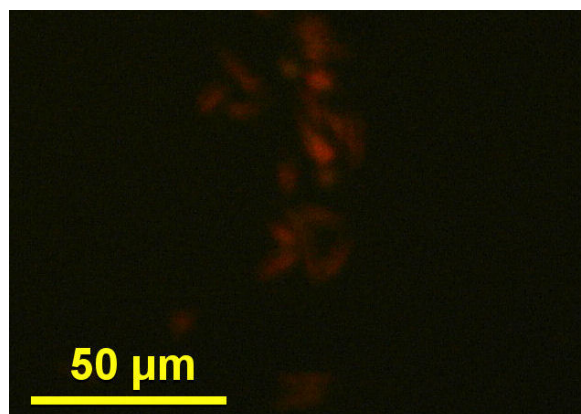


Figura 27 – Aspecto de um resultado negativo obtido pela técnica da IFI (ampliação de 1000x) (fotografia original)



4. Discussão

4.1. Rastreo de dirofilariose por *D. immitis* em 70 gatos da AML

A AML é uma região endémica de dirofilariose canina, até à data não foi relatado nenhum estudo de dirofilariose em gatos, e têm sido poucas as publicações sobre esta doença nesta região em cães. Pereira da Fonseca *et al.* (1991) encontraram, com o auxílio da técnica de Knott modificada, uma prevalência de 16,7% (40/239) de cães infectados da Direcção Regional de Agricultura da Região do Ribatejo e Oeste, na qual se inclui a AML. Segundo Ribeiro *et al.* (1993, citado por Clemente, 1996), em Portugal Continental, *Anopheles atroparvus* constitui o principal transmissor de dirofilariose canina, seguido de *Culex theileri* e *Culex pipiens*. Porém, no Parque Natural da Arrábida (AML Sul) o principal responsável pela transmissão de dirofilariose canina parece ser *Culex pipiens*, seguido de *Culiseta longiareolata* (Barreiro, 1993, citado por Clemente, 1996). É provável que estes insectos sejam também os principais vectores de *D. immitis* para os gatos nesta região.

Ao que se sabe, este rastreio demonstrou, pela primeira vez, a existência de infecções por *D. immitis* na população de gatos na Área Metropolitana de Lisboa e em Portugal.

A prevalência de infecção por *D. immitis* obtida foi de 1,43% (1/70 gatos) o que está de acordo com estudos epidemiológicos efectuados anteriormente noutros países com a mesma técnica. No Norte da Flórida (EUA), Luria *et al.* (2004) encontraram uma prevalência de 1,3% (7/553 gatos). Na República da Coreia do Sul, Liu *et al.* (2005) obtiveram uma prevalência de 2,6% (4/155 gatos).

É provável que mais gatos incluídos neste rastreio estejam infectados por *D. immitis*, no entanto, a técnica de diagnóstico utilizada não os detectou. Animais com infecções larvares imaturas (Atkins, 2007b) e infecções apenas por machos adultos (Nelson *et al.*, 2007) não são detectadas pela técnica de detecção de antígenos provenientes do trato reprodutivo de *D. immitis* fêmeas adultas (como o teste Witness® Dirofilaria utilizado). Ou seja, o animal detectado representa apenas a “ponta do iceberg” relativamente a um maior número de gatos que estão em risco de infecção, que possuem uma infecção precoce e que apresentam infecção apenas por parasitas machos.

Como se pode confirmar pelos estudos de Courtney e Zeng (2001) e McCall *et al.* (2000) as sensibilidades obtidas com o teste Witness® Dirofilaria são baixas quando existem infecções larvares sem fêmeas adultas ou infecções apenas por machos (sensibilidade de 0% a 42%) e mesmo quando existem uma a duas fêmeas adultas (sensibilidade de 69% a 90%). A especificidade do teste Witness® Dirofilaria variou entre os 98% (Courtney & Zeng, 2001) e os 100% (McCall *et al.*, 2000), logo o resultado positivo obtido indica uma elevada probabilidade desse animal estar de facto infectado com pelo menos uma fêmea adulta de *D. immitis*.

De notar que, a doença clínica desenvolve-se mesmo na ausência de parasitas adultos, sendo frequente a dirofilariose larvar provocada pelas L5 que não alcançam a maturidade (Dillon, 2007). Nesses casos o teste de detecção de antígenos utilizado é inútil.

A técnica de exame de sangue a fresco e a técnica de Knott modificada não permitiram encontrar microfilárias no sangue dos gatos testados, nem mesmo do animal infectado com pelo menos uma *D. immitis* fêmea adulta. Esta situação pode ter ficado a dever-se a uma infecção constituída apenas por fêmea(s) adulta(s). Mas, mesmo quando ambos os sexos estão presentes nem sempre ocorre microfilarémia (Levy, 2007a; Nelson *et al.*, 2007). As microfilárias circulantes são encontradas em menos de 20% dos gatos infectados por *D. immitis* (Miller, 1998a). Assim sendo, as técnicas de detecção e concentração de microfilárias (como a técnica de filtração e a técnica de Knott modificada) são frequentemente de pouca utilidade. Quando existente, a microfilarémia é transitória (Miller, 1998a; Goodwin, 1998; Nogami *et al.*, 2000) durando não mais que dois meses e com baixas concentrações de microfilárias no sangue (Miller, 1998a) sendo, por isso, esperado um grande número de resultados falsos negativos. Para aumentar a sensibilidade destas técnicas, Miller (1998a) sugeriu a utilização de 5 mL de sangue em vez de 1 mL e a repetição dos testes, mas tendo em conta o carácter agressivo da maioria dos gatos e os condicionalismos impostos pelos quadros clínicos dos animais e a vontade dos proprietários, não foi possível, neste estudo, obter essas quantidades de sangue e efectuar essas repetições dos testes.

Adicionalmente, poderia ter sido utilizado o teste para a detecção de anticorpos anti-*D. immitis* para o estudo da prevalência de exposição ao agente, no entanto, devido a

condicionalismos de ordem financeira esse procedimento não foi realizado. Os testes para a detecção de anticorpos anti-*D. immitis* têm a vantagem de serem capazes de detectar a exposição a larvas ou adultos de ambos os sexos que estimulem uma resposta imunitária detectável tão cedo como um a dois meses pós-infecção (Miller, 1998a; Nelson *et al.*, 2007). Mesmo após a eliminação das larvas, numa infecção imatura, os testes podem manter-se positivos por nove a doze meses (Miller, 1998a). A detecção de anticorpos contra larvas L3 e L4 (que podem ser eliminadas antes de alcançarem as artérias pulmonares) e a presença de anticorpos devida a infecções anteriores por *D. immitis* diminuem a especificidade deste teste (Snyder *et al.*, 2000). Também, em infecções ectópicas pode ser obtido um resultado positivo (Goodwin, 1998). Além disso, os anticorpos nem sempre foram detectados em gatos infectados com este parasita como demonstrado no estudo efectuado por Kalkstein, Kaiser, & Kaneene (2000), onde mais de 20% dos gatos infectados assintomáticos e com antígenos para *D. immitis* obtiveram resultados negativos para a detecção de anticorpos.

Os sinais clínicos compatíveis com DFel foram registados para cada animal do rastreio. Esses sinais incluíram letargia, anorexia, perda de peso, taquipneia persistente, tosse intermitente, dispneia e vômito intermitente não relacionado com as refeições. Também, foram procurados os sinais como insuficiência cardíaca direita, *cor pulmonale*, sopro cardíaco sistólico, pneumotórax, hidrotórax, quilotórax, ascite, ataxia, convulsões, síncope e alterações neurológicas. Alguns gatos do rastreio apresentaram sinais clínicos que também surgem em animais com infecção por *D. immitis*. No entanto, a maioria desses sinais tinha etiologia conhecida, sendo que nenhum deles foi suspeito de ter dirofilariose felina.

O animal infectado por *D. immitis* apresentou-se com dispneia, mas na observação da radiografia torácica não foi possível observar alterações significativas e compatíveis com dirofilariose felina. Os achados radiográficos mais característicos de DFel são a dilatação e a tortuosidade da artéria pulmonar principal e das artérias pulmonares caudais (Miller, 1998a). Os achados radiográficos são frequentemente transitórios nos gatos infectados, ao contrário dos cães, tendendo a normalizar e podendo desaparecer completamente, não deixando nenhuma evidência de infecção (Nelson *et al.*, 2007). Também, Schafer, e Berry (1995, citados por Litster & Atwell, 2008b) demonstraram que o critério radiográfico mais sensível (artéria pulmonar caudal esquerda num rácio médio maior que 1,6 vezes a nona costela, no nono espaço intercostal e na projecção ventrodorsal) apenas detectou 53% dos casos (Schafer & Berry, 1995, citados por Litster & Atwell, 2008b; Litster *et al.*, 2005). Em alguns gatos, a radiografia torácica não fornece evidências de doença (Nelson *et al.*, 2007), mas não deve ser excluído um diagnóstico de DFel apenas com base neste exame complementar.

A gata infectada detectada no rastreio era um animal errante, que foi confinado a um espaço fechado e estranho, pelo que a causa da sua dispneia foi atribuída ao stress. Como apresentou melhoras no seu estado clínico foi ovariectomizada e, após recuperação,

libertada para a colónia de gatos de onde provinha. Uma vez que a testagem serológica foi efectuada posteriormente a essa libertação, não foi possível efectuar mais exames complementares, como uma ecocardiografia. Recorrendo a este exame complementar de diagnóstico, em mais de 50% dos casos, os adultos de *D. immitis* podem ser visualizados dentro das câmaras cardíacas ou artérias pulmonares (Miller, 1998a). As câmaras do lado direito do coração felino podem ser investigadas por ecocardiografia 2D e um acesso à artéria pulmonar principal, e a um segmento relativamente longo das artérias pulmonares direitas e uma pequena porção das artérias pulmonares esquerdas (Miller, 1998a; Nelson *et al.*, 2007). Na ecocardiografia, os adultos de *D. immitis* apresentam-se como estruturas hiperecogénicas paralelas (Atkins, 2007a).

A gata infectada apresentou resultados negativos para os testes de FIV e de FeLV o que corrobora a hipótese de não haver uma associação entre infecção por *D. immitis* e co-infecção por esses vírus imunossupressores (Levy *et al.*, 2003; Levy, 2007a). Além disso, e sendo um animal do sexo feminino não confirma a hipótese que os gatos machos sejam mais susceptíveis à infecção tal como afirmado por Kramer e Genchi (2002), Levy *et al.* (2003) e Atkins (2005b).

A gata infectada era um animal errante o que corrobora a hipótese de animais com acesso ao exterior apresentem um risco aumentado de infecção (Atkins & Paul, 2006). Porém, mesmo os animais mantidos estritamente em casa podem ser infectados (Nelson *et al.*, 2007). No estudo de Atkins *et al.* (2000, citados por Litster & Atwell, 2008b), observou-se que 27% dos gatos infectados viviam apenas no interior de habitações. De acordo com estes dados, na AML, os proprietários de todos os gatos devem ser alertados sobre o risco potencial de infecção por *D. immitis*.

A gata deveria ter sido submetida a tratamento sintomático caso apresentasse tosse ou dispneia. Poderiam administrar-se corticosteróides e broncodilatadores (Miller, 1998a). A Prednisolona em doses progressivamente diminuídas providenciaria um tratamento médico eficaz (Nelson *et al.*, 2007). O tratamento adulticida (Tiacetarsamida ou Melasormina) seria desaconselhado pois poderia colocar a gata em risco de morte súbita como resultado de colapso circulatório e de insuficiência respiratória (Atwell & Lister, 2002). O tratamento microfilaricida era desnecessário uma vez que o animal não apresentava microfilarémia.

Caso o animal manifestasse sinais clínicos poderia ser indicada a remoção cirúrgica dos adultos de *D. immitis*. No entanto, as dirofilárias deveriam ser previamente localizadas por ecocardiografia, tendo de se encontrar em localizações acessíveis aos instrumentos cirúrgicos (Nelson *et al.*, 2007; Litster & Atwell, 2008b). A remoção cirúrgica seria atractiva por minimizar o risco de tromboembolismo (Atkins, 2005a).

O tratamento anti-*Wolbachia* poderia também ser considerado. McCall *et al.* (2008) encorajou o teste da associação Doxiciclina com Ivermectina como um tratamento adulticida alternativo para gatos. As tetraciclina inibem o desenvolvimento inicial das dirofilárias e

bloqueiam a embriogénese de *D. immitis*, presumivelmente pela eliminação de *Wolbachia* do parasita (Taylor *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2005; Kramer, 2006; McCall *et al.*, 2008).

No caso da gata infectada por *D. immitis* detectada no rastreio deveria ser efectuada a repetição dos testes serológicos com intervalos de quatro a cinco meses (com o propósito de monitorizar a evolução da infecção) até ao desaparecimento da antigenémia detectável (como resultado da provável eliminação do parasita). A repetição dos testes serológicos deveria incluir tanto os testes para a detecção de antígenos como os testes para a detecção de anticorpos anti-*D. immitis* (Nelson *et al.*, 2007).

Devido ao elevado risco de infecção, à elevada taxa de mortalidade e ao resultado imprevisível da infecção felina, a profilaxia é o único meio efectivo e seguro de proteger os gatos que vivem em áreas endémicas de DCan (Genchi *et al.*, 2008; Tuzio *et al.*, 2005). Os fármacos profiláticos devem ser administrados mensalmente durante o período sazonal de transmissão desta doença (Nelson *et al.*, 2007) ou durante todo o ano, segundo Atkins & Paul (2006). A profilaxia é efectuada com macrólidos que são administrados em formulações orais (Ivermectina e Milbemicina oxima) ou tópicas (Selamectina e Moxidectina) (Nelson *et al.*, 2007). Para além disso, estes fármacos antiparasitários possuem uma actividade de largo espectro (Krautmann, 2000). O risco de efeitos adversos devido à morte das microfilárias é pequeno devido a serem microfilaricidas de acção lenta (excepto a Milbemicina) (McCall *et al.*, 1996, citados por McCall *et al.*, 2007; Atkins & Paul, 2006) e porque a maioria dos gatos não apresentam microfilárias (como o caso da gata infectada detectada no rastreio) ou apresentam baixas cargas de microfilárias.

Tendo em conta a presença de *D. immitis* detectada no animal em causa, é provável que os clínicos da AML estejam rotineiramente a não considerar a hipótese de infecções por *D. immitis* em gatos. De acordo com os resultados do presente estudo, a dirofilariose felina deve ser incluída na lista de diagnósticos diferenciais em gatos desta região. O aumento da utilização dos testes para pesquisa de antígenos resultaria na detecção de um número significativo de casos positivos (Lorentzen & Caola, 2008). Na AML, animais que tenham morrido de forma súbita e sem causa aparente devem ser necropsiados para pesquisa de *D. immitis*.

A incidência de casos de dirofilariose pulmonar humana tem aumentado em todo o mundo, no entanto na AML desconhece-se a existência desses casos. Apesar da maioria dos relatos de DHum documentarem a transmissão a partir dos cães, a infecção a partir dos gatos já foi relatada (Narine *et al.*, 1999). Porém, a necessidade da transmissão por um mosquito vector e o facto de os gatos raramente serem microfilarémicos (como ocorreu no animal infectado detectado neste rastreio) sugere que estes animais apresentam um papel pouco importante como reservatórios desta zoonose.

O aquecimento mundial do sistema climático é inequívoco (IPCC, 2007). Há uma concordância de vários modelos em relação a uma subida de temperatura generalizada em

Portugal, sendo a região situada a sul do Tejo a mais afectada. Todos os modelos apontam para uma temperatura média anual em Portugal em 2100 com um desvio positivo de +3 °C a +5 °C em relação à média do período 1961 a 1990 (Ferreira, 2005). Estes aumentos na temperatura provocam o aumento das populações de vectores. Segundo os modelos climáticos utilizados por Casimiro, Calheiros, e Dessai (2001), a percentagem de dias por ano com intervalos de temperatura favoráveis à sobrevivência dos vectores de *D. immitis* (*Aedes* e *Anopheles*) aumentará para cerca de 99% dos dias. Conclui-se, portanto, que as alterações climáticas promoverão o aumento das populações de vectores e como consequência o aumento do risco de transmissão de *D. immitis*.

Na AML, os dados existentes sobre a DCan são escassos e desactualizados. Desconhecem-se as áreas actualmente mais afectadas e as prevalências de infecção por *D. immitis* nos canídeos e nos felídeos. É necessário efectuar mais estudos sobre a dirofilariose canina e felina nesta área.

4.2. Rastreio de leishmaniose por *L. infantum* em 70 gatos da AML

Na AML existem populações dos flebotomíneos *P. ariasi*, *P. perniciosus* e *S. minuta*, sendo que já foram encontradas fêmeas de *P. ariasi* e *P. perniciosus* infectadas por *Leishmania* (Pires, 2000). Esta área é uma região endémica para LCan. Cortes *et al.* (2007) determinaram que na área urbana de Lisboa existia uma prevalência de 19,2% de cães infectados com o parasita, contrastando com uma prevalência de 5,5% num estudo seroepidemiológico semelhante efectuado na década de 1980 na mesma área (Abranches *et al.*, 1983, citado por Cortes *et al.*, 2007).

Entre 2000 e 2006, 144 casos de LVHum foram diagnosticados no laboratório da Unidade de Leishmanioses do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, a maioria dos quais eram casos provenientes da AML (Maia *et al.*, 2008a).

Os gatos podem ser infectados com *Leishmania*, ficarem clinicamente doentes e até morrerem devido à leishmaniose. Na AML, de acordo com a informação obtida de um caso clínico de LFel (Costa-Durão *et al.*, 1994) e de estudos epidemiológicos prévios (Vaz *et al.*, 2005; Maia *et al.*, 2008a) concluiu-se que *L. infantum* circula na população felina desta área podendo causar doença nos gatos.

Todas as técnicas da imunofluorescência indirecta efectuadas aos 70 gatos do rastreio para a detecção de anticorpos anti-*L. infantum* apresentaram resultados negativos. A prevalência de infecção por *L. infantum* obtida com a técnica de IFI para esta população de gatos foi de 0% (0/70 gatos).

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Faria (2008) que realizou um estudo epidemiológico no concelho de Vila Franca de Xira (incluído na AML) e em que nenhum (0%) dos 75 gatos apresentou resultado positivo para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania*. A pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* pela técnica de IFI realizada por

Vaz *et al.* (2005) em gatos errantes da região de Lisboa obteve uma prevalência de apenas 1,03% (1/97 gatos).

Maia, Nunes e Campino (2008a) realizaram um estudo epidemiológico em 23 gatos errantes assintomáticos da mesma região. Foi realizada IFI para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em amostras de soro de 20 gatos, quatro (15%) apresentaram resultados positivos mas para diluições muito baixas (1:2 e 1:16). Nestes quatro animais, apenas três apresentaram resultados positivos para PCR e Real Time-PCR. Na totalidade da amostra, foi identificado ADN de *Leishmania infantum* por PCR e PCR-RFLP em sete animais (30,4%).

Os métodos serológicos são os métodos preferenciais para o diagnóstico de LCan e LVHum, mesmo durante as fases iniciais da doença (OIE, 2008). Na LCan, altos títulos de anticorpos indicam infecção activa e potencial transmissão do protozoário para os vectores (Quinnell *et al.*, 2003). No entanto, vários estudos demonstram que o mesmo não ocorre nos gatos com LFel (Kirckpatrick *et al.*, 1984, citado por Venet, 2007; Simões-Mattos *et al.*, 2005; Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Maia *et al.*, 2008a).

Neste estudo, deveriam ter sido utilizadas as técnicas moleculares (PCR) associadas à técnica da IFI para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, uma vez que vários estudos demonstraram que a presença de ADN do parasita não está associada com o nível de anticorpos circulantes específicos detectados por IFI (Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Maia *et al.*, 2008a), pelo que a técnica da IFI não é eficaz na detecção de infecção activa por *L. infantum* em gatos. Segundo Solano-Gallego *et al.* (2007), a falta de produção de anticorpos pode ser devida ao facto da forma clínica mais comum de LFel não ser a visceral mas a cutânea. Do ponto de vista epidemiológico, a ausência de anticorpos anti-*Leishmania* no soro de gatos com lesões cutâneas activas (Simões-Mattos *et al.*, 2005) podem levar a uma falha no diagnóstico e à consequente possibilidade de transmissão do parasita para os vectores flebotomíneos e destes para outros hospedeiros vertebrados. Maia *et al.* (2008a) são da opinião que o diagnóstico de LFel deve ser efectuado por técnicas moleculares.

No rastreio efectuado e através da anamnese e do exame físico foi possível registar sinais que também ocorrem em gatos com LFel nomeadamente: anorexia, perda de peso, depressão, apatia, nódulos cutâneos, alopecias, estomatite, adenomegália, hepatomegália, esplenomegália e febre. No entanto, a maioria desses sinais estavam associados a diversas doenças com etiologia conhecida e não associada a LFel. Nenhum animal apresentou lesões nodulares ou ulcerosas no focinho e nas orelhas, as localizações cutâneas mais frequentemente afectadas nos gatos com LFel. Nenhum dos animais foi suspeito de possuir leishmaniose felina.

De acordo com os estudos de Martín-Sánchez *et al.* (2007) e Maia *et al.* (2008a), o gato age como um bom hospedeiro reservatório de *L. infantum* e pode transmitir esse parasita aos vectores (Maroli *et al.*, 2007).

Maia *et al.* (2008a) verificaram que todos os gatos infectados encontrados no seu estudo eram assintomáticos e tinham uma baixa resposta de anticorpos anti-*Leishmania*. Estes investigadores sugeriram a existência de um grave desconhecimento do número real de gatos infectados. Logo, a falta de um diagnóstico precoce de LFel nas zonas endémicas, como a AML, pode implicar que o animal continue a constituir um risco potencial para a transmissão de *Leishmania* aos vectores.

Vários estudos demonstraram a presença de vectores de *L. infantum* na AML. Pires (2000, citado por Afonso & Alves-Pires, 2008) e Alves-Pires *et al.* (2001, citados por Afonso & Alves-Pires, 2008) obtiveram uma percentagem de 41,9% de *P. ariasi* e de 56% de *P. perniciosus*, sendo que 2,5% (2/79) de *P. ariasi* e 1,3% (2/229) de *P. perniciosus* estavam infectados com *Leishmania*. Na área da Arrábida, Afonso, Campino, Cortes, e Alves-Pires (2005) contabilizaram 58,65% de *P. perniciosus*, 27,07% de *S. minuta*, 13,83% de *P. ariasi* e 0,45% de *P. sergenti* dos flebotómicos totais. Na AML, as preferências alimentares destes vectores devem ser estudadas com o objectivo de saber qual a atractividade dos gatos para estes flebotómicos. Em Espanha, Colmenares *et al.* (1995) consideraram *P. perniciosus* como um insecto oportunista, que se alimentou das espécies às quais teve acesso mais fácil. O sangue recolhido dos flebotómicos provinha de cães (33%), humanos (25%), gatos (25%) e ratos (17%) (Colmenares *et al.*, 1995, citados por Simões-Mattos *et al.*, 2004). Sánchez *et al.* (2000, citados por Simões-Mattos *et al.*, 2004) expuseram um gato às picadas de *P. perniciosus* e observaram uma taxa de ingurgitamento de 93% das fêmeas deste insecto. Num estudo efectuado por Maroli *et al.* (2007), 20% das fêmeas de *P. perniciosus* picaram um gato naturalmente infectado com *L. infantum*.

Em Lisboa, em 2006, cerca de 49% dos dias do ano eram favoráveis à transmissão de *L. infantum* (Calheiros *et al.*, 2006). Com as alterações climáticas previstas ocorrerá o aumento da densidade flebotómica e o consequente aumento da transmissão de leishmaniose nesta região (Calheiros *et al.*, 2006), sendo previsível o aumento da incidência dos casos de LCan, LFel e LHum nesta área. A nível nacional a incidência de LFel poderá estar a aumentar considerando que, em 2009, foram registados dois casos de LFel em Portugal (Marcos *et al.*, 2009; Sanches *et al.*, 2009).

Devem ser estudadas formas de profilaxia, sendo que a utilização de coleiras impregnadas de repelentes para os vectores pode ser uma solução. De notar que, os piretróides utilizados nas coleiras dos cães apresentam toxicidade para os gatos (Sutton, Battes & Campbell, 2007) pelo que devem ser investigados outros compostos.

São necessários mais estudos sobre a leishmaniose na espécie felina. O esclarecimento do papel epidemiológico do gato e do seu envolvimento no ciclo biológico de *Leishmania infantum* é fundamental quer em Saúde Animal quer em Saúde Pública.

5. Conclusões

A realização do estágio curricular no Hospital Veterinário do Restelo foi francamente positiva, visto que me permitiu aprofundar os conhecimentos adquiridos ao longo do curso de Medicina Veterinária, com o apoio incondicional do corpo clínico, das enfermeiras e dos auxiliares.

O rastreio efectuado a 70 gatos veio documentar, pela primeira vez, a existência de infecção felina por *Dirofilaria immitis* na Área Metropolitana de Lisboa. Utilizando o teste para a detecção de antígenos Witness® *Dirofilaria*, a prevalência obtida foi de 1,43% (1/70 gatos). Provavelmente, esta prevalência revela apenas a “ponta do iceberg” uma vez que o teste utilizado apresenta baixa sensibilidade, em especial, em infecções imaturas e infecções causadas apenas por parasitas machos, muito frequentes nos gatos. Não foram observadas microfírias no exame de sangue a fresco nem com a técnica de Knott modificada, mesmo no animal infectado, confirmando a frequente ausência de microfilarémia nos gatos.

Nenhum dos gatos apresentou anticorpos anti-*Leishmania infantum* para a técnica de imunofluorescência indirecta. Apesar disso, vários estudos indicam que gatos infectados podem não desenvolver títulos de anticorpos detectáveis, em especial, durante a fase activa da doença, pelo que a técnica da imunofluorescência indirecta deve ser associada às técnicas moleculares de diagnóstico.

Os proprietários dos gatos da Área Metropolitana de Lisboa devem ser alertados para a possibilidade de infecção dos seus animais e devem ser adoptadas medidas de profilaxia contra ambos os parasitas.

Considerando o carácter zoonótico destas duas parasitoses, o esclarecimento do papel epidemiológico do gato é fundamental quer em Saúde Animal quer em Saúde Pública, sendo necessários mais estudos sobre a dirofilariose e a leishmaniose felinas abrangendo todo o território nacional.

Bibliografia

- Afonso, M., Campino, L., Cortes, S. & Alves-Pires, C. (2005). The phlebotomine sandflies of Portugal. XIII - occurrence of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 in the Arrabida leishmaniasis focus [versão electrónica]. *Parasite*, 2005, pp. 12, 69-72. Acedido em Mar. 17, 2009, disponível em: http://www.parasite-journal.org/dwld/N1_05_AFONSO.pdf
- Afonso, M. & Alves-Pires, C. (2008). Capítulo II: Bioecologia dos vectores. In Santos-Gomes, G. M., Pereira da Fonseca, I. M. (Eds.). *Leishmaniose Canina*. Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A., 2008, pp. 27-40
- Alexander, B. & Maroli, M. (2003). Control of phlebotomine sandflies [versão electrónica]. *Med. Vet. Entomol.* 17 (2003), pp. 1–18. Acedido em Mar. 17, 2009, disponível em: http://www.scalibor-vet.com.br/descargas/otros/Artigo_1.pdf
- AHS (2009). Feline Heartworm Disease, American Heartworm Society Acedido em Mar. 17, 2009, disponível em: http://www.heartwormsociety.org/article_1142.html
- AML (2007). Área Metropolitana de Lisboa – Território. Acedido em Jul. 10, 2009, disponível em: <http://www.aml.pt/index.php?&iLevel1=gaml&iLevel2=territorio&iContent=index.html>
- Amóra, S., Bevilaqua, C., Feijó, F., Alves, N. & Maciel M. (2009). Control of phlebotomine (Diptera: *Psychodidae*) leishmaniasis vectors [versão electrónica]. *Neotrop. entomol.* 2009, vol.38, n.3, pp. 303-310. ISSN 1519-566X. Acedido em Ago. 3, 2009 disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ne/v38n3/a01v38n3.pdf>
- Arther, R., Charles, S., Ciszewski, D., Davis, W. & Settje, T. (2005). Imidacloprid/moxidectin topical solution for the prevention of heartworm disease and the treatment and control of flea and intestinal nematodes of cats [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 133, Issues 2-3, 24 October 2005, pp. 219-225 Acedido em Abr. 8, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.04.001>
- Ashford, R. (1996). Leishmaniasis reservoirs and their significance in control [versão electrónica]. *Clin. Dermatol.* 14 (1996), pp. 523–532. Acedido em Abr. 8, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0738-081X\(96\)00041-7](http://dx.doi.org/10.1016/0738-081X(96)00041-7)
- Atkins, C., DeFrancesco, T., Coats, J., Sidley, J. & Keene, B. (2000). Heartworm infection in cats: 50 cases (1985–1997) [versão electrónica]. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 217 (2000), pp. 355–358. Acedido em Jul. 10, 2009, disponível em: <http://avmajournals.avma.org/doi/pdf/10.2460/javma.2000.217.355>
- Atkins, C. (2005a). Feline heartworm disease. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 6th ed. St. Louis: Elsevier; 2005 pp: 881, 898, 1118-1144
- Atkins, C., Moresco, A. & Lister, A. (2005b). Prevalence of naturally occurring *Dirofilaria immitis* infection among nondomestic cats housed in an area in which heartworms are endemic [resumo] [versão electrónica]. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227 (2005), pp. 139-143. Acedido em Jul. 10, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.2460/javma.2005.227.139>

- Atkins, C. & Paul, M. (2006). Heartbreakers: Dodging the difficulties of *Dirofilaria immitis* [versão electrónica]. In *Proceedings of the NAVC North American Veterinary Conference: Small Animal – Parasitology*, Orlando, Florida, Jan. 13-27, 2006, Volume 20, pp.1017-1019. Acedido em Abr. 8, 2009, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/navc/2006/SAE/358.asp?LA=1>
- Atkins, C. (2007a). Feline Dirofilariasis: The Cutting Edge [versão electrónica]. In *Proceedings of the NAVC North American Veterinary Conference: Small Animal – Cardiology*, Orlando, Florida, Jan. 13-27, 2007 Acedido em Abr. 6, 2009, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/navc/2007/SAE/053.asp?LA=1>
- Atkins, C. (2007b). Feline Heartworm Disease: What's New? [versão electrónica]. In *Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association*, Sydney, Australia, 2007, pp. 145-148. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: www.ivis.org/proceedings/wsava/2007/pdf/atkins3001.pdf
- Atkins, C., Arther, R., Ciszewski, D., Davis, W., Ensley, S., Guity, P., Chopade, H., Hoss, H. & Settje, T. (2008). Echocardiographic quantification of *Dirofilaria immitis* in experimentally infected cats [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 158, Issue 3, 10 December 2008, pp. 164-170. Acedido em Abr. 8, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.09.003>
- Atwell, R. & Litster, A. (2002). Surgical Extraction of Transplanted Adult *Dirofilaria immitis* in Cats [versão electrónica]. *Veterinary Research Communications*, Volume 26, 2002, pp 301-308, Kluwer Academic Publishers, Netherlands. Acedido em Abr. 8, 2009, disponível em: <http://www.springerlink.com/content/5wradup03r7rrnu6/fulltext.pdf>
- Bandi, C., Trees, A. & Brattig, N. (2001). *Wolbachia* in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology* 98 (2001) 215–238. Acedido em Jul. 10, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00432-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00432-0)
- Baneth, G., Koutinas, A., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., & Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one [versão electrónica]. *Trends in Parasitology*, Volume 24, Issue 7, July 2008, Pages 324-330. Acedido em Jul. 10, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2008.04.001>
- Barnes, J., Stanley, O. & Craig, T. (1993). Diffuse cutaneous leishmaniasis in a cat. *J Am Vet Med Assoc.* 1993 Feb 1;202(3):416-8.
- Bates, P. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies [versão electrónica]. *Int. J. Parasitol.* 37 (2007), pp. 1097-1106. Acedido em Jul. 10, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>
- Bazzocchi, C., Genchi, C., Paltrinieri, S., Lecchi, C., Mortarino, M. & Bandi, C. (2003). Immunological role of the endosymbionts of *Dirofilaria immitis*: the *Wolbachia* surface protein activates canine neutrophils with production of IL-8 [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology* 117 (2003) 73-83. Acedido em Jul. 10, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.07.013>

- Berdoulay, P., Levy, J., Snyder, P., Pegelow, M., Hooks, J., Tavares, L., Gibson, N. & Salute, M. (2004). Comparison of Serological Tests for the Detection of Natural Heartworm Infection in Cats [versão electrónica]. *Journal of the American Animal Hospital Association* 40:376-384 (2004). Acedido em Mai. 27, 2009, disponível em: http://www.synbiotics.com/Products/PDF_lib/96-0230d.pdf
- Bonfante-Garrido, R., Valdivia, O., Torrealba, J., García, M., Garófalo, M., Urdaneta, I., Urdaneta, R., Alvarado, J., Copulillo, E., Momen, H. & Grimaldi Jr., G. (1996). Cutaneous leishmaniasis in cats (*Felis domesticus*) caused by *Leishmania (Leishmania) venezuelensis* [versão electrónica]. *Revista Científica, FCV-LUZ* 6 (1996), pp. 187-190. Acedido em Mai. 27, 2009, disponível em: www.fcv.luz.edu.ve/Pdf/1996/03/articulo7.pdf
- Bongiorno, G., Habluetzel, A., Khoury, C. & Maroli, M. (2003). Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy [versão electrónica]. *Acta Trop.*, 88 (2003). pp. 109-116. Acedido em Mai. 27, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0001-706X\(03\)00190-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0001-706X(03)00190-6)
- Borja-Cabrera, G., Correia Pontes, N., da Silva, V., Paraguai de Souza, E., Santos, W., Gomes, E., Luz, K., Palatnik, K. & Palatnik de Sousa, C. (2002). Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN) [versão electrónica]. *Vaccine* 20 (2002) 3277-3284. Acedido em Mai. 27, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00294-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00294-3)
- Bowman, D., Hendrix, C., Lindsay, D. & Barr, S. (2002). *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) Railliet & Henry, 1911. Cap. 4: The Nematodes. In *Feline Clinical Parasitology*. (pp. 331-334) Ames: Iowa State University Press.
- Bowman, D., Lynn, R., Eberhard, M. & Alcaraz, A. (2003). Chapter 6: Histopathological diagnosis. In *Georgi's Parasitology for Veterinarians*. (8th ed.). (pp. 390). St. Louis: Elsevier (USA).
- Bray, R. (1982). The zoonotic potential of reservoirs of leishmaniasis in the Old World [resumo] [versão electrónica]. *Ecol Dis.* 1982;1(4):257-67. PMID: 6765308 [PubMed - indexed for MEDLINE]. Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6765308>
- Burchmore, R. & Barrett, M. (2001). Life in vacuoles – nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotas [versão electrónica]. *International Journal for Parasitology*. Volume 31, Issue 12, October 2001, pp. 1311-1320. Acedido em Jul. 11, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00259-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00259-4)
- Calheiros, J., Casimiro, E., Almeida, A., Alves-Pires, C., Pereira, M., Cardoso, M., Santos-Silva M., Afonso, M. & Sousa, R. (2006). Saúde humana e implicações para o turismo. In Santos, F. & Miranda, P. (eds) *Alterações Climáticas em Portugal: Cenários, Impactos e Medidas de Adaptação*. (revisão Luís Milheiro) Projecto SIAM II, Gradiva, Lisboa, 2006

- Câmara Municipal de Lisboa (2001). 1.2 Enquadramento e Divisão Territorial, Área Metropolitana de Lisboa, (Fontes: Junta Metropolitana de Lisboa 1999 e DGA, Atlas Digital do Ambiente, 2001). Lisboa em Mapas – Informação geo-referenciada, Câmara Municipal de Lisboa – Urbanismo, Lisboa, Setembro, 2001, ISBN: 972-98786-0-9
- Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, J., Santos-Gomes, G., Alves-Pires, C., Cortes, S., Ramada, J., Cristovão, J., Afonso, M., & Dedet, J. (2006). Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. [versão electrónica]. Tropical Medicine & International Health. 2006;11:1708–1714. Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3156.2006.01728.x>
- Cancrini, G. & Gabrielli, S. (2007). Chapter 3: Vectors of *Dirofilaria* nematodes: biology, behaviour and host/parasite relationships [versão electrónica]. In C. Genchi, L. Rinaldi & G. Cringoli (Eds.), *Proceedings of the First European Dirofilaria Days: Dirofilaria immitis and D. repens in dog and cat and human infections*, Zagreb, Croatia, 22-25 February 2007, pp. 49-58. Acedido em Abr. 9, 2009, disponível em: www.ivis.org/proceedings/dirofilaria/2007/cancrini1.pdf
- Carleton, R. & Tolbert, M. (2004). Prevalence of *Dirofilaria immitis* and gastrointestinal helminths in cats euthanized at animal control agencies in northwest Georgia [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 119, 2004, pp. 319-326. Acedido em Abr. 4, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.10.019>
- Casimiro, E., Calheiros, J. & Dessai, S. (2001). Capítulo 8 – Human Health pp. 274, 276, 284-286 In Santos, F., K. Forbes, R. Moita (Eds) *Climate Change in Portugal: Scenarios, Impacts And Adaptation Measures*. SIAM Project [versão electrónica]. Gradiva, Lisboa, 2001. Acedido em Ago. 13, 2009, disponível em: http://www.siam.fc.ul.pt/SIAM_Book/8_HumanHealth.pdf
- Catorze, M. (2005). Leishmaniose e SIDA [versão electrónica]. *Med Cutan Iber Lat Am* 2005;33(6):237-250. Acedido em Jul. 14, 2009, disponível em: www.medigraphic.com/pdfs/cutanea/mc-2005/mc056b.pdf
- Chen, D., Kolli, B., Yadava, N., Lu, H., Gilman-Sachs, A., Peterson, D., & Chang, K. (2000). Episomal Expression of Specific Sense and Antisense mRNAs in *Leishmania amazonensis*: Modulation of gp63 Level in Promastigotes and Their Infection of Macrophages In Vitro [versão electrónica]. *Infection And Immunity*, Jan. 2000, p. 80-86. Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: <http://iai.asm.org/cgi/reprint/68/1/80.pdf>
- Chen, C., Hsieh, H., Hu, B. & Fu, C. (2005). Mosquito-killing water molds isolated from soil samples collected in Taiwan [versão electrónica]. *Pedobiologia*, Volume 49, Issue 6, 30 November 2005, pp. 585-589. Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pedobi.2005.06.010>
- Clemente, M. (1996). Prevalence of *Dirofilaria* in dogs in Madeira Island. Examination and identification of microfilaria. *Vet. Técnica* Agosto . 1996. pp. 34-37.

- Coelho, W., Lima, V., Soutello, R., Amarante, A., Gennari, S., Meireles, M., Apolinário, J. & Bresciani, K. (2008). Ocorrência de anticorpos contra *Leishmania* spp. em gatos domésticos do município de Andradina – São Paulo, Brasil [resumo] [versão electrónica]. Veterinária e Zootecnia, v.15, n. 2, , supl. 1, ago., pg 75, 2008. Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: http://www.fmvz.unesp.br/revista/volumes/vol15_n2_supl/Suplemento_v15_n2_p75.pdf
- Colmenares, M., Portús, M., Botet, J., Dobaño, C., Gállego, M., Wolff, M. & Seguí, G. (1995). Identification of blood meals of *Phlebotomus Perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method [resumo] [versão electrónica]. J. Med. Entomol., 1995 May;32(3):229-33. Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7616511>
- Cortes, S., Afonso, M., Alves-Pires, C. & Campino, L. (2007). Stray dogs and leishmaniasis in urban areas, Portugal [versão electrónica]. Emerging Infectious Diseases, Vol. 13, No. 9, September 2007 1431-1432. Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: <http://www.cdc.gov/eid/content/13/9/pdfs/1431.pdf>
- Costa, F., Goto H., Saldanha, L., Silva, S., Sinhorini, I., Silva, T. & Guerra J. (2003). Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis [versão electrónica]. Vet. Pathol. 40 (2003), pp. 677–684. Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: <http://www.vetpathology.org/cgi/reprint/40/6/677.pdf>
- Costa-Durão, J., Rebelo, E., Peleteiro, M., Correia J. & Simões, G. (1994). Primeiro caso de leishmaniose em gato doméstico (*Felis Catus Domesticus*): Nota Preliminar, Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, Volume 89, n.º 551, Julho/Setembro 1994, pp. 140-144.
- Courtney, C. & Zeng, Q. (2001). Comparison of heartworm antigen test kit performance in dogs having low heartworm burdens [versão electrónica]. Veterinary Parasitology, Volume 96, Issue 4, 19 April 2001, pp. 317-322. Acedido em Abr. 4, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00374-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00374-0)
- Coutinho, M., Bueno, L., Sterzik, A., Fujiwara, R., Botelho, J., De Maria, M., Genaro, O., & Linardi, P. (2005). Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis [versão electrónica]. Vet. Parasitol. 128 (2005), pp. 149–155. Acedido em Abr. 4, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.11.011>
- Craig, T., Barton, C., Mercer, S., Droleskey, B. & Jones, L. (1986). Dermal leishmaniasis in a Texas cat [resumo] [versão electrónica]. Am J Trop Med Hyg. 1986 Nov;35(6):1100-2. Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3789264>
- Croft, S., Yardley, V., & Kendrick, H. (2002). Drug sensitivity of *Leishmania* species: some unresolved problems [versão electrónica]. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, Volume 96, Supplement 1, April 2002, pp. S127-S129. Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0035-9203\(02\)90063-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0035-9203(02)90063-5)

- Croft, S. & Coombs, G. (2003). Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs [versão electrónica]. Trends in Parasitology, Volume 19, Issue 11, November 2003, pp. 502-508. Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2003.09.008>
- Dantas-Torres, F. (2007). The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* [versão electrónica]. Veterinary Parasitology, Volume 149, Issues 3-4, 10 November 2007, pp. 139-146. Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.007>
- Datz, C. (2003). Update on Canine and Feline Heartworm Tests. [versão electrónica]. Compendium Article 2 Vol. 25, No. 1 January 2003. pp. 30-42. Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: http://www.vettechjournal.com/Media/PublicationsArticle/PV_25_01_30.pdf
- Diakou, A., Papadopoulos, E. & Lazarides, K. (2009). Specific anti-*Leishmania* spp. antibodies in stray cats in Greece [versão electrónica]. Journal of Feline Medicine & Surgery, In Press, Corrected Proof, Available online 28 February 2009. Acedido em Mai. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfms.2008.01.009>
- Dias, F., Lorosa, E. & Rebêlo, J. (2003). Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychididae, Phlebotominae) [versão electrónica]. Cadernos de Saúde Pública, 19, 1373-1380. Acedido em Jul. 12, 2009, disponível em: <http://www.scielo.org/pdf/csp/v19n5/17809.pdf>
- DiBella, C., Vitale, F., Russo, G., Greco, A., Milazzo, C., Aloise, G. & Cagnin, M. (2003). Are rodents a potential reservoir for *Leishmania infantum* in Italy? [versão electrónica]. J. Mt. Ecol., 7 (Suppl.): 2003 pp. 125-129. Acedido em Abr. 24, 2009, disponível em: <http://www.mountainecology.org/IBEX7/pdf/leishmania%20infantum.pdf>
- Dillon, R. (2007). The nature of heartworm disease in cats: different from the dog [versão electrónica]. In Proceedings of the NAVC North American Veterinary Conference: Small Animal – Parasitology, Orlando, Florida, Jan. 13-27, 2007, pp 985-987 Acedido em Abr. 8, 2009, disponível em: <http://www.avis.org/proceedings/navc/2007/SAE/347.asp?LA=1>
- Dillon, A., Warner, A., Brawner, W., Hudson, J. & Tillson, M. (2008). Activity of pulmonary intravascular macrophages in cats and dogs with and without adult *Dirofilaria immitis* [versão electrónica]. Veterinary Parasitology, Volume 158, Issue 3, 10 December 2008, pp. 171-176. Acedido em Abr. 4, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.09.004>
- Echeverri, A., Long, R., Check, W. & Burnett, C. (1999). Pulmonary Dirofilariasis [versão electrónica]. Ann Thorac Surg, The Society of Thoracic Surgeons, Volume 67, 1999, pp. 201–2. Acedido em Abr. 4, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-4975\(98\)01060-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-4975(98)01060-1)
- Faria, T. (2008). Estudo sero-epidemiológico da infecção por *Leishmania infantum* em cães e gatos do município de Vila Franca de Xira (Ribatejo, Portugal) utilizando o teste de imunofluorescência indirecta. Dissertação de Mestrado. Afonso, F. (Orientador), Pereira da Fonseca, I. (Co-orientador), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa

- Ferreira, D. (2005). Capítulo 3: O clima de Portugal estará a mudar?. Medeiros, C., Ferreira, A., Ferreira, D., Moreira, M., Neto, C. & Ramos, C. (2005). Geografia de Portugal – O ambiente físico Círculo de Leitores e Autores, volume 1; ISBN 972-42-3538-6, pp. 371-381
- Ferreira M., Fattori, K., Souza, F. & Lima, V. (2009). Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. [versão electrónica]. Veterinary Parasitology, In Press, Corrected Proof, Available online 25 June 2009. Acedido em Abr. 4, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.06.026>
- Figueiredo, F., Pereira, S., Gremião, I., Nascimento, L., Madeira, M. & Schubach, T. (2008). Leishmaniose tegumentar americana em felino doméstico do município do Rio de Janeiro, Brasil – relato de caso. Saúde Pública. Clínica Veterinária n.º 74, pp.58-60
- Figueiredo, F., Bonna, I., Nascimento, L., da Costa, T., Baptista, C., Pacheco, T., Amendoeira, M. & Madeira, M. (2009). Serological evaluation for detection of anti-Leishmania antibodies in dogs and cats in the district of Santa Rita de Cássia, municipality of Barra Mansa, State of Rio de Janeiro [resumo] [versão electrónica]. Rev Soc Bras Med Trop. 2009 Mar-Apr; 42(2):141-5. Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19448930>
- Figueiró-Filho, E., Duarte G., El-Beitune, P., Quintana, S. & Maia, T. (2004). Leishmaniose visceral e gestação: relato de caso. Rev. Bras. Ginecol. Obstet. [versão electrónica]. 2005, vol.27, n.2, pp. 92-97. ISSN 0100-7203. Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbgo/v27n2/24303.pdf>
- Foster, J., Ganatra, M., Kamal, I., Ware, J., Makarova, K., Ivanova, N., Bhattacharyya, A., Kapatral, V., Kumar, S., Posfai, J., Vincze, T., Ingram, J., Moran, L., Lapidus, A., Omelchenko, M., Kyrpides, N., Ghedin, E., Wang, S., Goltsman, E., Joukov, V., Ostrovskaya, O., Tsukerman, K., Mazur, M., Comb, D., Koonin, E. & Slatko, B. (2005). The Wolbachia genome of *Brugia malayi*: endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode [resumo] [versão electrónica]. PLoS Biology, 2005 Apr;3(4):e121. Epub 2005 Mar 29. Acedido em Abr. 4, 2009, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15780005>
- Fourie, L., Kok D. & Heine, J. (2003). Evaluation of efficacy of an imidaclopride 10% + moxidectin 1% spot-on against *Otodectes cynotis* in cats [versão electrónica]. Parasitol. Res. 90 (Suppl. 3) (2003), pp. 112–113. Acedido em Abr. 4, 2009, disponível em: <http://www.springerlink.com/content/ak80jeqgyr2r7whx/fulltext.pdf>
- Fuller, S. & Hurrell, J. (1989). US Patent 4842999 - Canine heartworm vaccine and diagnostic test [versão electrónica]. Biotechnology Advances, Volume 7, Issue 4, 1989, Page 604. Acedido em Abr. 4, 2009, disponível em: <http://www.patentstorm.us/patents/4842999/fulltext.html>
- Genchi, C., Cody, R., Pengo, G., Büscher, G., Cavalleri, D., Bucci, V. & Junquera, P. (2004). Efficacy of a single milbemycin oxime administration in combination with praziquantel against experimentally induced heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in cats [versão electrónica]. Veterinary Parasitology, Volume 122, Issue 4, 6 August 2004, pp. 287-292. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.04.011>

- Genchi, C., Rinaldi, L., Cascone, C., Mortarino, M. & Cringoli, G. (2005a). Is heartworm disease really spreading in Europe? [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 133, 2005, pp. 137-148. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.04.009>
- Genchi, C., Simón, F. & Kramer, L. (2005b) *Dirofilariosis in Humans: Is it a Real Zoonotic Concern?* [versão electrónica]. *Proceedings of the 30th World Congress of World Small Animal Veterinary Association*, May 11-14, 2005, Mexico City, Mexico, Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2005&PID=10908&Print=1&O=Generic>
- Genchi, C., Venco, L. & Genchi, M. (2007). Chapter 11: Guideline for the laboratory diagnosis of canine and feline *Dirofilaria* infections [versão electrónica]. In C. Genchi, L. Rinaldi & G. Cringoli (Eds.), *Proceedings of the First European Dirofilaria Days: Dirofilaria immitis and D. repens in dog and cat and human infections*, Zagreb, Croatia, 22-25 February 2007, pp. 139-144. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: www.ivis.org/proceedings/dirofilaria/2007/genchi1.pdf
- Genchi, C., Venco, L., Ferrari, N., Mortarino, M. & Genchi, M. (2008). Feline heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection: A statistical elaboration of the duration of the infection and life expectancy in asymptomatic cats [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 158, Issue 3, 10 December 2008, pp. 177-182. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.09.005>
- Gomes, L., Serrão, M., Duarte, R., Bendas, A. & Labarthe, N. (2007). Attraction of mosquitoes to domestic cats in a heartworm enzootic region [versão electrónica]. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, Volume 9, Issue 4, August 2007, pp. 309-312. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfms.2007.01.009>
- Goodwin, J. (1998). The Serologic Diagnosis of Heartworm Infection in Dogs and Cats [versão electrónica]. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, Volume 13, N.º 2, May 1998, pp 83-87. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1096-2867\(98\)80011-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1096-2867(98)80011-X)
- Grevot, A., Hugues, P. J., Marty, P., Pratlong, F., Ozon, C., Haas, P., Breton, C. & Bourdoiseau, G. (2005). Leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in a FIV and FeLV positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods [versão electrónica]. *Parasite*. 2005;12: 271-275. Acedido em Mai. 2, 2009, disponível em: http://www.parasite-journal.org/dwld/N3_05_GREVOT.pdf
- Hallé, M., Gomez, M., Stuble, M., Shimizu, H., McMaster, W., Olivier, M., Tremblay, M. (2009) The *Leishmania* surface protease GP63 cleaves multiple intracellular proteins and actively participates in p38 mitogen-activated protein kinase inactivation [resumo][versão electrónica]. *J Biol Chem*. 2009 Mar 13;284(11):6893-908. Epub 2008 Dec 8. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19064994>
- Harnett, W. & Harnett, M. (2006). What causes lymphocyte hyporesponsiveness during filarial nematode infection [versão electrónica]. *Trends in Parasitology*, Volume 22, Issue 3, March 2006, pp. 105-110. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2006.01.010>

- Hatam, G., Adnani, S., Asgari, Q., Fallah, E., Motazedian, M., Sadjjadi, S., & Sarkari, B. (2009). First Report of Natural Infection in Cats with *Leishmania infantum* in Iran [resumo] [versão electrónica]. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, Vol. 0, Number 0, 2009, Acedido em Mai. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2009.0023>
- Hayasaki, M., Okajima, J., Song, K. & Shiramizu, K. (2003). Diurnal variation in microfilaremia in a cat experimentally infected with larvae of *Dirofilaria immitis* [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 111, Issues 2-3, 13 February 2003, pp. 267-271. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00356-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00356-4)
- Henriques, M. (2009). Freguesia de São Francisco Xavier – Um testemunho do seu cinquentenário, 1959-2009, By The Book, Lisboa, Portugal, ISBN: 978-989-20-1457-9. pp. 1, 10-11, 41, 80, 84
- Hervás, J., Chacon-ManriqueDeLara, F., Sanchez-Isarria, M., Pellicer, S., Carrasco, L., Castillo, J. & Gomez-Villamandos, J. (1999). Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniasis in Spain [versão electrónica]. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, Volume 1, Issue 2, June 1999, pp. 101-105 Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1098-612X\(99\)90066-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1098-612X(99)90066-9)
- Hervás, J., Chacon-ManriqueDeLara, F., Lopez, J., Gomez-Villamandos, J., Guerrero, M. & Moreno, A. (2001). Granulomatous (pseudotumoral) iridocyclitis associated with leishmaniasis in a cat, *Vet. Rec.* 149 (2001), pp. 624–625.
- Hervás, J., Arevalo, J., Chacon-ManriqueDeLara, F., Ripoll, G., Fernandez, J., Boiso, A. & Villamandos, J. (2002). Evaluation of Local Immunoresponse in feline leishmaniasis [versão electrónica]. In *Proceedings of the 27 WSAVA Congress: Oral Communications – Infectious diseases*, 3 a 6 October 2002, Granada, Espanha. Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=2754>
- Heska (2009). Feline Heartworm Antibody Test Kit – Package Insert. Heska Corporation, 2009 Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: http://www.heska.com/solostep/fh_insert.asp
- Hide, M., Bañuls, A. & Tibayrenc, M. (2001). Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodeme MON-1. Epidemiological implications. [versão electrónica]. Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: <http://gemi.mpl.ird.fr/PDF/HidePARASITOLOGY2001.pdf>
- Hoerauf, A., Nissen-Pähle, K., Schmetz, C., Henkle-Dührsen, K., Blaxter, M., Büttner, D., Gallin, M., Al-Qaoud, K., Lucius, R. & Fleischer, B. (1999). Tetracycline therapy targets intracellular bacteria in the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* and results in filarial infertility [versão electrónica]. *J. Clin. Invest.* 103:1 Acedido em Jul. 14, 2009, disponível em: <http://www.jci.org/articles/view/4768/pdf>
- Idexx (2002). IDEXX Laboratories Launches New SNAP® Feline Heartworm Antigen Diagnostic Test [versão electrónica]. Press releases. IDEXX Laboratories, Inc., Maine, Acedido em Jul. 4, 2009, disponível em: <http://www.idexx.com/aboutidexx/pressroom/releases/20020304pr.jsp>

- Idexx (2008). IDEXX Laboratories launches SNAP® Feline Triple™ [versão electrónica]. Press releases. IDEXX Laboratories, Inc., Maine, Acedido em Jul. 4, 2009, disponível em: <http://www.idexx.com/aboutidexx/pressroom/releases/20081211pr.jsp>
- Idexx (2009). SNAP® Feline Triple™ Test FAQ [versão electrónica]. IDEXX Laboratories, Inc., Maine. Acedido em Jul. 4, 2009, disponível em: <http://www.idexx.com/animalhealth/testkits/triple/faq.jsp>
- Instituto Nacional de Estatística (2007), O País em números: informação estatística 1991-2005, [CD-ROM] INE, Lisboa, Portugal, ISBN 978-972-673-897-8, ISSN 1645-5703
- IPCC, 2007: Summary for Policymakers. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [versão electrónica] [Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA. Acedido em Ago. 1, 2009, disponível em: <http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/wg1/ar4-wg1-spm.pdf>
- Ivens, A., Peacock, C., Worthey, E., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S., Bianchetti, G., Borzym, K., Bothe, G., Bruschi, C., Collins, M., Cadag, E., Ciarloni, L., Clayton, C., Coulson, R., Cronin, A., Cruz, A., Davies, R., Gaudenzi, J., Dobson, D., Duesterhoeft, A., Fazelina, G., Fosker, N., Frasc, A., Fraser, A., Fuchs, M., Gabel, C., Goble, A., Goffeau, A., Harris, D., Hertz-Fowler, C., Hilbert, H., Horn, D., Huang, Y., Klages, S., Knights, A., Kube, M., Larke, N., Litvin, L., Lord, A., Louie, T., Marra, M., Masuy, D., Matthews, K., Michaeli, J., Rutter, S., Saunders, D., Schäfer, M., Schein, J., Schwartz, D., Seeger, K., Seyler, A., Sharp, S., Shin, H., Sivam, D., Squares, R., Squares, S., Tosato, V., Vogt, C., Volckaert, G., Wambutt, R., Warren, T., Wedler, H., Woodward, J., Zhou, S., Zimmermann, W., Smith, D., Blackwell, J., Stuart, K. Barrell, B. & Myler, P. (2005). The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major* [resumo] [versão electrónica]. *Science* 15 July 2005: Vol. 309. no. 5733, pp. 436 – 442. Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1112680>
- Johnson, R., Ngumbi, P., Mwanyumba, J. & Roberts, C. (1993). Host feeding preference of *Phlebotomus guggisbergi*, a vector of *Leishmania tropica* in Kenya [resumo] [versão electrónica]. *Med Vet Entomol.* 1993 Jul;7(3):216-8. Acedido em Jul. 10, 2009, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8369555>
- Kalkstein, T., Kaiser, L. & Kaneene, J. (2000). Prevalence of heartworm infection in healthy cats in the lower peninsula of Michigan [resumo] [versão electrónica]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, September 15, 2000, Vol. 217, No. 6, pp. 857-861. Acedido em Jul. 10, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.2460/javma.2000.217.857>
- Kendall, K., Collins, G., & Pope S. (1991). *Dirofilaria immitis* in cats from inner Sydney [resumo] [versão electrónica]. *Australian Veterinary Journal*, Volume 68 Issue 11, pp. 356 – 357 Acedido em Mar. 20, 2009, disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/120742250/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>

- Killick-Kendrick, R. (1999). The biology and control of Phlebotomine sand flies [versão electrónica]. *Clinics in Dermatology*, Volume 17, Issue 3, 6 May 1999, Pages 279-289. Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0738-081X\(99\)00046-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0738-081X(99)00046-2)
- Kirkpatrick, C., Farrell J. & Goldschmidt M. (1984). *Leishmania chagasi* and *L. donovani*: Experimental infections in domestic cats [resumo] [versão electrónica]. *Experimental Parasitology*, Volume 58, Issue 2, October 1984, pp. 125-131. Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4894\(84\)90027-4](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4894(84)90027-4)
- Knight, D. & Lok, J. (1998). Seasonality of heartworm infection and implications for chemoprophylaxis [versão electrónica]. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, Vol 13, No 2 (May), 1998: pp 77-82. Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: <http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/1096-2867/PIIS1096286798800108.pdf>
- Kozek, W. (2005). What is new in the Wolbachia/Dirofilaria interaction? [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology* 133 (2005) 127-132. Acedido em Jul. 10, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.02.005>
- Kramer, L. & Genchi, C. (2002). Feline heartworm infection: serological survey of asymptomatic cats living in northern Italy [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 104, Issue 1, 27 February 2002, pp. 43-50. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00602-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00602-1)
- Kramer, L. (2006). How *Wolbachia* / *Dirofilaria immitis* interact? [versão electrónica]. In *Proceedings of the NAVC North American Veterinary Conference*, Orlando, Florida, Jan. 13-27, 2006, Volume 20, pp.1024-1026. Acedido em Abr. 8, 2009, disponível em: www.ivis.org/proceedings/navc/2006/SAE/360.asp?LA=1
- Krautmann, M., Novotny, M., Keulenaer, K., Godin, C., Evans, E., McCall, J., Wang, C., Rowan, T. & Jernigan, A. (2000). Safety of selamectin in cats [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 91, Issues 3-4, 23 July 2000, pp. 393-403. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00307-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00307-1)
- Labarthe, N., Ferreira, A., Guerrero, J., Newcomb, K. & Paes-de-Almeida, E. (1997). Survey of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) in random source cats in metropolitan Rio de Janeiro, Brazil, with descriptions of lesions [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 71, 1997, pp. 301-306. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00041-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00041-1)
- Labarthe, N., Serrão, M., Melo, Y., Oliveira, S. & Lourenço-de-Oliveira, R. (1998). Potential Vectors of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) in Itacoatiara, Oceanic Region of Niterói Municipality, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [versão electrónica]. 1998, vol.93, n.4, pp. 425-432. ISSN 0074-0276. Acedido em Jul. 10, 2009, disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761998000400001&lng=en
- Lai, C., Tung, K., Ooi, H. & Wang, J. (2000). Competence of *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* as vector of *Dirofilaria immitis* after blood meal with different microfilarial density [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 90, Issue 3, 27 June 2000, pp. 231-237. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00242-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00242-9)

- Laruelle-Magalon, C. & Toga, I. (1996). Un cas de leishmaniose féline. *Prat. Méd. Chir. An. Comp.*, Volume 31 (1996) pp. 255-261.
- Lee, S., Kim, H., Chong, S., Klein, T. & Lee, W. (2007). Molecular survey of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* by direct PCR for wild caught mosquitoes in the Republic of Korea [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 148, Issue 2, 1 September 2007, pp. 149-155. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.04.015>
- Leishdomus (2005). Leishmania. Last updated: April, 2005 - LeishDOMUS. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://www.leishdomus.org/leish.htm>
- Leiva, M., Lloret, A., Peña, T. & Roura, X. (2002). Ocular and Visceral Leishmaniosis in a Domestic Cat [versão electrónica]. In *Proceedings of the 27 WSAVA Congress: Case Reports: Ophthalmology*, 3 a 6 October 2002, Granada, Espanha. Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=2884>
- Leiva, M., Lloret, A., Peña, T. & Roura, X. (2005). Therapy of ocular and visceral leishmaniasis in a cat [resumo] [versão electrónica]. *Vet Ophthalmol.* 2005;8:71–75. Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/118669393/abstract>
- Lemesre, J., Holzmüller, P., Gonçalves, R., Bourdoiseau, G., Hugnet, C., Cavaleyra, M. & Papierok, G. (2007). Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the *LiESAp*-MDP vaccine in endemic areas of France: Double-blind randomised efficacy field trial [versão electrónica]. *Vaccine*, Volume 25, Issue 21, 22 May 2007, pp. 4223-4234. Acedido em Abr. 1, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.02.083>
- Lessa Silva, F. (2007). Lesões genitais em cadelas naturalmente infectadas com *Leishmania chagasi* e soroconversão de cadelas acasaladas com cães portadores. Tese apresentada à Escola de Veterinária da UFMG, Orientador: Prof. Renato de Lima Santos. Co-orientador: Prof. Ernane Fagundes do Nascimento. Belo Horizonte. Escola de Veterinária – UFMG. 2007. Acedido em Abr. 1, 2009, disponível em: <http://dSPACE.lcc.ufmg.br/dSPACE/handle/1843/VETC-7AQMRK>
- Levy, J., Snyder, P., Taveres, L., Hooks, J., Pegelow, M., Slater, M., Hughes, K. & Salute, M. (2003). Prevalence and Risk Factors for Heartworm Infection in Cats From Northern Florida [resumo] [versão electrónica]. *Journal of the American Animal Hospital Association* 39:533-537 (2003) Acedido em Abr. 1, 2009, disponível em: <http://www.jaaha.org/cgi/content/abstract/39/6/533>
- Levy, J. (2007a). Cats Versus Heartworms: How Real Is The Threat? [versão electrónica]. In *Proceedings of the NAVC North American Veterinary Conference*, Orlando, Florida, Jan. 13-27, 2007, pp. 1000-1002 Acedido em Abr. 7, 2009, disponível em: www.ivis.org/proceedings/navc/2007/SAE/353.asp?LA=1

- Levy, J., Edinboro, C., Glotfelty, C., Dingman, P., West, A. & Kirkland-Cady, K. (2007b), Seroprevalence of *Dirofilaria immitis*, feline leukemia virus, and feline immunodeficiency virus infection among dogs and cats exported from the 2005 Gulf Coast hurricane disaster area [versão electrónica], *Vet Med Today: Disaster Medicine*. JAVMA, Vol 231, No. 2, July 15, 2007, pp. 218-225. Acedido em Abr. 1, 2009, disponível em: http://www.avma.org/avmacollections/disaster/javma_231_2_218.pdf
- Litster, A., Atkins, C., Atwell, R. & Buchanan, J. (2005). Radiographic cardiac size in cats and dogs with heartworm disease compared with reference values using the vertebral heart scale method: 53 cases [versão electrónica]. *Journal of Veterinary Cardiology*, Volume 7, Issue 1, May 2005, pp. 33-40. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvc.2005.02.002>
- Litster, A., Atkins, C. & Atwell, R. (2008a). Acute death in heartworm-infected cats: unraveling the puzzle [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 158, Issue 3, 10 December 2008, pp. 196-203. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.09.007>
- Litster, A. & Atwell, R. (2008b). Feline heartworm disease: a clinical review [versão electrónica]. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, Volume 10, Issue 2, April 2008, pp. 137-144. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfms.2007.09.007>
- Liu, J., Song, K., Lee, S., Lee, J., Lee, J., Hayasaki, M., You, M. & Kim, D. (2005). Serological and molecular survey of *Dirofilaria immitis* infection in stray cats in Gyunggi province, South Korea [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 130, Issues 1-2, 10 June 2005, pp. 125-129. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.03.026>
- Loke, P., MacDonalds, A., Maizels, R., Robb, M. & Allen, J. (2000). Alternatively activated macrophages induced by nematodes infection inhibit proliferation via cell-to-cell contact [resumo] [versão electrónica] *J. Immunol.* 30 (2000), p. 2669. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1002/1521-4141\(200009\)30:9<2669::AID-IMMU2669>3.0.CO;2-1](http://dx.doi.org/10.1002/1521-4141(200009)30:9<2669::AID-IMMU2669>3.0.CO;2-1)
- Lorentzen, L. & Caola, A. (2008). Incidence of positive heartworm antibody and antigen tests at IDEXX laboratories: trends and potential impact on feline heartworm awareness and prevention [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 158, Issue 3, 10 December 2008, pp. 183-190. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.09.006>
- Love, D., Mentink-Kane M. & Mosser, D. (1998). *Leishmania amazonensis*: the phagocytosis of amastigotes by macrophages [versão electrónica]. *Exp. Parasitol.* 88 (1998), pp. 161–171. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1006/expr.1998.4232>
- Luria, B., Levy, J., Lappin, M., Breitschwerdt, E., Legendre, A., Hernandez, J., Gorman, S. & Lee, I (2004). Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida [versão electrónica]. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, Volume 6, Issue 5, October 2004, Pages 287-296. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfms.2003.11.005>

- Maia, C., Nunes, M. & Campino, L. (2008a). Importance of Cats in Zoonotic Leishmaniasis in Portugal, Vector-Borne And Zoonotic Diseases, Volume 8, Number 4, 2008, Mary Ann Liebert, Inc.
- Maia, C. & Campino, L. (2008b). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection [versão electrónica]. Veterinary Parasitology, Volume 158, Issue 4, 20 December 2008, pp. 274-287. Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.028>
- Mancianti, F. (2004). Leishmaniosi felina: quale ruolo epidemiologico? [versão electrónica]. Parassitologia, Volume 46, pp. 203-206. Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: <http://www.parassitologia.net/PDF/No.%2046/Mancianti.pdf>
- Manfredi, M., Cerbo, A. & Genchi, M. (2007). Chapter 2: Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats [versão electrónica]. In C. Genchi, L. Rinaldi & G. Cringoli (Eds.), *Proceedings of the First European Dirofilaria Days: Dirofilaria immitis and D. repens in dog and cat and human infections*, free communications, Zagreb, Croatia, 22-25 February 2007, pp. 41-45. Acedido em Abr. 4, 2009, disponível em: www.ivis.org/proceedings/dirofilaria/2007/manfredi1.pdf
- Manzillo, V., Oliva, G., Pagano, A., Manna, L., Maroli M. & Gradoni L. (2006). Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: Evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. Veterinary Parasitology, Volume 142, Issues 1-2, 30 November 2006, pp. 142-145. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.06.029>
- Mar, P., Yang, I., Chang, G. & Fei, A. (2002). Specific polymerase chain reaction for differential diagnosis of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* using primers derived from internal transcribed spacer region 2 (ITS2) [versão electrónica]. Veterinary Parasitology, Volume 106, Issue 3, 26 June 2002, pp. 243-252. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00032-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00032-8)
- Marcos, R., Santos, M., Malhão, F., Pereira, R., Fernandes, A., Montenegro, L. & Roccabianca, P. (2009). Case report: Pancytopenia in a cat with visceral leishmaniasis, Veterinary Clinical Pathology, American Society for Veterinary Clinical Pathology, 2009, ISSN 0275-6382, pp. 1-5
- Marcos-Atxutegi, C., Kramer, L., Fernandez, I., Simoncini, L., Genchi, M., Prieto, G. & Simóna, F. (2003). Th1 response in BALB/c mice immunized with *Dirofilaria immitis* soluble antigens: a possible role for Wolbachia? [versão electrónica]. Veterinary Parasitology 112 (2003) pp. 117-130 Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00419-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00419-3)
- Maroli, M., Pennisi, M., DiMuccio, T., Khoury, C., Gradoni, L. & Gramiccia, M. (2007). Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum* [versão electrónica]. Veterinary Parasitology, Volume 145, Issues 3-4, 30 April 2007, pp. 357-360. Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.11.009>

- Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O. & Morillas-Márquez, F. (2007). Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 145, Issues 3-4, 30 April 2007, pp. 267-273. Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.11.005>
- McCall, J., Jun, J. & Bandi, C. (1999). "Wolbachia and the antifilarial properties of tetracycline. An untold story" [versão electrónica]. *Italian Journal of Zoology*, 66:1, 7-10. Acedido em Jul. 10, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/11250009909356230>
- McCall, J., Supakaorndej, N., Donoghue, A. & Turnbull, R. (2000). Study to determine the performance of commercially available canine heartworm antigen test kits [versão electrónica]. 45th Annual Meeting, July 22-25, 2000, Salt Lake City, Utah. Acedido em Abr. 13, 2009, disponível em: http://www.synbiotics.com/Products/PDF_lib/96-0230a.pdf
- McCall, J. (2005). The safety-net story about macrocyclic lactone heartworm preventives: A review, an update, and recommendations [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 133, Issues 2-3, 24 October 2005, Pages 197-206. State of the Heartworm (AHS Sumposium 2004) - Proceedings of the 11th Triennial Symposium of the American Heartworm Society 2004. Acedido em Jul. 10, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.04.005>
- McCall, J., Dzimianski, M., Steffens, W., Supakorndej, N., Supakorndej, P., Mansour, A., Ard, M., McCall, S., Hack, R. & Domingo, D. (2007). Chapter 13: Safety and efficacy of selamectin in dogs with *Dirofilaria immitis* infection [versão electrónica]. In C. Genchi, L. Rinaldi & G. Cringoli (Eds.), *Proceedings of the First European Dirofilaria Days: Dirofilaria immitis and D. repens in dog and cat and human infections*, Zagreb, Croatia, 22-25 February 2007, pp. 165-174. Acedido em Abr. 5, 2009, disponível em: www.ivis.org/proceedings/dirofilaria/2007/mccall1.pdf
- McCall, J., Genchi, C., Kramer, L., Guerrero, J., Dzimianski, M., Supakorndej, P., Mansour, A., McCall, S., Supakorndej, N., Grandi, G. & Carson, B. (2008). Heartworm and Wolbachia: Therapeutic implications [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 158, 2008, pp. 204-214. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.09.008>
- McTier, T., Shanks, D., Watson, P., McCall, J., Genchi, C., Six, R., Thomas, C., Dickin, S., Pengo, G., Rowan, T. & Jernigan, A. (2000a). Prevention of experimentally induced heartworm (*Dirofilaria immitis*) infections in dogs and cats with a single topical application of selamectin [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 91, Issues 3-4, 23 July 2000, pp. 259-268. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00297-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00297-1)
- McTier, T., Shanks, D., Wren, J., Six, R., Bowman, D., McCall, J., Pengo, G., Genchi, C., Smothers, C., Rowan, T. & Jernigan, A. (2000b). Efficacy of selamectin against experimentally induced and naturally acquired infections of *Toxocara cati* and *Ancylostoma tubaeforme* in cats [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 91, Issues 3-4, 23 July 2000, pp. 311-319. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00301-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00301-0)

- Medeiros, F. (1995). Pesquisa de *Dirofilaria* sp e de anticorpos contra a *Brucella abortus* em canídeos da Ilha de São Miguel. *Veterinária Técnica*. Dezembro 1995 pp. 24-26
- Meinecke, C., Schottelius, J., Oskam, L., & Fleischer, B. (1999). Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala azar) from an asymptomatic mother to her child. *Pediatrics* Vol. 104 No. 5 November 1999, p. e65. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/content/full/104/5/e65>
- Meireles, J. (2008). Capítulo VII: Terapêutica e profilaxia da leishmaniose canina. In Santos-Gomes, G. M., Pereira da Fonseca, I. M. (Eds.). *Leishmaniose Canina*. Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A., 2008, pp. 93-99
- Mello, G. (1940). Verificação da infecção natural do gato (*Felix domesticus*) por um protozoário do genero *Leishmania* [versão electrónica]. *Brasil Médico* 54:180, 1940. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: http://iah.iec.pa.gov.br/iah/fulltext/memo_iec/v2p7-9.pdf
- Miller, M. (1998a). Feline dirofilariasis [versão electrónica]. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, Volume 13, Issue 2, May 1998, pp. 99-108. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1096-2867\(98\)80014-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1096-2867(98)80014-5)
- Miller, M., Atkins, C., Stemme, K., Robertson-Plouch, C. & Guerrero, J. (1998b). Prevalence of exposure to *Dirofilaria immitis* in cats in multiple areas of the United States. In: Seward, R.L. (Ed.), *Recent Advances in Heartworm Disease: Symposium'98*. American Heartworm Society, Batavia, IL, pp. 161–166. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: http://www.vettechjournal.com/Media/PublicationsArticle/VTX_01_03_169.pdf
- Mittal, P., Wijeyaratne, P. & Pandey, S. (2004). Status of Insecticide Resistance of Malaria, Kala-azar and Japanese Encephalitis Vectors in Bangladesh, Bhutan, India and Nepal (BBIN) [versão electrónica]. *Environmental Health Project*, 26568/E.X.ANE.MDRCOORE, March 2004, Kathmandu, Nepal pp.14-15,44-48, 57. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: http://www.ehproject.org/PDF/Activity_Reports/AR-129%20Status%20Insect%20Format.pdf
- Montoya, J., Morales, M., Juste, M. & Corbera, J. (2007). Chapter 14: Heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs: current update in Spain [versão electrónica]. In C. Genchi, L. Rinaldi & G. Cringoli (Eds.), *Proceedings of the First European Dirofilaria Days: Dirofilaria immitis and D. repens in dog and cat and human infections*, Zagreb, Croatia, 22-25 February 2007, pp. 177-180. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: www.ivis.org/proceedings/dirofilaria/2007/montoya1.pdf
- Morchón, R., Ferreira, A., Martín-Pacho, J., Montoya, A., Mortarino, M., Genchi, C. & Simón, F. (2004). Specific IgG antibody response against antigens of *Dirofilaria immitis* and its *Wolbachia* endosymbiont bacterium in cats with natural and experimental infections [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 125, 2004, pp. 313–321. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.08.003>

- Morchón, R., Bazzocchi, C., López-Belmonte, J., Martín-Pacho, J., Kramer, L., Grandi, G. & Simón, F. (2007a). iNOs expression is stimulated by the major surface protein (rWSP) from *Wolbachia* bacterial endosymbiont of *Dirofilaria immitis* following subcutaneous injection in mice – Short communication [versão electrónica]. *Parasitology International* 56 (2007) 71-75. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2006.10.003>
- Morchón, R., Roca, F., López-Belmonte, J., Genchi, M., Venco, L., Rodríguez-Barbero, A. & Simón, F. (2007b). Changes in the levels of eicosanoids in cats naturally and experimentally infected with *Dirofilaria immitis* [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 147, Issues 3-4, 20 July 2007, pp. 271-275. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.04.010>
- Morsy, T. & ElSeoud, S. (1994). Natural infection in two pet cats in a house of a zoonotic cutaneous leishmaniasis patient in Imbaba area, Giza Governorate, Egypt [resumo] [versão electrónica]. *J Egypt Soc Parasitol.* 1994 Apr;24(1):199-204. Acedido em Abr. 4, 2009, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8169443>
- Morsy, T., Al-Dakhil, M. & El-Bahrawy, A. (1999). Natural Leishmania infection in sand cats captured in Riyadh district, Saudi Arabia.[resumo] [versão electrónica] *J Egypt Soc Parasitol.* 1999;29(1):69-74. Acedido em Abr. 4, 2009, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12561884>
- Muro, A., Genchi, C., Cordero, M. & Simón, F. (1999). Human *Dirofilaria immitis* in the European Union [versão electrónica]. *Parasitology Today*, vol. 15, no. 9, 1999. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-4758\(99\)01496-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01496-9)
- Naderer, T., Wee, E. & McConville, M. (2008). Role of hexosamine biosynthesis in *Leishmania* growth and virulence [resumo] [versão electrónica]. *Mol Microbiol.* 2008 Aug;69(4):858-69. Epub 2008 Jun 4. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18532982>
- Narine, K., Brennan, B., Gilfillan, I. & Hodge, A. (1999). Pulmonary presentation of *Dirofilaria immitis* (canine heartworm) in man [versão electrónica]. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, Volume 16, Issue 4, 1 October 1999, pp. 475-477. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1010-7940\(99\)00240-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1010-7940(99)00240-7)
- Nasereddin, A., Salant, H. & Abdeen, Z. (2008). Feline leishmaniasis in Jerusalem: Serological investigation [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 158, Issue 4, 20 December 2008, pp. 364-369. Acedido em Mai. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.09.022>
- Nelson, T., Seward, R., McCall, J., Rubin, S., Buzhardt, L., Graham, W., Longhofer, S., Guerrero, J., Robertson-Plouch, C., Paul, A. & Carithers, D. (2007). 2007 Guidelines for the diagnosis, prevention and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in cats [versão electrónica]. American Heartworm Society. Acedido em Jul. 10, 2009, disponível em: http://www.heartwormsociety.org/article_47.html
- Nelson, T. (2008). *Dirofilaria immitis* in Cats: Anatomy of a Disease [versão electrónica]. CE Article 1. Compendium. July 2008. Pp: 382-389. Acedido em Jul. 10, 2009, disponível em: http://www.vetlearn.com/Media/PublicationsArticle/PV_30_07_382_0.pdf

- Nogami, S., Murasugi, E., Shimazaki, K., Maeda, R., Harasawa, R. & Nakagaki, K. (2000). Quantitative analysis of microfilarial periodicity of *Dirofilaria immitis* in cats [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 92, Issue 3, 1 October 2000, pp. 227-232. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00285-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00285-5)
- Nuchprayoon, S., Junpee, A., Nithiuthai, S., Chungpivat, S., Suvannadabba, S. & Poovorawan, Y. (2006). Detection of filarial parasites in domestic cats by PCR-RFLP of ITS1 [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 140, Issues 3-4, 10 September 2006, pp. 366-372. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.003>
- Nuwayri-Salti, N. & Khansa, H. (1985). Direct non-insect-vector transmission of *Leishmania* parasites in mice [versão electrónica]. *International Journal for Parasitology*, Volume 15, Issue 5, October 1985, pp. 497-500. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0020-7519\(85\)90043-8](http://dx.doi.org/10.1016/0020-7519(85)90043-8)
- O'Connor, R., Jenson, J., Osborne, J. & Devaney, E. (2003). An enduring association? Microfilariae and immunosuppression in lymphatic filariasis [versão electrónica]. *Trends in Parasitology*, Volume 19, Issue 12, December 2003, pp. 565-570. Acedido em Jul. 10, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2003.09.017>
- OIE (2008). Chapter 2.1.8. Leishmaniosis In OIE Terrestrial Manual 2008 [versão electrónica]. pp. 240-250. Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: http://www.oie.int/Eng/Normes/Mmanual/2008/pdf/2.01.08_LEISHMANIOSIS.pdf
- Ordeix, L., Solano-Gallego, L., Fondevila, D., Ferrer, L. & Fondati, A. (2005). Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses [resumo] [versão electrónica]. *Vet. Dermatol.* 16 (2005), pp. 187-191. Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/118705183/abstract>
- Owens, S., Marryott, D., Hatchett, W., Walton, R., Nolan, T., Newton, A., Steurer, F., Schantz, P. & Giger, U. (2001). Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English Foxhounds to anemic dogs [resumo] [versão electrónica]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. October 15, 2001, Vol. 219, No. 8, pp. 1076-1083. Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.2460/javma.2001.219.1076>
- Ozon, C., Marty, P., Pratlong, F., Breton, C., Blein, M., Lelièvre, A. & Haas, P. (1998). Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Southern France. *Veterinary Parasitology*, Volume 75, Issues 2-3, 28 February 1998, pp. 273-277. Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00174-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00174-X)
- Palatnik-de-Sousa, C., Silva-Antunes, I., Morgado, A., Menz, I., Palatnik, M. & Lavor, C. (2009). Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis after dog vaccination with Leishmune® in Brazilian endemic areas [versão electrónica]. *Short communication. Vaccine* 27 (2009) 3505-3512. Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.03.045>

- Pangrazio, K., Costa, E., Amarilla, S., Cinoa, A., Silva, T., Paixão, T., Costa, L., Dengues, E., Diaz, A. & Santos, R. (2009 in press). Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches [resumo] [versão electrónica]. Short communication. Veterinary Parasitology Article in Press, Corrected Proof. Acedido em Jun. 29, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.013>
- Passos, V.M., Lasmar, E.B., Gontijo C.M., Fernandes, O. & Degraeve, W. (1996). Natural Infection of a Domestic Cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania* (Viannia) in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil [versão electrónica]. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 91(1): 19-20, Jan./Feb. 1996. Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: www.scielo.br/pdf/mioc/v91n1/03.pdf
- Peacock, C., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J., Quail, M., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., Kerhornou, A., Ivens, A., Fraser, A., Rajandream, M., Carver, T., Norbertczak, H., Chillingworth, T., Hance, Z., Jagels, K., Moule, S., Ormond, D., Rutter, S., Squares, R., Whitehead, S., Rabinowitsch, E., Arrowsmith, C., White, B., Thurston, S., Bringaud, F., Baldauf, S., Faulconbridge, A., Jeffares, D., Depledge, D., Oyola, S., Hilley, J., Brito, L., Tosi, L., Barrell, B., Cruz, A., Mottram, J., Smith, D. & Berriman, M. (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease [versão electrónica]. Nature Genetics 39, 839 - 847 (2007). Published online: 17 June 2007. Acedido em Mai. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/ng2053>
- Pennisi, M. (2002). A High prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy [versão electrónica]. In: R. Killick-Kendrick, Editor, *Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla* (2002), pp. 21–24. Acedido em Mai. 2, 2009, disponível em: <http://www.scalibor-vet.com.pt/descargas/sumarios/2nd-Proc-IntCanLforum-2002.pdf>
- Pennisi, M., Venza, M., Reale, S. & Vitale, F. (2004). Lo Giudice. S., Case Report Of Leishmaniasis In Four Cats [versão electrónica]. *Vet. Res. Commun.*, 28, 363-366. Acedido em Mai. 2, 2009, disponível em: <http://www.springerlink.com/content/x657rw200m451j04/>
- Pereira, A. (2003). III. Geografia física e ambiente: Diversidade do meio físico e recursos naturais. Tenedório, J.A. (2003). Atlas da Área Metropolitana de Lisboa, Área Metropolitana de Lisboa, 2003, ISBN: 972-98655-7-4, pp. 47-48, 56-57, 60-62, 77
- Pereira, M. A. (2008). Capítulo III: Epidemiologia da leishmaniose canina. In Santos-Gomes, G., Pereira da Fonseca, I. (Eds). *Leishmaniose Canina*. Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A., 2008, pp. 41-51
- Pereira da Fonseca, I., Madeira de Carvalho, L., Carvalho, S., & Carvalho-Varela, M. (1991). Prevalência da dirofilariose na população canina portuguesa. I. Detecção de microfilárias sanguíneas. *Vet. Técnica Set/Out* 1991. pp. 36–38.
- Pereira da Fonseca, I., Cortes, S., Magalhães, A., Madeira de Carvalho, L., Meireles, J., Santos Gomes, G., Campino, L. & Fazendeiro, M. (2002). Prevalência de *Leishmania* spp. em raposas vermelhas (*Vulpes Vulpes silacea*, Miller, 1907) em Portugal. *Res. 2º Encontro da Sociedade Portuguesa de Epidemiologia e Medicina Veterinária Preventiva*, Montemor-o-Novo, 9-10 de Novembro de 2002, pp. s/n.

- Pereira da Fonseca, I., Santos, C., Diaz, S. & Oliveira, A. (2008). "Resultado de um inquérito sobre leishmaniose canina efectuado a Médicos Veterinários em Portugal em 2007: I. Dados epidemiológicos". Res. 17º Congresso Nacional da APMVEAC, Centro de Congressos do Estoril, 6-8 Junho de 2008, pp. 135.
- Peribáñez, M., Lucientes, J., Arce, S., Morales, M., Castillo, J. & Gracia, M. (2001). Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Acanthocheilonema dracunculoides* microfilariae by staining with a commercial kit, Leucognost-SP® [versão electrónica]. Veterinary Parasitology, Volume 102, Issues 1-2, 3 December 2001, pp. 173-175. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00516-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00516-7)
- Pires, C.A. (2000). Os flebótomos (*Diptera*, *Psychodidae*) dos focos zoonóticos de leishmanioses em Portugal. Tese de doutoramento. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Edição do Autor, 228 pp.
- Poli, A., Abramo, F., Barsotti, P., Leva, S., Gramiccia, M., Ludovisi, A. & Mancianti, F. (2002). Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy, Veterinary Parasitology, Volume 106, Issue 3, 26 June 2002, pp. 181-191
- Pratlong, F., Rioux, J., Marty, P., Faraut-Gambarelli, F., Dereure, J., Lanotte G., & Dedet, J. (2004). Isoenzymatic Analysis of 712 Strains of *Leishmania infantum* in the South of France and Relationship of Enzymatic Polymorphism to Clinical and Epidemiological Features [versão electrónica]. Journal of Clinical Microbiology, Sept. 2004, Vol. 42, No. 9. p. 4077–4082. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.9.4077-4082.2004>
- Prieto, C., Venco, L., Simón, F. & Genchi, C. (1997). Feline heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection: detection of specific IgG for the diagnosis of occult infections [versão electrónica]. Veterinary Parasitology, Volume 70, Issue 4, 1 July 1997, pp. 209-217. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00008-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00008-3)
- Prieto, G., Simón, F., Genchi, C., McCall, J. & Venco, L. (1999). Utility of adult antigens of *Dirofilaria immitis* for the early detection of dirofilariosis and for the evaluation of chemoprophylactic treatment in experimentally infected cats [versão electrónica]. Veterinary Parasitology, Volume 86, Issue 1, 15 September 1999, pp. 5-13. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00116-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00116-8)
- Quaresma, P., Murta, S., Ferreira, E., Rocha-Lima, A., Xavier, A. & Gontijo, C. (2009). Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR [versão electrónica]. Acta Tropica 111 (2009) pp. 289-294. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.05.008>
- Quinnell, R., Courtenay, O., Garcez, L., Kaye, P., Shaw, M., Dye, C. & Day, M. (2003). IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis [versão electrónica]. Veterinary Immunology and Immunopathology. Volume 91, Issues 3-4, 10 February 2003, Pages 161-168. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00311-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00311-2)

- Rafikov, M., Bevilacqua, L. & Wyse, A. (2009). Optimal control strategy of malaria vector using genetically modified mosquitoes [versão electrónica]. *Journal of Theoretical Biology*, Volume 258, Issue 3, 7 June 2009, pp. 418-425. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2008.08.006>
- Ramos, J., Sarasa, I., Ochoa, P., Hernández, J., Salinas, M. & Amella, M. (2002). Serological Evidence of Leishmaniasis in Cats in Aragon, Spain [versão electrónica]. In *Proceedings of the 27 WSAVA Congress: Poster Communications – Infectious diseases*, 3 a 6 October 2002, Granada, Espanha. Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=2860>
- Rawlings, C., Farrel, R., & Mahood, R. (1990). Morphologic changes in the lungs of cats experimentally infected with *Dirofilaria immitis* [resumo][versão online]. *J. Vet. Intern. Med.* 4 (1990), pp. 292–303. Acedido em Mai. 29, 2009, disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/120714843/abstract>
- Rishniw, M., Barr, S., Simpson, K., Frongillo, M., Franz, M. & Alpizar, J. (2006). Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology* 135 (2006) 303–314. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.10.013>
- Rogers, M., Chance, M. & Bates P. (2002). The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis* [versão electrónica]. *Volume 124, Issue 5*, 2002, pp. 495-507. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182002001439>
- Roncalli, R.A., Yamane, Y. & Nagata, T. (1998). Prevalence of *Dirofilaria immitis* in cats in Japan [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 75, Issue 1, 15 February 1998, pp. 81-89. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00194-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00194-5)
- Rosypal, A. & Lindsay, D. (2005a). Non-Sand Fly Transmission Of A North American Isolate Of *Leishmania Infantum* In Experimentally Infected Balb/c Mice [resumo] [versão electrónica]. *Journal of Parasitology* 91(5):1113-1115. 2005. Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1645/GE-586R.1>
- Rosypal, A., Troy, G., Zajac, A., Frank, G., & Lindsay, D. (2005b). Transplacental Transmission of a North American Isolate of *Leishmania infantum* in an Experimentally Infected Beagle [resumo] [versão electrónica]. *Journal of Parasitology* 91(4):970-972. 2005. Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1645/GE-483R.1>
- Rüfenacht, S., H. Sager, N. Muller, V. Schaerer, A. Heier, M.M. Welle & P.J. Roosie, (2005). Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland, *Vet. Rec.* 156 (2005), pp. 542–545.
- Sanches, A., Cardoso, C., Pereira, A. & Carvalho, J. (2009). Um caso de leishmaniose felina In *Proceedings of 18º Congresso Nacional da Associação Portuguesa de Médicos Veterinários Especialistas em Animais de Companhia (APMVEAC) – Livro de Resumos: comunicações livres: painel (CD)*, Lisboa, 29-31 Maio 2009

- Santa-Ana, M., Khadem, M. & Capela, R. (2006). Natural Infection of *Culex theileri* (Diptera: Culicidae) with *Dirofilaria immitis* (Nematoda: Filarioidea) on Madeira Island, Portugal [resumo] [versão electrónica]. *Journal of Medical Entomology* 43(1):104-106. Acedido em Abr. 28, 2009, disponível em: [http://www.bioone.org/doi/abs/10.1603/0022-2585\(2006\)043%5B0104%3ANIOCTD%5D2.0.CO%3B2?prevSearch=\[fulltext%3A+madeira+immitis\]+AND+\[publisher%3A+bioone\]&searchHistoryKey](http://www.bioone.org/doi/abs/10.1603/0022-2585(2006)043%5B0104%3ANIOCTD%5D2.0.CO%3B2?prevSearch=[fulltext%3A+madeira+immitis]+AND+[publisher%3A+bioone]&searchHistoryKey)
- Savani, E., Camargo, M., Carvalho, M., Zampieri, R., Santos, M., D'Áuria, S., Shaw, J. & Floeter-Winter, L. (2004). The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 120, Issue 3, 25 March 2004, pp. 229-233. Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.01.008>
- Sawaf, B., Mansour, N., El Said, S., Daba, S., Youssef, F., Kenawy, M. & Beier, J. (1989). Feeding patterns of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodiade) in El Agamy [resumo] [versão electrónica]. *Egyptian Journal of Medical Entomology*, 6, 497-498. Acedido em Jul. 10, 2009, disponível em: <http://www.ingentaconnect.com/content/esa/jme/1989/00000026/00000005/art00023>
- Schenker R., D. Bowman, C. Epe, R. Cody, W. Seewald, G. Strehlau, P. Junquera (2007). Efficacy of a milbemycin oxime–praziquantel combination product against adult and immature stages of *Toxocara cati* in cats and kittens after induced infection [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 145, Issues 1-2, 10 April 2007, pp. 90-93. Acedido em Jul. 10, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.11.003>
- Schonemeyer, R. Lucius, B. Sonnenburg, N. Brattig, R. Sabat, K. Schilling, J. Bradley and S. Hartmann (2001) Modulation of human T cell responses and macrophage functions by onchocystatin, a secreted protein of the filarial nematode *Onchocerca volvulus* [resumo] [versão electrónica] *J. Immunol.* 167 (2001), pp. 3207–3215. Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: http://www.scopus.com/record/display.url?eid=2-s2.0-0035884985&view=basic&origin=inward&txGid=ruToYR0ww_2ufRRcCuP60eg%3a3
- Schubach, T., Figueiredo, F., Pereira, S., Madeira, M., Santos, I., Andrade, V., Cuzzi, T. Marzochi, M. & Schubach, A. (2004) American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* [versão electrónica]. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Volume 98, Issue 3, March 2004, pp. 165-167. Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B75GP-4BDC8JW-4&_user=2459750&_coverDate=03%2F31%2F2004&_alid=944237745&_rdoc=3&_fmt=high&_orig=search&_cdi=13100&_sort=r&_docanchor=&view=c&_ct=235&_acct=C000057394&_version=1&_urlVersion=0&_userid=2459750&md5=a169cd41b3865f5267275ac9f79111b5
- Selcer, B., Newell, S., Mansour, A. & McCall, J. (1996). Radiographic and 2-D echocardiographic findings in eighteen cats experimentally exposed to *D. immitis* via mosquito bites [resumo] [versão electrónica]. *Veterinary Radiology & Ultrasound*. Volume 37 Issue 1, pp. 37-44. Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/119223811/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>

- Serrano A., Nunes C, Savani, E., D'Auria S., Bonello F., Vasconcelos R., Lima V., Bresciani, K. (2008). Feline leishmaniosis within the urban zone of Araçatuba, SP, Brazil - case report. *Clínica Veterinária*, n. 76, p. 36-40, 2008. Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: <http://www.editoraguara.com.br/cv/ano13/cv76/cv76.htm>
- Sharma, S., Tyagi, P., Upadhyay, A., Haque, M., Mohanty, S., Raghavendra, K. & Dash A. (2009). Efficacy of permethrin treated long-lasting insecticidal nets on malaria transmission and observations on the perceived side effects, collateral benefits and human safety in a hyperendemic tribal area of Orissa, India [versão electrónica]. *Acta Tropica*, In Press, Corrected Proof, Available online 6 August 2009. Acedido em Ago. 22, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.07.022>
- Simões-Matos, L., Bevilaqua, C., Mattos, M. & Pompeu, M. (2004). Feline Leishmaniasis: Uncommon or Unknown? [versão electrónica]. *Rev. Port. Ciênc. Vet.*, 99 (550): 79-87. Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: http://www.fmv.utl.pt/spcv/edicao/6_2004/550_79_87.htm
- Simões-Mattos, L., Mattos, M., Teixeira, M., Oliveira-Lima, J., Bevilaqua, C., Prata-Júnior, R., Holanda, C., Rondon, F., Bastos, K., Coêlho, Z., Coêlho, I., Barral, A. & Pompeu, M. (2005). The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis* [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 127, Issues 3-4, 28 February 2005, pp. 199-208 Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.10.008>
- Simón, F., López-Belmonte, J., Marcos-Atxutegi, C., Morchón, R. & Martín-Pacho, J. (2005). What is happening outside North America regarding human dirofilariasis? State of the Heartworm (AHS Symposium 2004) - Proceedings of the 11th Triennial Symposium of the American Heartworm Society 2004. *Veterinary Parasitology*. Volume 133, Issues 2-3, 24 October 2005, pp. 181-189. Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.03.033>
- Simón, F., Kramer, L., Morchón, R. & Genchi, C. (2007). Chapter 6: A possible role for *Wolbachia* in the diagnosis of *Dirofilaria* infections [versão electrónica]. In C. Genchi, L. Rinaldi & G. Cringoli (Eds.), *Proceedings of the First European Dirofilaria Days: Dirofilaria immitis and D. repens in dog and cat and human infections*, Zagreb, Croatia, 22-25 February 2007, pp. 75-80. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: www.ivis.org/proceedings/dirofilaria/2007/simon1.pdf
- Simón, F., Morchón, R., Rodríguez-Barbero, A., López-Belmonte, J., Grandi & G., Genchi, C. (2008). *Dirofilaria immitis* and *Wolbachia*-derived antigens: Its effect on endothelial mammal cells [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 158, Issue 3, 10 December 2008, pp. 223-231. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.09.010>
- Six, R., Sture, G., Thomas, C., Clemence, R., Benchaoui, H., Boy, M., Watson, P., Smith, D., Jernigan, A. & Rowan, T. (2000). Efficacy and safety of selamectin against gastrointestinal nematodes in cats presented as veterinary patients [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 91, Issues 3-4, 23 July 2000, pp. 321-331. Acedido em Jul. 10, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00302-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00302-2)

- Small, M., Atkins, C., Gordon S., Birkenheuer, A., Booth-Sayer, M., Keene, B., Fujii, Y. & Miller, M. (2008). Use of a nitinol gooseneck snare catheter for removal of adult *Dirofilaria immitis* in two cats [resumo] [versão electrónica]. Journal of the American Veterinary Medical Association November 1, 2008, Vol. 233, No. 9, pp. 1441-1445. Acedido em Jul. 10, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.2460/javma.233.9.1441>
- Smith, J., Scott-Moncrieff, J. & Rivers, B. (1998). Pneumothorax secondary to *Dirofilaria immitis* infection in two cats [resumo] [versão electrónica]. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 197 (1998), pp. 91-93. Acedido em Jul. 10, 2009, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9656031>
- Snyder, P., Levy, J., Salute, M., Gorman, S., Kubilis, P., Smail, P. & George, L. (2000). Performance of serologic tests used to detect heartworm infection in cats [resumo] [versão electrónica]. Journal of the American Veterinary Medical Association. March 1, 2000, Vol. 216, No. 5, pp. 693-700. Acedido em Jul. 10, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.2460/javma.2000.216.693>
- Soares, N. & Domingues, A. (2003) VI População – Consolidação e Maturidade demográfica de uma área metropolitana. Tenedório, J.A. (2003). Atlas da Área Metropolitana de Lisboa, Área Metropolitana de Lisboa, 2003, ISBN: 972-98655-7-4 pp.121-123
- Sobrinho, R., Ferroglio, E., Oleaga, A., Romano, A., Millan, J., Revilla, M., Arnal, M., Trisciuglio, A. & Gortázar, C. (2008). Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Veterinary Parasitology* 155 (2008) 198-203. Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.05.003>
- Solano-Gallego, L., Rodríguez-Cortés, A., Iniesta, L., Quintana, J., Pastor, J., Espada, Y., Portús, M. & Alberola, J. (2007). Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the northwestern Mediterranean [versão electrónica]. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 76:676–680. Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: <http://www.ajtmh.org/cgi/reprint/76/4/676.pdf>
- Solano-Gallego, L., Koutinas A., Miró, G., Cardoso L., Pennisi M., Ferrer L., Bourdeau P. Oliva G. & Baneth G. (2009 in press). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis [versão electrónica]. Review. *Veterinary Parasitology* xxx (2009) xxx–xxx. Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.022>
- Souza, A., Barros, E., Ishikawa, E., Ilha, I., Marin, G. & Nunes, V. (2005). Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 128, Issues 1-2, 10 March 2005, pp. 41-45. Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.11.020>
- Souza, A., Nunes, V., Borralho, V. & Ishikawa, E. (2009). Domestic feline cutaneous leishmaniasis in the municipality of Ribas do Rio Pardo, Mato Grosso do Sul state, Brazil: a case report [versão electrónica]. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 2009, vol.15, n.2, pp. 359-365. ISSN 1678-9199. Acedido em Jul. 22, 2009, disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jvatitd/v15n2/a17v15n2.pdf>

- Strickland, K. (1998). Canine and Feline Caval Syndrome [versão electrónica]. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, Volume 13, N.º 2, May 1998: pp. 88-95. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1096-2867\(98\)80012-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1096-2867(98)80012-1)
- Sutton, N., Battes, N. & Campbell, A. (2007). Clinical effects and outcome of feline permethrin spot-on poisonings reported to the Veterinary Poisons Information Service (VPIS), London [versão electrónica]. *Journal of Feline Medicine and Surgery* (2007) 9, 335e339. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfms.2007.05.003>
- Su, X., Zou, F., Guo, Q., Huang, J. & Chen, T. (2001). A report on a mosquito-killing fungus, *Pythium carolinianum* [resumo] [versão electrónica]. *Fungal Diversity* 7 (2001), pp. 129–133. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: http://www.scopus.com/record/display.url?eid=2-s2.0-5844372164&view=basic&origin=inward&txGid=CSp4fcTni3_8Ri7bg0PQ_ZI%3a2
- Synbiotics (2009a). DiroCHEK® Lab Pack. SYNBIOTICS CORPORATION. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://www.synbiotics.com/cgi-bin/Products.pl?cgifunction=Search&Product%20Code=96-0230>
- Synbiotics (2009b). Witness® HW. SYNBIOTICS CORPORATION. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://www.synbiotics.com/cgi-bin/Products.pl?cgifunction=Search&Product%20Code=96-0263>
- Synbiotics (2009c). Synbiotics Corp: Witness® HW – Canine Heartworm Antigen Test. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: http://www.westernmedicalsupply.com/dio_prod_smani/wm_dio_prod_smani_syn_hw.html
- Taylor, M., Bandi, C., Hoerauf, A. & Lazdins, J. (2000). *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes: a target for control? [versão electrónica]. *Parasitology Today*. Volume 16, Issue 5, 1 May 2000, pp. 179-180. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01661-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01661-6)
- Taylor, M., Makunde, W., McGarry, H., Turner, J., Mand, S. & Hoerauf, A. (2005). Macrofilaricidal activity after doxycycline treatment of *Wuchereria bancrofti*: a double-blind, randomised placebo-controlled trial [versão electrónica]. *The Lancet*, Volume 365, Issue 9477, pp. 2116 - 2121, 18 June 2005. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66591-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66591-9)
- Terenius, O., Marinotti, O., Sieglaff, D. & James, A. (2008). Molecular genetic manipulation of vector mosquitoes [versão electrónica]. *Cell Host & Microbe*, Volume 4, Issue 5, 13 November 2008, pp. 417-423. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2008.09.002>
- Theis, J. (2005). Public health aspects of dirofilariasis in the United States [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 133, 2005, pp. 157-180. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.04.007>
- Tomás, A. & Freitas Romão, S. (2008). Capítulo I: Biologia do parasita. In Santos-Gomes, G. M., Pereira da Fonseca, I. M. (Eds.) *Leishmaniose Canina*. Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A., pp.7-26

- Tuzio, H., Edwards, D., Elston, T., Jarboe, L., Kudrak, S., Richards, J. & Rodan, I. (2005). Feline zoonoses guidelines from the American Association of Feline Practitioners [versão electrónica]. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, Volume 7, Issue 4, August 2005, pp. 243-274. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfms.2004.11.001>
- Uchôa, C., Serra, C., Duarte, R., Magalhães, C., Macedo da Silva, R., Theophilo, F., Figliuolo, L., Horta, F. & Madeira, M. (2001). Aspectos sorológicos e epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana canina em Maricá, Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* [versão electrónica]. 2001, vol.34, n.6, pp. 563-568. ISSN 0037-8682. Acedido em Jul. 10, 2009, disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v34n6/7445.pdf>
- UniProt (2009). UniProt Consortium – Taxonomy: *Dirofilaria immitis* [versão electrónica]. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://www.uniprot.org/taxonomy/6287>
- Urquhart, G., Armour, J., Duncan, J., Dunn, A. & Jennings, F. (1996). Family *Culicidae*, Suborder *Nematocera*, Order *Diptera*, Class *Insecta*, Phylum *Arthropoda*, Veterinary Entomology. *Veterinary Parasitology*. (2nd ed.). Oxford: Blackwell Science Ltd, pp. 148-149
- USEPA (2009). Methods of Mosquito Control [versão electrónica] U.S. Environmental Protection Agency. Last updated on Tuesday, May 26th, 2009. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://www.epa.gov/opp00001/health/mosquitoes/mosquito.htm>
- Vaz, Y., Almeida, V., Pereira da Fonseca, I., Duarte, A., Madeira de Carvalho, L., Meireles, J., Fazendeiro, M. (2005). Estudo de doenças transmissíveis em populações de gatos errantes. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. Ano 33º. SUPL. 129-130, Jan-Jun. 2005: pp. 9-10
- Venco, L. (2007). Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in cats [versão electrónica]. In C. Genchi, L. Rinaldi & G. Cringoli (Eds.), *Proceedings of the First European Dirofilaria Days: Dirofilaria immitis and D. repens in dog and cat and human infections*, Zagreb, Croatia, 22-25 February 2007, pp. 129-132. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: www.ivis.org/proceedings/dirofilaria/2007/venco2.pdf
- Venco, L., Genchi C., Genchi M., Grandi G. & Kramer, L. (2008a). Clinical evolution and radiographic findings of feline heartworm infection in asymptomatic cats [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 158, Issue 3, 10 December 2008, pp. 232-237. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.09.011>
- Venco, L., Mortarino, M., Carro, C., Genchi, M., Pampurini, F. & Genchi, C. (2008b). Field efficacy and safety of a combination of moxidectin and imidacloprid for the prevention of feline heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection [versão electrónica]. *Veterinary Parasitology*, Volume 154, Issues 1-2, 14 June 2008, pp. 67-70. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.02.020>
- Venet, B. (2007). La leishmaniose feline: depistage en region Toulonnaise [versão electrónica]. *Ecole Nationale Veterinaire de Lyon*. Thèse n.º 99. Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: http://www2.vet-lyon.fr/bib/fondoc/th_sout/dl.php?file=2007_lyon099.pdf

- Verneuil, M. (2006). Feline ocular Leishmaniasis: an underdiagnosed disease? [versão electrónica]. In Proceedings of the European College of Veterinary Ophthalmologists and of the European Society of Veterinary Ophthalmology, May 10-14, 2006 - Brugge Belgium. Reprinted in the IVIS website with the permission of the ESVO-ECVO. Acedido em Mai. 27, 2009, disponível em: www.ivis.org/proceedings/esvo/2006/verneuil.pdf
- Vezzani, D., Fontanarrosa, M. & Eiras, D. (2008). Are antigen test kits efficient for detecting heartworm-infected dogs at the southern distribution limit of the parasite in South America? Preliminary results. *Research in Veterinary Science* 85 (2008) 113-115. Acedido em Mai. 27, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.08.001>
- Vita, S., Santori, D., Aguzzi, I., Petrotta, E. & Luciani, A., (2005). Feline leishmaniasis and ehrlichiosis: serological investigation in Abruzzo region [versão electrónica]. *Vet. Res. Commun.* 29 (2005), pp. 319–321. Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: <http://www.springerlink.com/content/u23053351663h755/>
- Volf, P., Hajmova, M., Sadlova, J. & Votypka, J. (2004) Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models [versão electrónica]. *International Journal for Parasitology*, Volume 34, Issue 11, October 2004, pp. 1221-1227. Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.07.010>
- Weil, G. (1987). *Dirofilaria immitis*: Identification and partial characterization of parasite antigens in the serum of infected dogs [resumo][versão electrónica]. *Exp Parasitol* 64:244-251, 1987. Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4894\(87\)90149-4](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4894(87)90149-4)
- Yao, C., Donelson, J. & Wilson, M. (2003). The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. biosynthesis, regulation of expression, and function [versão electrónica]. *Review. Molecular & Biochemical Parasitology* 132 (2003) 1-16. Acedido em Jun. 2, 2009, disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00211-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00211-1)
- Yin, Y., Martin, J., McCarter, J., Clifton, S., Wilson, R. & Mitreva, M. (2006). Identification and analysis of genes expressed in the adult filarial parasitic nematode *Dirofilaria immitis* [versão electrónica]. *International Journal for Parasitology*, Volume 36, Issue 7, June 2006, pp. 829-839. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.03.002>
- Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W. & Laskay, T. (2004). Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages [resumo] [versão electrónica]. *The Journal of Immunology*, 2004, 173: 6521-6525. Acedido em Abr. 2, 2009, disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/173/11/6521>

Anexos

Anexo 1 – Estudos epidemiológicos sobre dirofilariose felina (*D. immitis*)

Autores (Ano)	Método	Local	N.º de <i>D. immitis</i>/gato	N.º de gatos com resultados positivos/ testados	%
Okabe & Oba (1959) ^{*1}	Necrópsia	Japão (Fukuoka, Kumamoto)	-	3/52	5,77%
Ikuyama (1960) ^{*1}	Necrópsia	Japão (Fukuoka)	2	1/15	6,67%
Takayama <i>et al.</i> (1965) ^{*1}	Necrópsia	Japão (Kyoto)	-	2/307	0,65%
Kondo <i>et al.</i> (1969) ^{*1}	Necrópsia	Japão (Shiga)	1	1/83	1,20%
Tanaka <i>et al.</i> (1971) ^{*1}	Necrópsia	Japão (Tokyo)	1	3/121	2,48%
Oishi <i>et al.</i> , (1973) ^{*1}	Necrópsia	Japão (Tokyo)	1-2	4/62	6,45%
Iseki <i>et al.</i> (1974) ^{*1}	Necrópsia	Japão (Osaka)	1	7/100	7,00%
Takada <i>et al.</i> (1976) ^{*1}	Necrópsia	Japão (Osaka)	-	5/198	2,53%
Mutoh <i>et al.</i> (1976) ^{*1}	Necrópsia	Japão (Tokyo)	1-5	29/305	9,51%
Fujinami <i>et al.</i> (1983) ^{*1}	Necrópsia	Japão (Kanto)	3-4	3/91	3,30%
Fujinami <i>et al.</i> (1983) ^{*1}	Necrópsia	Japão (Kanto)	0	0/80	0,00%
Saito <i>et al.</i> (1983) ^{*1}	Necrópsia	Japão (Saitama)	-	2/106	1,89%
Gotoh <i>et al.</i> (1984) ^{*1}	Necrópsia	Japão (Hyogo)	1-3	24/1024	2,34%
Fukase <i>et al.</i> (1984) ^{*1}	Necrópsia	Japão (Kanagawa)	-	1/53	1,89%
Tanaka <i>et al.</i> (1985) ^{*1}	Necrópsia	Japão (Kanto)	-	3/151	1,99%
Yamane <i>et al.</i> (1986) ^{*1}	Necrópsia	Japão (Tettori)	1-2	3/100	3,00%
Willard <i>et al.</i> , 1988 ^{*2}	Necrópsia	EUA (Alabama)	-	3/200	2,80%
Levy (2007)	Necrópsia	EUA (Kentucky)	-	14/100	14,00%
Courtney and Qi-Yun, 1989 ^{*2}	Necrópsia	EUA (Nordeste e Centro da Flórida)	-	22/712	3,10%
Patton and McCracken, 1991 ^{*2}	Necrópsia	EUA (Este do Tennessee)	-	3/122	2,50%
Guerrero <i>et al.</i> , 1992 ^{*2}	(sem dados)	EUA (Carolina do Sul)	-	-	4,3%
Guerrero <i>et al.</i> , 1992 ^{*2}	Necrópsia	EUA (Louisiana)	-	8/50	10,00%
Genchi <i>et al.</i> , 1992 ^{*2}	(sem dados)	Itália	-	-	23%
Guerrero <i>et al.</i> , 1992 ^{*2}	Necrópsia	EUA (Sudeste da Georgia: Savannah)	-	-	6,9%
Levy (2007)	Necrópsia	EUA (Georgia)	-	5/164	3,00%
Levy (2007)	Necrópsia	EUA (Carolina do Sul)	-	3/51	5,90%
Levy (2007)	Necrópsia	EUA (Texas)	-	14/155	9,00%
Levy (2007)	Necrópsia	Austrália	-	1/100	1,00%
Shimomura <i>et al.</i> (1990) ^{*1}	Necrópsia	Japão (Aomori)	8	1/200	0,50%

Legenda: ^{*1} citado por Roncalli, Yamane, e Nagata (1998); ^{*2} citado por Carleton e Tolbert (2004); - sem dados;

Anexo 1 (continuação) – Estudos epidemiológicos sobre dirofilariose felina (*D. immitis*)

Autores (Ano)	Método	Local	N.º de <i>D. immitis</i>/gato	N.º de gatos com resultados positivos/ testados	%
Levy (2007)	Necrópsia	Japão	-	5/200	2,50%
Kendall, Collins & Pope (1991)	Necrópsia	Austrália	-	2/200	1,00%
Kunimune <i>et al.</i> (1993) ^{*1}	Necrópsia	Japão (Nara)	-	2/100	2,00%
Fukase <i>et al.</i> (1994) ^{*1}	Necrópsia	Japão (Kanto)	-	5/206	2,40%
Nishida & Awazu (1994) ^{*1}	Necrópsia	Japão (Osaka)	1-3	3/58	5,20%
Kurata <i>et al.</i> (1995) ^{*1}	Necrópsia	Japão	-	15/363	4,10%
Labarthe <i>et al.</i> (1997)	Necrópsia	Brasil	-	1/125	0,80%
Levy (2007)	Necrópsia	Japão	-	15/1840	0,80%
Miller <i>et al.</i> (1998b)	Pesquisa de anticorpos	EUA (21 estados)	-	240/2000	12%
Miller <i>et al.</i> (1998b)	Pesquisa de anticorpos	EUA (Califórnia)	-	-	35%
Hermesmeyer <i>et al.</i> (2000)	Necrópsia	EUA (Michigan)	-	6/239	2,50%
Kramer & Genchi (2002)	Pesquisa de anticorpos	Itália (25 províncias do Norte de Itália)	-	157/980	16%
Levy <i>et al.</i> (2003)	Necrópsia	EUA (Norte da Flórida)	-	31/630	4,90%
Levy <i>et al.</i> , (2003)	Pesquisa de anticorpos	EUA (Norte da Flórida)	-	107/630	17%
Carleton & Tolbert (2004)	Necrópsia	EUA (Noroeste da Geórgia)	-	4/184	2,10%
Luria <i>et al.</i> (2004)	Pesquisa de antígenos (ELISA)	EUA (Norte da Flórida)	-	64/553	11,6%
Luria <i>et al.</i> (2004)	Pesquisa de antígenos (ELISA)	EUA (Norte da Flórida)	-	7/553	1,3%
Liu <i>et al.</i> (2005)	Pesquisa de antígenos	República da Coreia do Sul	-	4/155	2,6%
Nuchprayoon <i>et al.</i> (2006)	PCR	Tailândia	-	1/52	1,9%
Levy <i>et al.</i> (2007)	Pesquisa de antígenos	EUA (Louisiana, Mississippi e Texas)	-	7/176	4,0%
Lorentzen & Caola (2008)	Pesquisa de antígenos	EUA	-	-	0,9%

Legenda: ^{*1} citado por Roncalli, Yamane, e Nagata (1998); - sem dados;

Anexo 2 – Estudos epidemiológicos sobre leishmaniose felina utilizando métodos parasitológicos e moleculares

Autor; Ano	Local	Técnica	Fonte	Espécie identificada	N.º animais	N.º gatos positivos/ examinados (%)
Giordano (1933) ^{*1,*3}	Itália ^{*3}	Citologia e histologia ^{*3}	Medula óssea, Baço, Fígado ^{*3}	-	120 ^{*3}	0/120 (0,00%) ^{*3}
Ondovilla (1933) ^{*1,*3}	Espanha ^{*3}	Citologia	-	-	495 ^{*3}	1/495 (0,20%) ^{*3}
Chagas <i>et al.</i> (1938) ^{*1,*3}	Brasil ^{*3}	Citologia ^{*3}	Fígado ^{*3}	-	202 ^{*3}	1/202 (0,50%) ^{*3}
Alencar <i>et al.</i> (1955) ^{*1,*3}	Brasil ^{*3}	Citologia ^{*3}	Fígado ^{*3}	-	214 ^{*3}	0/214 (0,00%) ^{*3}
Deane <i>et al.</i> (1956) ^{*1,*3}	Brasil ^{*3}	Citologia ^{*3}	Fígado ^{*3}	-	142 ^{*3}	0/142 (0,00%) ^{*3}
Morsy <i>et al.</i> (1980)	Amman, Jordânia	Citologia	Fígado, Baço	-	78	16/78 (20,50%)
Sherlock <i>et al.</i> (1996) ^{*1,*3}	Brasil ^{*3}	Citologia ^{*3}	Orelha ^{*3}	-	53	1/53 (1,90%) ^{*3}
Pennisi <i>et al.</i> (2000) ^{*1,*2}	Este da Sicília, Itália	PCR	Sangue	-	89	54/89 (61,00%)
Martín-Sánchez <i>et al.</i> (2007)	Sul de Espanha	PCR	Sangue	<i>L. infantum</i>	183	47/183 (25,70%)
Venet (2007)	Aubagne, La Seine Sur Mer, França	PCR	Sangue, Pele	-	26	0/26 (0,00%)
Maia <i>et al.</i> (2008)	Lisboa, Portugal	PCR	-	<i>L. infantum</i>	23	7/23 (30,40%)
Hatam <i>et al.</i> (2009)	Fars e East Azerbaijan, Irão	Citologia e histologia	Fígado e Baço	<i>L. infantum</i>	40	4/40 (10,00%)

^{*1} Citado por Venet (2007); ^{*2} citado por Pennisi (2002); ^{*3} citado por Simões-Mattos (2004); - sem dados

Anexo 3 – Estudos epidemiológicos sobre leishmaniose felina utilizando métodos serológicos

Autor	Local	Técnica	N.º gatos positivos/ n.º gatos testados (%)
Michael <i>et al.</i> (1982) ^{*2, *3}	Al Ismailiyah, Egipto ^{*3}	IHA ^{*3}	3/80 (3,75%) ^{*3}
MacVean (citado por Kirkpatrick <i>et al.</i> , 1984) ^{*3}	EUA ^{*3}	DAT ^{*3}	1/10 (10%)
Morsy <i>et al.</i> (1988) ^{*1, *2}	Suez, Egipto	IHA	1/28 (3,60%)
Bez (1992) ^{*1, *2}	Alpes-maritimes, França	IFI	1/174 (0,60%)
Marechal (1993) ^{*1}	Région marseillaise, França	WB; ELISA	3/110 (2,7%)
Morsy & El Seoud (1994) ^{*1}	Imbaba, Giza, Egipto	IHA	2/60 (3,30%)
Sherlock <i>et al.</i> (1996) ^{*1}	Brasil	IFI	0/53 (0,00%)
Pennisi <i>et al.</i> (1998) ^{*1, *2}	Sicília, Itália	IFI	55/93 (59,10%)
Ozon <i>et al.</i> (1999) ^{*1, *2}	(Alpes-maritimes), França	Western Blot	12/97 (12,40%)
Pennisi <i>et al.</i> (2000) ^{*1, *2}	Sicília, Itália	IFI	60/89 (68,00%)
Simões-Mattos <i>et al.</i> (2001) ^{*1, *2}	Brasil	ELISA	9/84 (10,70%)
Simões-Mattos <i>et al.</i> (2002) ^{*1}	Brasil	ELISA	43/106 (40,50%)
Oliveira (2002) ^{*1}	Brasil	IFI	45/89 (50,50%)
Portus <i>et al.</i> (2002) ^{*1, *2}	Catalonia, Espanha	ELISA	2/117 (1,70%)
Ramos <i>et al.</i> (2002)	Aragon, Espanha	DAT	21/50 (42,00%)
Poli <i>et al.</i> (2002)	Imperia, Itália	IFI	1/110 (0,90%)
Vaz <i>et al.</i> (2005)	Lisboa, Portugal	IFI	1/97 (1,03%)
Vita <i>et al.</i> (2005) ^{*1}	Abruzzo, Itália	IFI	33/203 (16,30%)
Solano-Gallego <i>et al.</i> (2007) ^{*1}	Barcelona, Tarragona, Mallorca, Espanha	ELISA-IgG	23/445 (5,30%)
		ELISA-proteína A	28/445 (6,30%)
		WB	69/445 (15,50%)
Martín-Sánchez <i>et al.</i> (2007) ^{*1}	(Granada), Sul de Espanha	IFI ($\geq 1:10$; $\geq 1:160$)	108/180 (60,00%); 11/180 (6,10%)
Venet (2007)	Aubagne, La Seine sur mer, França	IFI ($\geq 1:50$)	10/26 (38,50%)
Nasereddin, Salant & Abdeen (2008)	Jerusalém, Israel	ELISA	6,70%
Coelho <i>et al.</i> (2008)	Andradina, São Paulo, Brasil	ELISA	3,90%
Tabar <i>et al.</i> (2008)	Espanha	molecular	3,00%
Maia <i>et al.</i> (2008)	Lisboa, Portugal	IFI (=1:2)	3/23 (17,40%)
		IFI (=1:16)	1/23 (4,30%)
Faria (2008)	Vila Franca de Xira, Portugal	IFI	0/75 (0,00%)
Figueiredo <i>et al.</i> (2009)	Santa Rita de Cássia, RJ, Brasil	IFI	0/43 (0,00%)
		ELISA	1/43 (2,40%)
Diakou, Papadopoulos & Lazarides (2009)	Thessaloniki, Grécia	ELISA	11/284 (3,87%)

^{*1} Citado por Venet (2007); ^{*2} citado por Pennisi (2002); ^{*3} citado por Simões-Mattos (2004)

Anexo 4 – Compilação dos 49 casos clínicos de LFel relatados na literatura científica mundial

N.º caso clínico	Autor	(Origem) País de diagnóstico	Sexo	Idade	Tamanho da pelagem	Raça	Habitat
C01	Sergeant (1912, citado por Mancianti, 2004; Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2007)	Algéria	M	4 meses	-	-	Com cão LCan e criança LVHum
C02	Bergeon (1927, citado por Mancianti, 2004; Pennisi <i>et al.</i> , 2002; Venet, 2007; Simões-Mattos <i>et al.</i> , 2004)	Vietname	F	-	-	Siamês	-
C03	Mazza (1927, citado por Simões-Mattos <i>et al.</i> , 2004; Pennisi <i>et al.</i> , 2002; Venet, 2007)	Argentina	-	-	-	-	-
C04	MacHattie <i>et al.</i> (1931, citados por Mancianti, 2004; Pennisi <i>et al.</i> , 2002; Venet, 2007; Simões-Mattos <i>et al.</i> , 2004)	Iraque	M	1 anos	-	-	-
C05	MacHattie <i>et al.</i> (1931, citados por Mancianti, 2004; Pennisi <i>et al.</i> , 2002; Venet, 2007; Simões-Mattos <i>et al.</i> , 2004)	Iraque	M	2 anos	-	-	-
C06	Ondovilla (1932, citado por Pennisi <i>et al.</i> , 2002)	Espanha	-	-	-	-	-
C07	Mello (1940)	Aurá, Belém, Brasil	M	Adulto	-	-	-
C08	Bosselut (1947, citado por Mancianti, 2004; Pennisi <i>et al.</i> , 2002; Venet, 2007; Simões-Mattos <i>et al.</i> , 2004)	Algéria	-	-	-	Siamês	-
C09	Schawalter (1977, citado por Mancianti, 2004; Pennisi <i>et al.</i> , 2002; Venet, 2007; Simões-Mattos <i>et al.</i> , 2004)	(Espanha) Suíça	-	-	-	-	-
C10	Denuzière (1976, citado por Mancianti, 2004; Pennisi <i>et al.</i> , 2002; Venet, 2007; Simões-Mattos <i>et al.</i> , 2004)	Ilha da Reunião	-	-	-	-	-
C11	Craig <i>et al.</i> (1986); Barnes <i>et al.</i> (1993)	Uvalde, Texas, EUA	M	6 anos	Longo	-	-
C12	Dunan <i>et al.</i> (1989, citado por Mancianti, 2004; Simões-Mattos <i>et al.</i> , 2004)	Marseille, França	M	7 anos	-	-	-
C13	Costa Durão (1994)	Sesimbra, Portugal	F	5 anos	-	-	-
C14	Morsy & El Seoud (1994, citados por Mancianti, 2004; Rüfenacht <i>et al.</i> , 2005)	Imbaba, Giza, Egito	-	-	-	-	-
C15	Bonfante-Garrido <i>et al.</i> (1991, citados por Bonfante-Garrido <i>et al.</i> , 1996)	Barquisimeto, Venezuela	M	-	-	-	Acesso exterior
C16	Bonfante-Garrido <i>et al.</i> (1991, citados por Bonfante-Garrido <i>et al.</i> , 1996)	Barquisimeto, Venezuela	F	-	-	-	Acesso exterior
C17	Bonfante-Garrido <i>et al.</i> (1991, citados por Bonfante-Garrido <i>et al.</i> , 1996)	Barquisimeto, Venezuela	F	-	-	-	Acesso exterior
C18	Bonfante-Garrido <i>et al.</i> (1996)	Barquisimeto, Venezuela	F	-	-	-	Acesso exterior
C19	Laruelle-Magalon & Toga (1996)	(Marseille?), França	FC	15 anos	Longo	Europeu	Acesso exterior
C20	Passos <i>et al.</i> (1996)	Belo Horizonte, Brasil	F	5 anos	-	-	-
C21	Ozon <i>et al.</i> (1998)	Biot, França	F	6 anos	-	-	Acesso exterior
C22	Hervás <i>et al.</i> (1999)	(Málaga?), Espanha	F	5 anos	Curto	-	-
C23	Hervás <i>et al.</i> (1999)	(Málaga?), Espanha	F	3 anos	Curto	-	-
C24	Pennisi <i>et al.</i> (1999, citados por Pennisi <i>et al.</i> , 2002; Pennisi, Venza, Reale & Vitale, 2004)	Messina, Itália	FC	14 anos	Curto	-	Acesso exterior
C25	Pennisi <i>et al.</i> (1999, citados por Pennisi <i>et al.</i> , 2002; Pennisi <i>et al.</i> , 2004)	Messina, Itália	M	Adulto	Longo	-	Acesso exterior

Legenda: M = macho; F = fêmea; MC = Macho castrado; FC = fêmea castrada; - = sem dados

Anexo 4 (continuação) – Compilação dos 49 casos clínicos de LFel relatados na literatura

N.º caso clínico	Autor	(Origem) País de diagnóstico	Sexo	Idade	Tamanho da pelagem	Raça	Habitat
C26	Hervás <i>et al.</i> (2001)	(Málaga?), Espanha	F	6 anos	-	Europeu	-
C27	Gramiccia <i>et al.</i> (2002, citados por Mancianti, 2004)	Itália	-	-	-	-	-
C28	Poli <i>et al.</i> (2002)	Imperia, Itália	F	6 anos	Curto	Europeu	-
C29	Leiva (2002); Leiva (2005)	(Barcelona?), Espanha	FC	8 anos	Curto	-	-
C30	Mancianti (2003, citados por Mancianti, 2004)	(Pisa?), Itália	-	-	-	-	-
C31	Savani <i>et al.</i> (2004)	Cotia, São Paulo, Brasil	M	2 anos	-	-	-
C32	Schubach <i>et al.</i> (2004)	Rio de Janeiro, Brasil	F	4 anos	-	-	-
C33	Schubach <i>et al.</i> (2004)	Rio de Janeiro, Brasil	F	5 anos	-	-	-
C34	Pennisi <i>et al.</i> (2002, citados por Pennisi <i>et al.</i> , 2002; Pennisi <i>et al.</i> , 2004)	Messina, Itália	M	6 anos	Curto	-	Acesso exterior
C35	Pennisi <i>et al.</i> (2002, citados por Pennisi <i>et al.</i> , 2002; Pennisi <i>et al.</i> , 2004)	Messina, Itália	F	10 anos	Curto	-	Acesso exterior
C36	Pratlong <i>et al.</i> (2004)	Côte d'Azur, França	-	-	-	-	-
C37	Rüfenacht <i>et al.</i> (2005)	(Mallorca, Espanha), Suíça	MC	6 anos	-	Siamês	-
C38	Rüfenacht <i>et al.</i> (2005)	(Espanha), Suíça	F	9 anos	Curto	-	-
C39	Grevot <i>et al.</i> (2005)	Alpes-maritimes, França	FC	13 anos	-	-	Com cães
C40	Souza <i>et al.</i> (2005)	Campo Grande, MS, Brasil	F	2 anos	-	-	-
C41	Verneuil (2006)	Le Muy, França	MC	6 anos	-	-	-
C42	Maroli <i>et al.</i> (2007)	Lipari, Itália	MC	13 anos	Curto	-	-
C43	Serrano <i>et al.</i> (2008)	Araçatuba, SP, Brasil	M	4 anos	Curto	Indeter.	-
C44	Coelho (comunicação pessoal, Ago 4., 2009)	Andradina, SP, Brasil	M	Adulto	-	Indeter.	-
C45	Coelho (comunicação pessoal, Ago 4., 2009)	Andradina, SP, Brasil	F	Jovem	-	Indeter.	-
C46	Figueiredo <i>et al.</i> (2008)	Mendanha, RJ, Brasil	F	3 anos	-	Indeter.	-
C47	Marcos <i>et al.</i> (2009)	Porto/Covilhã, Portugal	FC	4 anos	Curto	-	Acesso exterior
C48	Sanches <i>et al.</i> (2009)	Portimão, Portugal	MC	7 anos	-	Europeu	-
C49	Souza <i>et al.</i> (2009)	Ribas do Rio Pardo, MS, Brasil	-	Adulto	Curto	-	-

Legenda: M = macho; F = Fêmea; MC = Macho castrado; FC = Fêmea castrada; - = sem dados

Anexo 5 – Casos clínicos de LFel: doenças e infecções concomitantes

N.º caso clínico	Resultados dos testes serológicos para alguns agentes infecciosos						Outras doenças concomitantes
	FIV	FelV	PIF	Coronavirus	Toxoplasma gondii	Bartonella henselae	
C01	-	-	-	-	-	-	-
C02	-	-	-	-	-	-	Bronquite parasitária
C03	-	-	-	-	-	-	-
C04	-	-	-	-	-	-	-
C05	-	-	-	-	-	-	-
C06	-	-	-	-	-	-	-
C07	-	-	-	-	-	-	-
C08	-	-	-	-	-	-	-
C09	-	-	-	-	-	-	-
C10	-	-	-	-	-	-	-
C11	NEG	NEG	-	-	-	-	Otite externa; Síndrome urológica; Linfossarcoma linfoblástico mediastínico
C12	-	-	-	-	-	-	-
C13	-	-	-	-	-	-	-
C14	-	-	-	-	-	-	-
C15	-	-	-	-	-	-	-
C16	-	-	-	-	-	-	-
C17	-	-	-	-	-	-	-
C18	-	-	-	-	-	-	-
C19	NEG	NEG	-	-	-	-	Dermatite alérgica à picada das pulgas; angioma nasal; complexo eosinofílico granulomatoso felino na pálpebra
C20	-	-	-	-	-	-	-
C21	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
C22	-	-	-	-	-	-	-
C23	NEG	NEG	-	-	-	-	História de abortos recorrentes
C24	POS	NEG	-	NEG	POS	NEG	IRC; broncopneumonia; piotorax
C25	NEG	NEG	-	POS	POS	POS	-
C26	POS	NEG	-	-	-	-	-
C27	-	-	-	-	-	-	-
C28	POS	POS	NEG	-	-	-	-
C29	NEG	NEG	-	-	POS	-	Diabetes mellitus; estomatite linfoplasmocítica crónica
C30	-	-	-	-	-	-	-
C31	NEG	NEG	POS	-	-	-	-
C32	NEG	NEG	-	-	-	-	-
C33	NEG	NEG	-	-	-	-	-
C34	POS	NEG	-	NEG	NEG	POS	Otodectes cynotis; abscessos após mordeduras; IRC
C35	POS	NEG	-	NEG	POS	NEG	-
C36	-	-	-	-	-	-	-
C37	NEG	NEG	-	-	-	-	-
C38	NEG	NEG	-	-	-	-	Pemfigo foliáceo
C39	POS	POS	-	-	-	-	Carcinoma espinocelular
C40	-	-	-	-	-	-	-
C41	NEG	NEG	-	-	NEG	-	-
C42	NEG	NEG	-	-	-	-	-
C43	NEG	NEG	-	-	-	-	-
C44	NEG	NEG	-	-	-	-	-
C45	NEG	NEG	-	-	-	-	-
C46	NEG	NEG	-	-	-	-	-
C47	NEG	NEG	-	-	-	-	-
C48	NEG	NEG	-	-	-	-	Demodex cati
C49	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: NEG = negativo; POS = Positivo; - = sem dados.

Anexo 6 – Casos clínicos de LFel: localização e tipo das lesões cutâneas

N.º caso clínico	Lesões generalizadas	Localização das lesões cutâneas (localizadas)											Tipo de lesões cutâneas																
		Cabeça						Pescoço	Torax	Abdómen	Dorso-lombar	Cauda	Membros	Interdigital	Úlceras	Nódulos	Pápulas	Alopécias	Eritema	Pústulas	Crostras	Seborreia	Estomatite	Descamação	Prurido	Lesões difusas	Pêlo baço	Dermatite miliar	Lesão vegetativa
		Trufa	Orelhas	Olho - canto medial	Pálpebras	Boca e lábios	Outras regiões da cabeça																						
C01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C02	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C03	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C04	-	X	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C05	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C07	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C08	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C09	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	X	X	-	-
C10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C11	-	X	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C12	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X	-	-	X	-	-	-	-
C13	-	-	-	-	X	-	X	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C15	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C16	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C17	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C19	-	X	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	X	-	-	X	X	-	-	X	-
C20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X
C21	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	X	-	-	X	X	-	-	X	-	-	-	-
C22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C23	-	-	X	-	-	-	-	-	-	X	-	-	X	-	X	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-
C24	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C25	X	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	X	-	-	X	-	-	-	-	-	X	-	X	-	-	-
C26	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-
C27	X	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-
C28	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-
C29	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	X	-	-	-
C30	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
C31	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C32	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
C33	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X
C34	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
C35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C38	-	X	X	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X	-	-	-	-	X	-	-	-
C39	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C40	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C42	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-
C43	-	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-
C44	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	X	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-
C45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C46	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C48	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X	-	-	-
C49	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda:

X = existência da lesão / tipo de lesão no animal do caso clínico;

- = lesão / tipo de lesão não referidos

Anexo 7 – Casos clínicos de LFel: sinais oculares e sinais gerais

	Sinais oculares							Sinais gerais													
N.º caso clínico	Uveíte	Conjuntivite	Queratite	Coriorretinite	Edema corneano	Úlcera corneana	Protusão do globo ocular	Bom estado / nada a assinalar	Mau estado geral / emagrecimento / caquexia	Depressão/Apatia	Desidratação	Anorexia	Adenomegália generalizada	Adenomegália localizada	Dispneia	Esplenomegália	Hepatomegália	Febre / hipertermia	Vómito	Diarreia	Icterícia
C01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C02	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-
C03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C04	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C05	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C08	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-
C09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-
C11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	X	-	-	-	-	-	-	X	-	-
C13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C21	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	X	-	X
C23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-
C24	X	-	-	-	-	-	-	-	X	-	X	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-
C25	X	-	X	-	-	-	-	-	X	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	X	-
C26	X	-	-	-	X	-	X	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-
C27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C28	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	X	X	-	-	X	-	-	-	-	-
C29	X	-	X	-	X	X	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-
C30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C31	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-
C32	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C33	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C34	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-
C35	X	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	X	X	-	-	-	X	-	-	-	-
C36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-
C41	X	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-
C43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-
C44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-
C45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C46	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-
C47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-	-
C48	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: X = existência da lesão / tipo de lesão no animal do caso clínico; - = lesão / tipo de lesão não referidos

Anexo 8 – Casos clínicos de LFeI: alterações hematológicas e bioquímicas

N.º caso clínico de LFeI	Sem alterações hematológicas	Anemia	Leucocitose	Neutrofilia	Eosinofilia	Linfócitos	Monócitos	Trombócitos	Albumina	Proteínas Totais	Globulinas	Gamaglobulinas	Betaglobulinas	Alfa2globulinas	Alfa1globulinas	ALAT aumentada	Ureia	Creatinina	Glicémia
C01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C10	-	X	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C11	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C13	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-
C14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-
C20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C21	-	-	↑	-	↑	-	-	-	-	↑	↑	↑	-	-	-	-	-	-	-
C22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C23	-	-	-	-	↑	-	-	-	↓	↑	-	↑	↑	-	-	-	-	-	-
C24	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	↑	-	-	-	-	↑	↑	-
C25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-	-	-
C26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C28	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-
C29	-	-	-	↑	-	-	↑	-	-	↑	↑	↑	-	-	-	-	↑	↑	↑
C30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C32	-	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C33	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C34	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-	-	↑	↑	-	↑	-	-	-	-	-
C35	-	X	↓	↓	-	-	-	↓	-	-	-	↑	-	↑	-	-	-	-	-
C36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C37	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-
C38	-	-	↓	-	-	↓	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-
C39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C40	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C41	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C46	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C47	-	X	↓	↓	-	-	-	↓	-	-	-	↑	↓	-	↓	-	-	↑	-
C48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C49	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	N	N	-

Legenda: N = valores considerados normais; X = presença; ↓ = diminuição; ↑ = aumento; - = não referido;

Anexo 9 – Casos clínicos de LFel: exames citopatológicos/histopatológicos e serologia

N.º caso clínico	Exames citopatológicos e/ou histopatológicos								Imunocito/histoquímica do tecido lesionado	Teste de Montenegro	Serologia					
	Lesões cutâneas	Linfonodos	Medula óssea	Fígado	Baço	Intestinos e estômago	Olho	Sangue			IFI	Imunoprecipitação	ELISA	WB	IHA	DAT
C01	-	-	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C02	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C03	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C04	POS	POS	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C05	POS	POS	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C06	POS à observação directa (tecido não especificado)								-	-	-	-	-	-	-	-
C07	POS	-	-	NEG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C08	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C09	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C10	-	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C11	POS	-	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-	NEG	-	-	-	-	-	-
C12	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C13	POS	POS	-	-	-	-	-	-	POS	-	-	-	-	-	-	-
C14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	POS	-
C15	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C16	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C17	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C19	-	-	NEG	-	-	-	-	-	NEG	-	1/200	1 arc	POS	POS	-	-
C20	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C21	POS	-	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	POS	-	1/10.240
C22	-	-	-	POS	POS	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C23	-	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	1/160	-	-	-	-	-
C24	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/640	-	-	-	-	-
C25	-	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	1/640	-	-	-	-	-
C26	-	-	-	-	-	-	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C27	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C28	POS	POS	-	-	-	-	-	-	POS	-	1/80	-	-	-	-	-
C29	-	-	POS	-	-	-	POS	-	POS	-	-	-	POS	-	-	-
C30	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	POS	-	-	-	-	-
C31	POS	-	-	NEG	NEG	-	-	-	-	-	1/80	-	-	-	-	-
C32	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C33	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C34	POS	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	1/1.280	-	-	-	-	-
C35	-	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	1/640	-	-	-	-	-
C36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C37	POS	-	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13-47 (POS)	-	-	-
C38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	182 (POS)	-	-	-
C39	POS	POS	-	-	POS	-	-	-	-	-	POS	-	POS	POS	-	-
C40	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C41	-	-	-	-	-	-	-	POS	-	-	1/800	-	-	-	-	-
C42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/40; 1/160	-	-	-	-	-
C43	-	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	NEG	-	NEG	-	-	-
C44	-	POS	-	POS	-	-	-	-	-	-	POS	-	POS	-	-	-
C45	-	POS	-	POS	-	-	-	-	-	-	POS	-	-	-	-	-
C46	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/1.280	-	POS	-	-	-
C47	-	POS	POS	-	POS	-	-	POS	-	-	-	-	-	-	1/100	-
C48	-	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	1/240	-	-	-	-	-
C49	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: NEG = negativo; POS = Positivo; - = sem dados.

Anexo 10 – Casos clínicos de LFel: cultura e PCR

N.º do caso clínico de LFel	Cultura e caracterização Isoenzimática					PCR					
	Lesões cutâneas	Medula óssea	Linfonodos	Sangue	Espécie identificada	Lesões cutâneas	Medula óssea	Linfonodos	Baço	Sangue	Espécie identificada
C01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C04	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C05	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C07	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C11	POS	-	-	-	<i>L. mexicana</i>	-	-	-	-	-	-
C12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C13	POS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C15	POS	-	-	-	<i>L. venezuelensis</i>	-	-	-	-	-	-
C16	POS	-	-	-	<i>L. venezuelensis</i>	-	-	-	-	-	-
C17	POS	-	-	-	<i>L. venezuelensis</i>	-	-	-	-	-	-
C18	POS	-	-	-	<i>L. venezuelensis</i>	-	-	-	-	-	-
C19	-	POS	-	-	-	-	POS	-	-	-	-
C20	NEG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>L. (Viannia)</i>
C21	-	POS	-	-	<i>L. infantum</i> MON-1	-	-	-	-	-	-
C22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C25	-	-	POS	-	-	-	-	POS	-	-	-
C26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C28	POS	-	POS	-	-	POS	-	NEG	-	-	<i>L. infantum</i>
C29	-	-	-	-	-	-	POS	-	-	-	-
C30	-	-	-	-	-	POS (tecido não especificado)					-
C31	-	-	-	-	-	-	-	-	POS	-	<i>L. infantum chagasi</i>
C32	POS	-	-	-	<i>L. braziliensis</i>	-	-	-	-	-	-
C33	POS	-	-	-	<i>L. braziliensis</i>	-	-	-	-	-	-
C34	NEG	-	POS	NEG	-	POS	-	POS	-	POS	-
C35	-	-	POS	-	-	-	-	POS	-	POS	-
C36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C37	-	-	-	-	-	POS	-	-	-	-	-
C38	-	-	-	-	-	POS	-	-	-	-	-
C39	-	-	-	POS	<i>L. infantum</i> MON-1	-	-	-	-	-	-
C40	POS	-	-	-	<i>L. amazonensis</i>	-	-	-	-	-	-
C41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C42	-	-	POS	-	<i>L. infantum</i>	-	-	NEG	-	POS	-
C43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C44	-	-	-	-	-	POS (tecido não especificado)					-
C45	-	-	-	-	-	POS (tecido não especificado)					-
C46	POS	-	-	-	<i>L. braziliensis</i>	-	-	-	-	-	-
C47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	POS	<i>L. infantum</i>
C48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C49	POS	-	-	-	<i>L. (L.) amazonensis</i>	-	-	-	-	-	-

Legenda: NEG = negativo; POS = Positivo; - = sem dados.

Anexo 11 – Casos clínicos de LFel: xenodiagnóstico

N.º do caso clínico de LFel	Macrófagos bovinos	Hamsters	Cobaíes	Camundongos	Rato branco	Cães	<i>Triatoma braziliensis</i> (lesão do gato)	<i>Triatoma braziliensis</i> (ventre do gato: não lesionado)
C01	-	-	-	-	-	-	-	-
C02	-	-	-	-	-	-	-	-
C03	-	-	-	-	-	-	-	-
C04	-	-	-	-	-	-	-	-
C05	-	-	-	-	-	-	-	-
C06	-	-	-	-	NEG	-	-	-
C07	-	-	-	-	NEG	-	-	-
C08	-	-	-	-	-	-	-	-
C09	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
C10	-	-	-	-	-	-	-	-
C11	-	-	-	-	-	-	-	-
C12	-	-	-	-	-	-	-	-
C13	POS	POS	-	-	-	NEG	-	-
C14	-	-	-	-	-	-	-	-
C15	-	-	-	-	-	-	-	-
C16	-	-	-	-	-	-	-	-
C17	-	POS	-	-	-	-	-	-
C18	-	POS	-	-	-	-	-	-
C19	-	POS	-	-	-	-	-	-
C20	-	POS	-	-	-	-	-	-
C21	-	-	-	-	-	-	-	-
C22	-	-	-	-	-	-	-	-
C23	-	-	-	-	-	-	-	-
C24	-	-	-	-	-	-	-	-
C25	-	-	-	-	-	-	-	-
C26	-	-	-	-	-	-	-	-
C27	-	-	-	-	-	-	-	-
C28	-	-	-	-	-	-	-	-
C29	-	-	-	-	-	-	-	-
C30	-	NEG	-	-	-	-	-	-
C31	-	-	-	-	-	-	-	-
C32	-	-	-	-	-	-	-	-
C33	-	-	-	-	-	-	-	-
C34	-	-	-	-	-	-	-	-
C35	-	-	-	-	-	-	-	-
C36	-	-	-	-	-	-	-	-
C37	-	-	-	-	-	-	-	-
C38	-	-	-	-	-	-	-	-
C39	-	-	-	-	-	-	-	-
C40	-	-	-	-	-	-	-	-
C41	-	-	-	-	-	-	-	-
C42	-	POS	-	-	-	-	-	-
C43	-	-	-	-	-	-	-	-
C44	-	-	-	-	-	-	-	-
C45	-	-	-	-	-	-	-	-
C46	-	-	-	-	-	-	-	-
C47	-	-	-	-	-	-	-	-
C48	-	-	-	-	-	-	-	-
C49	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: NEG = negativo; POS = Positivo; - = sem dados.

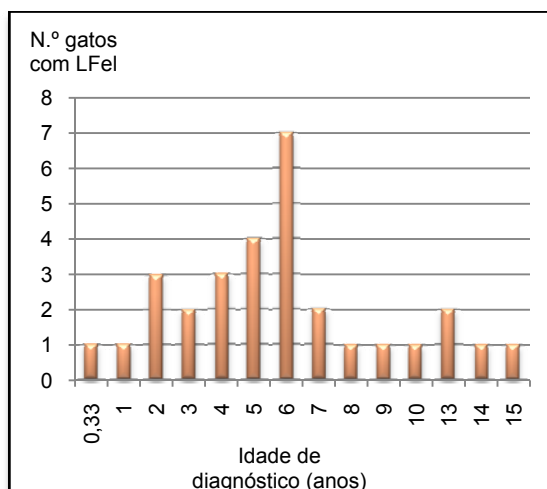
Anexo 12 – Casos clínicos de LFel: tratamento e evolução

N.º caso clínico de LFel	Efectuado tratamento etiológico	Tratamento específico para Leishmaniose											Exerece da lesão	Evolução			
		Antimoniato de méglumina	Ketoconazol	Itraconazol	Fluconazole	Clotrimazole	Levamisole	Aminosidina	Metronidazol com Espiramicina	Pentamidina	Alopurinol	Enrofloxacin		Sem melhoras significativas	Melhoras	Cura clínica	Morte ou eutanásia
C01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X
C05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C06	SIM	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-
C07	SIM	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	X
C08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X
C11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C12	SIM	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	X	-
C13	SIM	-	-	-	-	X	X	X	-	-	-	-	X	X	-	-	X
C14	NÃO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	X
C15	SIM	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	X	-
C16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C17	NÃO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18	NÃO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C19	NÃO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20	NÃO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C21	NÃO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-
C22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X
C24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X
C25	SIM	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-
C26	NÃO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	X
C27	SIM	-	-	X	X	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-	-	X
C28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
C29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	X
C31	SIM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X	-	-	X	-
C32	SIM	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X
C34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C36	NÃO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X
C37	SIM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-
C38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C39	SIM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	X	-	-	X	-
C40	SIM	-	X	X	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	X	-	-
C41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X
C42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X
C43	NÃO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	X	-
C44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-
C45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C49	SIM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	X

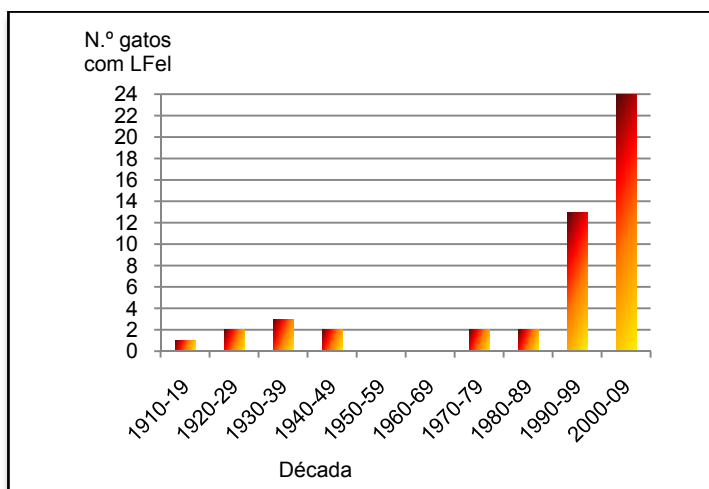
Legenda: X = efectuado o tratamento ou ocorreu a evolução assinalada; - = sem dados;

Anexo 13 – Análise dos dados obtidos a partir dos 49 casos clínicos de LFel

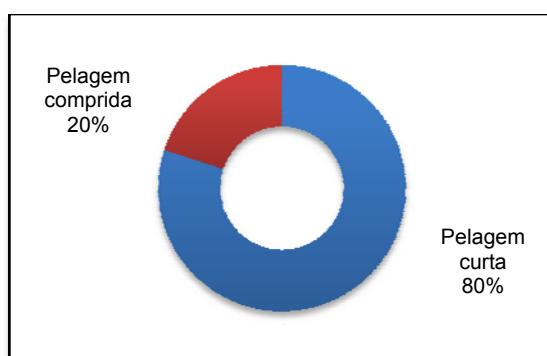
Anexo 13.a – Distribuição das idades de diagnóstico da doença nos animais com LFel



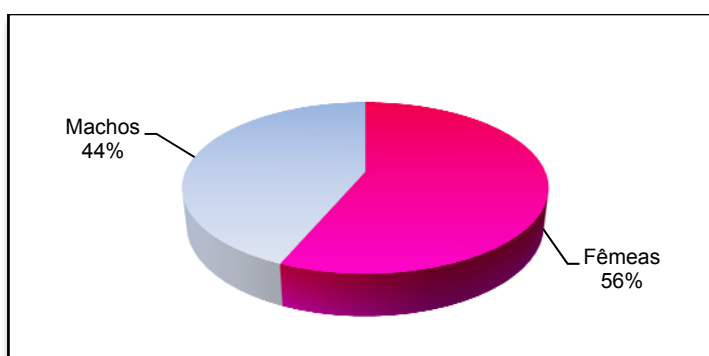
Anexo 13.b – Incidência de LFel a nível mundial entre as décadas de 1910 a 2000



Anexo 13.c – Tamanho da pelagem dos animais com LFel (%) (15/49 gatos)



Anexo 13.d – Sexo dos animais com LFel (%) (39/49 gatos)



Anexo 13.e – Raça dos gatos com LFel

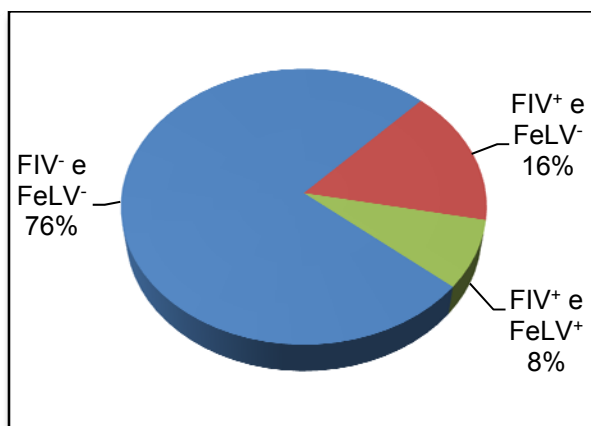
Raça	N.º gatos com LFel
Europeu	4
Indeterminada	4
Siamês	3
Total Geral	11

Anexo 13.f – Habitat dos gatos com LFel

Habitat	N.º gatos com LFel
Habitava com um cão e uma criança infectados com <i>Leishmania</i>	1
Habitava com cães	1
Tinha acesso ao exterior	11
Total Geral	13

Anexo 13 (continuação I) – Análise dos dados obtidos a partir dos 49 casos clínicos de LFel

Anexo 13.g – Co-infecções por FIV e por FeLV dos gatos com LFel



Anexo 13.h – Outras co-infecções dos gatos com LFel

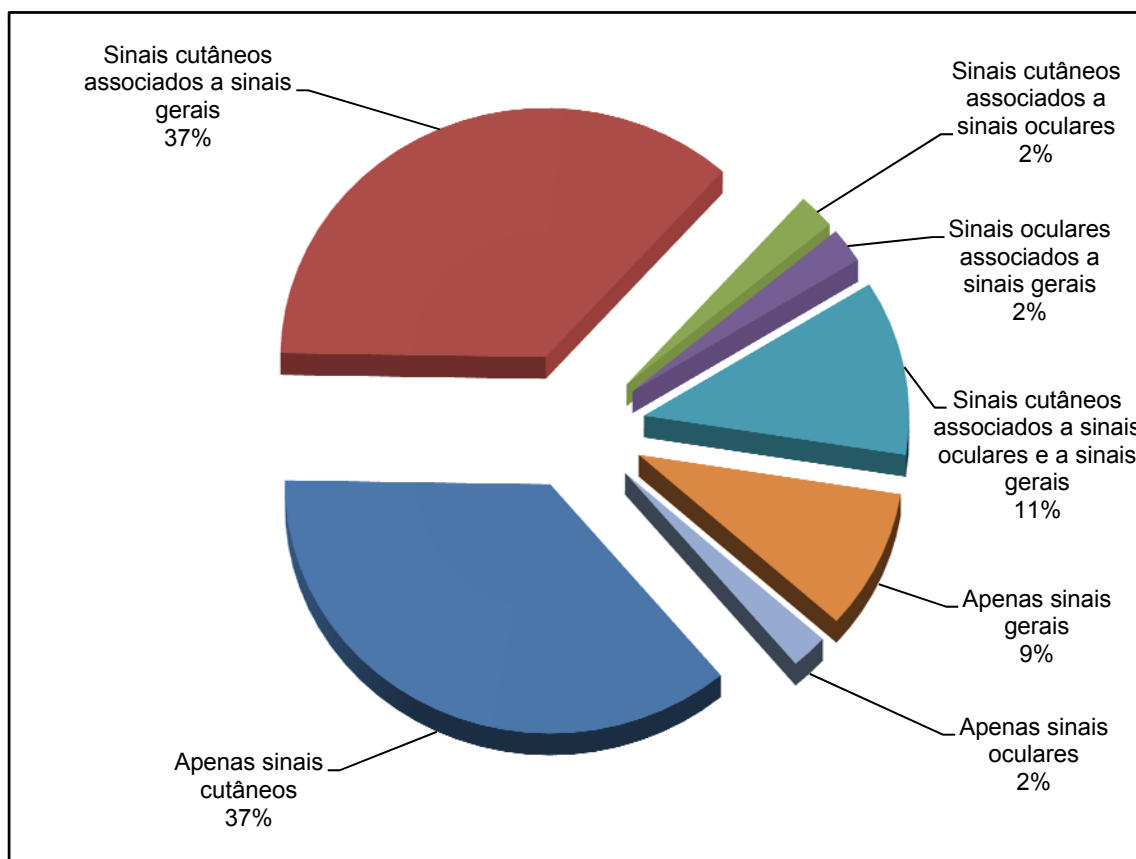
Agente pesquisado	Resultado do teste para detecção do agente		
	Positivo	Negativo	Total
PIF	1	2	3
Coronavirus	1	3	4
<i>Toxoplasma gondii</i>	4	2	6
<i>Bartonella henselae</i>	2	2	4

Anexo 13.i – Doenças concomitantes nos gatos com LFel

Autores do relato do caso clínico de LFel	Doenças concomitantes referidas
Bergeon (1927, citado por Mancianti, 2004; Pennisi <i>et al.</i> , 2002; Venet, 2007; Simões-Mattos <i>et al.</i> , 2004)	Bronquite parasitária
Barnes <i>et al.</i> (1993)	Otite externa, síndrome urológica felina e linfossarcoma linfoblástico mediastínico
Laruelle-Magalon & Toga (1996)	Dermatite alérgica à picada das pulgas, angioma nasal e complexo eosinofílico granulomatoso felino (pálpebra)
Hervás <i>et al.</i> (1999)	Abortos recorrentes
Pennisi <i>et al.</i> (1999, citado por Pennisi <i>et al.</i> , 2002; Pennisi <i>et al.</i> , 2004)	IRC, broncopneumonia e pitoráx
Leiva (2002); Leiva (2005)	Diabetes <i>mellitus</i> e estomatite linfoplasmocítica crónica
Pennisi <i>et al.</i> (2002); Pennisi <i>et al.</i> (2004)	Sarna por <i>Otodectes cynotis</i> , IRC e abscessos originados em lutas
Rüfenacht <i>et al.</i> (2005)	Penfigo foliáceo
Grevot <i>et al.</i> (2005)	Carcinoma espinocelular
Sanches <i>et al.</i> (2009)	Demodicose por <i>Demodex cati</i>

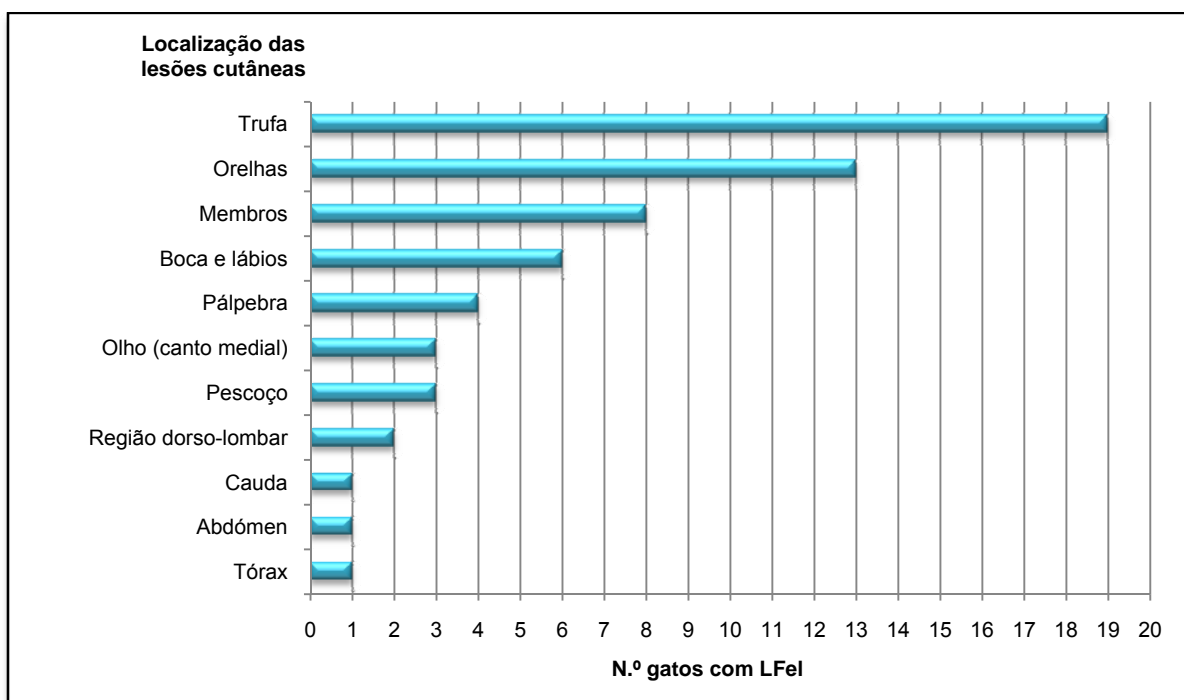
Anexo 13 (continuação II) – Análise dos dados obtidos a partir dos 49 casos clínicos de LFeI

Anexo 13.j – Sinais cutâneos, oculares e gerais dos casos de LFeI

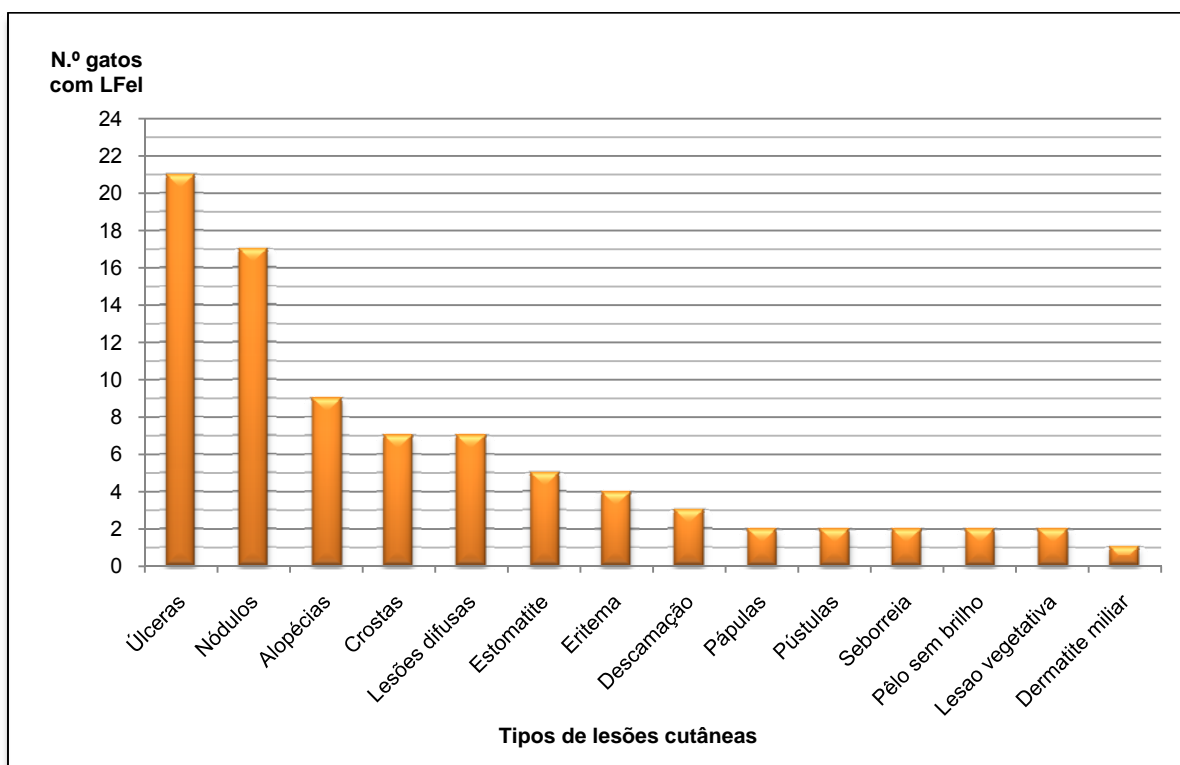


Anexo 13 (continuação III) – Análise dos dados obtidos a partir dos 49 casos clínicos de LFel

Anexo 13.I – Localização das lesões cutâneas nos gatos com LFel

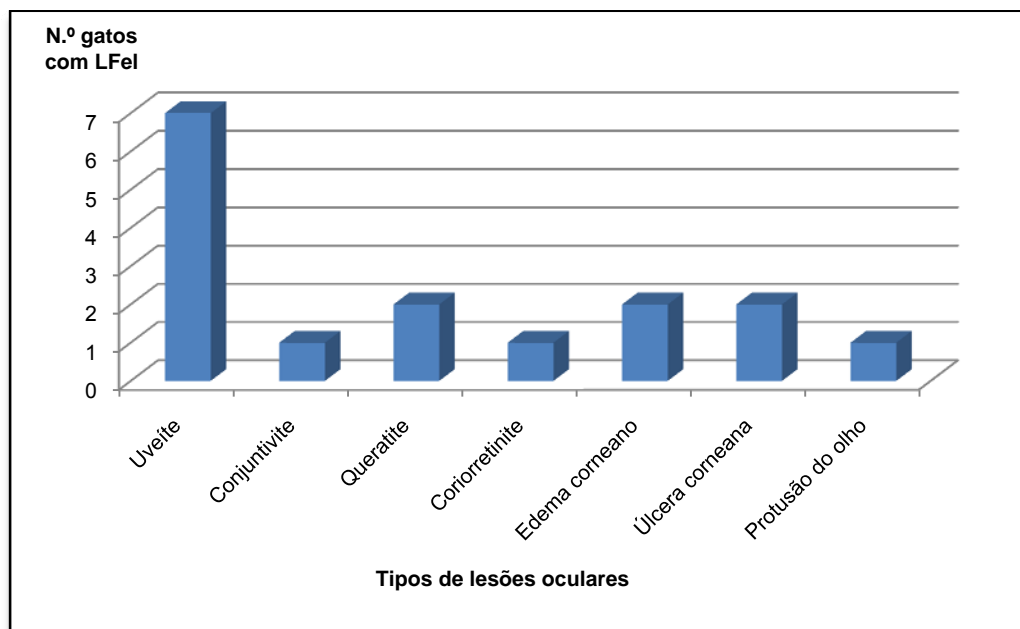


Anexo 13.m – Tipos de lesões cutâneas nos gatos com LFel

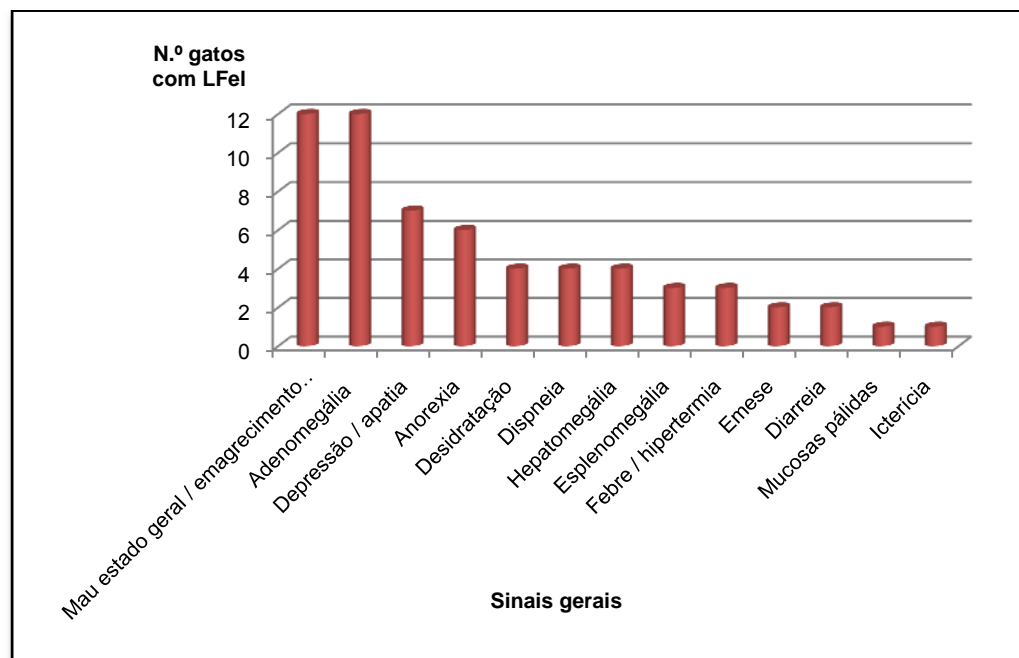


Anexo 13 (continuação IV) – Análise dos dados obtidos a partir dos 49 casos clínicos de LFel

Anexo 13.n – Tipos de lesões oculares nos animais com LFel



Anexo 13.o – Sinais gerais dos animais com LFel



Anexo 13 (continuação V) – Análise dos dados obtidos a partir dos 49 casos clínicos de LFel

Anexo 13.p – Alterações hematológicas relatadas nos casos de LFel

Alteração hematológica	N.º de animais com LFel	%
Leucocitose	6	33%
Neutrofilia	6	33%
Anemia	4	22%
Leucopénia	4	22%
Eosinofilia	3	17%
Neutropénia	2	11%
Trombocitopénia	2	11%
Linfocitose	1	6%
Linfopénia	1	6%
Monócitos	1	6%

Anexo 13.q – Alterações bioquímicas séricas relatadas nos casos de LFel

	Alteração bioquímica	N.º de animais com LFel	%
Proteínas sanguíneas	Hiperglobulinémia	9	50%
	Aumento das γ -globulinas	8	44%
	Hiperproteinémia	3	17%
	Hipoalbuminémia	2	11%
	Aumento das α_2 -globulinas	2	11%
	Aumento das β -globulinas	1	6%
	Diminuição das β -globulinas	1	6%
	Diminuição das α_1 -globulinas	1	6%
Outras variáveis	Aumento da creatinina	3	17%
	Ureia aumentada	2	11%
	ALAT aumentada	1	6%
	Hiperglicémia	1	6%

Anexo 13.r – Tipos de técnicas serológicas utilizadas nos casos de LFel

Total testes serológicos	N.º casos LFel (23)	%
IFI	17	74%
ELISA	9	39%
Western Blot	3	13%
Hemaglutinação indirecta	2	9%
Imunoprecipitação	1	4%
DAT	1	4%

Anexo 13.s – Tecidos e órgãos que foram alvo de exames citológicos ou histológicos nos casos de LFel

	N.º casos LFel com resultados positivos	N.º casos LFel com resultados negativos
Lesões cutâneas	29	0
Linfonodos	15	0
Medula óssea	5	4
Fígado	3	5
Baço	3	4
Intestinos e estômago	1	0
Olho	2	0
Sangue	2	0
Não especificado	1	0

Anexo 13 (continuação VI) – Análise dos dados obtidos a partir dos 49 casos clínicos de LFel

Anexo 13.t – Casos clínicos e estudos epidemiológicos de LFel em que foi utilizada a técnica da imunofluorescência indirecta para a detecção de *L. infantum* e de *L. chagasi*

IFI para <i>L. infantum</i> ou <i>L. chagasi</i>	Diluição mínima considerada	Diluições positivas	Tipo de estudo
Laruelle-Magalon & Toga (1996)	1:100 (Faculdade de Medicina da Universidade de Marselha);	≥ 1:200	Caso clínico
Hervás <i>et al.</i> (1999)	-	1:160	Caso clínico
Penissi (1999, citado por Penissi, 2002)	-	1:640 (2 animais)	Caso clínico
Poli <i>et al.</i> (2002)	-	1:80	Caso clínico
Savani <i>et al.</i> (2004)	-	1:80	Caso clínico
Penissi (2002)	-	1:640 (1 gato); 1:1.280 (1 gato);	Caso clínico
Verneuil (2006)	-	1:800	Caso clínico
Maroli <i>et al.</i> (2007)	-	1:40, 1:80, 1:160	Caso clínico
Serrano <i>et al.</i> (2008)	1:40 (Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vectores de São Paulo)	Todos os resultados foram negativos	Caso clínico
Sanches <i>et al.</i> (2009)	-	1:240	Caso clínico
Maia <i>et al.</i> (2008)	1:2	1:2 a 1:16	Estudo seroepidemiológico
Poli <i>et al.</i> (2002)	-	1:160	Estudo seroepidemiológico
Faria (2008)	1:40	Todos os resultados foram negativos	Estudo seroepidemiológico
Venet (2007)	≥ 1:50	≥ 1:50	Estudo seroepidemiológico
Martín-Sánchez <i>et al.</i> (2007)	≥ 1:10	≥ 1:10 a ≥1:160	Estudo seroepidemiológico
Vaz <i>et al.</i> (2005)	-	≥ 1:160	Estudo seroepidemiológico
Vita <i>et al.</i> (2005)	-	≥ 1:40, 1:80, 1:160, 1:320	Estudo seroepidemiológico

Anexo 13.u – Tecidos utilizados para cultura parasitológica de *Leishmania*

Cultura parasitológica	N.º casos de LFel com resultados positivos	N.º casos de LFel com resultados negativos
Lesões cutâneas	15	2
Medula óssea	2	0
Linfonodos	5	0
Sangue	1	1

Anexo 13.v – Tecidos utilizados na técnica da PCR (detecção de ADN de *Leishmania*)

PCR	N.º casos de LFel com resultados positivos	N.º casos de LFel com resultados negativos
Lesões cutâneas	4	0
Medula óssea	2	0
Linfonodos	3	2
Baço	1	0
Sangue	5	0

Anexo 13 (continuação VII) – Análise dos dados obtidos a partir dos 49 casos clínicos de LFel

Anexo 13.x – Possível influência de tratamento específico para leishmaniose na evolução do estado clínico do animal

Evolução do estado clínico	Com tratamento etiológico		Sem tratamento etiológico	
	N.º de casos LFel	%	N.º de casos LFel	%
Cura clínica	7	54%	2	29%
Melhoras	2	15%	1	14%
Sem melhoras	0	0%	1	14%
Morte	4	31%	3	43%
TOTAL	13	100%	7	100%

Anexo 13.z – Agentes de tratamento etiológico para leishmaniose e a evolução do estado clínico do animal

Fármacos utilizados	Cura clínica		Melhoras sem cura clínica		Morte	
	N.º casos de LFel	%	N.º casos de LFel	%	N.º casos de LFel	%
Antimoniato de méglumina	2	15%	1	8%	0	0%
Ketoconazol	1	8%	1	8%	0	0%
Itraconazol	0	0%	1	8%	1	8%
Fluconazole	0	0%	0	0%	1	8%
Clotrimazole	1	8%	0	0%	1	8%
Levamisole	1	8%	0	0%	1	8%
Aminosidina	1	8%	0	0%	1	8%
Metronidazol + Espiramicina	0	0%	0	0%	1	8%
Pentamidina	1	8%	0	0%	1	8%
Alopurinol	4	31%	1	8%	1	8%
Enrofloxacina	1	8%	0	0%	0	0%

Anexo 14 – Caracterização da amostra do rastreio para dirofilariose e leishmaniose em 70 gatos da Área Metropolitana de Lisboa

N.º do animal	Idade (anos)	Sexo	Raça	Habitat	Convive com	Localidade
1	3	MC	Indeterminada	Rua e casa	Animais errantes	Alcabideche
2	11	FI	Indeterminada	Casa	Sem contacto directo	Carcavelos
3	Adulto	MI	Indeterminada	Rua	Animais errantes	Lisboa
4	10	FI	Indeterminada	Rua e casa	Animais errantes	Lisboa
5	5	MC	Indeterminada	Casa	Com cães	Lisboa
6	1	MI	Indeterminada	Rua e casa	Animais errantes	Massamá
7	10	FC	Persa	Casa	Apenas gatos domésticos	Carnaxide
8	16	FC	Siamês	Casa	Sem contacto directo	Carnaxide
9	Adulto	FI	Indeterminada	Rua	Animais errantes	Lisboa
10	16	MC	Indeterminada	Casa	Apenas gatos domésticos	Queijas
11	14	MC	Indeterminada	Casa	Com cães	Póvoa de Santo Adrião
12	12	FI	Indeterminada	Rua e casa	Animais errantes	Lisboa
13	14	MC	Indeterminada	Rua e casa	Animais errantes	Carcavelos
14	10	FC	Indeterminada	Rua e casa	Animais errantes	Alcabideche
15	Adulto	FI	Indeterminada	Rua	Animais errantes	Lisboa
16	Adulto	FI	Indeterminada	Rua	Animais errantes	Lisboa
17	Adulto	FI	Indeterminada	Rua	Animais errantes	Lisboa
18	11	FC	Indeterminada	Casa	Sem contacto directo	Damaia
19	Adulto	FI	Indeterminada	Rua	Animais errantes	Lisboa
20	3	FC	Indeterminada	Rua e casa	Animais errantes	Lisboa
21	4	FI	Indeterminada	Casa	Apenas gatos domésticos	Queluz
22	Adulto	MI	Indeterminada	Rua	Animais errantes	S. João da Talha
23	5	FC	Indeterminada	Casa	Sem contacto directo	Paço de Arcos
24	15	MC	Indeterminada	Casa	Sem contacto directo	Lisboa
25	Adulto	MI	Persa	Rua	Animais errantes	Lisboa
26	Adulto	MI	Indeterminada	Rua e casa	Animais errantes	Queluz
27	18	MI	Siamês	Casa	Sem contacto directo	Lisboa
28	10	FC	Indeterminada	Rua e casa	Animais errantes	Lisboa
29	10	MC	Indeterminada	Casa	Sem contacto directo	Dafundo
30	Adulto	MI	Indeterminada	Rua	Animais errantes	Lisboa
31	Adulto	MI	Bosque da Noruega	Rua	Animais errantes	Lisboa
32	12	MC	Siamês	Casa	Sem contacto directo	Lisboa
33	2	MC	Indeterminada	Rua e casa	Animais errantes	Paiões
34	15	FI	Siamês	Casa	Apenas gatos domésticos	Amadora
35	6	FC	Indeterminada	Rua e casa	Animais errantes	Alcabideche
36	2	MI	Indeterminada	Casa	Sem contacto directo	Lisboa

Legenda: FC = Fêmea ovariectomizada; FI = Fêmea inteira; MC = Macho castrado; MI = macho inteiro;

Anexo 14 (continuação) – Caracterização da amostra do rastreio para dirofilariose e leishmaniose em 70 gatos da Área Metropolitana de Lisboa

N.º do animal	Idade (anos)	Sexo	Raça	Habitat	Convive com	Localidade
37	2	FI	Indeterminada	Rua e casa	Animais errantes	Lisboa
38	Adulto	FI	Indeterminada	Rua	Animais errantes	Lisboa
39	5	MC	Bosque da Noruega	Casa	Apenas gatos domésticos	Mem Martins
40	14	MC	Indeterminada	Casa	Apenas gatos domésticos	Lisboa
41	15	MI	Siamês	Casa	Sem contacto directo	Lisboa
42	8	MC	Indeterminada	Casa	Sem contacto directo	Lisboa
43	1	FI	Indeterminada	Casa	Apenas gatos domésticos	Alfragide
44	2	MI	Indeterminada	Rua e casa	Animais errantes	Lisboa
45	5	MC	Indeterminada	Casa	Apenas gatos domésticos	Alfragide
46	1	MI	Indeterminada	Casa	Apenas gatos domésticos	Lisboa
47	9	MC	Persa	Casa	Apenas gatos domésticos	Paço de Arcos
48	7	MI	Indeterminada	Casa	Sem contacto directo	Lisboa
49	9	FC	Siamês	Casa	Sem contacto directo	Lisboa
50	Adulto	FI	Indeterminada	Rua	Animais errantes	Lisboa
51	12	MC	Indeterminada	Casa	Sem contacto directo	Lisboa
52	5	MC	Indeterminada	Casa	Apenas gatos domésticos	Lisboa
53	6	FC	Indeterminada	Casa	Apenas gatos domésticos	Lisboa
54	2	MC	Indeterminada	Casa	Sem contacto directo	Cascais
55	14	FC	Indeterminada	Casa	Sem contacto directo	Lisboa
56	Adulto	MI	Indeterminada	Rua	Animais errantes	Fernão Ferro
57	Adulto	MI	Indeterminada	Casa	Apenas gatos domésticos	Lisboa
58	10	MC	Indeterminada	Casa	Apenas gatos domésticos	Lisboa
59	4	FI	Indeterminada	Casa	Apenas gatos domésticos	Lisboa
60	12	FI	Siamês	Casa	Sem contacto directo	Lisboa
61	8	FI	Indeterminada	Casa	Sem contacto directo	Lisboa
62	Adulto	FI	Indeterminada	Rua	Animais errantes	Lisboa
63	7	MC	Siamês	Casa	Sem contacto directo	Amadora
64	14	MC	Indeterminada	Casa	Sem contacto directo	Lisboa
65	15	MC	Indeterminada	Casa	Apenas gatos domésticos	Carnaxide
66	13	MC	Siamês	Casa	Apenas gatos domésticos	Amadora
67	12	MC	Indeterminada	Casa	Sem contacto directo	Lisboa
68	7	FI	Indeterminada	Rua e casa	Animais errantes	Almargem do Bispo
69	15	FC	Indeterminada	Casa	Sem contacto directo	Lisboa
70	8	MC	Indeterminada	Casa	Apenas gatos domésticos	Lisboa

Legenda: FC = Fêmea ovariectomizada; FI = Fêmea inteira; MC = Macho castrado; MI = macho inteiro;

Anexo 14 (continuação II) – Caracterização da amostra do rastreio para dirofilariose e leishmaniose em 70 gatos da Área Metropolitana de Lisboa

N.º do animal	Motivo de apresentação à consulta por área clínica	Resultado da pesquisa de Ac FIV	Resultado da pesquisa de Ag FeLV	Resultado da pesquisa de PIF
1	Ortopedia	-	-	-
2	Outra doença	-	-	-
3	Reprodução	-	-	-
4	Urologia	Negativo	Negativo	-
5	Ortopedia	-	-	-
6	Reprodução	Negativo	Negativo	-
7	Urologia	-	-	-
8	Urologia	-	-	-
9	Reprodução	-	-	-
10	Gastroenterologia	-	-	-
11	Urologia	Negativo	Negativo	-
12	Oncologia	-	-	-
13	Oncologia	-	-	-
14	Ortopedia	-	-	-
15	Reprodução	-	-	-
16	Reprodução	-	-	-
17	Reprodução	-	-	-
18	Urologia	Negativo	Negativo	-
19	Outra doença	-	-	-
20	Outra doença	Negativo	Negativo	-
21	Oncologia	Negativo	Negativo	-
22	Outra doença	Negativo	Positivo	-
23	Outra doença	-	-	-
24	Urologia	-	-	-
25	Ortopedia	-	-	-
26	Urologia	Negativo	Negativo	-
27	Gastroenterologia	-	-	-
28	Gastroenterologia	-	-	-
29	Oncologia	-	-	-
30	Reavaliação	Negativo	Negativo	-
31	Outra doença	Negativo	Negativo	-
32	Outra doença	Negativo	Negativo	-
33	Outra doença	-	-	-
34	Outra doença	-	-	-
35	Outra doença	Negativo	Negativo	-
36	Reprodução	Negativo	Negativo	-

Legenda: Ac = anticorpos; Ag = antígenos; - = pesquisa não efectuada

Anexo 14 (continuação III) – Caracterização da amostra do rastreio para dirofilariose e leishmaniose em 70 gatos da Área Metropolitana de Lisboa

N.º do animal	Motivo de apresentação à consulta por área clínica	Resultado da pesquisa de Ac FIV	Resultado da pesquisa de Ag FeLV	Resultado da pesquisa de PIF
37	Reprodução	Negativo	Negativo	-
38	Reprodução	-	-	-
39	Oncologia	Negativo	Positivo	-
40	Reavaliação	Negativo	Negativo	-
41	Outra doença	-	-	-
42	Urologia	-	-	-
43	Reprodução	Negativo	Negativo	-
44	Gastroenterologia	-	-	-
45	Oncologia	-	-	-
46	Endocrinologia	Negativo	Negativo	Positivo
47	Urologia	Negativo	Negativo	Positivo
48	Urologia	-	-	-
49	Outra doença	-	-	-
50	Reprodução	-	-	-
51	Gastroenterologia	-	-	Positivo
52	Outra doença	Positivo	Negativo	-
53	Outra doença	-	-	-
54	Outra doença	Negativo	Negativo	-
55	Oncologia	-	-	-
56	Pneumologia	Negativo	Negativo	-
57	Hematologia	Negativo	Negativo	-
58	Odontologia	Negativo	Negativo	-
59	Oncologia	-	-	-
60	Oncologia	-	-	-
61	Oncologia	-	-	-
62	Gastroenterologia	Negativo	Negativo	-
63	Outra doença	Negativo	Positivo	-
64	Gastroenterologia	-	-	-
65	Nefrologia	-	-	-
66	Oncologia	-	-	-
67	Endocrinologia	-	-	-
68	Oncologia	-	-	-
69	Gastroenterologia	Negativo	Negativo	-
70	Oncologia	Negativo	Negativo	-

Legenda: Ac = anticorpos; Ag = antígenos; - = pesquisa não efectuada

Anexo 15 – Sinais clínicos compatíveis com LFel e DFel dos 70 gatos do rastreio

N.º animal	Sinais compatíveis com DFel									Sinais compatíveis com DFel e LFel			Sinais compatíveis com LFel							
	Suspeito de asma	Taquipneia	Tosse	Dispneia	Vômito	Ascite	Derrame torácico	Convulsões	Síncope	Depressão ou apatia	Anorexia	Perda de peso	Nódulos	Alopécias	Adenomegália	Estomatites	Hepatomegália	Esplenomegália	Febre / Hipertermia	
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	-	-	-	X	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X	-	-	-	-	-	X	-	
9	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	X	-	-	-	-	-	-	
11	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
13	X	X	-	X	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	X	-	-	-	-	
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
18	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	X	-	-	
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	X	
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	X	
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
24	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
27	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
28	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	
30	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
32	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	X	
34	-	-	-	-	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X	-	-	-	-	-	-	-	

Legenda: X = sinal presente; - = sinal ausente

Anexo 15 (continuação) – Sinais clínicos compatíveis com LFel e DFel dos 70 gatos do rastreio

	Sinais compatíveis com DFel									Sinais compatíveis com DFel e LFel			Sinais compatíveis com LFel						
N.º animal	Suspeito de asma	Taquipneia	Tosse	Dispneia	Vômito	Ascite	Derrame torácico	Convulsões	Síncope	Depressão ou apatia	Anorexia	Perda de peso	Nódulos	Alopécias	Adenomegália	Estomatites	Hepatomegália	Esplenomegália	Febre / Hipertermia
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	X
45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-
52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	X
54	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-
56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-
57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-
61	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-
62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-
63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	X	-	-	-	-	-
67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-
68	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: X = sinal presente; - = sinal ausente

Anexo 16 – Pesquisa de microfilárias e antígenos de *Dirofilaria immitis* em 70 gatos da Área Metropolitana de Lisboa

N.º do animal	Pesquisa de microfilárias		Pesquisa de Antígenos
	Exame de sangue a fresco	Técnica de Knott	Witness® Dirofilaria
1	Negativo	Negativo	Negativo
2	Negativo	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo	Negativo
5	Negativo	Negativo	Negativo
6	Negativo	Negativo	Negativo
7	Negativo	Negativo	Negativo
8	Negativo	Negativo	Negativo
9	Negativo	Negativo	Positivo
10	Negativo	Negativo	Negativo
11	Negativo	Negativo	Negativo
12	Negativo	Negativo	Negativo
13	Negativo	Negativo	Negativo
14	Negativo	Negativo	Negativo
15	Negativo	Negativo	Negativo
16	Negativo	Negativo	Negativo
17	Negativo	Negativo	Negativo
18	Negativo	Negativo	Negativo
19	Negativo	Negativo	Negativo
20	Negativo	Negativo	Negativo
21	Negativo	Negativo	Negativo
22	Negativo	Negativo	Negativo
23	Negativo	Negativo	Negativo
24	Negativo	Negativo	Negativo
25	Negativo	Negativo	Negativo
26	Negativo	Negativo	Negativo
27	Negativo	Negativo	Negativo
28	Negativo	Negativo	Negativo
29	Negativo	Negativo	Negativo
30	Negativo	Negativo	Negativo
31	Negativo	Negativo	Negativo
32	Negativo	Negativo	Negativo
33	Negativo	Negativo	Negativo
34	Negativo	Negativo	Negativo
35	Negativo	Negativo	Negativo

N.º do animal	Pesquisa de microfilárias		Pesquisa de Antígenos
	Exame de sangue a fresco	Técnica de Knott	Witness® Dirofilaria
36	Negativo	Negativo	Negativo
37	Negativo	Negativo	Negativo
38	Negativo	Negativo	Negativo
39	Negativo	Negativo	Negativo
40	Negativo	Negativo	Negativo
41	Negativo	Negativo	Negativo
42	Negativo	Negativo	Negativo
43	Negativo	Negativo	Negativo
44	Negativo	Negativo	Negativo
45	Negativo	Negativo	Negativo
46	Negativo	Negativo	Negativo
47	Negativo	Negativo	Negativo
48	Negativo	Negativo	Negativo
49	Negativo	Negativo	Negativo
50	Negativo	Negativo	Negativo
51	Negativo	Negativo	Negativo
52	Negativo	Negativo	Negativo
53	Negativo	Negativo	Negativo
54	Negativo	Negativo	Negativo
55	Negativo	Negativo	Negativo
56	Negativo	Negativo	Negativo
57	Negativo	Negativo	Negativo
58	Negativo	Negativo	Negativo
59	Negativo	Negativo	Negativo
60	Negativo	Negativo	Negativo
61	Negativo	Negativo	Negativo
62	Negativo	Negativo	Negativo
63	Negativo	Negativo	Negativo
64	Negativo	Negativo	Negativo
65	Negativo	Negativo	Negativo
66	Negativo	Negativo	Negativo
67	Negativo	Negativo	Negativo
68	Negativo	Negativo	Negativo
69	Negativo	Negativo	Negativo
70	Negativo	Negativo	Negativo

WITNESS Dirofilaria

GENERALIDADES

A dirofilariose cardíaca do cão é uma doença de incidência mundial, cujo agente é um nemátodo filariforme, denominado *Dirofilaria immitis*. Os vermes adultos localizam-se no ventrículo direito e nas artérias pulmonares dos cães infestados. As filárias fêmeas libertam na circulação sanguínea larvas de 1º estadio (microfilárias) que se encontram preferencialmente na circulação periférica. O ciclo prossegue quando um mosquito, vector da doença, ingere as microfilárias que se desenvolvem, tornando-se larvas infestantes de 3º estadio. Estas podem então ser transmitidas a um outro cão onde prosseguirão o seu desenvolvimento até ao estadio de adultos imaturos (70-80 dias). É neste momento que os adultos imaturos começam a migrar, primeiro para as artérias pulmonares distais, para em seguida atingirem a artéria pulmonar principal e o ventrículo direito. Aproximadamente 6 a 8 meses após a infestação pelas larvas de 3º. estadio, os parasitas atingiram a sua maturidade e excretam um antigénio circulante que pode ser detectado, assim como as microfilárias, no sangue periférico.

INDICAÇÕES DO TESTE

Um diagnóstico preciso da dirofilariose permite, nos cães infestados, efectuar uma terapêutica apropriada antes de aparecerem grandes problemas cardiovasculares, enquanto que os cães não infestados poderão ser protegidos por meios profiláticos eficazes.

WITNESS DIROFILARIA, teste de detecção do antigénio solúvel da *D. immitis*, é particularmente recomendado sempre que a história pregressa e/ou os sintomas evoquem uma dirofilariose, ou sempre que uma verificação rápida do estatuto do animal seja necessária. Este teste, como não se baseia na detecção das microfilárias, é igualmente utilizável para a detecção de infestações ditas “ocultas”.

PRINCÍPIO DO TESTE

O teste WITNESS DIROFILARIA é um teste de realização simples, baseado numa técnica de imunomigração rápida (*Rapid Immuno Migration, RIM*). Usa anticorpos dirigidos contra epitopos de um antigénio solúvel da *D. immitis*.

A amostra a testar contendo este antigénio (sangue total, soro ou plasma) é posto em contacto com partículas de ouro coloidal sensibilizadas.

O complexo assim formado migra sobre uma membrana antes de ser capturado sobre uma zona reactiva, ao nível da qual a sua concentração provoca a formação de uma banda de cor rosa claramente visível. Uma banda de controlo, situada na extremidade da membrana, permite assegurar que o teste foi realizado correctamente.

13

AMOSTRAS

- O teste pode ser realizado em sangue total, soro ou plasma. Para o sangue total, a amostra deve ser colhida com anticoagulante (EDTA ou heparina).
- As amostras devem ser sempre colhidas com seringa e agulha estéreis.
- A hemólise não interfere significativamente com o teste, se bem que uma amostra fortemente hemolizada possa estar na origem de uma interferência (hemoglobina), podendo prejudicar a leitura em casos de reacção fracamente positiva.

Conservação das amostras

As amostras devem ser testadas, de preferência imediatamente após a colheita, mas não mais de 4 horas depois, se forem conservadas à temperatura ambiente. Se a análise for adiada (até dois dias), a amostra deverá ser conservada refrigerada entre +2° e 8°C. Para uma conservação mais prolongada, será aconselhável congelar a amostra (plasma ou soro somente) a -20°C.

CONTEÚDO DO KIT

- A. 10 saquetas, contendo cada uma, 1 placa teste e uma saqueta desidratante.
- B. Um frasco conta-gotas de solução tampão (de 2,8 ml).
- C. Uma literatura.
- D. 10 pipetas.

PRECAUÇÕES

1. Não utilizar reagentes após a data de validade.
2. Conservar o kit entre +2° e +25°C. Não congelar.
3. Utilizar o teste após a abertura (nos 10 minutos após a abertura da saqueta).
4. Evitar tocar ou danificar as membranas reactivas (janela da amostra (1) e janela de leitura (2) e (3)).
5. Colocar a placa WITNESS sobre uma superfície plana e horizontal para permitir uma migração correcta da amostra.
6. Utilizar uma pipeta diferente para cada amostra.
7. Segurar a pipeta e o frasco de solução tampão na vertical quando da distribuição das amostras e do reagente.
8. Manipular as amostras e o material de análise como susceptíveis de transmitir a *D. immitis*.
9. Apenas para uso veterinário.

Anexo 17 (continuação) – Protocolo do teste Witness® Dirofilaria

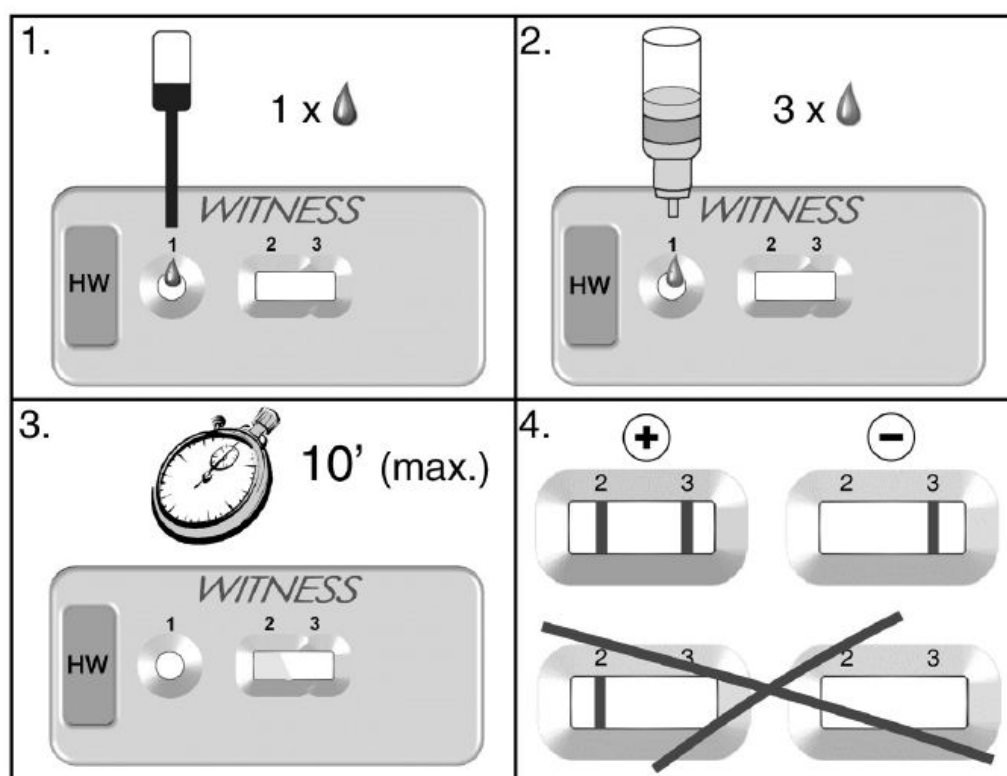
REALIZAÇÃO DO TESTE - RESULTADOS

Importante : Deixe cair as gotas da amostra e da solução tampão sobre a membrana da cúpula da amostra (janela 1). Não colocar a ponta da pipeta nem as gotas da amostra e da solução tampão directamente em contacto com a membrana.

<p>1. Repartição da amostra</p> <ul style="list-style-type: none"> Abrir uma saqueta, retirar a pipeta e a placa teste e colocá-la sobre uma superfície plana e horizontal. Colher a amostra com a pipeta fornecida e, mantendo-a bem vertical, colocar uma gota na janela da amostra (1). 	<p>2. Repartição da solução tampão</p> <ul style="list-style-type: none"> Depois de ter a certeza de que a amostra penetrou bem na membrana ; Tirar a tampa do frasco de solução tampão e, segurando-o sempre na vertical, colocar três gotas de solução na janela da amostra (1). Deixar em seguida a placa teste, sempre na horizontal, durante todo o tempo da migração do complexo amostra/reagente sobre a banda reactiva.
<p>3. Leitura do teste</p> <ul style="list-style-type: none"> Observar ao fim de 10 minutos a presença ou não de faixas de cor rosa nas janelas (2) e (3). <p>Notas</p> <ul style="list-style-type: none"> <i>É possível concluir a leitura do teste antes de 10 minutos, se as duas faixas de cor rosa (correspondendo respectivamente à faixa teste (2) e à faixa testemunha (3)) aparecerem nitidamente ;</i> <i>Pelo contrário, o aparecimento somente de uma faixa cor de rosa ao nível da faixa (3) não permite concluir o teste antes de decorrerem os 10 minutos necessários ao seu desenvolvimento completo.</i> <i>Com efeito, esta faixa de controlo (3) pode aparecer cor-de-mais precocemente que a faixa teste (2), nomeadamente no caso de amostras fracamente positivas.</i> 	<p>RESULTADOS</p> <p>1. Validação</p> <ul style="list-style-type: none"> O teste é validado se uma faixa cor de rosa aparecer na janela de leitura correspondente à testemunha (3). <p>2. Interpretação</p> <ul style="list-style-type: none"> Ausência de uma faixa cor de rosa ao nível da janela (2) e aparecimento de uma faixa cor de rosa ao nível da janela (3) : negativo em antígeno <i>D. immitis</i>. Presença de uma faixa cor de rosa ao nível das janelas (2) e (3) : positivo em antígeno <i>D. immitis</i>. <p>Atenção:</p> <ul style="list-style-type: none"> A ausência de uma faixa cor de rosa no nível da janela (3) torna o teste não válido. A interpretação de qualquer teste de diagnóstico deve ser feita em função do contexto clínico e epidemiológico do animal testado.

15

SBIO - Version n° 2 du 15/02/08



Anexo 18 – Técnica de imunofluorescência indirecta para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania infantum* em 70 gatos da Área Metropolitana de Lisboa

N.º do animal	IFI 1:40	IFI 1:80
1	Negativo	Negativo
2	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo
5	Negativo	Negativo
6	Negativo	Negativo
7	Negativo	Negativo
8	Negativo	Negativo
9	Negativo	Negativo
10	Negativo	Negativo
11	Negativo	Negativo
12	Negativo	Negativo
13	Negativo	Negativo
14	Negativo	Negativo
15	Negativo	Negativo
16	Negativo	Negativo
17	Negativo	Negativo
18	Negativo	Negativo
19	Negativo	Negativo
20	Negativo	Negativo
21	Negativo	Negativo
22	Negativo	Negativo
23	Negativo	Negativo
24	Negativo	Negativo
25	Negativo	Negativo
26	Negativo	Negativo
27	Negativo	Negativo
28	Negativo	Negativo
29	Negativo	Negativo
30	Negativo	Negativo
31	Negativo	Negativo
32	Negativo	Negativo
33	Negativo	Negativo
34	Negativo	Negativo
35	Negativo	Negativo

N.º do animal	IFI 1:40	IFI 1:80
36	Negativo	Negativo
37	Negativo	Negativo
38	Negativo	Negativo
39	Negativo	Negativo
40	Negativo	Negativo
41	Negativo	Negativo
42	Negativo	Negativo
43	Negativo	Negativo
44	Negativo	Negativo
45	Negativo	Negativo
46	Negativo	Negativo
47	Negativo	Negativo
48	Negativo	Negativo
49	Negativo	Negativo
50	Negativo	Negativo
51	Negativo	Negativo
52	Negativo	Negativo
53	Negativo	Negativo
54	Negativo	Negativo
55	Negativo	Negativo
56	Negativo	Negativo
57	Negativo	Negativo
58	Negativo	Negativo
59	Negativo	Negativo
60	Negativo	Negativo
61	Negativo	Negativo
62	Negativo	Negativo
63	Negativo	Negativo
64	Negativo	Negativo
65	Negativo	Negativo
66	Negativo	Negativo
67	Negativo	Negativo
68	Negativo	Negativo
69	Negativo	Negativo
70	Negativo	Negativo