



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Prevalência e distribuição de coinfeção por
dirofilariose e leishmaniose canina em Portugal**

JOANA CATARINA MATIAS DE LEMOS

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
PARASITOLOGIA MÉDICA**

outubro

2014



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Prevalência e distribuição de coinfeção por
dirofilariose e leishmaniose canina em Portugal**

Autora: Joana Catarina Matias de Lemos

Orientadora: Professora Doutora Silvana Maria Duarte Belo

Co-Orientadora: Doutora Carla Alexandra Soares Maia

Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Parasitologia Médica

*“A grandeza de uma nação pode ser julgada pelo modo como os seus
animais são tratados.”*

(Mahatma Gandhi)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que possibilitaram a realização deste trabalho, nomeadamente:

À coordenadora do projeto e minha orientadora Professora Doutora Silvana Belo, gostaria de agradecer por toda a ajuda disponibilizada, bem como por todos os conselhos dispensados.

À co-orientadora Doutora Carla Maia por toda a dedicação, paciência, sabedoria e simpatia dispensada aquando da realização do estudo.

Ao grupo de Técnicos e Investigadores de Protozoologia e Helminologia Médica pelo apoio técnico durante a realização do trabalho laboratorial, dando especial atenção ao Dr. José Cristóvão.

A todos os professores que partilharam conhecimentos durante o XII Mestrado de Parasitologia Médica.

Aos meus colegas de mestrado pela companhia durante estes dois anos.

À minha família, amigos e namorado pelo apoio.

RESUMO

A dirofilariose e a leishmaniose são doenças parasitárias causadas pelo nemátode *Dirofilaria immitis* e pelo protozoário *Leishmania infantum* respetivamente. Estas duas parasitoses de transmissão vetorial partilham não só a mesma distribuição geográfica como focos de endemicidade coincidentes. Portugal é considerado um país endémico para estas duas parasitoses, à semelhança dos outros países da bacia Mediterrânica.

O objetivo deste estudo foi estimar a prevalência de infeção por *D. immitis* e *L. infantum* em cães na zona centro de Portugal (Coimbra, Santarém e Setúbal) tendo-se estimado posteriormente a prevalência de coinfeção entre estas duas parasitoses. Para o efeito foi estudada uma população de duzentos e noventa e nove cães com idade superior a seis meses oriundos de diferentes canis pertencentes aos três distritos em análise.

A prevalência de *D. immitis* nos distritos de Coimbra, Setúbal e Santarém foi de 13,8%, 22,7% e 35,4% respetivamente, sendo a prevalência de *L. infantum* nos mesmos distritos de 1,06%, 2,7% e 2,3%. Constatou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2 = 13,417$; $P=0,001$) na prevalência de infeção por *D. immitis* inter distritos, tendo sido o distrito de Santarém o que revelou um maior número de casos positivos (46/77). Foram avaliadas associações entre parâmetros amostrais (idade, sexo e pelagem) e manifestações clínicas (lesões cutâneas, gânglios linfáticos, edema/ascite e auscultação) com as prevalências de cada uma das parasitoses tendo-se verificado uma associação estatisticamente significativa entre a infeção por *D. immitis* e a idade. Apenas um caso de coinfeção foi observado, no distrito de Setúbal, correspondendo a uma prevalência global de coinfeção de 0,33% (0,1-1,9; IC a 95%).

Este trabalho procurou compreender a situação de coinfeção e co-endemicidade atualmente presente em Portugal, numa perspetiva de promover medidas de controlo integradas para as duas parasitoses. A coinfeção não é significativa, devido possivelmente à baixa prevalência de infeção por *L. infantum*.

Palavras-chave: *Dirofilaria immitis*, *Leishmania infantum*, cães, prevalência, coinfeção;

ABSTRACT

Dirofilariasis and Leishmaniasis are infections caused by the parasitic nematode *Dirofilaria immitis* and the protozoan *Leishmania infantum*, respectively. These two vector-borne parasites share, not only the same geographic distribution, as well as similar endemic foci. As other Mediterranean countries, Portugal is also endemic for both parasitic diseases.

The aim of this study was to estimate the prevalence and co-infection caused by *D. immitis* and *L. infantum* in dogs in central Portugal regions (Coimbra, Santarém and Setúbal). For this purpose, 299 dogs, with more than six months old, housed in kennels from those districts were evaluated.

The prevalence of *D. immitis* in the districts of Coimbra, Setúbal and Santarém was 13.8%, 22.7% and 35.4%, respectively, while the prevalence of *L. infantum* was 1.06%, 2.3% and 2.7%, respectively. It was found a statistically significant association ($\chi^2 = 13.417$, $P = 0.001$) between the prevalence of *D. immitis* infection and the districts. Santarém was the district with more positive cases of *D. immitis* (46/77).

Associations between individual parameters (age, sex and body hair) and clinical manifestations (skin lesions, lymph nodes, oedema/ascites and respiratory signs) with the prevalence for each parasite were established. Statistically significant associations were only detected between *D. immitis* infection and the dog's age. Co-infection with both parasites was detected only in one case from the district of Setúbal [0.33% (0,1-1,9; 95% CI)].

This study sought to investigate the occurrence of co-infection and co-endemicity in those regions in order to design, if required, integrated control measures against dirofilariasis and leishmaniasis. It was found that co-infection is not significant, possibly due to the low prevalence of *L. infantum* infection.

Keywords: *Dirofilaria immitis*, *Leishmania infantum*, dogs, prevalence, co-infection;

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	II
ABSTRACT.....	III
ÍNDICE GERAL.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
1. Introdução.....	2
2. Revisão bibliográfica.....	4
2.1. Dirofilariose canina.....	4
2.1.1. Etiologia	4
2.1.2. Identificação e caraterização dos vetores.....	5
2.1.3. Identificação e caraterização do Hospedeiro definitivo/vertebrado	6
2.1.4. Ciclo biológico e transmissão <i>D. immitis</i>	7
2.1.5. Endossimbiose	9
2.1.6. Distribuição geográfica.....	10
2.1.7. Dirofilariose em Portugal.....	10
2.1.8. Patologia e clínica.....	12
2.1.9. Manifestações clínicas	12
2.1.10. Diagnóstico	13
2.1.11. Tratamento	15
2.1.12. Profilaxia.....	16

2.2.	Leishmaniose canina	17
2.2.1.	Etiologia.....	17
2.2.2.	Identificação e caraterização dos vetores.....	19
2.2.3.	Identificação e caraterização do Hospedeiro definitivo/vertebrado	20
2.2.4.	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.....	20
2.2.5.	Distribuição geográfica.....	22
2.2.6.	Leishmaniose em Portugal.....	23
2.2.7.	Patologia e clínica.....	25
2.2.8.	Manifestações clínicas	26
2.2.9.	Diagnóstico	27
2.2.10.	Tratamento	30
2.2.11.	Profilaxia.....	31
2.3.	Coinfeção e co-endemecidade entre dirofilariose e leishmaniose	33
3.	Objetivos.....	36
4.	Material e Métodos.....	38
4.1.	População canina estudada.....	38
4.2.	Critérios de inclusão.....	38
4.3.	Áreas geográficas em estudo.....	38
4.4.	Processamento das amostras biológicas.....	39
4.4.1.	Extração de ADN.....	40
4.4.2.	Diagnóstico laboratorial de <i>Dirofilaria</i> spp.....	40
4.4.3.	Diagnóstico laboratorial de <i>L. infantum</i>	41
4.5.	Análise estatística.....	44
4.6.	Considerações éticas e legais	45
5.	Resultados.....	47
5.1.	Caraterização geral da amostra	47

5.2.	Prevalência de <i>Dirofilaria</i> spp. e <i>L. infantum</i>	49
5.3.	Relação entre a idade, sexo e pelagem com a infecção por <i>D. immitis</i> e <i>L. infantum</i>	52
5.4.	Relação entre manifestações clínicas e infecção por <i>D.immitis</i> e por <i>L. infantum</i>	53
5.5.	Coinfecção por <i>Dirofilaria</i> spp e <i>L. infantum</i>	54
6.	Discussão e Conclusão	57
7.	Referências Bibliográficas.....	63
8.	Anexos.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia do parasita <i>Dirofilaria immitis</i> : A) adultos e B) microfíliarias.....	5
Figura 2 - Mosquito <i>Culex</i> fêmea. Ocular 10X e obj. 1X (adaptado de Seixas <i>et al.</i> , 2011).....	6
Figura 3 - Ciclo biológico de <i>D. immitis</i> (adaptado do <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> , 2014).....	7
Figura 4 - Observação microscópica da morfologia do parasita <i>Leishmania</i> (adaptado de http://www.icb.usp.br/livropar/img/capitulo5/8.html).....	17
Figura 5 - Ciclo de vida biológico do parasita <i>Leishmania infantum</i> (adaptado de Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2011).....	21
Figura 6 - Mapa da prevalência de LCan em Portugal (adaptado de <i>www.onleish.org</i>)	23
Figura 7 - Número de amostras de cães analisados em cada distrito estudado	47
Figura 8 - Frequência relativa dos grupos etários (anos) e do tipo de pelagem dos animais em estudo.....	48
Figura 9 - Frequência relativa à presença de lesões cutâneas e do aumento dos gânglios linfáticos nos cães em estudo.....	48
Figura 10 - Ilustração de um resultado positivo obtido pela técnica serológica ELISA (Original)	50
Figura 11 - Lâmina de IFI de uma amostra canina com anticorpos anti – <i>Leishmania</i> (Original)	50
Figura 12 - Representação gráfica da frequência absoluta de <i>D. immitis</i> nos distritos de Coimbra, Santarém e Setúbal (* <i>P</i> = 0,001)	51
Figura 13 - Mapa dos distritos em estudo relativamente à prevalência e coinfeção por <i>D. immitis</i> e por <i>L. infantum</i>	54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação taxonómica do parasita do género *Dirofilaria* segundo Anderson (2000) 4

Tabela 2 - Classificação taxonómica do parasita do género *Leishmania* segundo Kreutzer (1987)..... 18

Tabela 3 - Fases de amplificação de ADN de *L. infantum* através da técnica de PCR. . 42

Tabela 4 - Frequência relativa de amostras positivas e negativas segundo as técnicas de diagnóstico para deteção de infeção por *D. immitis* e *L. infantum* 49

Tabela 5 - Frequência relativa de resultados obtidos para a presença de *D. immitis* e *L. infantum* nos três distritos em estudo..... 51

Tabela 6 - Parâmetros físicos (idade, sexo e pelagem) em relação à infeção por *D. immitis* e *L. infantum*. 52

Tabela 7 - Manifestações clínicas em relação à infeção por *D. immitis* e *L. infantum*... 53

Tabela 8 - Caraterização dos parâmetros físicos e das manifestações clínicas dos cães seropositivos para *L. infantum*. 55

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADN** - Ácido desoxirribonucleico
- APC's** – Células Apresentadoras de antígenos
- C°** - Grau Celsius
- CD1/2/3/4** – Antígeno CD 1/2/3/4
- Cm** – centímetros
- CTAB** - Tampão de brometo cetiltrimetilamónio
- DCTV** - Doenças caninas transmitidas por vetores
- dNTP's** - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
- EDTA** - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- ELISA** – Ensaio imunoenzimático
- ESCCAP** - European Scientific Counsel Companion Animal Parasites
- FA** – Teste da Fosfatase ácida
- g** – g-force
- h** - Hora
- hab** – Habitante
- HCL** – Ácido clorídrico
- IFI** – Imunofluorescência Indirecta
- IFN – γ** – Interferão gama
- Ig's** – Imunoglobulinas
- IgM** – Imunoglobulina M
- IgG** – Imunoglobulina G
- OMS** – Organização Mundial da Saúde
- Km** – Quilómetros
- L1** – Primeira fase larvar de *D. immitis*, designada por microfilária
- L2** – Segunda fase larvar de *D. immitis*
- L3** – Terceira fase larvar de *D. immitis*
- L4** – Quarta fase larvar de *D. immitis*

- L5** – Quinta fase larvar de *D. immitis*
- LC** – Leishmaniose Cutânea
- LCan** – Leishmaniose canina
- LMC** – Leishmaniose Muco Cutânea
- LV** – Leishmaniose Visceral
- mA** – Miliamperes
- min** - Minutos
- mL** – Mililitros
- mM** – Milimolar
- mg** - Miligrama
- Mg²⁺** - Magnésio
- NaCl** – Cloreto de sódio
- PCR** – Polymerase chain reaction (Reacção em cadeia da polimerase)
- Pb** – Pares de base
- PBS** – Tampão fostato salino
- pH** – Potencial de hidrogénio
- seg** – Segundo
- TAE** - Tampão Tris-Acetato-EDTA
- Th2** – Resposta celular Th2
- Th1** – Resposta celular Th1
- TNF – α** – Factor de necrose tumoral alfa
- TMB** – Tetrametilbenzidina
- UNL** – Universidade Nova de Lisboa
- VIH** – Vírus da Imunodeficiência Humana
- WITNESS** – Teste rápido de deteção de antígenos circulantes (*Witness® Dirofilaria*)
- WHO** – World Health Organization
- μ l** – microlitro
- μ m** - micrómetro

1- INTRODUÇÃO

1. Introdução

Nos anos recentes tem-se vindo a verificar uma maior preocupação nos cuidados e tratamento de cães e de gatos. As medidas profiláticas e terapêuticas atualmente aplicadas possibilitam uma maior longevidade do animal de estimação no seio da sociedade moderna, estreitando a proximidade com o Homem e o seu núcleo familiar.

As doenças transmitidas por artrópodes vetores encontram-se em notável expansão por todo o mundo, devido a alterações climáticas, a trocas comerciais internacionais, à mobilidade da população humana e animal assim como ao aumento da resistência a fármacos e inseticidas por parte dos vetores e agentes patogénicos. De salientar que as mudanças ecológicas não se limitam meramente às alterações climáticas causadas pelo aquecimento global, compreendendo também fenómenos de urbanização e desflorestação (Otranto *et al.*, 2009).

Sendo assim, tanto os cães como os gatos estão expostos diariamente a parasitas e outros agentes estando o Homem em risco devido à transmissão zoonótica, sendo fundamental conhecer e entender todos os fatores de risco associados a essa mesma transmissão (Otranto *et al.*, 2009). Será de ressaltar a extrema importância na colaboração entre médicos veterinários e profissionais da saúde, na busca da concretização do conceito “*One Health*”.

A dirofilariose e a leishmaniose são zoonoses parasitárias transmitidas por insetos vetores, cujo principal hospedeiro é o cão. Como tal, neste estudo procurou-se determinar as prevalências de cada uma destas parasitoses na região centro de Portugal e a possível ocorrência de coinfeção na população canina.

Este trabalho encontra-se dividido em duas partes, a primeira que procura compilar de forma esquematizada uma revisão bibliográfica acerca das parasitoses em estudo, e a segunda parte composta pela componente prática, onde são apresentados os dados, resultados e possíveis conclusões.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. Revisão bibliográfica

2.1. Dirofilariose canina

2.1.1. Etiologia

A dirofilariose é uma doença parasitária de transmissão vetorial, causada por nemátodes do género *Dirofilaria* (Tabela 1), o qual se subdivide em dois subgéneros - o subgénero *Dirofilaria* que incluiu a espécie *Dirofilaria immitis* e o subgénero *Nochtiella* que inclui a espécie *Dirofilaria repens* (Manfredi *et al.*, 2007). Considera-se que o subgénero *Dirofilaria* possui cinco espécies válidas e sete questionáveis e que o subgénero *Nochtiella* possui vinte e duas espécies válidas e oito ainda questionáveis (Manfredi *et al.*, 2007).

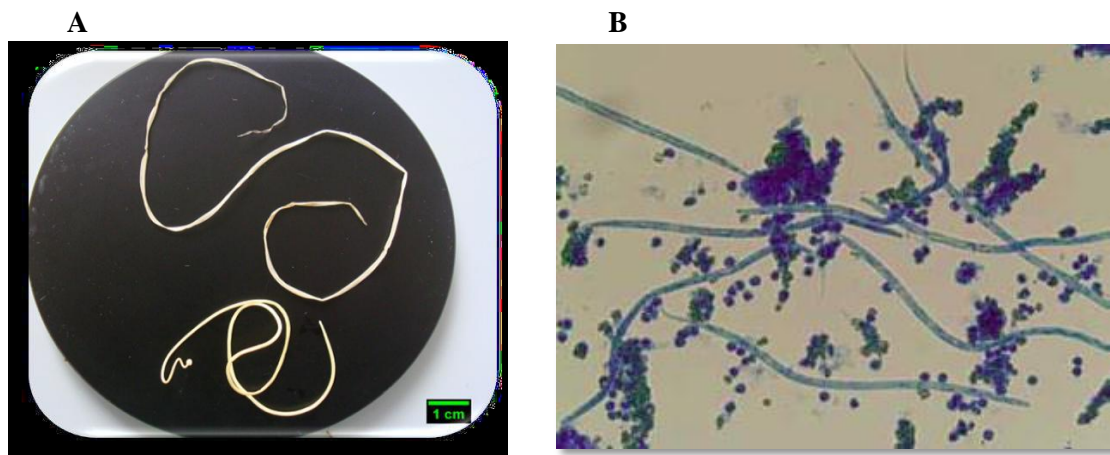
Tabela 1 - Classificação taxonómica do parasita do género *Dirofilaria* segundo Anderson (2000):

Reino	Animal
Filo	Nematoda
Classe	Secernentea
Ordem	Spirurina
Subordem	Spirurina
Superfamília	Filarioidea
Família	Onchocercidae
Subfamília	Dirofilarinae
Género	<i>Dirofilaria</i>

Em termos morfológicos os nemátodes *D. immitis* são brancos, alongados e filiformes com uma cutícula estriada e possuem uma cápsula bucal rudimentar. Apresentam um dimorfismo sexual acentuado, em que as fêmeas medem entre 25 a 31 cm e os machos entre 12 a 20 cm, sendo a extremidade posterior dos machos de forma

espiralada com duas espículas. As microfilárias são fusiformes e têm entre 218 a 240 μm (Bautista *et al.*, 1998).

Os nemátodes *D. repens* possuem uma tonalidade esbranquiçada, tendo as fêmeas dimensões entre 10 a 17 cm e os machos entre 5 a 7 cm. As microfilárias medem de 200 a 360 μm (Campillo & Vásquez, 1999). A locomoção destes nemátodes ocorre através da realização de movimentos ondulantes de contração e relaxamento muscular (Urquhart *et al.*, 1996). Uma vez presentes os dois sexos no hospedeiro vertebrado ocorre a cópula - as fêmeas são ovovivíparas, libertando as microfilárias descapsuladas ou na fase larvar L1, para a corrente sanguínea (Figura 1).



A - *Dirofilaria immitis* adultos (adaptado de Landum (2012));

B - Observação microscópica de microfilarias através da técnica de Knott modificado a 100x (adaptado de Seixas *et al.*, (2011))

Figura 1 - Morfologia do parasita *Dirofilaria immitis*: A) adultos e B) microfilarías

2.1.2. Identificação e caracterização dos vetores

Os vetores de dirofilariose são mosquitos pertencentes à família *Culicidae*, possuindo aproximadamente 70 espécies dos géneros *Aedes*, *Anopheles*, e *Culex* capazes de se infetarem com o parasita, embora apenas uma pequena percentagem destas espécies seja capaz de o transmitir (Bautista *et al.*, 1998). *D. repens* é transmitido maioritariamente por mosquitos do género *Anopheles* e *Aedes* e em menor grau pelo género *Culex*. A espécie *D. immitis* é transmitida principalmente por mosquitos dos géneros *Anopheles* e *Culex*, assumindo o género *Culex* o papel de vetor de maior importância (Seixas *et al.*, 2011). A competência vetorial do mosquito deve ser avaliada

de acordo com a sua capacidade em suportar o desenvolvimento do parasita até ao estágio larvar L3, considerado o estágio infetante (Vezzani & Carbajo, 2006). Em Portugal a espécie comprovadamente vetora de *D.immitis* é o *Culex theileri* e possivelmente o *C. pipiens*, *Aedes caspius* e *Anopheles atroparvus* (Araújo, 1996).

Os culicídeos são dípteros de 2 a 10 mm de comprimento, sendo apenas as fêmeas hematófagas (Figura 2). Após a refeição sanguínea as fêmeas podem pôr até 300 ovos na superfície da água, sendo o período de eclosão e maturação larvar dependentes da temperatura. Os quatro estádios larvares são aquáticos e alimentam-se de matéria orgânica (Seixas *et al.*, 2011).

Com o auxílio do vento estes dípteros possuem a capacidade de se dispersarem por longas distâncias (Urquhart *et al.*, 1996).



Figura 2 - Mosquito *Culex* fêmea. Ocular 10X e obj. 1X (adaptado de Seixas *et al.*, 2011)

2.1.3. Identificação e caracterização do Hospedeiro definitivo/vertebrado

Os principais hospedeiros de *D. immitis* são os cães, podendo infetar igualmente gatos, lobos, raposas, coiotes, furões, ratos, leões-marinhos, mustelídeos, ursos, pandas, coelhos, cavalos, veados, castores, primatas e raramente o Homem (Manfredi *et al.*, 2007). Considera-se que, à exceção do cão, a maioria das infeções nos restantes hospedeiros é esporádica, de microfilarémia transitória ou ausente (Manfredi *et al.*, 2007).

Os seres humanos são hospedeiros acidentais para a infecção por *D. immitis* uma vez que as larvas não se desenvolvem em formas adultas e conseqüentemente sem microfilarémia (Simón *et al.*, 2007).

2.1.4. Ciclo biológico e transmissão *D. immitis*

Os parasitas do género *Dirofilaria* caracterizam-se por possuírem um ciclo biológico heteroxeno (Figura 3) com um hospedeiro intermediário obrigatório denominado de artrópode vetor onde ocorrem dois estádios larvares e um hospedeiro definitivo, o cão ou outros mamíferos, onde ocorre a reprodução do parasita (Seixas *et al.*, 2011).

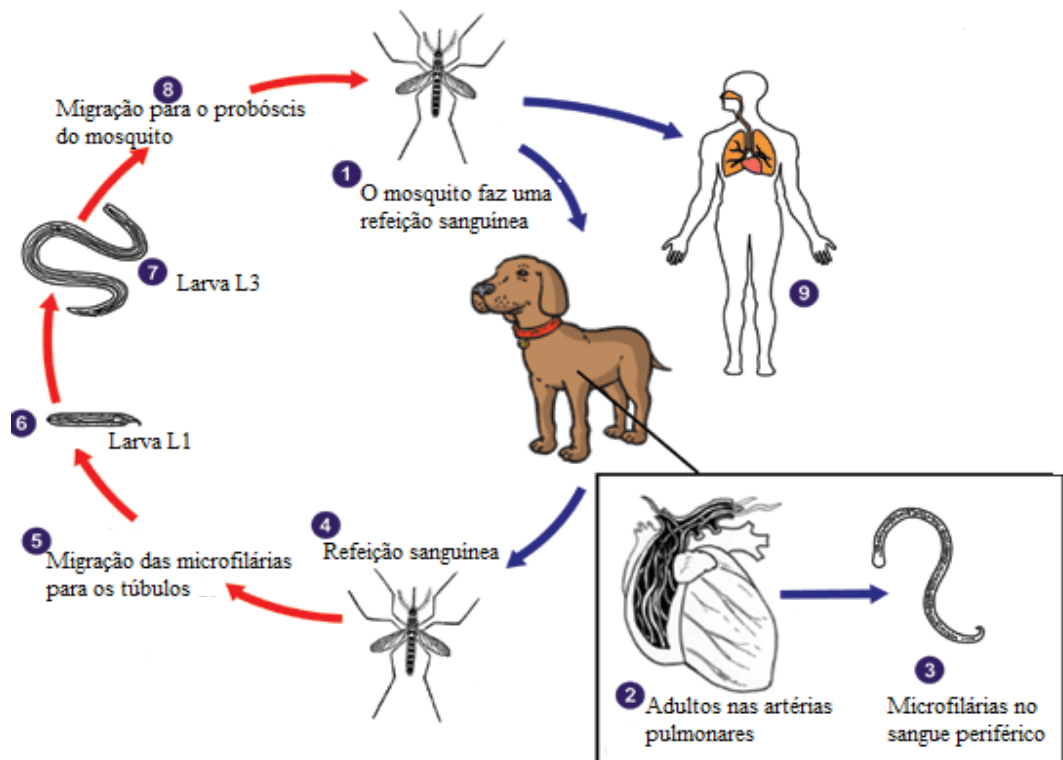


Figura 3 - Ciclo biológico de *D. immitis* (adaptado do *Centers for Disease Control and Prevention*, 2014)

O ciclo de vida de *D. immitis* caracteriza-se por ser longo comparativamente com o de outros nemátodes (6 a 9 meses). O mosquito fêmea infeta-se aquando da realização da refeição hematófaga num hospedeiro microfilarémico. Após a ingestão de microfilárias estas alcançam o intestino médio onde permanecem 24 a 36 horas, migrando posteriormente para as células dos túbulos de Malpighi tornando-se intracelulares (L1). Nestes últimos ocorre a evolução para L2 e desta para L3, sendo o terceiro estágio larvar infetante (McCall *et al.*, 2014). As L3 migram através do hemocélio, desde o abdómen para a cabeça, onde se instalam no aparelho bucal. (Ledesma & Harrington, 2011). O tempo de maturação até à fase larvar infetante dependerá da temperatura, podendo oscilar entre os 10 e os 14 dias, a temperaturas entre os 22 e os 30°C (McCall *et al.*, 2014). O desenvolvimento larvar cessa perante temperaturas inferiores a 14°C, sendo retomado uma vez aumentada a temperatura (Cancrini *et al.*, 2007).

Quando o mosquito fêmea faz novamente uma refeição sanguínea, as larvas L3 penetram na pele do hospedeiro definitivo, através da contusão causada pela picada do vetor, sendo a hemolinfa responsável pela manutenção da viabilidade larvar e locomoção. As larvas L3 migram pelos tecidos subcutâneos, musculares e adiposos onde continuam a sua maturação para L4 e L5. A muda de L3 para L4 demora cerca de 3 dias, enquanto a muda de L4-L5 ocorre em cerca de 2 meses, após migração tecidular. Através do auxílio de uma veia periférica as L5 imaturas migram pela corrente sanguínea até ao coração e artérias pulmonares, onde se desenvolvem até à fase adulta, 70 a 90 dias após infeção inicial (McCall *et al.*, 2014).

A maturação sexual ocorre cerca de 120 dias após infeção, sucedendo posteriormente a cópula, a fecundação e consequente produção de microfilárias. A deteção de microfilárias na corrente sanguínea do cão ocorre habitualmente a partir dos 6 a 9 meses após infeção (McCall *et al.*, 2014). Os vermes adultos possuem em média uma longevidade de 5-7 anos e as microfilárias de 30 meses (Shearer, 2011).

De salientar a periodicidade associada à microfilarémia, em que a concentração de microfilárias oscila ao longo do dia, sendo superior no fim da tarde e ao longo da noite. Esta oscilação é igualmente sazonal, sendo a Primavera e Verão os períodos em que existem maior número de microfilárias em circulação (Bowman *et al.*, 2009).

O parasita pode realizar o seu ciclo biológico igualmente em gatos, porém existem algumas diferenças, na medida em que estes parecem ser menos suscetíveis à infecção (Reifur & Montiani-Ferreira, 2011).

A transmissão de *D. immitis* não ocorre unicamente através de vetores culicídeos, apesar de estes representarem a via mais comum. A transmissão vertical por via transplacentária e por transfusão sanguínea são apontadas igualmente como possíveis vias capazes de propagar a infecção. Atendendo que apenas no vetor se completa o ciclo de vida, estas formas não terão importância epidemiológica (Monteiro, 2007).

O nematode *Dirofilaria repens* é igualmente um agente etiológico de dirofilariose. A deteção de microfírias no sangue periférico dos hospedeiros vertebrados é aperiódica, podendo ser efetuada em qualquer altura do dia. Estes parasitas têm como hospedeiros definitivos habituais o cão, o gato, assim como outros carnívoros selvagens, podendo o ser humano ser acidentalmente parasitado (Manfredi *et al.*, 2007).

2.1.5. Endossimbiose

Em 1975 McLaren e colaboradores observaram pela primeira vez a existência de organismos simbioses no interior das células de *D. immitis* e de outras filárias. Posteriormente, através da aplicação de metodologias moleculares determinou-se que os organismos no interior dos vermes adultos pertenciam à espécie *Wolbachia pipientis*, um endossimbionte comum em artrópodes (Bowman *et al.*, 2009). Este endossimbionte é reportado como possuindo efeitos benéficos sobre a fertilidade das filárias (Tabar *et al.*, 2013).

O parasita *D. immitis* alberga esta bactéria em todas as fases do seu ciclo de vida e encontram-se fundamentalmente nos ovos contendo as larvas L1 (transmissão vertical), sendo libertadas do parasita aquando da produção de microfírias, durante a maturação nos estádios larvares seguintes e durante a morte dos mesmos (Dingman *et al.*, 2010)

2.1.6. Distribuição geográfica

A dirofilariose causada por *D. immitis* é uma doença de distribuição mundial, encontrando-se presente em áreas tropicais, subtropicais e temperadas, sendo endêmica em áreas onde o clima e condições ambientais propiciam o elevado número de vetores capazes de transmitirem o parasita. Este clima caracteriza-se como sendo consideravelmente quente de verão associado à existência de lagos, rios ou terras irrigadas suscetíveis de permitir o desenvolvimento do vetor (Rey, 2005). As áreas de co-endemecidade para *D. immitis* e *D. repens* compreendem a Europa, Ásia, África, Austrália, América do Sul, Estados Unidos da América e Canadá. No entanto, nos últimos anos, tem-se vindo a verificar um aumento da prevalência desta doença em termos globais (Nematollahi & Barazandeh, 2010). A maioria dos casos de dirofilariose humana causados por *D. repens* foi detetada nos Estados Unidos da América (Simon *et al.*, 2007).

Na Europa os países do sul são os que possuem temperaturas mais favoráveis para a transmissão da dirofilariose canina, nomeadamente Portugal, Espanha, Sul de França, Itália e Grécia. Mais recentemente, diversos casos autóctones têm sido referidos em países da Europa central e do leste, comprovando a sua emergência em regiões tradicionalmente consideradas não endêmicas para a dirofilariose (Genchi, 2005). A patogenicidade para cães e gatos associada a uma infeção com *D. repens* é baixa, razão pela qual existem poucos estudos sobre a distribuição desta filária (Scaramozzino *et al.*, 2005).

Por outro lado tem-se observado que a prevalência das infeções por filárias, incluindo *D. immitis*, tem aumentado em cães não tratados com fármacos profiláticos, pelo que a existência de um elevado número de mosquitos vetores poderá potenciar o reaparecimento de dirofilariose em regiões anteriormente livres da doença (Cancrini *et al.*, 2007).

2.1.7. Dirofilariose em Portugal

A dirofilariose é uma das doenças parasitárias de maior relevância em Portugal, sendo as bacias fluviais do Tejo, Douro, Sado, Mondego e o arquipélago da Madeira

consideradas as principais zonas endémicas (Genchi *et al.*, 2005). Segundo a ESCAAP (*European Scientific Counsel Companion Animal Parasites*) Portugal é atualmente considerado uma zona hiperendémica para dirofilariose (ESCAAP, 2011).

No estudo realizado por Araújo (2006), as prevalências de dirofilariose canina encontradas foram de 16,7% no Ribatejo, 16,5% no Alentejo, 12% no Algarve e 30% na ilha da Madeira. Em 2012, Cardoso *et al.*, realizaram um rastreio serológico em cães aparentemente saudáveis e em animais com sinais clínicos compatíveis com agentes transmitidos por vetores, tendo obtido para cada um dos grupos seroprevalências de 2,9% e 3,4% para o Norte do país, 0,9% e 7,4% para a região Centro, 2,4% e 5,8% para Lisboa, 4,7% e 14% para o Alentejo, 5,1% e 17,1% para o Algarve, 0% para os Açores. Na Madeira a prevalência de infeção obtida em cães aparentemente saudáveis foi de 40%.

Os resultados parasitológicos e serológicos de inquéritos epidemiológicos realizados recentemente efetuados no país, confirmam a associação intrínseca da parasitose à temperatura (Alho *et al.*, 2014). Com efeito, as prevalências encontradas em Coimbra (13,0%), Santarém (15,3%) e Setúbal (19,0%), demonstram uma tendência de aumento da prevalência de Norte para o Sul, acompanhando o aumento da temperatura.

Apesar dos poucos estudos realizados ao nível dos felinos, os resultados do rastreio serológico de Almeida (2010) em gatos demonstraram uma prevalência de 1,2% na região de Setúbal. Miranda (2011) realizou um estudo na Sub-região do Baixo Vouga obtendo uma seroprevalência de 1,4% enquanto Ramos (2012) obteve uma prevalência de 5,9% na região de Olhão. No entanto, valores mais elevados de seroprevalência (15%) foram encontrados por Vieira *et al.*, (2014) em gatos das regiões Norte e Centro do país embora neste último estudo se tenha efetuado o diagnóstico de dirofilariose pela pesquisa de anticorpos, ou seja determinou-se o contacto com o parasita e não apenas infeções ativas como nos estudos anteriormente mencionados. Relativamente a estudos relacionados com a fauna silvestre, foram analisadas cinco lontras tendo-se encontrado *D. immitis* em duas delas (Morchón *et al.*, 2012).

Em Portugal e até ao momento apenas foi relatado um caso de dirofilariose humana, de localização ocular (Almeida, 2011 & Rosa, 2009).

2.1.8. Patologia e clínica

A dirofilariose cardiopulmonar é considerada a filariose mais preocupante e prevalente sendo a causa mais comum de morbidade e mortalidade canina em Portugal (Seixas *et al.*, 2011). A patologia causada por *D. immitis* não é exclusivamente cardíaca, podendo ocorrer lesões frequentes nas artérias e parênquima pulmonar, estando o grau da lesão relacionado com a carga parasitária e com a duração e a reação do hospedeiro ao parasita (Hoch & Strickland, 2008). A dirofilariose canina é uma infeção parasitária das artérias pulmonares, e em casos mais severos do lado direito do coração dos cães, sendo assim denominada igualmente de “doença do verme do coração” (Pereira, 2010).

A dirofilariose é de evolução crónica, sendo a maioria dos cães infetados portadores assintomáticos (ESCCAP, 2009). A fisiopatologia desta parasitose compreende alterações anatómicas provocadas pela presença de vermes nas artérias e consequente libertação de componentes tóxicos por parte dos vermes, desencadeando reações imunológicas intensas (Hoch & Strickland, 2008). Poderão ser desencadeados fenómenos de estenose, tromboembolismo e alteração do fluxo sanguíneo com hipertensão pulmonar, resultando a longo prazo num quadro de insuficiência cardíaca congestiva (ESCCAP, 2009).

2.1.9. Manifestações clínicas

Os sinais clínicos costumam caracterizar-se pela sua componente gradual e moderada, iniciando-se com uma tosse crónica que evoluiu para dispneia, prostração e síncope pós-excitação (Venco *et al.*, 2005).

Com o decorrer do desenvolvimento da insuficiência cardíaca, o animal pode apresentar anorexia, perda de peso progressiva, intolerância ao exercício e ascite. Poderá ocorrer igualmente distensão da veia jugular e pulso jugular tipicamente acompanhados por hepatoesplenomegalia (Calvert & Thompson, 2008). A Síndrome da Veia Cava é a manifestação mais grave de dirofilariose, causando falência cardíaca e consequente morte do animal. As infeções crónicas por *D. immitis* caracterizam-se por glomerulonefrite e proteinúria como resultado da deposição de complexos antigénio-anticorpo nos rins (Hoch & Strickland, 2008). Menos frequentemente ocorrem casos de

sintomatologia aguda com morte imediata ou após tratamento adulticida acompanhado de tromboembolismos graves (Mórchon *et al.*, 2011).

A presença do endossimbionte *W. pipientis* poderá contribuir igualmente para o agravamento da patologia, devido à disseminação bacteriana resultante da morte dos vermes após tratamento antiparasitário (Tabar *et al.*, 2013). A patologia desencadeada pelas microfilárias não é tão notória, podendo em casos mais extremos ocorrer hipersensibilidade cutânea.

Nos gatos a infeção caracteriza-se por ser de baixa carga parasitária e de microfilarémia ausente ou transitória (Kramer & Genchi, 2002).

2.1.10. Diagnóstico

A identificação dos animais infetados por *Dirofilaria* spp inclui o exame microscópico de amostras sanguíneas, testes serológicos de deteção de antigénio parasitário e de anticorpos anti-*Dirofilaria* e técnicas moleculares. Os testes de deteção de microfilárias em circulação ou testes serológicos de deteção de antigénios de *D. immitis* são os mais utilizados para identificar os animais infetados (Kittleson & Kienle, 1998). A diferenciação das espécies de microfilárias em circulação é muito importante, na medida em que existem filárias que não têm as consequências patogénicas de *D. immitis* para o hospedeiro como por exemplo *Acanthocheilonema (Dipetalonema) reconditum* (American Heartworm Society, 2012).

Testes de deteção de microfilárias: A visualização de microfilárias pode ser feita através de esfregaços sanguíneos afresco ou através de técnicas de concentração como a modificada de Knott. Esta técnica bem como a de coloração da fosfatase ácida permitem a diferenciação entre *D. immitis* e outras microfilárias tais como *D. repens* ou *A. reconditum* (Kittleson, 1999) através da sua morfologia. Possuem como desvantagem o facto de exigirem técnicos experientes, com conhecimentos na diferenciação morfológica das microfilárias (Venco, 2005). Outra desvantagem que possuem é o facto de até 20-30% de cães parasitados não apresentarem microfilárias e, apenas 20% dos gatos serem microfilarémicos (ESCAAP, 2009). Estes testes não permitem excluir a infeção, uma vez que não asseguram a deteção de infeções amicrofilarémicas, podendo

também ocorrer resultados falsos negativos, caso o número de microfilárias em circulação seja reduzido e/ou se a quantidade de sangue colhido for insuficiente (McCall, 2014).

Testes serológicos: Os testes serológicos utilizados na detecção de *D. immitis* incluem a Imunofluorescência indirecta (IFI), o ensaio imunoenzimático “Enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA), técnicas de hemaglutinação e de imunocromatografia (Goodwin, 1998). Os testes serológicos poderão aplicar-se à pesquisa de antígenos de *D. immitis* ou à pesquisa de anticorpos resultantes da infeção por este parasita. Os testes de pesquisa de antígenos são altamente específicos para detecção de vermes adultos do sexo feminino, estando a sua sensibilidade dependente do tempo de infeção e do número de parasitas (Nelson & Couto, 2010). Utilizam-se para o efeito kits comerciais de testes imunocromatográficos e de ELISA. Estes testes possuem alta especificidade e sensibilidade não existindo reações cruzadas com outras filárias que podem ser encontradas a parasitar os animais (ESCCAP, 2009). Existindo uma correlação entre a quantidade de antígenos circulantes e o número de fêmeas existentes, pelo que alguns destes testes permitem essa quantificação. Tem como desvantagem o facto de poderem apresentar resultados incorrectos, devido à morte dos parasitas, promovendo assim o aumento dos antígenos circulantes (Hoch & Strickland, 2008).

Podem também ocorrer falsos negativos se o exame for realizado antes do final do período pré-patente (6-9 meses) ou se existirem infeções só por machos ou com baixa carga parasitária (ESCCAP, 2009). De um modo geral são testes úteis na detecção de casos de infeções sem microfilárias em circulação (*American Heartworm Society*, 2012). Na detecção de anticorpos anti-*Dirofilaria* utiliza-se sobretudo a IFI, no entanto este teste só será positivo em cães que desenvolvem hipersensibilidade à presença das microfilárias e tem tendência a ser negativo em cães com resposta antigénica elevada, ou seja, em cães com um número elevado de microfilárias circulantes (Goodwin, 1998).

Segundo este autor, os níveis de anticorpos circulantes não se correlacionam com a gravidade da infeção, uma vez que dependerá da variabilidade dos anticorpos produzidos, com a fase de desenvolvimento do parasita e com as interacções parasita-hospedeiro. O teste de ELISA pode ser utilizado tanto na detecção de anticorpos como de antígenos específicos (Goodwin, 1998). Contudo a detecção de anticorpos não é

frequente em cães, devido à sua baixa especificidade e à existência de métodos mais específicos, nomeadamente pela detecção de antígenos (Ferasin & Knight, 2005).

Técnicas moleculares: A técnica de reacção em cadeia da polimerase (PCR) é uma importante alternativa para o diagnóstico de filárias possuindo uma forte importância em termos de diagnóstico. É considerada igualmente uma ferramenta bastante sensível e precisa na identificação de microfilárias de diferentes espécies capazes de infetar cães (Hoch & Strickland, 2008). Apesar dos esforços na detecção e identificação de ADN de nemátodes, a verdade é que poucos são os testes comerciais que estão disponíveis, e muitos destes são apenas utilizados ocasionalmente no diagnóstico de parasitoses (Hunt, 2011).

A utilização de testes complementares tais como o diagnóstico imagiológico (que compreende a realização de radiografias torácicas, angiografias pulmonares, e ecocardiogramas) e exames laboratoriais permitem a confirmação do diagnóstico, a determinação da gravidade da infeção e a fase da doença (McCall *et al.*, 2014).

2.1.11. Tratamento

O tratamento possui como principal objectivo a melhoria da condição clínica do canídeo, através da eliminação de todos os estádios de *Dirofilaria* existentes no hospedeiro vertebrado, sem com isso comprometer a vida do animal (McCall, 2014).

O tratamento adulticida é realizado através da administração de melarsomina via intramuscular profunda nos músculos lombares epaxiais (McCall, 2014). Os corticosteróides, a heparina, e o ácido acetilsalicílico são considerados terapêuticas adjuvantes (Venco, 2005). No tratamento microfilaricida os fármacos mais utilizados na eliminação de microfilárias são as lactonas macrocíclicas, sendo a milbemicina oxima o fármaco mais eficaz (Atkins, 2010). A ivermectina e milbemicina oxima- e fármacos tópicos - selamectina e moxidectina - actuam no ciclo biológico do parasita entre a fase larvar L3 e a produção de microfilárias (Nelson, 2010).

O tratamento cirúrgico consiste na remoção dos parasitas sendo considerada a metodologia de eleição em animais que se encontrem severamente infetados ou que

estejam em risco. Apes remoção cirúrgica dos parasitas o canídeo deverá ser submetido a tratamento adulticida para que desta forma se removam quaisquer parasitas remanescentes (Atkins, 2010).

Em cães com elevada microfilarémia, deverá ser efectuado previamente o tratamento anti-*Wolbachia* com antibiótico (tetraciclina) e posteriormente a terapêutica anti-parasitária, prevenindo assim as eventuais reacções anafiláticas (McCall, 2014).

2.1.12. Profilaxia

Ao nível do controlo vetorial deverá proceder-se ao controlo das populações de vetores culicídeos através da eliminação ou redução dos seus criadouros, da introdução de peixes predatórios (controlo biológico) e da utilização de insecticidas (Urquhart *et al.*, 1996). Quanto a medidas anti-vetoriais para o hospedeiro vertebrado recomendam-se a utilização de redes mosquiteiras, repelentes e insecticidas nas habitações e de aplicação individual (sprays, spot-ons e coleiras) (Urquhart *et al.*, 1996).

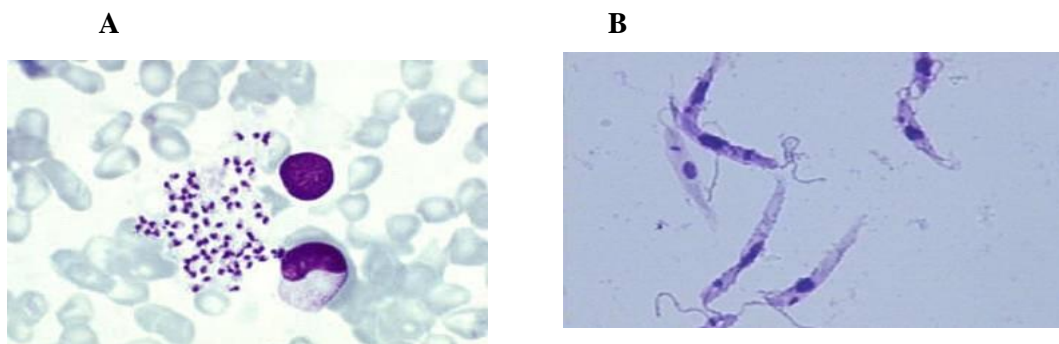
A profilaxia através da administração de lactonas macrocíclicas é recomendada a todos os canídeos que residam em zonas endémicas.

2.2. Leishmaniose canina

2.2.1. Etiologia

A Leishmaniose é uma doença parasitária causada por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*. Este protozoário infeta inúmeras espécies de mamíferos, incluindo Humanos, sendo responsável por diferentes formas clínicas: visceral, cutânea e mucocutânea. A gravidade desta parasitose depende não só da variabilidade genética das diferentes espécies de *Leishmania* como da resposta imunitária dos hospedeiros envolvidos (Dedet, 2002).

O parasita *Leishmania* é um protozoário dimórfico que se caracteriza por possuir dois estados morfológicos principais, a forma amastigota (Figura 3. A) que se encontra presente no sistema fagocítico mononuclear do mamífero e a forma promastigota (Figura 3. B) que se encontra presente no tracto intestinal médio do inseto vetor (Dedet, 2002). A forma amastigota caracteriza-se por ser intracelular, ovóide e mede $2 \times 4 \mu\text{m}$ de diâmetro. O citoplasma apresenta um núcleo excêntrico e bem visível, um cinetoplasto em forma de bastonete e um envelope flagelar de flagelo rudimentar. Estas formas não apresentam motilidade e são desprovidas de flagelo livre (Abranches, 1994). A forma promastigota é extracelular e fusiforme, com cerca de $15 \times 3 \mu\text{m}$ de diâmetro, possuindo na sua região anterior um flagelo livre que pode atingir $20 \mu\text{m}$ de comprimento, sendo a presença deste flagelo que lhe confere motilidade (Abranches, 1994).



A – Forma amastigota do parasita *Leishmania*, coloração Giemsa (Obj.100x)

B – Forma promastigota do parasita *Leishmania*, coloração Giemsa (Obj. 100x)

Figura 4 - Observação microscópica da morfologia do parasita *Leishmania* (adaptado de <http://www.icb.usp.br/livropar/img/capitulo5/8.html>)

O género *Leishmania* divide-se no subgénero *Leishmania* e subgénero *Viannia*, e dentro destes subgéneros ocorre uma individualização em diversos complexos filogenéticos, que incluem uma ou mais espécies diferentes (WHO, 2010). São conhecidas atualmente trinta espécies de *Leishmania*, sendo que vinte são patogénicas para o ser humano.

Tabela 2 - Classificação taxonómica do parasita do género *Leishmania* segundo Kreutzer (1987)

Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Filo	Sarcomastigophora
Subfilo	Mastigophora
Classe	Zoomastigophora
Ordem	Kinetoplastida
Subordem	Trypanosomatina
Família	Trypanosomatidae
Género	<i>Leishmania</i>

Uma vez que as espécies de *Leishmania* são indistinguíveis morfologicamente, outros critérios estão a ser utilizados na classificação das mesmas, nomeadamente caracteres extrínsecos como a sintomatologia, distribuição geográfica, hospedeiros e vetores, bem como caracteres intrínsecos tais como a imunologia, a bioquímica e a componente molecular específica para cada espécie do parasita. A metodologia de referência compreende a caracterização isoenzimática (Dedet, 2002). O principal zimodemo responsável pela maioria de casos de leishmaniose visceral no Mediterrâneo por *Leishmania infantum* é o MON-1, sendo igualmente o zimodemo predominante nos casos de leishmaniose canina (Campino *et al.*, 2006). Todavia a genotipagem é cada vez mais utilizada no estudo da variabilidade genética do parasita (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

2.2.2. Identificação e caracterização dos vetores

Os parasitas são transmitidos aos hospedeiros vertebrados por insetos pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae e sub família Phlebotominae. Os flebótomos vetores pertencem a dois géneros: *Lutzomyia* França, 1924 no Novo Mundo e *Phlebotomus* Rondani, 1843 no Velho Mundo (Afonso & Alves-Pires, 2008). O seu ciclo de vida inclui o estágio adulto que se movimenta no meio aéreo e os estádios imaturos (ovo, quatro estádios larvares e pupa) que se desenvolvem em meio terrestre rico em matéria orgânica (Killick- Kendrick, 1999).

Morfologicamente, os adultos são dípteros de reduzidas dimensões, com 2 a 5 mm, possuindo um abdómen com dimorfismo sexual acentuado, existindo no macho um conjunto de segmentos posteriores designados por genitália que ajudam a segurar a fêmea no momento da cópula (Urquhart *et al.*, 1996).

Ambos os sexos são fitófagos alimentando-se de sucos vegetais, contudo as fêmeas necessitam de uma refeição sanguínea para que ocorra o desenvolvimento gonotrófico. Durante o dia repousam em locais escuros e abrigados, apresentando um comportamento ativo ao crepúsculo e à noite, dependendo da espécie e da altura do ano (Afonso, 2011).

Quer os hábitos alimentares como a natureza do hospedeiro, de onde obtêm alimento, dependerá da espécie de flebótomo, sendo estes factores importantes na transmissão de *Leishmania* spp (Arruda, 2005). Assim sendo, populações vatorias que vivam perto de um reservatório desenvolverão uma maior capacidade de transmissão dos parasitas, uma vez que o voo dos flebótomos é limitado (Killick- Kendrick, 1999).

A existência de focos zoonóticos ou antroponóticos dependerá substancialmente da presença vatorial capaz de propagar os agentes infecciosos, da sua distribuição, densidade populacional, capacidade de dispersão e do tropismo da espécie para se alimentar de animais ou de seres humanos (Afonso & Alves-Pires, 2008). Na zona Mediterrânica, o inseto encontra-se ativo principalmente nos meses quentes, desde a Primavera até ao Outono (Afonso & Alves-Pires, 2008).

Em Portugal existem cinco espécies de flebótomos: *Phlebotomus perniciosus* (Newstead, 1911), *P. ariasi* (Tonnoir, 1921), *P. sergenti* (Parrot, 1917), *P. papatasi* (Scopoli, 1786) e *Sergentomyia minuta* (Rondani, 1843) (Afonso & Pires, 2008).

2.2.3. Identificação e caracterização do Hospedeiro definitivo/vertebrado

A maioria das leishmanioses são zoonoses e os hospedeiros vertebrados poderão compreender diversas espécies de mamíferos domésticos, peridomésticos e/ou selvagens. A espécie humana desempenha um papel de hospedeiro primário para a leishmaniose antroponótica e hospedeiro acidental na leishmaniose zoonótica (Arruda, 2005). De salientar que os hospedeiros vertebrados apresentam-se habitualmente bem adaptados ao protozoário em questão, desenvolvendo infecções persistentes e duradouras, não fatais, muitas das vezes sem desenvolverem sinais clínicos (Costa, 1998; Dedet, 2002).

O cão é considerado o principal hospedeiro e reservatório de leishmaniose visceral (LV) humana causada por *L. infantum* no Velho Mundo (sinónimo de *L. chagasi* no Novo Mundo). Em muitas áreas endémicas é possível considerar a ocorrência de dois ciclos de transmissão doméstica/peridoméstica pelo cão, e silvática pela raposa vermelha (*Vulpus vulpus*) que atuam simultaneamente, ligados através de um vetor comum responsável pela transmissão do parasita entre os dois ciclos (Campino & Maia, 2011).

2.2.4. Ciclo biológico de *Leishmania* spp

A leishmaniose é transmitida através da picada de um flebótomo fêmea infetado (Figura 5). Assim, quando um flebótomo fêmea efetua uma refeição hematófaga num hospedeiro vertebrado inocula na pele do mesmo formas promastigotas infetantes (promastigostas metacíclicos) (Figura 5-1C). Estas formas infetantes são fagocitadas pelos macrófagos da pele onde se transformam em amastigotas que iniciam um processo de multiplicação ativa, acabando por provocar a destruição da membrana da célula hospedeira e subsequente libertação dos parasitas que vão infetar novos macrófagos (Figura 5-1C). Os parasitas fagocitados podem permanecer no tecido subcutâneo, dando origem às formas clínicas de leishmaniose cutânea, ou invadir as células do sistema mononuclear fagocítico, como o baço, fígado, medula óssea, gânglios linfáticos e outros órgãos linfóides, causando a leishmaniose visceral (WHO, 2010). Quando um flebótomo fêmea efetua uma refeição hematófaga num hospedeiro

vertebrado infetado por *Leishmania* e com parasitas no tecido cutâneo ou sanguíneo, ingere os protozoários na forma amastigota (WHO, 2010).

Dentro do intestino dos insetos, as formas amastigotas transformam-se em promastigotas (Figura 5-1B). Para que possa ocorrer transmissão, os parasitas têm que sobreviver à ação das enzimas digestivas do hospedeiro invertebrado, evitarem serem expulsos do intestino durante a diurese e numa fase final, migrar para a zona anterior do estômago do vetor e libertarem-se do epitélio intestinal. Para atingirem este objetivo os parasitas sofrem várias fases, nomeadamente multiplicação e alterações morfológicas. Estas modificações permitem que as formas promastigotas metacíclicas se movam livremente e se posicionem junto à válvula estomodeal, possibilitando a sua expulsão do aparelho bucal quando o inseto efetua nova refeição sanguínea (Figura 5-1A). O tempo necessário para que o ciclo se complete no inseto é variável, dependendo da espécie de *Leishmania*, do vetor e das condições ambientais, geralmente oscilando entre os 6 a 14 dias (Marques, 2008).

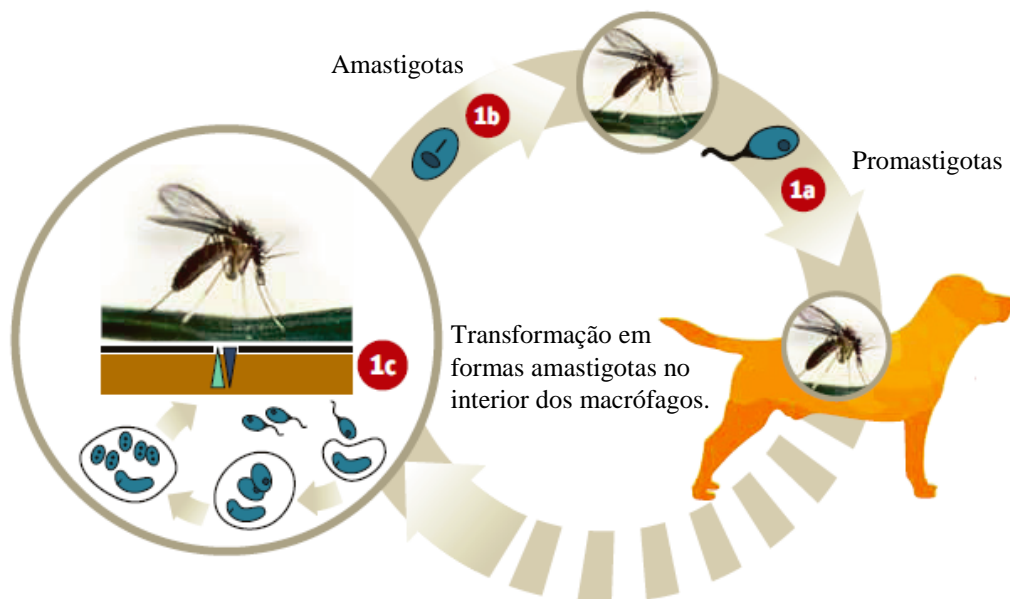


Figura 5 - Ciclo de vida biológico do parasita *Leishmania infantum* (adaptado de Solano-Gallego *et al.*, 2011)

A transmissão de *Leishmania* spp não ocorre unicamente através de vetores flebotômíneos, apesar de esta representar a via de transmissão mais comum. Como possíveis vias de transmissão no cão acrescenta-se a transmissão vertical, de índole venérea e a via iatrogénica - por transfusão de sangue (Gramiccia & Gradoni, 2005).

Foi aceite a hipótese de transmissão de *Leishmania* por contacto direto, entre cães, no Norte da Europa, onde é desconhecida a existência de vetores (Slappendel & Teske, 1999). Nos humanos o modo de transmissão não só abrange os anteriormente referidos para os cães como igualmente o transplante de órgãos e a partilha de seringas reutilizadas aquando do uso de drogas intravenosas (Campino *et al.*, 2005).

Apesar da carraça *Rhipicephalus sanguineus* e da pulga *Ctenocephalides felis* serem suscetíveis à infeção por *Leishmania chagasi*, a capacidade de transmissão do parasita por estes artrópodes a novos hospedeiros não se encontra comprovada (Coutinho *et al.*, 2005; Coutinho & Linardi, 2007). Contudo, é de salientar que em áreas endémicas as vias de transmissão do parasita, de real importância epidemiológica, recairão fundamentalmente na dependente do vetor flebotômíneo (Afonso, 2011).

2.2.5. Distribuição geográfica

A leishmaniose humana é uma doença endémica em 98 países, com mais de 350 milhões de pessoas em risco e com cerca de dois milhões de novos casos por ano (0,5 milhões de casos de leishmaniose visceral e 1,5 milhões de casos de leishmaniose visceral) (WHO, 2010).

A leishmaniose compreende três formas clínicas de doença, a LV, a mucocutânea (LMC) e a cutânea (LC), sendo que a LV é a forma cuja sintomatologia é a mais severa, sendo fatal em caso de não tratamento (WHO, 2010). A prevalência desta parasitose é mais elevada nas zonas intertropicais da América e África e regiões temperadas da América Latina, Europa e Ásia (Gramiccia, 2011).

A emergência e/ou reemergência desta parasitose, deve-se igualmente às modificações ambientais, às condições socioeconómicas, e à resistência dos parasitas e dos vetores aos fármacos e inseticidas em uso (Campino & Maia, 2010). O aumento da temperatura média, devido a alterações climáticas pode ocasionar a proliferação e a disseminação dos insetos vetores (Killick- Kendrick, 1999).

Relativamente à leishmaniose canina (LCan), os estudos de seroprevalência realizados nos últimos anos demonstram que em Portugal, Espanha, Itália e França existem cerca de 2,5 milhões de animais infetados (Campino & Maia, 2010).

2.2.6. Leishmaniose em Portugal

Em relação à leishmaniose humana em Portugal o primeiro caso de LV foi relatado por Dionísio Alvares em 1910, tendo ocorrido numa criança de nove anos e o primeiro caso de LC foi descrito em 1943 na região do Alto Douro (Campino *et al.*, 2006). Desde 1950 que a leishmaniose visceral humana é de notificação obrigatória, porém os números costumam ser vulgarmente subestimados. Ao longo dos anos estas parasitoses têm sido consideradas essencialmente infantis, porém verifica-se uma tendência crescente para a diminuição do número de casos pediátricos e um aumento da infeção em adultos imunocomprometidos (Campino & Maia, 2010).

Em relação à LCan, existem casos esporádicos por todo país (Campino *et al.*, 2006) (Figura 6).

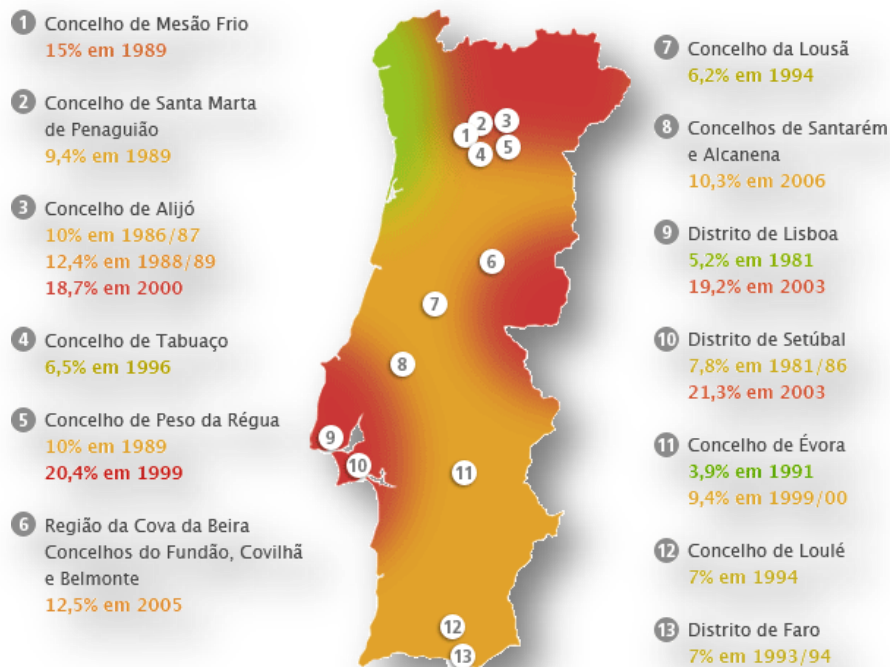


Figura 6 - Mapa da prevalência de LCan em Portugal (adaptado de www.onleish.org)

Na região Metropolitana de Lisboa, Abranches e colaboradores em 1987, obtiveram uma prevalência de 3,8% na zona urbana e de 8,8% na zona rural, tendo sido mais elevada (10,9%) no Parque Natural da Arrábida. Em 2003 na região Metropolitana de Lisboa em 374 cães (domésticos e errantes) os mesmos autores obtiveram uma prevalência de 19,2% de LCan. Este estudo comprovou a importância dos cães errantes na transmissão e propagação de novas infeções de *Leishmania* em áreas urbanas e periurbanas (Cortes *et al.*, 2007). Em 2008 Sousa *et al.*, constaram através de um estudo com amostras caninas obtidas em 2006 na área de Coimbra, 843 casos positivos para LCan e em 2007 com 100 amostras de sangue canino e de medula óssea obtidas na mesma área obtiveram uma prevalência de 10,1% e de 12,5% de LCan respetivamente. Num rastreio epidemiológico nacional realizado entre 2010-2011 em cães aparentemente saudáveis e em animais clinicamente suspeitos de estarem infetados por agentes transmitidos por vetores, as prevalências de *L. infantum* variaram entre os dois grupos 3,6% e 18,6% para a região Norte, 0,9% e 25,4% para a região Centro, 5,9% e 27,2% para o Alentejo, 7,9% e 30,2% para Lisboa e 3,8% e 25,7% para o Algarve (Cardoso *et al.*, 2012). Os resultados obtidos por Cortes *et al.*, (2012) realizaram um rastreio serológico envolvendo 3974 cães provenientes dos 18 distritos de Portugal Continental, demonstraram uma prevalência global de LCan de 6,31%, sendo para os distritos de Santarém, Coimbra e Setúbal 7,93%, 6,43% e 5,02% respetivamente.

Existem não só estudos sero-epidemiológicos como estudos de identificação de vetores infetados por leishmaniose. Em 2003 comprovou-se a responsabilidade de *P. ariasi* e *P. perniciosus* como vetores de *L. infantum* em Portugal (Cortes *et al.*, 2007).

Quanto à leishmaniose felina esta também tem sido estudada em Portugal, tendo o primeiro caso clínico sido referido em 1994 (Durão *et al.*, 1994). Dos vários estudos epidemiológicos realizados em Portugal continental (Maia *et al.* 2009, 2010, 2014 Vilhena *et al.*, 2013), a deteção de ADN do parasita no sangue periférico de gatos variou entre 0,3% no norte (Vilhena *et al.*, 2013) e 30,4% em gatos errantes residentes na região de Lisboa (Maia *et al.*, 2009).

2.2.7. Patologia e clínica

A histopatologia típica associada a LCan corresponde a uma reação de inflamação granulomatosa ao nível dos tecidos associados à presença de amastigotas no interior dos macrófagos (Baneth *et al.*, 2008).

Aquando da refeição sanguínea por parte do flebótomo vetor infetado, este transmite cerca de 100-1000 promastigotas, sendo a maioria destes mortos pelos factores do complemento. Os promastigotas sobreviventes aderem a células residentes ou recrutadas da linhagem monócito/macrófago, incluindo células dendríticas e de Langerhans. Durante o processo clássico da fagocitose, os lisossomas, que contêm hidrolases, fundem-se com o fagossoma (vacúolo parasitóforo), que contém o parasita, formando o fagolisossoma. No interior do fagolisossoma o parasita encontra as condições ideais para a sua sobrevivência e posterior transformação na forma amastigota (Rosenthal, 1996). A multiplicação dos parasitas é seguida de rutura da célula parasitada, sendo as formas amastigotas fagocitadas por outros macrófagos. A infeção por *Leishmania* induz o recrutamento de mais monócitos/macrófagos para o local da infeção, possibilitando, assim, a disseminação do parasita (Belkaid, 2000).

Nos animais suscetíveis à infeção ocorre a disseminação dos parasitas para os gânglios linfáticos, baço e medula óssea enquanto nos animais resistentes os parasitas mantêm-se localizados na pele (ou apenas atingem os gânglios linfáticos locais) (Belkaid, 2000).

O desenvolvimento da resposta imunitária protetora anti-*Leishmania* é um processo muito complexo que consiste na apresentação de antígenos apropriados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), a indução e expansão dos linfócitos T “helper” (Th) Th1 CD4⁺, e a ativação dos macrófagos para a destruição dos parasitas (Solbach & Laskay, 2000).

O tipo de resposta desenvolvida pelo animal infetado será crucial na evolução da doença. No caso do desenvolvimento de uma resposta de origem celular os linfócitos T helper (Th1) estimulam a produção de interferão gama (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2) e do factor de necrose tumoral alfa (TNF- α) levando à indução da ação leishmanicida dos macrófagos com concomitante controlo da infeção permanecendo o hospedeiro sem manifestações clínicas aparentes (Baneth, 2008). Em contrapartida, os animais que desenvolvem uma resposta predominantemente do tipo humoral, contam com uma

elevada produção de anticorpos, desenvolvendo quadros clínicos severos de prognóstico reservado devido à deposição de complexos imunes (Lopez *et al.*, 1996).

Não obstante, é de salientar que nos cães infetados não existe uma clara distinção entre a resposta Th1 e Th2, ocorrendo uma resposta imunitária que resulta de uma combinação entre estas duas, em que o controlo da replicação do parasita e a progressão da doença ou cura serão determinados pelo equilíbrio entre ambas as respostas.

Portanto a evolução clínica da LCan resulta de um conjunto complexo de interações entre o parasita e o perfil genético e imunológico do hospedeiro. Nos animais considerados sintomáticos, ocorre fundamentalmente uma resposta do tipo humoral com opressão da resposta celular contra o parasita, com o concomitante desenvolvimento de sinais clínicos. Por outro lado, nos animais assintomáticos/ resistentes ao parasita ocorre sobretudo uma resposta do tipo celular com a inibição de manifestações clínicas aparentes (Maia & Campino, 2012).

2.2.8. Manifestações clínicas

O quadro clínico no cão com leishmaniose é muito variável na medida em que a diversidade de mecanismos patogénicos, a progressão da doença e das diferentes respostas imunes depende do animal infetado (Abranches, 1998).

A LCan é uma doença sistémica crónica com envolvimento viscerocutâneo, atingindo qualquer órgão, tecido e fluido biológico, manifestando-se através de sinais clínicos inespecíficos. A sintomatologia clínica mais comum são as lesões cutâneas, linfadenopatia generalizada, emagrecimento, atrofia muscular, onicogribose (hipertrofia ungueal), incapacidade de praticar exercício, redução do apetite, letargia, esplenomegália, poliúria, polidipsia, lesões oculares (conjuntivites, uveítes, querato – conjuntivites) epistáxis, vômitos e diarreias (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Ou seja as lesões mais importantes ocorrem ao nível dos rins, fígado, órgãos linfóides e pele, contudo também se podem encontrar lesões ósseas e articulares e ao nível do sistema nervoso central (Alvar *et al.*, 2004).

As lesões cutâneas podem ocorrer isoladamente, sem mais sinais clínicos óbvios de doença sistémica. De acordo com Alexandre-Pires & Correia (2008) ocorrem lesões

básicas de dermatite crónica proliferativa, que também se manifesta como dermatite descamativa-pustular, ulcerativa ou nodular. Grande percentagem de animais afetados desenvolve alopecias progressivas e simétricas, localizadas na face, na região periaocular e perilabial, que se estendem posteriormente por todo o corpo. Frequentemente, os animais apresentam feridas ulcerativas e de difícil cicatrização, variando a prevalência de lesões cutâneas em cães com leishmaniose entre os 56% e os 90%.

A inexistência de sinais patognomónicos torna o diagnóstico diferencial bastante extenso, uma vez que existem inúmeras patologias que poderão apresentar uma sintomatologia semelhante (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Os sinais clínicos causados por esta infeção, em gatos, não estão ainda bem definidos, no entanto na leishmaniose felina causada por *L. infantum* as lesões mais frequentes são a dermatite nodular e ulcerocrostosa, alopecia e descamação (Ayllón *et al.*, 2008).

2.2.9. Diagnóstico

A LCan é um problema de Saúde Pública e veterinária muito importante, pelo que o diagnóstico e tratamento precoce permitem um controlo mais eficaz ao nível da prevenção e da transmissão quer entre animais quer para o ser humano (Maia & Campino, 2008).

O diagnóstico definitivo da LCan pode revelar-se complexo, uma vez que nem todos os animais infetados com o parasita desenvolvem manifestações clínicas. Este facto não pode ser negligenciado uma vez que, apesar de assintomáticos os cães portadores são infecciosos para os vetores (Campino & Maia, 2012).

Para que se proceda a um diagnóstico correto de leishmaniose é necessário conhecer os testes de diagnóstico, tendo em conta as suas limitações e a sua correta interpretação clínica. O diagnóstico da LCan deve basear-se numa abordagem integrada (Maia & Campino, 2008) e considerar a história clínica, os dados laboratoriais não-específicos (hemograma, análises bioquímicas séricas/plasmáticas, proteinograma e urianálise), e/ou os métodos laboratoriais específicos como os parasitológicos (com a

observação do parasita ou detecção do seu ADN) e/ou serológicos (que avaliam a resposta imunitária específica do hospedeiro).

Diagnóstico parasitológico: O exame direto consiste na observação, ao microscópico ótico, de preparações do material biológico, após coloração por *Giemsa* ou *Leishman*. A visualização de uma só célula parasitada é patognomónica da infeção por *Leishmania* (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Na maior parte dos casos o diagnóstico é efetuado a partir de biópsias da medula óssea, de pele, de punção dos gânglios linfáticos ou raspados de lesões cutâneas (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Esta técnica é rápida e económica, possuindo uma elevada especificidade, tendo como principal desvantagem a sua baixa sensibilidade principalmente em cães assintomáticos, devido à baixa carga parasitária (Solano-Gallego *et al.*, 2009). De acordo com Alvar *et al.*, (2004), o exame direto de esfregaços de medula óssea e de gânglios linfáticos de cães infetados apresenta uma sensibilidade de 60-75% e 30-35% respetivamente. O exame cultural é mais sensível que o exame direto, aumentando assim a probabilidade de sucesso do diagnóstico. Este parasita cresce bem em diversos meios de cultura a uma temperatura de incubação de 24-26°C. O meio de cultura mais comumente utilizado para o seu isolamento é o agar-sangue de *Novy* e *McNeal* modificado por *Nicolle* – *NNN* (Gontijo & Carvalho, 2003). Apesar de apresentar 100% de especificidade, a obtenção do resultado é demorada e condicionada pela ausência de contaminação bacteriana ou fúngica das culturas. É também necessário ter em conta que nem todos os isolados crescem em meio de cultura e que um resultado negativo com suspeita clínica não significa que o animal não se encontre infetado pois a distribuição dos parasitas nos tecidos e nos diferentes órgãos não é homogénea (Maia & Campino, 2008). O isolamento do parasita em meio de cultura a partir de tecidos infetados não é portanto o mais adequado para a realização de um diagnóstico rápido, possuindo uma sensibilidade mais baixa que a obtida por metodologias serológicas ou moleculares (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Diagnóstico serológico: Esta metodologia consiste na pesquisa de anticorpos circulantes anti-*Leishmania* (IgG e IgM) através de técnicas serológicas. Devido à baixa sensibilidade dos testes parasitológicos tornou-se necessário investir em metodologias de diagnóstico capaz de detetar a infeção, mesmo em casos assintomáticos. Geralmente os animais infetados com leishmaniose desenvolvem uma resposta imune humoral,

sendo habitualmente bastante intensa com a produção de altos níveis de imunoglobulinas sobretudo da classe IgG. Apesar da produção de anticorpos ser baixa na fase inicial e final da infeção, bem como em casos assintomáticos, os cães usualmente tendem a aumentar de forma gradual os títulos de anticorpos (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Os testes serológicos utilizados no diagnóstico da leishmaniose devem ter em conta que a presença de anticorpos específicos não está necessariamente associada à fase ativa da doença e que após o tratamento os títulos de anticorpos podem permanecer elevados durante anos (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Vários testes serológicos foram desenvolvidos, sendo a técnica de IFI, ELISA e os kits rápidos imunocromatográficos os mais utilizadas para a deteção de anticorpos anti-*Leishmania* (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Teste de Imunofluorescência Indireta (IFI) – A sensibilidade e especificidade desta técnica ronda os 100% em animais sintomáticos (Maia & Campino, 2008) e, por essa razão é considerado o método serológico de referência pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) (Gradoni & Gramiccia, 2000). No entanto a sensibilidade da técnica decresce em cães assintomáticos, ou seja, clinicamente saudáveis (Solano-Gallego *et al.*, 2009). De salientar que esta técnica exige um elevado nível de experiência e equipamento laboratorial dispendioso, nomeadamente microscópio de fluorescência. Outra das limitações é o facto de se ter de realizar diluições seriadas, o que torna a técnica bastante morosa e pouco prática quando é necessário testar um elevado número de amostras (Maia & Campino, 2008). No entanto a IFI permite o seguimento da evolução da doença e o estudo ao nível do efeito do tratamento, através da análise dos títulos de anticorpos, que reduzem em caso de cura clínica ou aumentam perante agravamento ou recaída (Faria, 2008).

“*Enzyme-linked immunosorbent assay*” (ELISA) – A aplicação do conjugado associado a uma enzima (peroxidase ou fosfatase) e a um substrato apropriado ao tipo de enzima presente permite a realização da leitura dos resultados (Fonseca, 2008). De acordo com alguns autores e dependendo da utilização de amastigotas ou promastigotas como antigénio, o método apresenta uma

especificidade de 100% e uma sensibilidade de 94,1-100% em cães assintomáticos e de 100% em sintomáticos (Maia & Campino, 2008). A utilização de antígenos recombinantes aumenta a sensibilidade da técnica (Solano-Gallego *et al.*, 2009) além de se tratar de uma metodologia rápida, que permite a análise de um grande número de amostras em simultâneo e em pouco tempo (Maia & Campino, 2008).

Diagnóstico molecular: Este tipo de diagnóstico é relativamente rápido ao detetar o ADN do parasita através da sua amplificação. São testes bastante fiáveis, na medida em que permitem a deteção e identificação do parasita, não apenas em casos de doença, mas igualmente em casos assintomáticos e na avaliação da eficácia da terapêutica (Maia & Campino, 2008). A PCR realizada em amostras de medula óssea, gânglios linfáticos, baço e pele apresenta elevada sensibilidade e especificidade no diagnóstico de LCan. De ressaltar que a realização de PCR em amostras de sangue total e buffy coat apresentam uma sensibilidade substancialmente mais baixa em comparação com as amostras anteriormente descritas (Maia *et al.*, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2009). De facto, a duração e intensidade da parasitemia no hospedeiro são desconhecidas, pelo que a PCR a partir de amostras de sangue pode levar a resultados falsos negativos. Por outro lado, podem ocorrer falsos positivos se a amostra for colhida durante a época de transmissão, devido a contaminação natural ou infeção transitória (Maia & Campino, 2009).

Os resultados laboratoriais de cada técnica devem ser interpretados adequadamente, pois uma PCR positiva apenas nos indica que o animal se encontra infetado, assim como uma serologia positiva apenas indica que houve infeção e resposta do tipo humoral (Fonseca, 2008). Assim deve-se sempre recorrer a um conjunto de técnicas complementares de diagnóstico de modo a confirmar a suspeita clínica.

2.2.10. Tratamento

O tratamento da LCan é habitualmente dispendioso, de longa duração e, por vezes ineficaz. Na maioria dos casos, um cão sujeito a tratamento não consegue a eliminação total dos parasitas, mas apenas a diminuição dos sinais clínicos, continuando a ser

portador de parasitas mas com menor capacidade de infetar os vetores (Campino & Maia, 2012).

Os únicos fármacos licenciados na Europa para o tratamento de LCan são os antimoniais pentavalentes (antimoniato de meglumina) – a aminosidina e a miltefosina. A combinação dos antimoniais pentavalentes com o alopurinol é considerada a terapêutica mais eficaz, constituindo o tratamento de primeira linha no combate da LCan (WHO, 2010).

2.2.11. Profilaxia

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010) as estratégias de controlo devem incidir sobre: i) os vetores, nomeadamente nas vertentes biológicas, ecológicas e químicas; ii) o parasita, erradicando-o nos hospedeiros através do tratamento dos doentes e dos reservatórios sempre que possível; iii) proteção da população humana e canina. Adicionalmente, o desenvolvimento de vacinas deve ser encorajado uma vez que a vacinação é uma das medidas de controlo mais promissoras.

Os piretróides são os inseticidas mais comumente utilizados devido à sua atividade anti-flebotomínica. De salientar a importância do uso destes inseticidas no interior das habitações, através da utilização de redes mosquiteiras impregnadas e em áreas peridomésticas, através da pulverização. A limpeza dos locais de produção animal, bem como a aplicação de inseticidas em possíveis habitats de desenvolvimento dos flebotomíneos, contribuirá para o controlo dos vetores exofílicos (Afonso, 2011).

Associada à eliminação dos vetores biológicos, dever-se-á preservar a saúde animal através da prevenção da picada pelo vetor (Campillo *et al.*, 1999). Para o controlo da infeção nos canídeos as medidas a implementar são: i) a manutenção do animal no interior das habitações desde o anoitecer até ao amanhecer; ii) a redução dos microhabitats favoráveis ao desenvolvimento do vetor e iii) tratamento tópico com inseticidas (através da aplicação de sprays, spot-on ou coleiras) contra os vetores (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Para além do cão existem outros animais, muitos deles silváticos (raposas, roedores etc.) que atuam como reservatórios, pelo que o controlo dos mesmos será de difícil concretização (Campillo *et al.*, 1999).

A vacina CaniLeish® composta por proteínas de excreção - secreção de *L. infantum* e extrato purificado de *Quillaja saponária* como adjuvante, é a primeira

comercialmente disponível na Europa (Moreno *et al.*, 2012) contribuindo para a diminuição do número de cães que progridem para um estado sintomático da doença. Tendo em conta que nenhuma medida preventiva garante 100% de eficácia contra a picada do flebótomo, o ideal em regiões endémicas, será a realização do controlo do vetor e proteção do hospedeiro em simultâneo. Se estas medidas forem aplicadas de forma adequada, irão contribuir não só para a diminuição da incidência da LCan, como baixar a densidade populacional do vetor, reduzindo a possibilidade do Homem adquirir o parasita (Afonso & Alves-Pires, 2008).

2.3. Coinfeção e co-endemecidade entre dirofilariose e leishmaniose

As doenças caninas transmitidas por vetores (DCTV) algumas delas zoonoses emergentes, ocorrem com muita frequência e com altas taxas de morbidade em zonas endêmicas, sendo os cães os hospedeiros potenciais e preferenciais para a proliferação destas doenças (Day, 2011). As DCTV são causadas por diferentes agentes, ressaltando-se as bactérias e os parasitas que são transmitidos aos cães por diferentes artrópodes vetores, particularmente por carrças e insetos (Otranto *et al.*, 2009).

Os parasitas *D. immitis*, *L. infantum* e as bactérias *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* e *Anaplasma platys* são os agentes que mais comumente se encontram em cães (Day, 2011). Os cães podem ser simultaneamente infetados por mais do que um agente etiológico, uma vez que estão expostos a artrópodes vetores podendo eles mesmos estarem infetados quer apenas por um, como por vários agentes patogénicos (Cardoso *et al.*, 2010). A coinfeção no cão poderá desencadear um quadro patológico severo, intensificando a sintomatologia clínica causada pelos diferentes agentes a título individual (Irwin & Jefferies, 2004).

A rápida disseminação de artrópodes e de DCTV em combinação com diversos factores tais como alterações climáticas e ambientais, mudanças na dinâmica populacional animal e humana e o aumento do intercâmbio de bens diversos, desempenham um papel crucial na reintrodução e manutenção de novos vetores e agentes patogénicos em áreas anteriormente livres de doença (Otranto *et al.*, 2005).

Nos anos recentes, tem-se verificado um aumento da prevalência das filarioses, no Sul da Europa, com maior incidência no Sul de Espanha, onde a leishmaniose é igualmente endémica (Cardoso *et al.*, 2012). Como tal, a coinfeção e coendemecidade entre filarioses e leishmaniose é passível de ocorrer na bacia Mediterrânica, uma vez que esta é uma área endémica para ambas as parasitoses (Irwin & Jefferies, 2004). Tendo em conta que a generalidade dos vetores alimenta-se indiscriminadamente em reservatórios animais, incluindo humanos, em áreas endémicas de leishmaniose e dirofilariose existe o risco do Homem contrair ambas as parasitoses desde que residam nas mesmas áreas endémicas (Simón *et al.*, 2009). Apesar desta possibilidade, poucos estudos têm sido efectuados na população canina envolvendo as duas parasitoses (Simón *et al.*, 2009).

No entanto, num estudo realizado no Sul de Espanha por Tabar *et al.*, (2013) para avaliar o nível de coinfeção entre a leishmaniose e filarioses (*D. immitis*, *D. repens*, *A. drancunculoides*), os autores verificaram que 29 dos 118 cães analisados pela técnica de PCR se encontravam coinfectados e que estes animais apresentavam um agravamento do quadro clínico em comparação com os animais apenas infetados por *Leishmania* spp ou por *D. immitis*.

Um outro estudo realizado por Cardoso *et al.*, (2012) em Portugal continental e ilhas, a prevalência de coinfeção *D. immitis* e *L. infantum* foi de 0,4% no grupo de cães aparentemente saudáveis e de 1,1% nos animais com sinais clínicos compatíveis com doenças transmitidas por vetores. Estes autores concluíram que *L. infantum* quer individualmente como em coinfeção, seria o principal agente implicado na doença dos cães, tendo uma maior prevalência nos animais suspeitos de DCTV.

Quanto à coinfeção em felinos, Ramos (2012) efectuou um estudo em gatos residentes na região de Olhão, tendo observado uma prevalência de co-infeção *Leishmania* spp e *Dirofilaria immitis* de 1,47% (1/68).

3 - OBJETIVOS

3. Objetivos

Atendendo ao exposto previamente e à reduzida informação no país sobre a coinfeção canina por estes dois agentes parasitários, o presente trabalho tem como principais objetivos:

- a) Determinar a prevalência de *D. immitis* e de *L. infantum* e avaliar a ocorrência de coinfeção por ambos os parasitas em cães residentes em três distritos de Portugal Continental (Coimbra, Setúbal e Santarém);

- b) Analisar os fatores de risco associados à mono-infeção e à coinfeção por *D. immitis* e *L. infantum* na população canina alvo do estudo.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4. Material e Métodos

4.1. População canina estudada

A população em estudo foi constituída por 299 cães pertencentes a instituições de acolhimento, nomeadamente canis. No total obtiveram-se amostras de oito canis pertencentes aos três distritos em estudo, três de Coimbra, quatro de Santarém e dois de Setúbal.

Para cada animal foi preenchido um inquérito que visava obter informações relativamente a cada cão nomeadamente, idade, sexo, pelagem e sinais clínicos compatíveis com as parasitoses em estudo, tais como: lesões cutâneas, edemas, gânglios linfáticos e avaliação respiratória. Ainda no exame clínico efetuado pelos Médicos Veterinários, foram investigados outros dados relevantes e adicionais relativos à sintomatologia e outras doenças concomitantes. A recolha dos dados e das amostras em questão decorreu em quatro períodos distintos, de Outubro/2011 a Novembro/2013.

4.2. Critérios de inclusão

Tendo em consideração o ciclo de vida do parasita, nomeadamente o período pré-patente mínimo descrito, a amostra incluiu apenas cães de idades iguais ou superiores a seis meses.

4.3. Áreas geográficas em estudo

A área geográfica do presente estudo compreende três distritos de Portugal Continental, nomeadamente Coimbra, Santarém e Setúbal.

O distrito de Coimbra encontra-se delimitado a norte pelos distritos de Aveiro e Viseu, a leste pelo distrito de Guarda e Castelo Branco, a sul pelo distrito de Leiria e a oeste pelo oceano Atlântico. Este distrito engloba dezassete concelhos: Arganil, Cantanhede, Coimbra, Condeixa-a-Nova, Figueira da Foz, Góis, Lousã, Mira, Miranda do Corvo, Montemor-o-Velho, Oliveira do Hospital, Pampilhosa da Serra, Penacova, Penela, Soure, Tábua e Vila Nova de Poiares. Apresenta uma área totalizando 3,974

km² (Censos 2011). Uma vez atravessado pelo rio Mondego, apresenta um clima do tipo mediterrâneo sendo tendencialmente frio (Governo Civil do distrito de Coimbra, 2014).

O distrito de Santarém encontra-se delimitado a norte pelos distritos de Leiria e Castelo Branco, a leste pelo distrito de Portalegre e a sul pelos distritos de Évora e Setúbal e a oeste pelos distritos de Lisboa e Leiria. Este distrito engloba vinte e um concelhos: Abrantes, Alcanena, Almeirim, Alpiarça, Benavente, Cartaxo, Chamusca, Constância, Coruche, Entroncamento, Ferreira do Zêzere, Golegã, Mação, Ourém, Rio Maior, Salvaterra de Magos, Santarém, Sardoal, Tomar, Torres Novas e Vila Nova da Barquinha. Apresenta uma área geográfica totalizando os 6 747 km² (Censos de 2011). Apresenta um clima sul-mediterrâneo temperado, influenciado pelo rio Tejo, com fracas declives (Governo Civil do distrito de Santarém, 2014).

O distrito de Setúbal encontra-se delimitado a norte pelos distritos de Lisboa e Santarém, a leste pelos distritos de Évora e Beja e a sul pelo distrito de Beja, tendo a oeste o Oceano Atlântico. Este distrito engloba treze concelhos: Alcácer do Sal, Alcochete, Almada, Barreiro, Grândola, Moita, Montijo, Palmela, Santiago do Cacém, Seixal, Sesimbra, Setúbal e Sines. Apresenta uma área de 5 064 Km² (Censos de 2011). Este distrito é constituído essencialmente por planícies, possuindo apenas duas principais serras. Uma vez atravessado pelo rio Sado e seus afluentes, apresenta um clima misto, sub tropical e mediterrâneo, com fracas amplitudes térmicas, apresentando um microclima com índices de pluviosidade baixos e temperaturas pouco oscilatórias. (Governo Civil do distrito de Setúbal, 2014).

4.4. Processamento das amostras biológicas

O volume de sangue recolhido da veia cefálica foi 3 ml de sangue, segundo as normativas gerais de assépsia associadas a colheitas de sangue. As amostras de sangue foram colocadas em tubos com anticoagulante EDTA e refrigeradas até posterior análise laboratorial. Para a realização dos testes laboratoriais destinados à pesquisa de dirofilariose, as amostras foram refrigeradas a 4^oC e para a pesquisa molecular de dirofilariose e leishmaniose as amostras foram conservadas a -20^oC.

De modo a se obter plasma para a pesquisa de anticorpos anti – *Leishmania* através da técnica de ELISA, as amostras de sangue foram diluídas em 20% de CaCl₂

(40 µl sangue + 160 µl de CaCl₂) mantidas a 4°C overnight, centrifugando-se posteriormente a 956g durante 5 a 10 minutos à temperatura ambiente.

4.4.1. Extração de ADN

O método de extração de ADN genómico utilizado (adaptado de Stothard *et al.*, 1996) aquando da realização deste trabalho é utilizado com frequência pelo grupo de Helmintologia e Malacologia Médica. A sua comprovada eficácia, baixo custo e facilidade de execução permite a sua utilização em detrimento de kits comerciais de extração de ADN.

Inicialmente aqueceu-se previamente o tampão de brometo cetiltrimetilamónio (CTAB) (100 mM Tris-HCL- “Amresco®”, pH 8.0, 1.4M NaCl-“Panreac”, 20 mM EDTA “Ameresco®”, 2% (CTAB), 0.2% 2-mercaptoethanol – “Ameresco®”) na estufa a 60°C durante 10 min. De seguida colocou-se 200µl de amostra num tubo de 1,5 ml, 600 µl de CTAB e 10 µl de proteinase K (20 mg/dl – “Bioline”), homogeneizaram-se as amostras com o auxílio de setas estéreis e incubou-se de seguida a 55°C durante 1h30 min agitando-se intermitentemente, de 15 em 15 min. Desnaturaram-se as proteínas pela adição de 600 µl de clorofórmio: álcool isoamil (24:1), agitou-se por inversão durante 2 min e centrifugou-se 15 segundos a 6000 g. Colocou-se 800 µl de etanol gelado em novos tubos de eppendorf de 1,5 ml, e retirou-se o sobrenadante resultante da centrifugação prévia para novos tubos. Centrifugou-se a 13000 g /20 min. De seguida retirou-se o sobrenadante e fez-se a lavagem do pellet com 500 µl de etanol a 70%. Centrifugou-se a 13000 g/15 min. Retirou-se o sobrenadante totalmente e colocou-se na estufa a 55°C durante um máximo de 15 min por forma a secar o pellet. Por fim fez-se a reidratação do pellet através da adição de 50 µl de TE (10 mM Tris-HCL, 1mM EDTA, pH 7.0 – “appliChem”) ou água destilada. O ADN foi conservado a -20°C até à realização da PCR.

4.4.2. Diagnóstico laboratorial de *Dirofilaria* spp

O diagnóstico laboratorial para a deteção de *Dirofilaria* spp foi realizado previamente no âmbito do projeto “Ecoepidemiologia de *Dirofilaria* spp: caraterização

molecular, vetores potenciais e dinâmica de transmissão” (PTDC/SAU-SAP/113523/2009) no qual se integra o presente estudo.

Para a deteção de infeção por *Dirofilaria* spp utilizou-se o teste serológico comercial WITNESS®, e para a pesquisa e identificação de microfilárias a técnica de Knott modificada e a técnica da fosfatase ácida (Alho *et al.*, 2014). Foi realizada igualmente a técnica de PCR para o diagnóstico e caracterização molecular de *Dirofilaria* spp; os primers usados na amplificação do gene ribossomal 16S foram *forward* 5'-GCA TCT TAG AAC TTG GTC CAT CC -3' e *reverse* 5'- CAA AGG CGT ATT TAC CGC CAC -3 de acordo com o descrito por Watts *et al.*, (1999). Em todas as amplificações utilizou-se um controlo de ADN genómico de *D. immitis* e como controlo negativo água ultrapura em substituição da amostra de ADN.

Como amostras positivas consideraram-se todas as que em pelo menos numa das técnicas anteriormente descritas, se tenha obtido um resultado positivo.

4.4.3. Diagnóstico laboratorial de *L. infantum*

a) Metodologia molecular

A pesquisa e deteção de ADN cinetoplastideal (KDNA) de *Leishmania infantum* foi realizada a partir de amostras de ADN anteriormente utilizadas no diagnóstico de *Dirofilaria* spp.

O kDNA de *L. infantum* foi amplificado utilizando os primers MC1 (5'GTTAGCCGATGGTGGTCTTG 3') e MC2 (5' CACCCATTTTTCCGATTTTG 3') (Cortes *et al.*, 2004).

Preparou-se para cada amostra (5 µl de ADN), 20 µl de uma mistura de reacção constituída por 5,3 µl de água ultrapura, 5 µl de tampão de reacção [tampão NH₄ (5X): 160mM (NH₄)₂ SO₄; 670mM Tris-HCl; pH 8,8 (25°C)], 3 µl de uma solução de Mg²⁺ (25mM MgCl₂), 0,5 µl de dNTPs (10mM), 3 µl de primers MC1 e 3 µl de MC2 (5 pmol/µl, cada), e 0,2 µl da enzima polimerase de ADN Taq (5U/µl). Em todas as amplificações utilizou-se um controlo de ADN genómico de *L. infantum* e como controlo negativo água ultrapura em substituição da amostra de ADN. As condições do termociclador para a PCR foram as seguintes:

Tabela 3 - Fases de amplificação de ADN de *L. infantum* através da técnica de PCR.

Fases de Amplificação	Temperatura (°C)	Duração	Nº de Ciclos
Desnaturação inicial	94	5 min.	1
Desnaturação	94	30 seg.	35
Ligação dos “primers”	60	30 seg.	
Elongação	72	30 seg.	
Elongação final	72	10 min	1

Os produtos de amplificação, constituídos por 447 pb, foram visualizados num gel de agarose a 1,5 % em 1X tampão TAE (2,25g de agarose e 150 ml de tampão TAE 1X; corado com 3µl de Greensafe Premium® após eletroforese a 120 volts e 400 mA, durante 60 minutos. Foi aplicado no gel um marcador de massa molecular de 100 pb de ADN. O resultado final foi visualizado no transiluminador UVIDoc®. A extração de ADN, a preparação da mistura de reação, a amplificação por PCR, e a deteção da amplificação foram realizadas em áreas separadas, a fim de evitar contaminações.

b) Metodologia serológica: ELISA e IFI

A técnica de ELISA foi realizada de acordo com as instruções fornecidas no Kit NovaTec Leishmania Canine IgG-ELISA® (Bioactiva diagnostica). Antes do início do ensaio procedeu-se à diluição das amostras a testar (1:100) no tampão fornecido com o kit (Sample Dilution). Após diluição adicionou-se, com exceção do poço referente ao branco de reação, 100µl das amostras e dos controlos positivo, negativo e da amostra cut-off (fornecidos pelo kit) nos 96 poços de fundo plano da placa previamente sensibilizada com antígeno solúvel de *L. infantum*. De seguida cobriu-se a placa com película aderente e incubaram-se as amostras a 60 min +/- 5 min a 37°C. Após o término da incubação procedeu-se à lavagem dos poços, utilizando-se para cada poço 300 µl de solução de lavagem, por três vezes distintas. De seguida dispensaram-se 100 µl de

conjugado anti-IgG *Leishmania* em todos os poços à exceção do branco e cobriu-se com papel de alumínio, deixando-se a incubar durante 30 min à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Procedeu-se novamente às três lavagens com a solução de lavagem e dispensou-se 100 µl de TMB (Substrato) em todos os poços, deixando-se a incubar novamente durante 15 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação dispensou-se 100 µl de solução STOP (solução de paragem) em todos os poços. A absorvância foi medida no espectrofotómetro *Anthos 2020®*, a 450/620 nm num intervalo máximo de 30 min após aplicação da solução de paragem. O cut-off foi calculado com base na média das absorvâncias do controlo cut-off fornecido pelo kit. Todas as amostras foram consideradas positivas se a sua absorvância fosse superior a 20% do cut-off e negativas se inferiores a 20% do cut-off. Todas as amostras correspondendo à zona cinzenta, de valores duvidosos, necessitaram de confirmação através técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI).

A preparação de antigénio figurado para a técnica de IFI foi utilizada com formas promastigotas da estirpe MHOM/PT/89/IMT163 de *Leishmania infantum* MON-1. Para que se obtivesse um número elevado de promastigotas, os parasitas foram cultivados em meio líquido de alto rendimento, incubado a 24°C: meio Schneider, suplementado com soro fetal bovino a 20 % (v/v), previamente inativado pelo calor (30 minutos a 56°C) e gentamicina 50 mg/ml. Após centrifugação a 425g durante 10 minutos a 4°C e lavagem com soro fisiológico 0,9%, os parasitas foram contados em hemacitómetro de *Neubauer* e a suspensão foi ajustada de modo a se obter uma concentração de 1×10^7 promastigotas/ml. Foram colocados 25 µl/círculo de antigénio nas lâminas com 10 círculos, que se colocaram em estufa a 37°C, na presença de um ventilador, para facilitar a evaporação rápida do líquido, mantendo a distribuição uniforme dos promastigotas no círculo. Após a secagem o antigénio foi conservado a -80°C até posterior utilização. As lâminas com antigénio conservadas a -80°C foram colocadas à temperatura ambiente e, após secagem, foram mergulhadas em acetona por 10 minutos para fixação do antigénio. De seguida foram retiradas da acetona, secas ao ar e marcadas de acordo com o esquema estabelecido. Os soros a testar e os controlos positivo e negativo, com titulação previamente conhecida, foram diluídos (1:2) em progressão geométrica em PBS (pH 7.2), aplicados a cada círculo (25 µl) e incubados a

37°C, em câmara húmida, durante 30 minutos. Após lavagem com PBS, por meio de um jacto tampão, emergiram-se as lâminas no tampão de PBS durante 10 minutos. Depois de secar colocaram-se 25 µl de conjugado (Anti-Dog IgG - FITC anticorpo produzido em coelho marcados com fluorocromo), diluído em solução de azul de Evans (1:100000 de azul de Evans em PBS). Procedeu-se à incubação em câmara húmida, durante meia hora, finda a qual se rejeitou o excesso de conjugado e colocou-se em PBS durante 10 minutos. Após montagem com glicerina tamponada (1:10) e lamela, procedeu-se à leitura em microscópio de fluorescência (Nikon 80i) com filtro ultravioleta (objetiva de 40X), no comprimento de onda 475 nm. Em caso de reação positiva os promastigotas mostraram fluorescência verde enquanto na reacção negativa, a ausência de anticorpos anti-*Leishmania* caracterizou-se por um campo ótico obscurecido com promastigotas pouco visíveis e/ou avermelhados. Consideraram-se positivos os soros com fluorescência em diluições iguais ou superiores a 1:64.

4.5. Análise estatística

A determinação da prevalência de infeção por *Dirofilaria* spp e *L. infantum* assim como a prevalência de coinfeção das duas espécies nos diferentes distritos estudados foi um dos objetivos principais deste projeto de investigação. Para esse feito, os dados foram processados nos programas *Microsoft Office Excel 2010* e *SPSS for Windows*. Utilizou-se o programa *EPITools* para estimar as prevalências e intervalos de confiança a 95%.

Através do *SPSS* procedeu-se à análise estatística de algumas variáveis qualitativas tais como o sexo, tipo de pelagem, grupo etário, distrito de origem e manifestações clínicas existentes. Para tal recorreu-se à aplicação do Teste de Qui-quadrado de *Pearson* e sempre que os pressupostos necessários para a sua utilização não foram verificados optou-se pelo Teste Exato de Fisher, tendo-se usado como valor significativo *P value* <0,05. Foi ainda usada a medida de concordância *Kappa* para avaliar o grau de concordância entre os diferentes testes de diagnósticos utilizados.

4.6. Considerações éticas e legais

O projeto (PTDC/SAU-SAP/113523/2009) no qual se integra este estudo teve em consideração todas as questões éticas e legais necessárias à sua realização. Todas as entidades, quer municipais como privadas das regiões em estudo emitiram o seu parecer positivo à realização do projeto, o qual foi previamente aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina de Veterinária, Universidade de Lisboa. Todos os dados e resultados obtidos estão sujeitos a sigilo e confidencialidade. Nenhum local, pessoa ou instituição utilizados aquando da realização do trabalho será identificado, por forma a garantir o anonimato e privacidade. Todos os dados resultantes do estudo serão facultados aos respetivos responsáveis das instituições envolvidas.

5 - RESULTADOS

5. Resultados

5.1. Caracterização geral da amostra

No presente trabalho foram analisadas 299 amostras de sangue canino, 94 (31,4%) do distrito de Coimbra, 130 (43,5%) do distrito de Santarém e 75 (25,1%) do distrito de Setúbal obtidas em diferentes canis de cada distrito, no período de Outubro de 2011 a Novembro de 2013 (Figura 7).

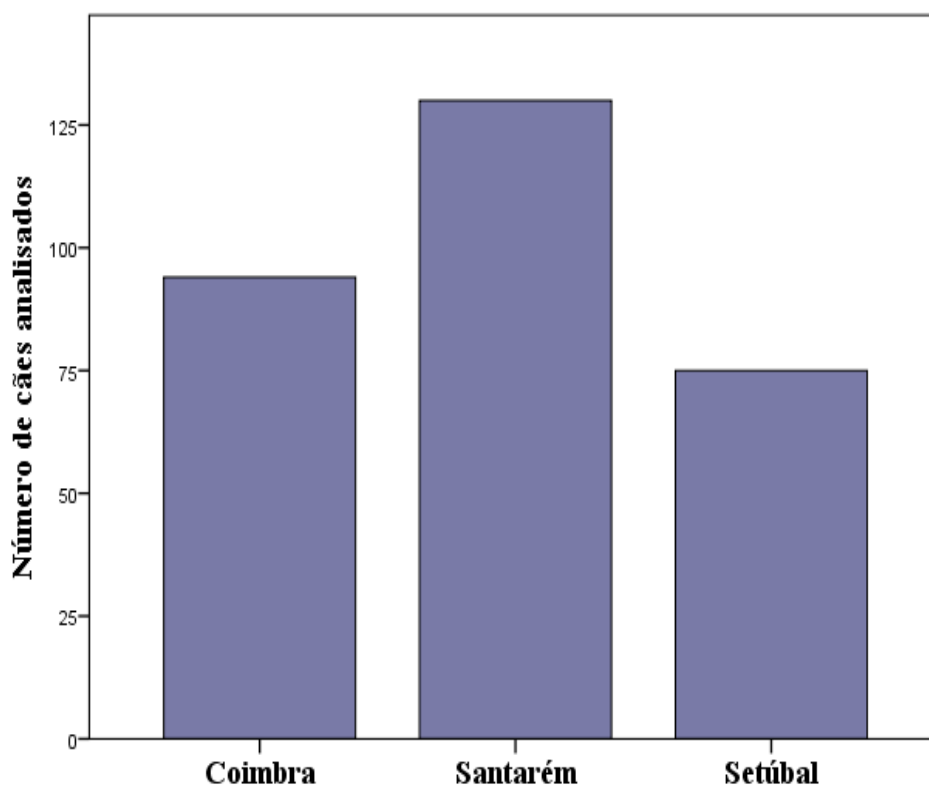


Figura 7 - Número de amostras de cães analisados em cada distrito estudado

A amostra da população canina em estudo era composta por 50,2% (150/299) de animais do sexo masculino e por 49,8% (149/299) de cães do sexo feminino.

Em relação à idade 8,7% (26/299) dos cães tinham idades compreendidas entre os seis e os 24 meses, 38,1% (114/299) idades compreendidas entre os dois anos e meio e os cinco anos e 53,2% (159/299) idades iguais ou acima dos cinco anos (Figura 8). A maioria (54,5%) dos cães em estudo possuía pêlo curto (Figura 8).

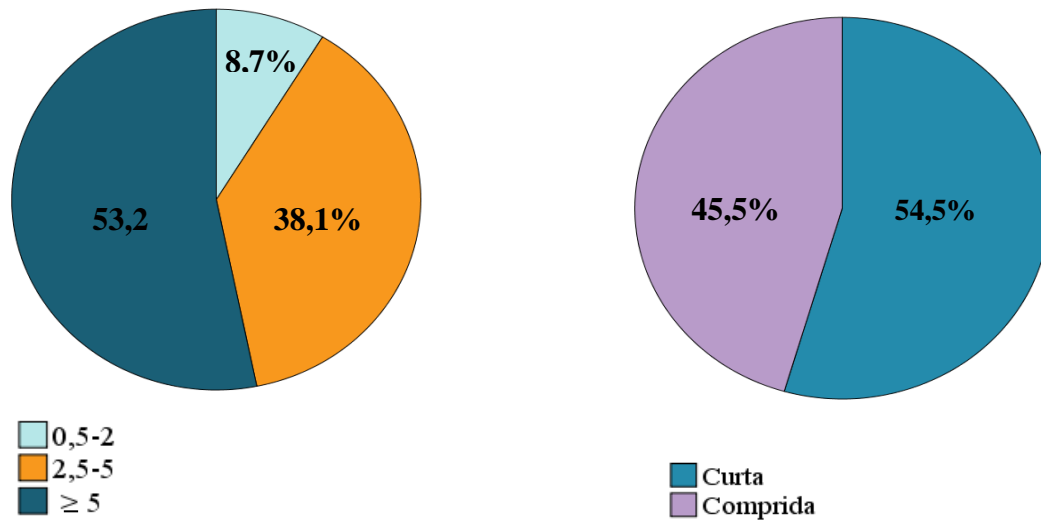


Figura 8 - Frequência relativa dos grupos etários (anos) e do tipo de pelagem dos animais em estudo.

Em relação às manifestações clínicas, 22,1 % (n=66) dos animais apresentavam lesões cutâneas e 17,1% (n=51) apresentavam aumento dos gânglios linfáticos (Figura 9). Apenas em 5,7% (n=17) e 0,3% (n=1) dos cães se detetaram edemas ou ascites ou anomalias durante o exame de auscultação.

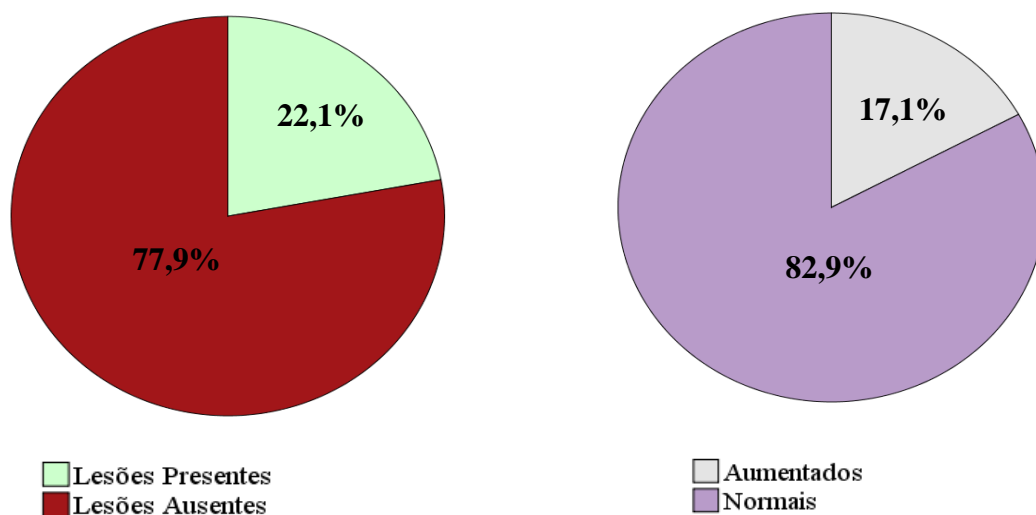


Figura 9 - Frequência relativa da presença de lesões cutâneas e do aumento dos gânglios linfáticos nos cães em estudo.

5.2. Prevalência de *Dirofilaria* spp. e *L. infantum*

Dos 299 cães analisados 25,8 % (77/299) tiveram diagnóstico positivo para *Dirofilaria* spp e 2% (6/299) para *L. infantum* (Tabela 4). Para *L. infantum*, obteve-se uma prevalência de 2% de infetados e 98% de não infetados. Das 299 amostras analisadas detetaram-se anticorpos anti-*Leishmania* em três pela técnica de ELISA (Figura 10) e outras 3 pela técnica de IFI (Figura 11; Tabela 4). Não se amplificou ADN de *L. infantum* em nenhuma das amostras testadas.

Tabela 4 - Frequência relativa de amostras positivas e negativas segundo as técnicas de diagnóstico para detecção de infecção por *D. immitis* e *L. infantum*

Técnicas laboratoriais							
	<i>Witness</i>	<i>Knott</i>	<i>FA</i>	<i>PCR</i>	<i>ELISA</i>	<i>IFI</i>	Total
<i>D. immitis</i>							
Positivas	43	72	58	77	-	-	77/ 299
%	14,4%	24,1%	19,4%	25,8%			25,8 %
Negativas	256	227	241	222	-	-	222/ 299
%	85,6%	75,9%	80,1%	74,2%			74,2 %
<i>L. infantum</i>							
Positivas	-	-	-	0	3	3	6/299
%				0%	1%	1%	2,0 %
Negativas	-	-	-	299	296	296	293/299
%				100%	99%	99%	98,0 %

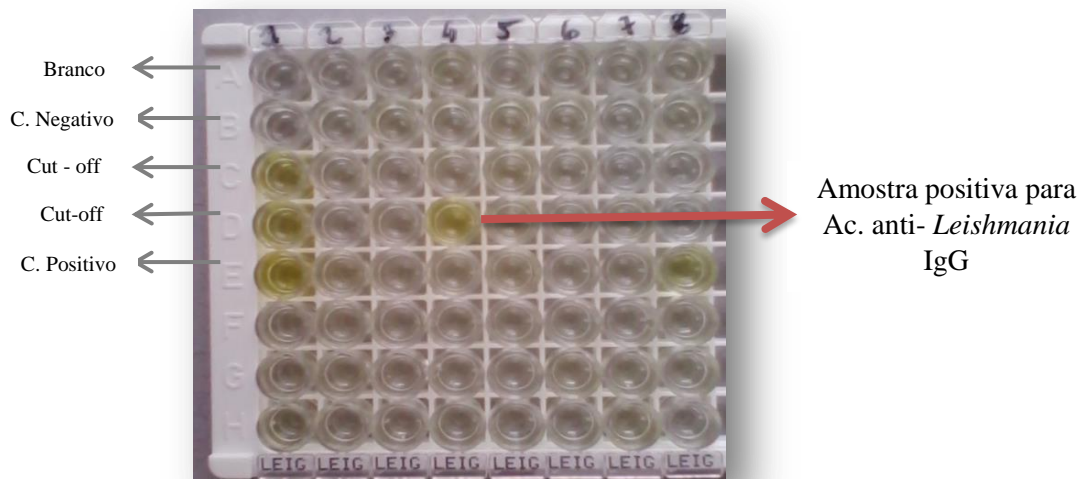


Figura 10 - Ilustração de um resultado positivo obtido pela técnica serológica ELISA (Original)

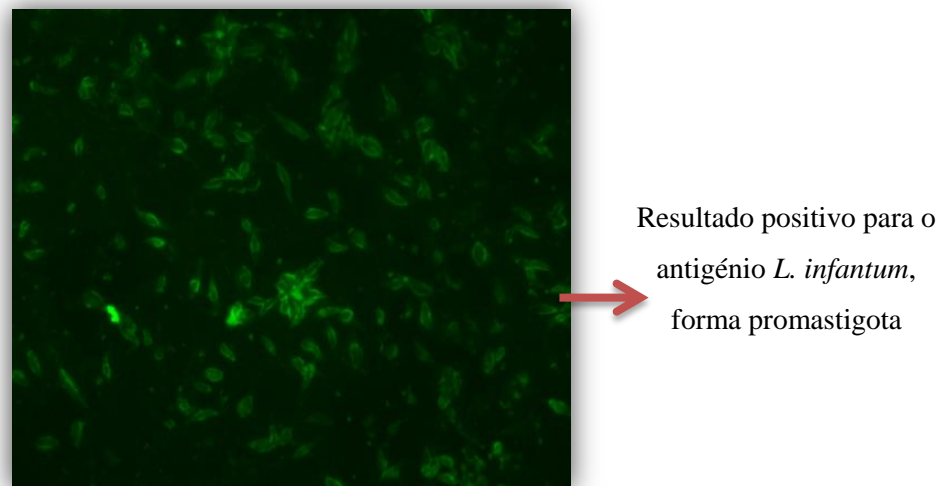


Figura 11 - Lâmina de IFI de uma amostra canina com anticorpos anti – *Leishmania* (Original)

Nos distritos de Coimbra, Santarém e Setúbal a prevalência de *D. immitis* foi respetivamente de 13,8% (13/94), 35,4% (46/130) e 22,7% (17/75) (Tabela 5; Figura 12) e a prevalência de *L. infantum* nos mesmos distritos foi de 1,1% (1/94), 2,3% (3/130) e 2,7% (2/75) respetivamente (Tabela 5; Figura 12).

Constatou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2 = 13,417$; $P=0,001$) na prevalência de infeção por *D. immitis* inter- distritos, tendo sido o distrito de Santarém o que revelou um maior número de casos positivos (46/77) (Figura 12). Em relação à infeção por *L. infantum* não se constatou diferença na sua prevalência inter-distrito (Teste Exato de Fisher $P=0.698$).

Tabela 5 - Frequência relativa de resultados obtidos para a presença de *D. immitis* e *L. infantum* nos três distritos em estudo.

Distritos em Portugal				
	Coimbra N=94	Santarém N=130	Setúbal N=75	
<i>D. immitis</i>				
Positivo	13	46	17	77/299
%	13,8 %	35,4 %	22,7 %	25,8 %
Negativo	81	84	58	222/299
%	86,2 %	64,6 %	77,3 %	74,2 %
<i>L. infantum</i>				
Positivo	1	3	2	6/299
%	1,1 %	2,3 %	2,7 %	2,0 %
Negativo	93	127	73	293/299
%	98,9 %	97,7 %	97,3 %	98,0 %

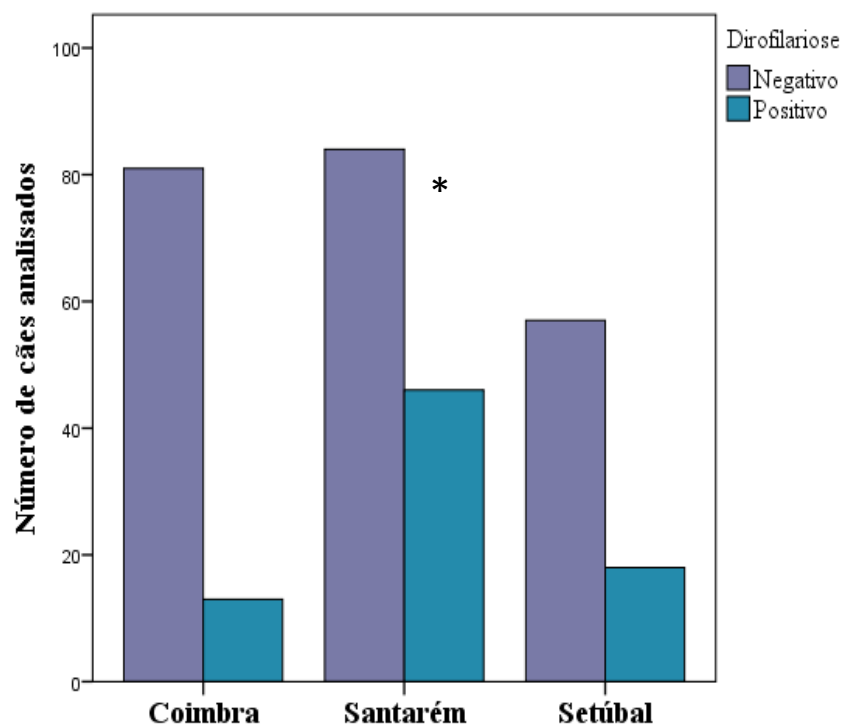


Figura 12 - Representação gráfica da frequência absoluta de *D. immitis* nos distritos de Coimbra, Santarém e Setúbal (* $P = 0,001$)

5.3. Relação entre a idade, sexo e pelagem com a infecção por *D. immitis* e *L. infantum*

Relativamente à infecção por *D. immitis* e os diferentes parâmetros observados, como a idade, sexo e pelagem, constatou-se a existência de uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo etário e a infecção por *D. immitis*, sendo que o grupo mais afetado foi o dos animais mais velhos (≥ 5 anos) ($\chi^2 = 7,926$; $P=0,025$), uma vez que, dos 77 animais positivos, 66,2% (51/77) dos cães pertenciam a esta faixa etária (Tabela 6). Não se encontrou qualquer associação estatisticamente significativa entre a infecção por *D. immitis* e o sexo e a pelagem, sendo 55,8% (43/77) dos infetados machos e 58,4% (45/77) de pêlo curto.

Em relação à infecção por *L. infantum* não se encontrou nenhuma associação entre os parâmetros amostrais estudados (sexo, idade e pelagem) com a sua prevalência. A maioria, 83,3% (5/6) dos animais infetados com *L. infantum* tinham idades superiores ou iguais a cinco anos, eram machos e 66,7% (4/6) tinham pêlo curto (Tabela 6).

Tabela 6 - Parâmetros físicos (idade, sexo e pelagem) em relação à infecção por *D. immitis* e *L. infantum*.

Parâmetros	<i>D. immitis</i>		<i>P</i>	<i>L. infantum</i>		<i>P</i>
	Positivo (%)	Negativo (%)		Positivo (%)	Negativo (%)	
Idade (anos)						
0,5 – 2	3,9	10,5	0,019	0	8,9	0,139
2,5 – 5	29,9	40,9		16,7	38,6	
≥ 5	66,2	48,6		83,3	52,5	
Sexo						
Macho	55,8	48,2	0,248	83,3	49,5	0,214
Fêmea	44,2	51,8		16,7	50,5	
Pelagem						
Curta	58,4	53,2	0,422	66,7	54,3	0,692
Comprida	41,6	46,8		33,3	45,7	

5.4. Relação entre manifestações clínicas e infecção por *D.immitis* e por *L. infantum*

Não se verificou a existência de qualquer associação estatisticamente significativa entre as manifestações clínicas estudadas (lesões cutâneas, aumento dos gânglios linfáticos, edema/ascite e auscultação) e a infecção por *D. immitis* e por *L. infantum*.

Dos 77 animais positivos para *D. immitis*, 29,8% (23/77) tinham lesões cutâneas, 16,9% (13/77) gânglios linfáticos aumentados e apenas 1,3% (1/77) apresentavam sopros no exame de auscultação (Tabela 7). Nenhum dos animais positivos para *D. immitis* apresentava edemas/ascite.

No que respeita à infecção por *L. infantum*, dos 6 animais seropositivos apenas 16,7% (1/6) apresentava linfadenomegalia (Tabela 7).

Tabela 7 - Manifestações clínicas em relação à infecção por *D. immitis* e *L. infantum*.

Manifestações clínicas	<i>D. immitis</i>			<i>L. infantum</i>		
	Positivo (%)	Negativo (%)	<i>P</i>	Positivo (%)	Negativo (%)	<i>P</i>
LC*						
Presente	29,8	19,4	0,06	0	22,5	0,345
Ausente	70,2	80,6		100	77,5	
LG*						
Aumentados	16,9	17,1	0,962	16,7	17,1	1,00
Normais	83,1	82,9		83,3	82,9	
EA*						
Presente	0	0,5	1,00	0	0,3	1,00
Ausente	100	99,5		100	99,7	
AC*						
Sopro	1,3	7,2	0,082	0	5,8	0,702
Normal	98,7	92,8		100	94,2	

*LC – lesões cutâneas; GL –linfadenomegalia; EA – Edema/ascite; AC – auscultação;

5.5. Coinfeção por *Dirofilaria* spp e *L. infantum*

Relativamente à coinfeção por *D. immitis* e *L. infantum* obteve-se um único caso positivo (Figura 13). O caso de coinfeção correspondeu a um animal do sexo masculino, com mais de cinco anos de idade, oriundo do distrito de Setúbal, de pelagem curta e sem quaisquer manifestações clínicas (Tabela 8). A prevalência global da coinfeção foi portanto de 0,33% (0,1-1,9; IC a 95%).

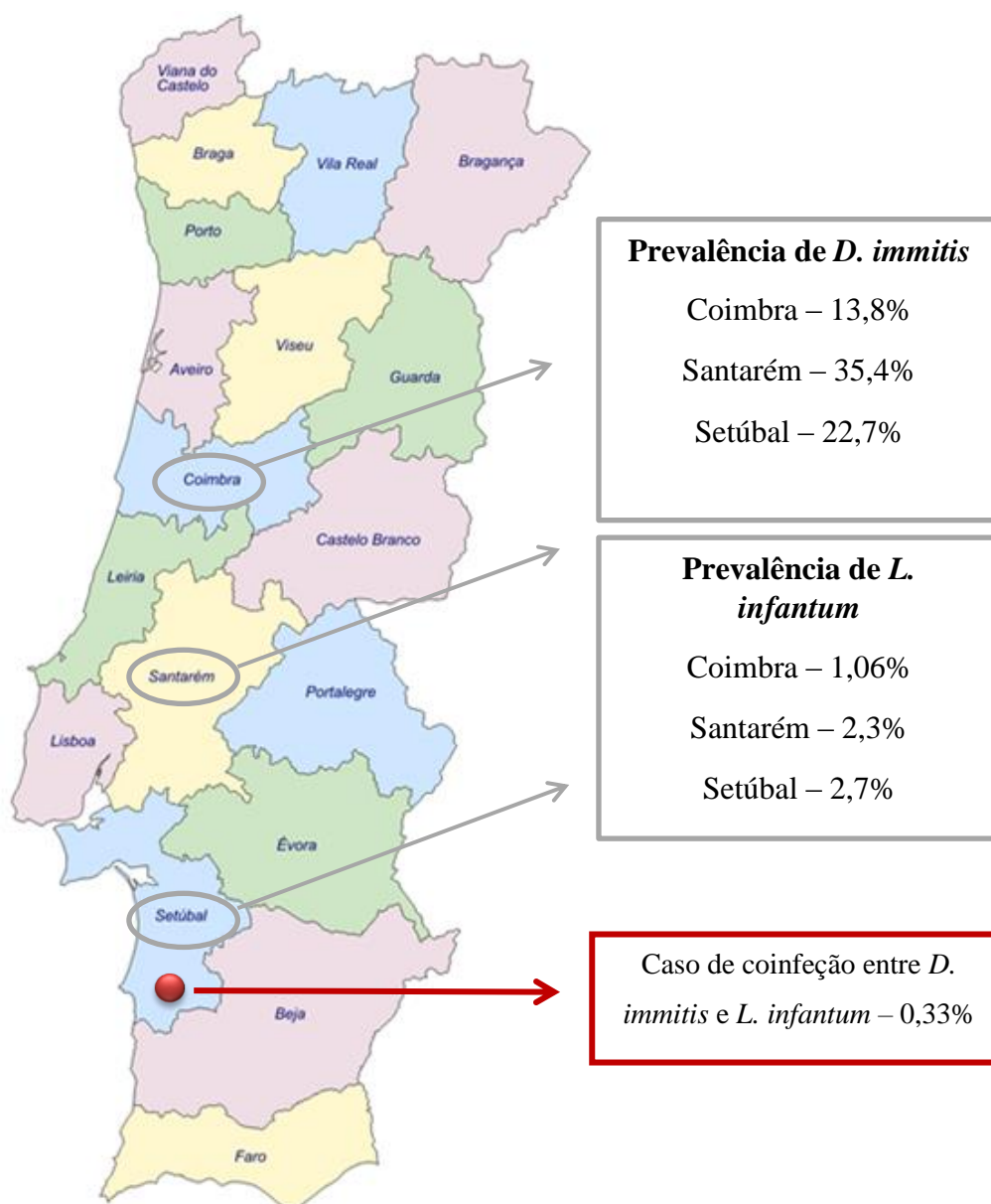


Figura 13 - Mapa dos distritos em estudo relativamente à prevalência e coinfeção por *D. immitis* e por *L. infantum*

Tabela 8 - Caracterização dos parâmetros físicos e das manifestações clínicas dos cães seropositivos para *L. infantum*.

Cães seropositivos	Distrito	Sexo	Idade	Pelagem	Lesões Cutâneas	Gânglios linfáticos	Edema/Ascite	Auscultação
11	Santarém	Macho	2,5 – 5	Comprida	Ausentes	Normais	Ausente	Normal
453	Coimbra	Macho	≥ 5	Curta	Ausentes	Normais	Ausente	Normal
524	Santarém	Macho	≥ 5	Curta	Ausentes	Normais	Ausente	Normal
536	Santarém	Macho	≥ 5	Comprida	Ausentes	Normais	Ausente	Normal
717*	Setúbal	Macho	≥ 5	Curta	Ausentes	Normais	Ausente	Normal
718	Setúbal	Fêmea	≥ 5	Curta	Ausentes	Aumentados	Ausente	Normal

* Caso de coinfeção entre *D. immitis* e *L. infantum*.

6 - DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

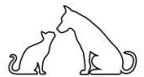


6. Discussão e Conclusão

O presente estudo teve como objetivos avaliar a presença de coinfeção por *Dirofilaria spp* e *L. infantum* na população canina em três distritos de Portugal (Coimbra, Santarém e Setúbal) endêmicos para ambas as parasitoses. Para tal determinou-se a prevalência de *D. immitis* e *L. infantum* em 299 amostras sanguíneas de cães com mais de seis meses de idade utilizando técnicas parasitológicas, moleculares e serológicas.

Para a deteção de *Dirofilaria spp* foram utilizadas diferentes metodologias por forma a minimizar as limitações individuais de cada uma das técnicas tendo-se obtido uma prevalência global 25,8% (77/299) (Tabela 4). No distrito de Coimbra a prevalência de infeção por *D. immitis* obtida foi de 13,8%, em Santarém de 35,4% e em Setúbal de 22,7% (Tabela 5). A prevalência obtida no distrito de Coimbra foi semelhante à obtida em estudos anteriores de 12,1% (Landum, 2012) e 13% (Sousa *et al.*, 2007; Cardoso *et al.*, 2010), o que indicia uma aparente estabilização da parasitose na região, a qual poderá estar associada à ausência de uma maior sensibilização dos proprietários e médicos veterinários para adotarem medidas profiláticas contra esta parasitose. Apesar de em estudos anteriores (Cardoso *et al.*, 2010; Landum, 2012; Alho *et al.*, 2014) se ter verificado um aumento da prevalência de infeção por *D. immitis* do Norte para o Sul de Portugal, associado a um aumento da temperatura atmosférica favorável ao vetor e ao desenvolvimento do parasita, no presente estudo detetaram-se mais cães positivos no distrito de Santarém do que no de Setúbal. A explicação para esta diferença pode ser devido à localização geográfica dos canis (pela possível alteração da densidade da população vetora) ou pela flutuação da prevalência da parasitose no distrito em análise. Por outro lado constatou-se uma diminuição do número de casos de infeção por *D. immitis* no distrito de Setúbal o que corrobora o estudo realizado por Landum (2012). Esta alteração poderá também ser devida a uma maior sensibilização por parte da população residente neste distrito a esta parasitose, provavelmente aliado ao aumento da utilização de medicação profilática.

Através da análise das características da população canina estudada verificou-se que a prevalência da infeção por *D. immitis* foi significativamente superior em animais com mais de cinco anos de idade, corroborando os resultados obtidos anteriormente por outros autores que determinaram a idade como sendo um fator de risco em zonas endêmicas (Montoya *et al.*, 2008; Jalali *et al.*, 2010; Landum 2012). Este resultado pode



ser explicado pelo facto dos cães com mais idade estarem sujeitos a uma maior exposição aos vetores e indiretamente ao parasita. Embora Pereira *et al.*, (2010) tenha verificado uma associação entre o sexo do animal e o tipo de pelagem com a infeção por *D. immitis* (os cães do sexo masculino e de pêlo curto apresentaram uma maior probabilidade de serem infetados) no presente estudo, e corroborando os resultados obtidos por Landum, não se verificou nenhuma destas associações. As maiores taxas de infeção encontradas em machos são sustentadas pelo facto de estes serem mais frequentemente utilizados como cães de guarda e de caça, e por isso serem mantidos no exterior das habitações e ao ar livre, estando por isso sujeitos a um maior contacto com potenciais vetores (Montoya *et al.*, 1998; Jalali *et al.*, 2010). No presente estudo o número de machos e fêmeas infetados foi semelhante, contudo desconhece-se o passado destes animais de canil, nomeadamente, o tipo de aptidão e o nível de exposição a potenciais vetores pelo que não é possível concluir se algum dos sexos é mais suscetível à infeção ou não.

A ausência de associação entre a pelagem e a infeção por *D. immitis* poderá estar relacionada com o facto de os mosquitos escolherem naturalmente áreas do corpo com menos pêlo para se alimentarem (Almeida *et al.*, 2007).

Em relação à associação entre o parasitismo por *D. immitis* e as manifestações clínicas estudadas, estas não apresentaram correlação. Segundo Bowman & Atkins (2009) os sinais clínicos mais específicos estão relacionados com uma forma mais avançada da doença, o que poderá explicar a ausência de associações obtidas. Não obstante a não correlação não é de estranhar devido à natureza generalista da sintomatologia observada nesta parasitose.

A Organização Mundial de Saúde recomenda a realização de, no mínimo, dois testes de metodologia diferente para o diagnóstico de infeções por *Leishmania* spp (McCown & Grzeszak, 2010). Como tal para a deteção de *L. infantum* utilizou-se no presente trabalho o teste serológico ELISA e a técnica molecular da PCR. Nas amostras duvidosas obtidas pela técnica de ELISA realizou-se a técnica IFI, uma vez que esta é considerada a técnica de referência para a deteção de infeção por *L. infantum*.

Seis dos animais analisados apresentaram anticorpos específicos anti-*Leishmania*. Não se detetou ADN de *L. infantum* em nenhum dos animais testados. As diferenças nos resultados obtidos pelas duas metodologias poderão ser explicadas na medida em que a deteção de anticorpos apenas indica que houve exposição à infeção, não implicando a existência de infeção ativa (Martin – Sánchez *et al.*, 2006) ou que se



trata de uma infecção antiga, em que já tenha ocorrido a eliminação do parasita (Vita *et al.*, 2005). A existência de falsos negativos não pode ser excluída na medida em que a carga parasitária no sangue é inferior aquela encontrada em órgãos internos (Maia *et al.*, 2009). Os fatores que influenciam a sensibilidade da PCR são a carga parasitária, o método de extração de ADN, os primers utilizados, a amostra biológica e a presença ou ausência de sinais clínicos (Quinnell *et al.*, 2001). Segundo Maia & Campino (2008) as amostras mais indicadas para a pesquisa de *Leishmania* spp são aspirados de medula óssea, de gânglios linfáticos e pele, porém a obtenção deste material requer a utilização de técnicas invasivas, não praticáveis durante a realização de estudos epidemiológicos. Como tal, a colheita de sangue periférico garante uma alternativa menos invasiva e mais exequível em estudo com um elevado número de amostras, e uma vez corretamente armazenadas possuem uma longa durabilidade (Gramiccia, 2011). Neste estudo, o facto de se ter utilizado amostras de sangue periférico e da maioria dos animais não apresentarem sinais clínicos pode ser justificativo para os valores obtidos (Solano – Gallego *et al.*, 2011).

A prevalência global de *L. infantum* determinada no presente estudo foi de 2% (6/299), inferior às obtidas em trabalhos semelhantes (Sousa *et al.*, 2008; Cardoso *et al.*, 2010; Cortes *et al.*, 2012). A prevalência de infecção por *L. infantum* no distrito de Coimbra foi de 1,1% (1/94), em Santarém de 2,3% (3/130) e em Setúbal foi de 2,7% (2/75) (Tabela 5). Constatou-se em todos estes estudos uma tendência para a diminuição do número de animais seropositivos para *L. infantum*. Esta diminuição da prevalência nos distritos analisados poderá representar uma maior sensibilização dos médicos veterinários, das entidades competentes e dos donos dos animais acerca da importância da profilaxia, da identificação dos animais infetados, pelo controlo e vigilância dos animais assintomáticos e pela utilização mais frequente de formas adequadas de prevenção contra a picada do vetor (Tabela 5).

Não se encontraram quaisquer associações entre a infecção por *L. infantum* e os parâmetros amostrais (idade, sexo e pelagem) e manifestações clínicas (lesões cutâneas, gânglios linfáticos, edemas/ascite, auscultação) (Tabela 7). Abranches *et al.*, (1991) constatarem uma associação entre o número de casos de infecção por *L. infantum* e a faixa etária, sendo mais frequente em animais de mais idade, o que não foi corroborado pelo presente estudo. Tal associação poderá ser facilmente explicada pelo facto dos cães de mais idade possuírem um período de exposição mais alargado ao flebótomo. Não obstante, tanto Fonseca (2009) como mais recentemente Moreno & Alvar (2012) não



obtiveram qualquer associação entre a idade e a infecção por *L. infantum*, o que se encontra em concordância com o obtido no estudo atual. Segundo Solano-Gallego *et al.*, (2009) a leishmaniose é uma doença que não possui uma sintomatologia clínica específica, mas sim um quadro vasto de sinais clínicos inespecíficos, pelo que a ausência de associação verificada no presente trabalho é um facto provável e expectável. Não obstante, as lesões cutâneas são as manifestações clínicas descritas como as mais comuns em cães infetados (Solano-Gallego *et al.*, 2011), o que não corrobora os resultados obtidos no presente trabalho, na medida em que não se encontrou uma correlação entre a infecção por *L. infantum* e a presença de lesões cutâneas. Tal poderá ser explicado pelo facto de que muitas vezes as lesões associadas a outras doenças principalmente dermatológicas serem usualmente confundidas com lesões e sinais clínicos de leishmaniose ou devido ao facto dos animais se encontrarem num estágio inicial da infecção e/ou se apresentarem assintomáticos.

Porém é importante referir que para a realização deste estudo o volume de amostras disponibilizadas condicionou não só o desempenho das técnicas como a aleatoriedade da população em estudo o que poderá explicar a ausência de associações entre os parâmetros amostrais e infecção por *D. immitis* e *L. infantum*. Dever-se-á referir igualmente a existência de poucas informações no historial dos animais envolvidos, o que não permitiu uma abordagem mais pormenorizada da eventual associação entre as parasitoses e as manifestações clínicas observadas.

Com a recente comercialização de uma vacina profilática para a *L. infantum* na Europa espera-se uma alteração das prevalências globais e distritais, porém tal facto não poderá excluir o estudo de situações de co-endemicidade uma vez que, conforme foi demonstrado, a sintomatologia clínica é muito inespecífica e sobreponível em ambas as parasitoses em estudo.

No presente estudo apenas se detetou um caso de coinfeção por *D. immitis* e *L. infantum*, obtendo-se uma prevalência global de coinfeção de 0,33% (1/299) (Figura 13; Tabela 8) corroborando a prevalência de 0,4% obtida por Cardoso *et al.*, (2010) em cães clinicamente saudáveis, isto é, não suspeitos de estarem infetados com nenhuma DCTV e a de 0,5% obtida por Ramos (2012) em gatos residentes na região de Olhão. Uma vez que ambas as parasitoses partilham de uma distribuição geográfica semelhante, com focos de endemicidade coincidentes em Portugal (Irwin & Jefferies, 2004) seria de esperar uma maior prevalência de coinfeção do que a obtida no presente estudo. Poderão ter contribuído para o enviesamento destes dados as campanhas profiláticas que



decorrem habitualmente nos locais de acolhimento e a triagem feita aos animais aquando da sua entrada nos canis.

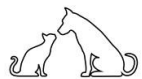
Apesar de Tabar *et al.*, (2014) terem verificado a ocorrência de um aumento na severidade dos sinais clínicos nos animais coinfectados por *L. infantum* e filarioses, tal facto não se verificou no presente estudo. Uma possível explicação para o cão coinfectado não ter apresentado qualquer manifestação clínica poderá estar relacionado com o facto de muitos cães coinfectados com DCTV permanecerem assintomáticos durante meses ou anos (Dantas- Torres *et al.*, 2009). Os percursos de viagem realizados pelos cães habitualmente não são conhecidos e visto que todas as amostras foram colhidas de canis, em que a origem do animal é geralmente desconhecida é impossível garantir que todos os casos positivos pertençam unicamente ao distrito correspondente.

Como conclusões finais pode-se destacar o facto de se ter demonstrado novamente através deste estudo a endemecidade das infeções por *D. immitis* e por *L. infantum* em Portugal. Tal facto torna-se de máxima importância devido às implicações clínicas nos animais e ao carácter zoonótico destas parasitoses.

Neste sentido, considera-se que deverão ser desenvolvidos mais rastreios serológicos e estudos não só na população canina mas estendendo a investigação a outros animais, como aos gatos, para que se consiga obter dados mais precisos sobre a situação da coinfeção e co-endemicidade da leishmaniose e diroflariose em Portugal, o que permitirá manter uma rede de vigilância atualizada para estas parasitoses.

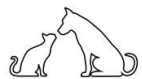
Considera-se também que será relevante prosseguir com as campanhas de educação e sensibilização à população em geral e, em particular, nas regiões de maior risco, para o combate destas parasitoses fortemente endémicas no nosso país, aliando a isso uma procura na melhoria das metodologias de diagnóstico e de prevenção contra os vetores infetantes.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

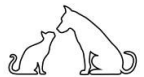


7. Referências Bibliográficas

- Abranches, P. (1994). Leishmanioses - Epidemiologia e diagnóstico laboratorial. In F. Antunes, & M. Forte, *Cadernos de doenças infecciosas*, Lisboa: Faculdade de Medicina de Lisboa, **3**: 59-68.
- Abranches, P., Pires, C., Conceição-Silva, F., Silva-Ferreira, M., & Gomes, G. (1987). O Kala-azar em Portugal VI. Inquérito epidemiológico realizado na área metropolitana de Lisboa: interpretação da estrutura e dinâmica do foco endémico. *Journal das Ciências Médicas de Lisboa*, **151**: 364-379.
- Abranches, P., Sampaio-Silva., & Santos-Gomes, M. (1992). Kala-azar in Portugal. VII. Epidemiological survey in Alijó (endemic region of Alto-Douro). *Revista Parasitologia*, **52** (3-4): 121-124.
- Afonso, M. O. (2011). O papel dos insetos vetores pertencentes à subfamília Phlebotominae e família Glossinidae na transmissão de protozoários trypanosomatidae: monitorização e controlo. O efeito das alterações climáticas na população vetorial. *CTA Newsletter Boletim Informativo do Grupo de Investigação em Ciência e Tecnologia Animal*, **3**: 1-3.
- Afonso, M., & Alves-Pires. (2008). *Bioecologia dos vetores*. In G.-G. & I.P. Fonseca, *Leishmaniose Canina*, Portugal: Chaves Ferreira - Publicações, S.A., **2**: 27-40.
- Aguiar, M. C. (2011). Estudo comparativo das alterações clínicas e laboratoriais e canídeos mono-infetados com *Leishmania infantum* versus canídeos co-infetados com *Leishmania infantum* e com *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e/ou *Rickettsia conorii*. Faculdade de Medicina Veterinária.
- Alexandre-Pires, G., & Correia, J. (2008). *Patogenia e lesões da leishmaniose canina*. In G.M. Santos-Gomes & I.M. Pereira da Fonseca (Eds.), *Leishmaniose canina*. Lisboa: Chaves Ferreira Publicações, **4**: 53-68.
- Almeida, A. (2011). Os mosquitos (*Diptera*, *Culicidae*) e a sua importância médica em Portugal - Desafios para o século XXI. *Acta Médica Portuguesa*, 961-974.



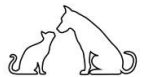
- Almeida, A., Gonçalves, Y., Novo, M., Sousa, C., Melim, M., & Gracio, J. (2007). Vetor monitoring of *Aedes aegypti* in the Autonomous region of Madeira, Portugal. *Eurosurveillance*, **12** (46): 4 - 3311.
- Almeida, C. (2010). Prevalência de Dirofilariose Felina na Região do Sado. Dissertação do Mestrado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J., & Nieto, J. (2004). Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, **57**: 1-85.
- Alho, A., Landum, M., Ferreira, C., Meireles J., Gonçalves L., Madeira de Carvalho, L., Belo, S. (2014). Prevalence and seasonal variations of canine dirofilariosis in Portugal. *Veterinary Parasitology*, **206** (1-2): 99-105.
- Araújo, A. (1996). Canine and human *Dirofilaria immitis* infections in Portugal: A review. In: Proceedings of VII European Multicolloquium of Parasitology. *Parasitologia*, **38**: 366.
- Araújo, A. (2006). Canine and human *Dirofilaria immitis* infection in Portugal: A review. *Parasitologia*, Pág 356.
- Arruda, M. M. (2005). *Programa de Zoonoses Região Sul*. Manual de Zoonoses. Conselhos Regionais de Medicina Veterinária do Sul (1ªed), 68- 90.
- American Heartworm Society: Graham, W., Rubin, S., Boeckh, A., Buzhardt, L., Jones, S., Miller, M., Payne, P., Rehm, C., Smith-Blackmore, M., Stannard, R., Nelson, C. T., Atkins, C., Carithers, D., McCall, J. & Von Simson, C., (2012). Current Feline Guidelines for the Diagnosis, Prevention, and Management of Heartworm (*Dirofilaria immitis*) Infection in Cats. [online] Disponível em: <http://heartwormsociety.org/veterinary-resources/Guidelines-Feline-HW-Disease.pdf>. Obtido em 20 de Fevereiro de 2014.
- Atkins, C. (2010). *Heartworm Disease*. Eds. Textbook of Veterinary Internal Medicine 7th Ed. St Louis, Missouri. *Saunders Elsevier Inc*, 1353-1380.
- Ayllón, T., M.A., T., Amusatogui, I., & Rodriguez - Franco, F. (2008). Serological and Molecular evaluation of *Leishmania infantum* in Cats from Central Spain. *Animal biodiversity and emerging diseases*, 361-364.



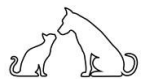
- Baneth, G. (2006). Leishmaniasis - Infectious diseases of the dog and cat. *Elsevier, Inc.*, **73**: 685-695.
- Baneth, G., Koutinas, A., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., & Lluís, F. (2008). Canine leishmaniosis - New concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, **24** (7): 314 - 330.
- Bautista, MG, Rojo Vázquez, FA, Guerrero, J. Filariatoses. In: Campillo, MC, Rojo Vázquez (1998). *Parasitología Veterinaria*. McGraw-Hill-Interamericana de España, 679- 693.
- Bates, P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacycle promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, **37**: 1097 - 1106.
- Belkaid Y. (2000). A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *Journal Immunology*, **165** (2): 969-77.
- Bowman, D.D., Eberhard, M.L., Lightowers, M.W., Little, S.E. & Lynn, R.C. (2009). *Georgis' Parasitology for Veterinarians* (9ª edição). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier, 208-210.
- Calvert, CA, Thompson J. (2008). *Heartworm Disease*. In: Tilley LP, Francis J, Smith WK, Oyama M.A, Sleeper MM, Eds. Manual of canine and feline cardiology. 4th ed. Saunders Elsevier Inc., 183 – 199.
- Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, L.-A., Santos-Gomes, G., Alves-Pires, C., Cortes, S., Ramada, J., Cristovão, J.M., Afonso, M.O. & Dedet, J.P. (2006). Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Tropical Medicine and International Health*, **11** (11): 1708-1714.
- Campino, L. & Maia, C. (2010). Epidemiologia das leishmanioses em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, **23**: 859-864.
- Campino, L., Bajanca, R., Franca, I., Pratlong, F., Dedet, J.P. & Fiadeiro, T. (2005). Leishmaniose cutânea causada por *Leishmania infantum* zimodeme MON-1 em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, **18**: 475-478.



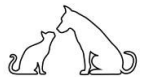
- Campillo, M. & Vázquez, F.A. (1999). *Parasitología Veterinaria*. Editorial McGraw-Hill, Madrid -España, 679-681.
- Cancrini G, Frangipane di Regalbono A, Ricci I, Tessarin C, Gabrielli S, Pietrobelli M. (2007). *Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy. *Veterinary Parasitology*, **118**:195-202.
- Cardoso, L., Lopes, A.P., Sherry, K., Schallig, H. & Solano-Gallego, L. (2010). Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. *Veterinary Parasitology*, **174**: 37-42.
- Cardoso, L., Mendão, C. & Madeira de Carvalho, L. (2012). Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal - a national serological study. *Parasites & Vectors*, **5**: 62.
- CENSOS (2011). Obtido em Julho de 2014: <http://censos.ine.pt/xportal/xmain?xpid=CENSOS&xpgid=censos2011>
- Cortes, S., Afonso, M. O. A., & Campino, L. (2007). Stray dogs and Leishmaniasis in Urban Areas, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, **13** (9): 1431-1432.
- Cortes, S., Rolão, N., Ramada, J., & Campino, L. (2004). PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **98**: 12-17.
- Cortes, S., Vaz, Y., Neves, R., Maia, C., Cardoso, L. & Campino, L. (2012). Risk factors for canine leishmaniasis in na endemic Mediterranean region. *Veterinary Parasitology*, **189** (2-4): 189-96.



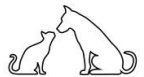
- Costa, L. M. (1998). Leishmaniose Tegumentar Americana: Uso de técnicas da biologia molecular (PCR) no diagnóstico de infecção em roedores da coleção do Museu Nacional. *Thesis*, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, Pág 70.
- Coutinho, T., & Linardi, P. (2007). Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Veterinary Parasitology*, **143** (3-4): 20-325.
- Coutinho, T., Bueno, L., Sterzik, A., Fujwara, R., Botelho, J., Maria, M., *et al.* (2005). Participation of *Rhicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, **128** (1-2): 149-155.
- Dantas - Torres D., Otranto. & Breitschwerdt. E.B. (2009). Managing canine vectorborne diseases of zoonotic concern: part one. *Trends in Parasitology*, **25**: 157-163.
- Dantas - Torres D.O., M.J., W., & M., L. (1975). Micro-organisms in filarial larvae (Nematoda). *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 509-514.
- Day, M. (2011). One health: the importance of companion animal vector-borne diseases. *Parasite Vectors*, **139**: 4-49.
- Day, M. (2011). The immunopathology of canine vector-borne diseases. *Parasite Vectors*, **13**: 4-48.
- Dedet, J.P. (2002). Current status of epidemiology of Leishmaniasis. In *World Class Parasites: Leishmania*, J. P. Farrell (Ed.), Kluwer Academic Publishers, London, 1-10.
- Dingman, P., Levy, J., Kramer, L., Johnson, C., Lappin, M., Greiner, E., *et al.* (2010). Association of *Wolbachia* with heartworm disease in cats and dogs. *Veterinary Parasitology*, **170** (1-2): 50-60.
- Durão, J. F.; Rebelo, E.; Peleteiro, M. C.; Correia, J. J.; Simões, G. Primeiro (1994) Caso de leishmaniose em gato doméstico (*Felis catus domesticus*)



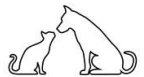
- detectado em Portugal (Concelho de Sesimbra): nota preliminar. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, **89** (511):140-14
- European Scientific Counsel Companion Animal Parasites - ESCCAP (2009). Borne diseases in Dogs and Cats. Obtido em 23 de Abril de 2014:. ESCCAP Guideline:http://www.esccap.org/index.php/fuseaction/download/lrn_file/esccap-gl5-vbddec09.pdf
 - Faria, T. C. P. (2008). Estudo sero-epidemiológico da infeção 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; Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
 - Ferasin, L., & Knight, D. (2005). Filarial infections. In Shaw, S. E. & Day, M. J. Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat. *London: Manson Publishing*, **5**: 51-61.
 - Fonseca, M. J. (2009). Estudo da seroprevalência de anticorpos anti-leishmania spp numa população que coabita com canídeos com leishmaniose. Lisboa: Mestrado da Faculdade de Medicina de Lisboa.
 - Genchi, C., Kramer, L., & Prieto, G. (2010). Epidemiology of canine and feline dirofilariosis: a global view. In F. Simón, & C. Genchi, *Heartworm infection in humans and animals*. Ediciones Universidad, 121-133.
 - Genchi, C., Rinaldi, L., & Cascone, C. (2005). Is heartworm disease really spreading in Europe? *Veterinary Parasitology*, **133** (2-3): 137-148.
 - Goodwin, J. (1998). The serologic diagnosis of heartworm infection in dogs and cats. *Clinical Techniques in small animal practice*, **13**: 83-87.
 - Gontijo B. & Carvalho M.L.R. (2003). Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Belo Horizonte*, **36**: 71-80.
 - Gramiccia, M. (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vetorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*, **181** (1): 23-30.



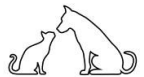
- Hoch, H., & Strickland, K. (2008). Canine and Feline Dirofilariasis: Life cycle, Pathophysiology and Diagnosis. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, **30** (5): 133-141.
- Hunt, P. (2011). Molecular diagnosis of infections and resistance in veterinary and human parasites. *Veterinary Parasitology*, **180**: 12-46.
- Irwin, P., & Jefferies, R. (2004). Arthropod-transmitted diseases of companion animals in Southeast Asia. *Trends in Parasitology*, **20**: 27-34.
- Jalali, M. H.R., Alborzi, A. R., Avizeh, R., Mosallanejad, B. (2010). A study on *Dirofilaria immitis* in healthy urban dogs from Ahvaz, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, **11**(4): 358- 362.
- Júnior, G., Teva, A., Santos, C., Ferreira, A., & Flaqueto, A. (2012). The effect of remaining potentially infectious dogs on the numbers of canine *Leishmania infantum* infections in an endemic area with high transmission rates. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **86** (6): 966-971.
- Killick- Kendrick, R. (1999). The Biology and Control of Phlebotomine Sand Flies. *Elsevier Science Inc.*, **17**: 279-289.
- Kittleson, M. (1999). Heartworm Infection and Disease (Dirofilariasis). *Small Animal Cardiovascular Medicine* 2nd ed. *W.B. Saunders*, 370–398.
- Kittleson, M., & Kienle, R. (1998). Small animal cardiovascular Medicine. In *Mosby*, 54-59.
- Knight, D., & Lok, J. (1998). Seasonality of heartworm infection and implications for chemoprophylaxis. *Clinical Techniques in small animal practice*, **13**: 77-82.
- Kramer, L., & Genchi, C. (2002). Feline heartworm infection: serological survey of asymptomatic cats living in northern Italy. *Veterinary Parasitology*, **104** (1): 43-50.
- Landum, M. C. (2012). Detecção de *Dirofilaria* spp. em cães da região centro de Portugal. Tese de mestrado em Parasitologia Médica, Faculdade Nova de Lisboa, Instituto de Medicina Tropical, Lisboa.



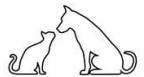
- Landum M., Ferreira C.C, Calado M, Alho AM, Maurício I.L., Meireles J.S., de Carvalho L.M., Cunha C., Belo S. (2014). Detection of *Wolbachia* in *Dirofilaria* infected dogs in Portugal. *Veterinary Parasitology*, 204 (3-4): 407-10.
- Ledesma, N., & Harrington, L. (2011). Mosquito Vectors of Dog Heartworm in the United States: Vector Status and Factors Influencing Transmission Efficiency. *Topics in Companion Animal Medicine*, **26** (4): 178-185.
- Lopez, R., Lucena, R., & Novales, M. (1996). Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. *Journal Veter Medicine Séries B. Zentralblatt fur Veterinarmedizin Reihe B*, **43**: 469-474.
- Maia, C., Ramos, C., Coimbra M., Bastos F., Martins, A., Pinto, P., Nunes, M., Vieira, M., Cardoso, L., Campino, L. (2014). Bacterial and protozoal agents of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from southern Portugal. *Parasites & Vectors*, **7**: 115
- Maia, C., & Campino, L. (2012). Cytokine and Phenotypic cell profiles of *Leishmania infantum* infection in the dog. *Journal Veter Borne Diseases*, 1-7.
- Maia, C., Afonso, O., Neto, L., Dionisio, L., & Campino, L. (2009). Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve Region, Portugal. *Journal Veter Borne Diseases*, **46** (4): 268-272.
- Manfredi, M., Carbo, A., & Genchi, M. (2007). *Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats*. In *Mappe Parassitologiche: Dirofilaria immitis and Dirofilaria repens in dogs, cats and human infection*. Itália: Rolando Editore, **2**: 41-45.
- Maroli, M., Gradoni, L., Oliva, G., Castagnaro, M., Crotti, A., Luvás, G., *et al.* (2010). Guidelines for prevention of leishmaniasis in dogs. *JAVMA*, 1200-1206.
- 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. *Veterinary Parasitology*, **145**: 267-273.
- Marques. M. I. L. M. (2008). Leishmaniose canina. Dissertação de Mestrado, Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa.



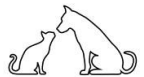
- McCall, J. W., Nelson, C., & Carithers, D. (2014). Diagnosis, Prevention and Management of Heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. *Guidelines for canine Heartworm Disease. American Heartworm Society*, 1-14.
- McCown, M. & Grzeszak, B. (2010). Zoonotic and Infectious Disease Surveillance in Central America: Honduran feral cats positive for *Toxoplasma*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Rickettsia*, and Lyme disease. *Journal Vector Borne Diseases*, **3**: 41-43.
- Miranda, B.O. (2011). Contribuição para o estudo da prevalência de Dirofilariose Felina na Sub-Região do Baixo Vouga. Dissertação de Mestrado. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.
- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Oliva, G., & Baneth, G. (2008). Canine leishmaniasis - New concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology*, **24** (8): 371 - 377.
- Monteiro (2007). Parasitologia Veterinária UFSM 2 ed Santa Maria. Obtido em 10 de Fevereiro de 2014, de <http://pt.scribd.com/doc/64301612/Parasitologia#page=215>.
- Montoya, J. M., Ferrer, O., Molina, J. & Corbera, J. (1998). The prevalence of *Dirofilaria immitis* in Gran Canaria, Canary Islands, Spain (1994-1996). *Veterinary Parasitology*, **75** (3): 221-226.
- Montoya-Alonso, J., Mellado, I., Carretón, E., Cabrera-Pedrero, E., Morchón, R. & Simón, F. (2010). Canine dirofilariosis caused by *Dirofilaria immitis* is a risk factor for the human population on the island of Gran Canaria, Canary Islands, Spain. *Parasitology Research*, **107** (5): 1265-1269.
- Mórchon, R., Carreón, E., González, J., & Hernández, I. (2012). Heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) and their vectors in Europe - new distribution trends. *Frontiers in Parasitology*, Página 1.



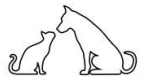
- Moreno, J., & Alvar, J. (2012). Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, **18** (9): 399-406.
- Nelson, R., & Couto, C. (2010). *Medicina Interna de Pequenos Animais*. Brasil: Elsevier Editora Lda, 396-406.
- Nematollahi, A., & Barazandeh, M. (2010). A survey on *Dirofilaria immitis* occurrence in stray dogs of Tabriz (Iran). *Acta Veterinaria*, **79**: 449-451.
- Otranto, D., F., D. T., & Breitschwerdt, E. (2005). Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. *Trends in Parasitology*, 157-163.
- Pereira, S. R. (2010). Estudo transversal de Dirofilariose canina na região d Madeira, Portugal. Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto.
- Pires, A. C., & Ribeiro, H. (1991). The phlebotominae sandflies of Portugal V. Observations on the ecology of vetores of leishmaniasis in the Alto Douro region. *Trends in Parasitology*, **33**: 63-68.
- Quinnell, R.J. & Courtenay, O. (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Journal Cambridge University*, 1-20.
- Ramos, C. (2012). A importância da infecção por *L. infantum* e *Dirofilaria* spp em gatos da região do Olhão. Mestrado integrado em Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Veterinária, Lisboa.
- Reifur, L. T. S., & Montiani-Ferreira, F. (2011). Aspectos biológicos que influenciam a existência de propagação da Dirofilariose. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia UNIPAR*, 65-70.
- Rey, L., Dreyer, G., Moura, H., & Silva, R. (1995). Human Pulmonary dirofilariasis: Review. *Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo*, **37** (6): 523-530.



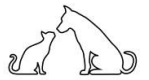
- Rey, L. (2005) *Nematelmintas*. Parasitologia (2ª ed). Guanabara Koogou, 549-561
- Rosa, N. J. (2009). Rastreo de Dirofilariose e de Leishmaniose em gatos da área metropolitana de Lisboa. Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa.
- Rosenthal, L., Sutterwala, F., Kehrl, M., & Mosser, D. (1996). *Leishmania major* human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (Cd11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. *Infection and Immunity*, **64** (6): 2206-2215.
- Rosypal, A. C. (2005). Characterization of canine Leishmaniasis in the United States: Pathogenesis, Immunological responses and transmission of an American Isolate of *Leishmania infantum*. *Infection and Immunity*, 1500-1513.
- Scaramozzino, P., Gabrielli, S., Di Paolo, M., Sala, M., Scholl, F., & Cancrini, G. (2005). Dog filariosis in the Lazio region (Central Italy): first report on the presence of *Dirofilaria repens*. *BMC Infectious Diseases*, **5**: 75.
- Seixas, R., Alho, A. M., Guerra, D., & Carvalho, L. M. (2011). Doenças caninas de transmissão vetorial: Uma picada com muitas consequências! *Veterinary Medicine*, 18-35.
- Shaw, S., & Day, M. (2005). *Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Manson Publishing, 23-28.
- Shearer, P. (2011). *Banfield Pet Hospital*. Obtido em 10 de Fevereiro de 2014, de <http://www.banfield.com/Banfield/files/b2/b26aea73-be96-4266a4fa83f54c851edb.pdf>.
- Simon F, Kramer LH, Roman A, Blasini W, Morchon R, Marcos-Atxutegi C, Grandi G Genchi (2007). Immunopathology of *Dirofilaria immitis* infection. *Veterinary Research Communications*, **31**(2): 161-171.
- Slappender L., R. J., Green C. E. (1990). *Leishmaniasis*. In Greene CE ed. *Infectious diseases of the dog and cat*, Philadelphia: WB Saunders, 769-777.



- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., *et al.* (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites and Vectors*, **4**: 1-16.
- Solbach, W., & Laskay, T. (2000). The host response to *Leishmania* infection. *Advances in Immunology*, **74**: 275-317.
- Sousa, P., Carvalho, L., & Silva, A. (2008). Poster 89: Dirofilariose canina no Distrito de Coimbra. *Livro de Resumos do IV Congresso de Ciências Veterinárias da SPCV, I Congresso Ibérico de Epidemiologia, INRB-INIA/Fonte Boa*, Página 197.
- Sousa S., Blanco A.S., Teixeira L., Madeira de Carvalho, L.M. (2008). Leishmaniose Canina no Distrito de Coimbra. IV Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias & I Congresso Ibérico de Epidemiologia. Santarém, Portugal.
- Sousa, S. L. (2011). Seroepidemiological survey of *Leishmania infantum* infection in dogs from northeastern Portugal. *Acta Tropica*, **12**: 82-87.
- Tabar, M., Altet, L., Martinez, V., & Roura, X. (2013). *Wolbachia*, filariae and *Leishmania* coinfection in dogs from a Mediterranean area. *Journal of Small Animal Practice*, 1 -5.
- Tarello, W. (2011). Clinical Aspects of Dermatitis Associated with *Dirofilaria repens* in Pets: A Review of 100 Canine and 31 Feline Cases (1990–2010) and a Report of a New Clinic Case Imported from Italy to Dubai. *Journal of Parasitology*, 15-23.
- Theis, J. (2005). Public health aspects of dirofilariasis in the United States. *Veterinary Parasitology*, **133**: 157-180.
- Urquhart, G., Armour, J., A., D., & Jennings, F. (1996). Parasitologia Veterinária. Rio de Janeiro, *Guanabara koogan*, **273**: 235-289.
- Venco, L., Kramer, L., & C., G. (2005). Heartworm disease in dogs: unusual clinical cases. *Veterinary Parasitology*, **133**: 207-218.



- Vezzani, D., & Carbajo, A. (2006). Spatial and temporal transmission risk of *Dirofilaria immitis* in Argentina. *International Journal of Parasitology*, **36**: 1463 - 1472.
- Vieira, A., Vieira, M., Oliveira, J., Simões, A., Banos, P.; Gestal, J. (2014). Prevalence of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs of central Portugal. *Parasite*, **21**: 5.
- Vita, S., Santori, D., Aguzzi, I., Petrotta, E. & Luciani, A. (2005). Feline Leishmaniasis and Ehrlichiosis: Serological Investigation in Abruzzo Region. *Veterinary Research Communications*, **2** (29): 319-321.
- Vilhena, H., Martinez-Díaz, L.V., Cardoso, L., Vieira, L., Altet, L., Francino, O., et al. (2013). Feline vector-borne pathogens in the north and centre of Portugal. *Parasites and Vectors*, **6**: 99.
- Watts K.J.; Courtney C. H., Reddy, G. R. (1999) Development of a PCR- and probe-based test for the sensitive and specific detection of the dog heartworm, *Dirofilaria immitis*, in its mosquito intermediate host. *Molecular Cell Probe*, **14**: 425-430.
- World Health Organization WHO (2010). Chapter 4 Leishmaniasis in the 2010 Edition. Obtido a Fevereiro de 2014 em: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2014/chapter-3-infectious-diseases-related-to-travel/leishmaniasis-cutaneous>.



8 - ANEXOS

8. Anexos

ANEXO A

✓ Reagentes utilizados para a extracção de ADN

- Cell Lysis (Citomed®)
- Proteinase K (20 mg/ml) (Bioline ®)
- Protein Precipitation (Citomed®)
- Isopropanol 100% (SIGMA®)
- Etanol 70% (Panreac ®)
- DNA Hydratation (Citomed®)

✓ Reagentes utilizados para a técnica PCR

- Tampão de reacção [tampão NH₄ (5X): 160 mM (NH₄)₂SO₄; 670 mM Tris-HCl; pH 8,8 (25°C)] (Bioline®)
- Solução de Mg²⁺ (25 mM MgCl₂) (Bioline®)
- dNTPs (10 mM) (Bioline ®)
- Primers Forward e Reverse 10 pmol/μl (Bioline ®)
- Polimerase de ADN Taq (5U/μl) (Promega®)
- Água ultrapura (H₂O mQ) (Labesfal ®)

✓ Reagentes utilizados para a preparação do gel de agarose

- Agarose (Invitrogen TM)
- Brometo de etídio (0,5 mg/ml)
- Tampão TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM Ácido acético, 1 mM EDTA; pH 8,3) (Bio-Rad®)
- Corante Orange G (5X)
- Marcador 100pb