

FILIPA CATARINA HENRIQUES DE BASTOS

**INFECÇÕES CAUSADAS POR PROTOZOÁRIOS E
BACTÉRIAS TRANSMITIDAS POR VECTORES EM
GATOS RESIDENTES NA REGIÃO DA ARRÁBIDA,
SETÚBAL**

Orientador: Doutora Carla Maia

Co-orientador: Dra. Ângela Martins

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2013

FILIPA CATARINA HENRIQUES DE BASTOS

**INFECCÕES CAUSADAS POR PROTOZOÁRIOS E
BACTÉRIAS TRANSMITIDAS POR VECTORES EM
GATOS RESIDENTES NA REGIÃO DA ARRÁBIDA,
SETÚBAL**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Orientador: Doutora Carla Maia

Co-orientador: Dra. Ângela Martins

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2013

Agradecimentos

À Professora Doutora Carla Maia por me ter dado a oportunidade de desenvolver este trabalho e de estagiar no Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Por todo o apoio, trabalho, disponibilidade e dedicação que teve durante a elaboração desta tese. A sua ajuda e conhecimento foram primordiais para a realização deste trabalho.

À Dra. Ângela Martins pela disponibilidade, orientação e ajuda prestada ao longo da elaboração da tese. Por me ter passado grandes conhecimentos e ser um exemplo a seguir como futura médica veterinária.

Ao Dr. Mauro Bragança, por me ter ajudado na análise estatística.

Ao Professor Gad Baneth da Faculdade de Medicina Veterinária de Israel (Hebrew University) pela cedência de alguns dos controlos positivos utilizados na parte prática do trabalho.

À Prof^a. Doutora Lenea Campino, líder do grupo de leishmanioses do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, e à restante equipa do grupo, Doutora Sofia Cortes, Sr. “Zé” e Andreia Albuquerque.

Aos meus companheiros de estágio do Hospital Veterinário Montenegro. À Carla Costa, um grande obrigado por tudo. A toda a equipa do Hospital Veterinário da Arrábida pelo apoio, ajuda e amizade durante o estágio.

À Andreia Ferreira pelo companheirismo durante o estágio no Instituto, pelas horas de trabalho passadas juntas, por todo o apoio, ajuda e amizade. À Claudia Ramos pela ajuda e disponibilidade e por toda a força e incentivo nos momentos de pânico durante o estágio no Instituto.

A todos os meus amigos que me acompanharam durante este percurso e um especial obrigada à Aninhas pelos momentos partilhados ao longo do curso e durante a resolução da tese (aqueles telefonemas) e à Susana pela amizade e companheirismo.

Ao Pedro Mergulhão pelo apoio incondicional neste últimos 3 anos, pela paciência de me aturar nas alturas de maior stress, por todo o amor, carinho e amizade.

Aos meus pais, Luis e Lurdes, e irmã Rita, por toda a força transmitida, pelos conselhos, por todo o carinho, paciência, por acreditarem nas minhas capacidades e me darem incentivo. Sem vocês não teria chegado aqui, Muito Obrigada.

Parte dos resultados incluídos na presente Dissertação foram aceites para publicação na revista internacional com arbitragem científica *Parasites and Vectors*: Maia C., Ramos C., Coimbra M., **Bastos F.**, Martins A., Pinto P., Nunes M., Vieira ML., Cardoso L., Campino L. 2014. **Bacterial and protozoal agents of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from southern Portugal** e serão apresentados no *IX International Symposium on Vector-Borne Diseases*, que terá lugar em Lisboa, de 22 a 25 de Março de 2014.

Resumo

As doenças transmitidas por vectores incluem uma ampla variedade de infecções causadas por vários agentes como vírus, bactérias ou parasitas e transmitidas por carraças, pulgas, mosquitos ou flebótomos. A prevalência de muitas destas doenças está a aumentar na Europa e a sua importância é elevada devido ao papel zoonótico de alguns destes agentes.

O presente estudo teve como objectivo determinar, através da técnica de reacção em cadeia da polimerase (PCR), a prevalência da infecção por *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp., *Hepatozoon* spp. e *Leishmania infantum* na população felina da região da Arrábida, Setúbal e relacionar a presença destes agentes com vários factores intrínsecos (idade, o sexo, raça, doenças concomitantes) e extrínsecos (modo de vida, desparasitações). Para tal, foi estudada uma amostra de 104 gatos com mais de três meses de idade que se apresentaram à consulta no Hospital Veterinário da Arrábida.

Na amostra em estudo obteve-se uma prevalência de 0,96% de infecção por *Babesia* spp, 4,8% de infecção por *Bartonella* spp., 10,6% de infecção por *Hepatozoon* spp., 1,9% de infecção por *Leishmania infantum*. Este foi o primeiro estudo a detectar gatos infectados por *H. felis* na zona metropolitana de Lisboa com uma prevalência de 3,8%. A presença de ectoparasitas (carraças) e vacinação foram os únicos factores em que se obteve uma associação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) com a infecção por *Hepatozoon*.

Este estudo realça a importância de se adoptarem medidas profilácticas nos gatos contra ectoparasitas, de modo a prevenir infecções por agentes patogénicos transmitidos por vectores artrópodes e assim levar a uma diminuição do seu potencial de transmissão a outros animais e humanos.

O papel dos gatos na epidemiologia de várias das infecções aqui descritas com potencial zoonótico ainda é pouco conhecido, motivo pelo qual será necessário a realização de mais estudos com amostras representativas da população felina (não só doméstica mas também errante), de modo a permitir na prática clínica uma abordagem mais eficaz por parte do médico veterinário ao paciente felino.

Palavras-chave: artrópodes vectores, gatos, Arrábida, PCR, prevalência.

Abstract

Vector-borne diseases consist of a wide variety of infections caused by various agents such as, viruses, bacteria or parasites which can be transmitted by ticks, fleas, mosquitoes or phlebotomine sandflies. The prevalence of many of these diseases, some of them of zoonotic concern, is increasing throughout Europe.

The purpose of this study was to determine the prevalence of *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp., *Hepatozoon* spp. and *Leishmania infantum* infections by polymerase chain reaction in the feline population from Arrábida region in Setubal and to relate these agents with intrinsic (age, gender, breed, concomitant diseases) and extrinsic (lifestyle, ectoparasiticides) factors. For this purpose, one hundred and four cats over three months of age which came to an appointment at the Arrábida Veterinarian Hospital were surveyed.

Prevalence 0.96% by *Babesia* spp., 4.8% of infections by *Bartonella* spp., 10.6% by *Hepatozoon* spp. and 1.9% by *Leishmania infantum* and were obtained. This was the first study to detect *H. felis* infection in cats from the metropolitan Lisbon region with a prevalence of 3.8%. The presence of ectoparasites (ticks) and vaccination were the only factors significantly correlated ($p < 0,05$) with *Hepatozoon* spp. infection.

This study emphasizes the importance of adopting prophylactic measures in cats against ectoparasites in order to prevent their infection with vector-borne pathogens, and therefore, leading to a decrease in their potential transmission to other animals and humans.

The roll of cats in the epidemiology of most of the infections here analyzed, especially the maintenance and potential transmission of pathogens with zoonotic concern is still unknown. For this reason, studies with a larger and more embracing population are needed to allow a better approach of veterinarians to the feline patient in the clinical practice.

Keywords: arthropod vectors, cats, Arrábida, PCR, prevalence.

Abreviaturas, Siglas e Símbolos

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ALT – Alanina transaminase

A. phagocytophilum – *Anaplasma phagocytophilum*

B. canis – *Babesia canis*

B. clarridgeiae – *Bartonella clarridgeiae*

B. felis – *Babesia felis*

B. henselae – *Bartonella henselae*

BID – Duas vezes ao dia

C. felis - *Ctenocephalides felis*

CK – Creatina quinasa

DTV – Doenças transmitidas por vetores

DFTV – Doenças felinas transmitidas por vectores

E. canis – *Ehrlichia canis*

ELISA – “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”

E.U.A – Estados Unidos da América

FeLV – Vírus da Leucemia Felina

FIV – Vírus da Imunodeficiência Felina

G – Gauge

H. canis – *Hepatozoon canis*

H. felis – *Hepatozoon felis*

IC – Intervalo de Confiança

IFI – Imunofluorescência indirecta

IM – Intramuscular

IFN- γ - Interferão gama

IgG – Imunoglobina G

IgM – Imunoglobina M

IGR – Regulador de crescimento de insectos

I. ricinus – *Ixodes ricinus*

Kg - Kilograma

LDH – Lactato desidrogenado

LC – Leishmaniose cutânea

LV – Leishmaniose visceral

L. infantum – *Leishmania infantum*

M. haemofelis – *Mycoplasma haemofelis*

mg – Miligrama

mA - Miliamper

ml – Mililitro

mm – Milimetro

min. – Minutos

μ g – Micrograma

μ l – Microlitro

pb – Par de Bases

PCR – “Polymerase Chain Reaction” (Reacção em cadeia da polimerase)

P. ariasi – *Phlebotomus ariasi*

P. perniciosus – *Phlebotomus perniciosus*

PO – Via oral

qPCR – PCR em tempo real

R. sanguineus – *Rhipicephalus sanguineus*

RML – região metropolitana de Lisboa

SC – Subcutâneo

seg. – Segundos

SID – Uma vez ao dia

SNC – Sistema Nervoso Central

UI – Unidade internacionais

V - Voltes

VVP – Valor preditivo positivo

X – Unidade de número de diluições

β – Beta

% – Percentagem

°C – Graus Celsius

< – Menor

® - Marca registada

Índice Geral

Agradecimentos	2
Resumo	4
Abstract.....	5
Abreviaturas, Siglas e Símbolos.....	6
Índice Geral	9
Índice de Tabelas	14
Índice de Figuras	15
1.Introdução.....	17
1.1. Doenças causadas por protozoários	18
1.1.1. <i>Babesia</i> spp.....	18
1.1.1.1. Etiologia.....	18
1.1.1.2. Ciclo de vida e transmissão do parasita.....	19
1.1.1.3. Epidemiologia.....	21
1.1.1.4. Patogenia.....	22
1.1.1.5. Sinais clínicos	23
1.1.1.6. Diagnóstico	24
A. Alterações Laboratoriais.....	24
B. Métodos Parasitológicos.....	25
C. Métodos Serológicos	25
D. Métodos Moleculares	25
1.1.1.7. Tratamento	26
1.1.1.8. Saúde Pública.....	27
1.1.2. <i>Hepatozoon</i> spp.....	27
1.1.2.1. Etiologia.....	27
1.1.2.2. Ciclo de vida e transmissão do parasita	28
1.1.2.3. Epidemiologia.....	30
1.1.2.4. Patogenia.....	30
1.1.2.5. Sinais clínicos	31
1.1.2.6. Diagnóstico	31
1.1.2.7. Tratamento	32

1.1.2.8. Saúde Pública.....	32
1.1.3. <i>Leishmania</i> spp	33
1.1.3.1. Etiologia.....	33
1.1.3.2. Ciclo de vida e transmissão do parasita	34
1.1.3.3. Epidemiologia.....	35
1.1.3.4. Patogenia.....	39
1.1.3.5. Sinais clínicos	41
1.1.3.6. Diagnóstico	42
A. Métodos Parasitológicos.....	43
B. Métodos Serológicos	43
C. Métodos Moleculares	44
1.1.3.7. Tratamento	45
1.1.3.8. Saúde Pública.....	46
1.2. Doenças causadas por bactérias	46
1.2.1. <i>Anaplasma</i> spp.....	46
1.2.1.1. Etiologia e Epidemiologia	46
1.2.1.2. Ciclo de vida e transmissão da bactéria	47
1.2.1.3. Patogenia.....	49
1.2.1.4. Sinais clínicos	49
1.2.1.5. Diagnóstico	50
A. Alterações Laboratoriais.....	50
B. Visualização Microscópica.....	50
C. Métodos Serológicos	50
D. Métodos Moleculares	51
1.2.1.6. Tratamento	51
1.2.1.7. Saúde Pública.....	51
1.2.2. <i>Bartonella</i> spp.....	52
1.2.2.1. Etiologia.....	52
1.2.2.2. Ciclo de vida e transmissão da bactéria	53
1.2.2.3. Epidemiologia.....	54
1.2.2.4. Patogenia.....	55

1.2.2.5. Sinais clínicos	56
1.2.2.6. Diagnóstico	59
A. Cultura	59
B. Métodos Serológicos	59
C. Métodos Moleculares	60
1.2.2.7. Tratamento	61
1.2.2.8. Saúde Pública.....	62
1.2.3. <i>Ehrlichia</i> spp.....	62
1.2.3.1 Etiologia.....	62
1.2.3.2. Ciclo de vida e transmissão da bactéria.....	63
1.2.3.3. Epidemiologia.....	64
1.2.3.4. Patogenia.....	65
1.2.3.5. Sinais clínicos	66
1.2.3.6. Diagnóstico	66
A. Alterações Laboratoriais.....	67
B. Visualização Microscópica.....	67
C. Cultura	68
D. Métodos Serológicos	68
E. Métodos Moleculares.....	68
1.2.3.7. Tratamento	69
1.2.3.8. Saúde Pública.....	70
1.3. Controlos de vectores	70
1.3.1. Controlos de carraças.....	71
1.3.2. Controlo de pulgas	72
1.3.2.1. Maneio ambiental	72
1.3.3. Controlo de flebótomos	73
2. Objectivos.....	74
3. Material e Métodos.....	74
3.1. Área geográfica de estudo	75
3.2 Caracterização da amostra.....	76
3.2.1. Critérios de inclusão	76

4. Protocolo Clínico.....	76
4.1. Colheita e Processamento de sangue periférico	76
4.2. Pesquisa de ADN de <i>Babesia</i> spp., <i>Bartonella</i> spp., <i>Ehrlichia</i> spp./ <i>Anaplasma</i> spp., <i>Hepatozoon</i> spp. e <i>Leishmania infantum</i> através da técnica de reacção em cadeia da polimerase (PCR).....	77
4.2.1. Extracção de ADN a partir de papel de filtro impregnado com sangue periférico....	78
4.2.2. Controlo de extracção de ADN-Amplificação de β -actina felina.....	78
4.2.3. Pesquisa de ADN de <i>Babesia</i> spp.....	79
4.2.4. Pesquisa de ADN de <i>Bartonella</i> spp.....	80
4.2.5. Pesquisa de ADN de <i>Ehrlichia</i> spp./ <i>Anaplasma</i> spp.....	80
4.2.6. Pesquisa de ADN de <i>Hepatozoon</i> spp	81
4.2.7. Pesquisa de ADN de <i>Leishmania infantum</i>	81
4.3. Purificação de fragmentos de ADN a partir de gel de agarose	82
4.4. Sequenciação e Análise dos fragmentos de ADN purificados.....	83
5. Análise Estatística	83
6. Resultados.....	83
6.1. Caracterização da amostra.....	83
6.2. Resultados da pesquisa de ADN de <i>Babesia</i> spp., <i>Bartonella</i> spp., <i>Ehrlichia</i> spp./ <i>Anaplasma</i> spp., <i>Hepatozoon</i> spp. e <i>Leishmania infantum</i> através da técnica de PCR .	86
6.2.1. <i>Babesia</i> spp	87
6.2.2. <i>Hepatozoon</i> spp.....	87
6.2.2.1. Factores intrínsecos dos animais positivos a <i>Hepatozoon</i> spp	88
6.2.2.2. Factores extrínsecos dos animais positivos a <i>Hepatozoon</i> spp.....	89
6.2.3. <i>Leishmania infantum</i>	89
6.2.3.1. Factores intrínsecos dos animais positivos a <i>Leishmania infantum</i>	90
6.2.3.2. Factores extrínsecos dos animais positivos a <i>Leishmania infantum</i>	90
6.2.4. <i>Bartonella</i> spp.....	90
6.2.4.1. Factores intrínsecos dos animais positivos a <i>Bartonella</i> spp.....	91
6.2.4.2. Factores extrínsecos dos animais positivos a <i>Bartonella</i> spp.....	91
6.2.5. Co-infecção	92
7. Discussão	94
7.1. Prevalências.....	95

7.1.1. <i>Babesia</i> spp.....	95
7.1.2. <i>Hepatozoon</i> spp.....	96
7.1.3. <i>Leishmania infantum</i>	96
7.1.4. <i>Bartonella</i> spp.....	98
7.2. Co-infecção	100
8. Conclusão	101
9. Referências bibliográficas	103

Índice de Tabelas

Tabela 1- Prevalência de infecções simples e co-infecções com agentes patogénicos transmitidos por vectores em 104 gatos da região da Arrábida detectados por PCR convencional.....	87
Tabela 2 - Resultados estatísticos obtidos a partir do teste de Mann-Whitney e teste exacto de Fisher das variáveis intrínsecas e extrínsecas com a presença de infecção por <i>Hepatozoon</i> spp., <i>Leishmania infantum</i> , <i>Bartonella</i> spp.....	88
Tabela 3- Descrição dos 18 casos positivos por PCR a pelo menos um dos agentes em estudados	93

Índice de Figuras

Figura 1- Eritrócito felino infectado com merozóitos de <i>Babesia canis</i> no citoplasma.....	20
Figura 2- Observação da forma gamonte de <i>Hepatozoon</i> spp. no citoplasma de um neutrófilo de um gato doméstico através de um esfregaço sanguíneo corado Giemsa	32
Figura 3- Formas amastigotas no citoplasma de um macrófago de um canídeo	33
Figura 4- Forma promastigota do parasita em cultura.....	33
Figura 5- <i>Phlebotomus perniciosus</i> , vector de <i>Leishmania infantum</i> em Portugal	34
Figura 6- Mapa de prevalência de leishmaniose canina em Portugal.....	37
Figura 7- Úlcera cutânea num gato com leishmaniose.....	41
Figura 8- Presença de crostas e pústulas no pavilhão auricular num gato com leishmaniose..	42
Figura 9- Presença de crostas, pústulas, eritema e despigmentação no plano nasal.....	42
Figura 10- <i>Ixodes ricinus</i> , um dos principais vectores de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> em Portugal.....	48
Figura 11- Esfregaços sanguíneos corados com inclusões no interior de neutrófilos de um gato com anaplasiose (coloração de Giemsa).....	50
Figura 12- Pulga do gato, <i>Ctenocephalides felis</i> , principal vector artrópode de <i>Bartonella henselae</i>	53
Figura 13- Análise pos-mortem de uma gata de 9 meses infectada por <i>Bartonella henselae</i> ..	58
Figura 14- <i>Rhipicephalus sanguineus</i> , carraça do cão, principal vector de <i>Ehrlichia canis</i>	63
Figura 15- Mapa de Portugal Continental com o distrito de Setúbal e a região de Azeitão em evidência.....	75
Figura 16- Papel de filtro impregnado com sangue periférico e tubo com amostra de sangue	77
Figura 17- Caracterização da amostra quanto ao sexo (frequência relativa, n=104)	84
Figura 18- Caracterização da amostra quanto à raça (frequência relativa, n=104).....	84
Figura 19- Caracterização da amostra quanto à pelagem (frequência relativa, n=104)	84
Figura 20- Caracterização da amostra quanto ao estilo de vida (frequência relativa, n=104) .	85
Figura 21- Caracterização da amostra quanto ao tipo de desparasitação externa (frequência relativa, n=104).....	85
Figura 22- Caracterização da amostra quanto ao tipo de desparasitação interna (frequência relativa, n=104).....	85
Figura 23- Electroforese em gel de agarose com os resultados da amplificação do gene da β -actina felina.....	86
Figura 24- Electroforese em gel de agarose com os resultados da amplificação de <i>Hepatozoon</i> spp.....	88

Figura 25- Electroforese em gel de agarose com o resultado da amplificação de *Leishmania infantum*..... 89

Figura 26- Electroforese em gel de agarose com o resultado da amplificação de *Bartonella spp*..... 91

1. Introdução

As doenças transmitidas por vectores (DTV) artrópodes (carrças, flebótomos, mosquitos e pulgas) são causadas por bactérias, parasitas e vírus (Beugnet & Marié, 2009; Vilhena *et al.*, 2013). Muitos destes agentes patogénicos são emergentes e/ou reemergentes e alguns apresentam potencial zoonótico, representando também um problema de saúde pública (Beugnet & Marié, 2009; Vilhena *et al.*, 2013).

A frequência das DTV está a aumentar na Europa em consequência do aumento da densidade, distribuição geográfica e capacidade vectorial de alguns artrópodes vectores e disseminação dos agentes transmitidos pelos mesmos. Os principais factores responsáveis por esta emergência são as alterações climáticas, as quais têm um impacto directo nas populações de artrópodes, o aumento da mobilidade do homem e dos animais domésticos para vários países do mundo, a criação de parques, barragens e lagos artificiais dentro de centros urbanos, e ainda o aumento da prática de actividades ao ar livre, promovendo o contacto com vectores (Shaw, 2008; Beugnet & Marié, 2009; Harrus *et al.*, 2011; Vilhena *et al.*, 2013).

As doenças felinas transmitidas por vectores (DFTV) constituem um problema de importância crescente com uma elevada morbilidade e mortalidade, embora a importância clínica e epidemiológica de alguns agentes patogénicos nos gatos ainda não tenha sido claramente determinada (Vilhena *et al.*, 2013).

Embora os artrópodes mais comumente encontrados em felinos domésticos sejam as pulgas (família Pulicidae) e as carrças (família Ixodidae), vectores de *Bartonella* spp. e de *Babesia* spp., respectivamente (Tabar *et al.*, 2008), os flebótomos (família Psychodidea, subfamília Phlebotominae) são responsáveis pela transmissão da infecção por *Leishmania* spp. em gatos (Tabar *et al.*, 2008).

O diagnóstico de doenças infecciosas em felinos pode ser complexo e até mesmo um desafio, uma vez que algumas infecções podem ocorrer em animais saudáveis e, mesmo quando aparecem sinais clínicos, estes são na maioria das vezes inespecíficos (Tabar *et al.*, 2008; Vilhena *et al.*, 2013). Por outro lado, muitos dos agentes patogénicos com tropismo hemático estão frequentemente presentes em baixo número em sangue periférico, sendo difícil a sua detecção por exame directo, assim como o seu isolamento em cultura. É ainda, importante referir, a inexistência de testes comerciais para muitos dos agentes patogénicos felinos e para o facto da produção de anticorpos específicos poder ser transiente e de, em

alguns casos, ocorrer reacções cruzadas com outros organismos (Tabar *et al.*, 2008; Vilhena *et al.*, 2013).

Uma adequada identificação dos agentes transmitidos por artrópodes é requerida para uma melhor abordagem e manejo clínico de felinos com sinais clínicos e para avaliar o papel que um portador assintomático poderá ter na transmissão da infecção (Tabar *et al.*, 2008).

O desenvolvimento de técnicas moleculares nas duas últimas décadas permitiu aumentar a detecção e caracterização de agentes patogénicos emergentes e reemergentes transmitidos por vectores (Harrus *et al.*, 2011). Embora o número de casos clínicos e estudos epidemiológicos de DFTV reportados a nível mundial tenham aumentado, a informação sobre os agentes transmitidos por vectores responsáveis por infecções nos felinos e a sua prevalência em Portugal é bastante reduzida (Vilhena *et al.*, 2013).

1.1. Doenças causadas por protozoários

1.1.1. *Babesia* spp.

1.1.1.1. Etiologia

A babesiose, também conhecida como piroplasmose, é uma infecção causada por um parasita hemoprotozoário do género *Babesia*, filo Apicomplexa, pertencente à classe Piroplasma, ordem Piroplasmida e família Babesiidae (Urquhart *et al.*, 1998; Taboada & Lobetti, 2006; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Hartmann *et al.*, 2013). Este parasita, transmitido por carrças, afecta animais domésticos e selvagens e humanos, apresentando uma distribuição mundial (Baneth *et al.*, 2004; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Hartmann *et al.*, 2013).

Várias espécies e subespécies de *Babesia* foram documentadas a nível mundial como infecciosas para os gatos domésticos, nomeadamente: *B. canis*; *B. vogeli*; *B. cati*; *B. felis*; *B. herpailuri*; *B. hongkongensis*; *B. leo*; *B. microti*; e *B. pantherae* (Baneth *et al.*, 2004; Taboada & Lobetti, 2006; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Hartmann *et al.*, 2013), sendo a espécie *B. felis* a mais comum (Shoeman *et al.*, 2001).

Histologicamente, as espécies de *Babesia* que infectam canídeos foram identificadas com base na aparência morfológica do parasita nos eritrócitos, tendo surgindo dois grupos de babesias: as pequenas babesias (*B. gibsoni*), com corpos piriformes com 1,0-2,5 µm de comprimento; e grandes babesias (*B. canis*) com 2,5-5,0 µm de comprimento (Urquhart *et al.*, 1998; Solano-Gallego & Baneth, 2011). Dennig & Brocklesby (1972) propuseram que os piroplasmas felinos também fossem divididos em pequenas babesias (*B. felis* e *B. cati*) e grandes babesias (*B. herpailuri* e *B. pantherae*) (Shoeman *et al.*, 2001).

Cytauxzoon felis é outro piroplasma que infecta felinos. Este parasita, filogeneticamente relacionado com os géneros *Theileria* e *Babesia*, tem sido reportado em gatos domésticos de França, Espanha e Itália e no lince Ibérico (Baneth *et al.*, 2004; Solano-Gallego & Baneth, 2011).

1.1.1.2. Ciclo de vida e transmissão do parasita

O ciclo de vida do piroplasma *Babesia* é heteroxeno, necessitando de um hospedeiro vertebrado (mamífero) e um invertebrado (carrapa da família Ixodidae) para completar o seu ciclo de vida (Urquhart *et al.*, 1998; Taboada & Lobetti, 2006).

A reprodução assexuada de *Babesia* spp. ocorre exclusivamente dentro dos eritrócitos dos mamíferos (Solano-Gallego & Baneth, 2011), enquanto a reprodução sexuada ocorre no tubo digestivo das carrapas (Urquhart, 1998).

Os hospedeiros vertebrados são infectados quando, após a picada da carrapa para se alimentar do sangue do hospedeiro, os esporozoítos (forma infectante do parasita) são inoculados com a saliva da carrapa. No hospedeiro, os parasitas invadem os eritrócitos e no seu interior replicam-se por divisão binária e formam merozoítos que são observados em pares ou de forma isolada dentro dos eritrócitos (figura 1) (Taboada & Lobetti, 2006; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Hartmann *et al.*, 2013). A reprodução assexuada (merogonia) leva à formação de oito ou mais merozoítos na mesma célula com conseqüente ruptura e libertação dos parasitas para a corrente sanguínea, seguida de invasão de novos eritrócitos (Solano-Gallego & Baneth, 2011).

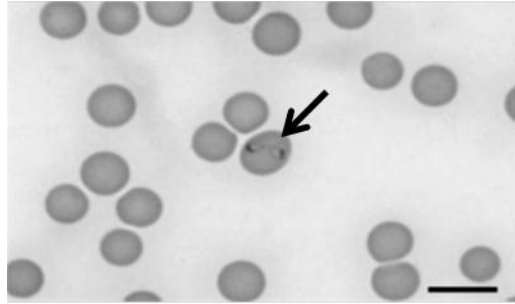


Figura 1 - Eritrócito felino infectado com merozóitos de *Babesia canis* (seta) no citoplasma (Baneth *et al.*, 2004).

Os hospedeiros invertebrados, ao alimentarem-se do sangue do hospedeiro infectado, ingerem os merozoitos presentes nos eritrócitos (Taboada & Lobetti, 2006; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Hartmann *et al.*, 2013). No interior do intestino do vector ocorre a reprodução sexuada por fusão dos micro e macro gâmetas com formação do zigoto móvel (Taboada & Lobetti, 2006). O zigoto migra para o tecido das glândulas salivares onde ocorre a esporogonia com formação de esporozoítos (Taboada & Lobetti, 2006; Solano-Gallego & Baneth, 2011). Para além das glândulas salivares, e dependendo da espécie de *Babesia*, os esporozoítos podem migrar para os ovários das carraças (Taboada & Lobetti, 2006).

Algumas espécies de *Babesia*, como *B. canis*, apenas se tornam infecciosas para os animais dois a três dias depois da fixação da carraça, presumindo-se que as mudanças de temperatura ou a presença de sangue no intestino do vector atuem como um estímulo para a maturação dos esporozoítos (Solano-Gallego & Baneth, 2011).

No geral, as diferentes espécies de *Babesia* são transmitidas pela carraça transestadialmente (a infecção persiste de um estágio para o outro) e dependendo da espécie de *Babesia* pode ser transmitido nos três estádios do ciclo de vida da carraça (larva, ninfa e adulto), como acontece na espécie *B. canis* (Urquhart *et al.*, 1998; Taboada & Lobetti, 2006; Solano-Gallego & Baneth, 2011). Além disso, em algumas espécies de *Babesia* também ocorre transmissão transovárica (através do ovo), podendo o parasita ser transmitido entre gerações de carraças sem necessidade destas se alimentarem de um hospedeiro infectado (Urquhart *et al.*, 1998; Solano-Gallego & Baneth, 2011).

Apesar da transmissão natural da babesiose para hospedeiros vertebrados ocorrer através da picada de carraças (Urquhart *et al.*, 1998; Taboada & Lobetti, 2006), existe pouca informação sobre os vectores na babesiose felina (Solano-Gallego & Baneth, 2011; Hartmann

et al., 2013). Nos canídeos, os agentes patogénicos que causam babesiose canina na Europa, *B. canis* e *B. vogeli*, são transmitidos pelas carraças *Dermacentor reticulatus* e *Rhipicephalus sanguineus*, respectivamente. *R. sanguineus*, o mesmo vector de *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis*, parasita preferencialmente canídeos domésticos e silvestres nas três fases do seu ciclo de vida (desde larva até adulto), razão pela qual é conhecido como a carraça castanha do cão, no entanto pode ocasionalmente parasitar outros hospedeiros, tais como o gato e o homem (Hagiwara, 2009; Dantas- Torres, 2010; Santos-Silva *et al.*, 2011).

A transmissão do parasita por via iatrogénica e através de transfusões sanguíneas também se encontram reportadas (Solano-Gallego & Baneth, 2011; Hartmann *et al.*, 2013).

1.1.1.3. Epidemiologia

A babesiose felina é menos comum que a babesiose canina e tem sido principalmente reportada em áreas costeiras na África do Sul, onde a infecção é principalmente devido à espécie *B. felis*, causando infecções severas em gatos domésticos e também felinos selvagens como leões e chitas (Taboada & Lobetti, 2006; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Hartmann *et al.*, 2013). Nestas áreas é também prevalente *B. leo*, tanto em gatos domésticos como em leões (Taboada & Lobetti, 2006; Hartmann *et al.*, 2013). *B. cati* tem sido reportada principalmente na Índia em gatos domésticos (Taboada & Lobetti, 2006; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Hartmann *et al.*, 2013). Estas espécies apresentam uma patogenicidade moderada, causando infecções crónicas acompanhadas por sinais clínicos pouco evidentes (Taboada & Lobetti, 2006; Hartmann *et al.*, 2013).

Casos esporádicos de espécies de *Babesia* que infectam canídeos foram reportados em gatos domésticos na Europa, tal como *B. canis* em Espanha e em Portugal e *B. vogeli* e *B. microti* (sinónimo de *Theileria annae*) em Portugal (Taboada & Lobetti, 2006; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Hartmann *et al.*, 2013; Vilhena *et al.*, 2013). *B. presentii* foi detectada em gatos domésticos em Israel (Baneth *et al.*, 2004) e *B. vogeli* é comum em gatos de rua na Tailândia (Baneth *et al.*, 2004; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Hartmann *et al.*, 2013).

Na Europa, a babesiose canina é causada principalmente por *B. canis* e *B. vogeli*. *B. canis* é transmitida pela carraça *D. reticulatus*, geralmente encontrada em regiões temperadas da Europa e comum em vários distritos do Centro e Norte de Portugal (Aveiro, Bragança,

Castelo Branco, Leiria, Lisboa, Porto, Vila Real e Viseu) (Cardoso *et al.*, 2008; Cardoso *et al.*, 2010; Santos-Silva *et al.*, 2011). *B. vogeli* é transmitida pela carraça *R. sanguineus*, que apresenta uma distribuição mundial, sendo detectada em todos os distritos de Portugal (Cardoso *et al.*, 2008; 2010; Santos-Silva *et al.*, 2011).

A babesiose em gatos domésticos também tem sido reportada, de forma esporádica, na Alemanha, Brasil, França, Tailândia e Zimbábue, por espécies de *Babesia* não identificadas (Shoeman *et al.*, 2001; Baneth *et al.*, 2004; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Hartmann *et al.*, 2013).

A idade é o único factor predisponente para a infecção felina com *Babesia* spp. em áreas endémicas (Solano-Gallego & Baneth, 2011; Vilhena *et al.*, 2013). A maioria dos gatos naturalmente infectados com babesiose tem idade inferior a três anos provavelmente devido ao estado imunitário imaturo dos gatos jovens (Vilhena *et al.*, 2013). Até ao momento, não se encontrou uma relação entre raça e género com a infecção por *Babesia* spp. (Shoeman *et al.*, 2001; Taboada & Lobetti, 2006; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Hartmann *et al.*, 2013).

1.1.1.4. Patogenia

A patogenia da infecção por *Babesia* spp. nos hospedeiros mamíferos varia consideravelmente de acordo com as diferentes espécies e subespécies envolvidas, assim como, com a idade do hospedeiro, a presença de co-infecções e a resposta imunitária à infecção (Baneth *et al.*, 2004; Taboada & Lobetti, 2006; Solano-Gallego & Baneth, 2011). Após a infecção, gera-se uma resposta imunitária significativa, mas incapaz de eliminar o parasita do organismo e os animais que geralmente recuperam tornam-se portadores crónicos (Taboada & Lobetti, 2006; Hartmann *et al.*, 2013).

A elevada prevalência de babesiose em gatos jovens suporta a possibilidade dos gatos em áreas endémicas contraírem a infecção no início de vida, tornando-se portadores subclínicos (Schoeman *et al.*, 2001).

A anemia hemolítica é a manifestação clínica predominante da babesiose felina e canina (Schoeman *et al.*, 2001; Taboada & Lobetti, 2006; Solano-Gallego & Baneth, 2011). A anemia hemolítica ocorre devido à hemólise intravascular e extravascular provocada pela replicação intracelular dos parasitas. No entanto, outros mecanismos podem estar envolvidos na destruição dos eritrócitos, nomeadamente: (i) ligação de anticorpos à superfície das células

parasitadas; (ii) activação do complemento; (iii) produção de factores hemolíticos no soro; (iv) dano oxidativo dos eritrócitos; (v) aumento do número de eritrócitos fagocitados; e (vi) aparecimento de esferócitos (Taboada & Lobetti, 2006; Solano-Gallego & Baneth, 2011). A intensa hemólise resulta em hemoglobinemias, hemoglobinúrias, bilirrubinemias e bilirrubinúrias (Taboada & Lobetti, 2006; Solano-Gallego & Baneth, 2011).

A hipóxia tecidual contribui na maioria das vezes para muitos dos sinais clínicos presentes. Várias são as causas para o aparecimento da hipoxia tecidual: anemia; choque hipotensivo; estase vascular provocada por alterações dos eritrócitos; e produção excessiva de monóxido de carbono (Solano-Gallego & Baneth, 2011). O sistema nervoso central, os rins e os músculos são os órgãos mais afectados pela presença de hipoxia (Taboada & Lobetti, 2006; Solano-Gallego & Baneth, 2011).

A babesiose felina aparece geralmente associada a lesões hepatocelulares devido à hipoxia tecidual causada pela anemia, sendo importante, após o tratamento da babesiose, repetir novos testes para determinar se as lesões hepáticas foram reversíveis (Schoeman *et al.*, 2001). No entanto, muitas vezes não existe uma relação consistente entre os valores da enzima hepática, alanina transaminase (ALT) e de hematócrito, o que indica que a anemia, apesar de ser a causa principal, não é a única causa responsável pelo dano hepatocelular e que outros factores, tal como citocinas inflamatórias, possam ser responsáveis pelas alterações hepáticas (Schoeman *et al.*, 2001). Qualquer dano hepatocelular pode potencialmente ser acompanhado por edema celular com consequente compressão dos canalículos biliares e desenvolvimento de colestase secundária (Schoeman *et al.*, 2001).

O baço tem uma função importante no controlo da babesiose (Taboada & Lobetti, 2006; Solano-Gallego & Baneth, 2011). Os cães infectados experimentalmente e esplenectomizados desenvolvem uma forma clínica grave e apresentam níveis elevados de parasitémia (Solano-Gallego & Baneth, 2011).

1.1.1.5. Sinais clínicos

Os sinais clínicos normalmente observados em gatos com babesiose são anorexia, letargia, anemia, perda de peso, e a presença de pêlo áspero. A icterícia e pirexia são menos comuns (Schoeman *et al.*, 2001; Taboada & Lobetti, 2006; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Hartmann *et al.*, 2013).

A maioria destes sinais são secundários à anemia hemolítica e em casos de complicações pode ocorrer falha renal, edema pulmonar, hepatopatia e alterações a nível do sistema nervoso central (Taboada & Lobetti, 2006; Hartmann *et al.*, 2013).

A presença de co-infecções com *Mycoplasma haemofelis*, vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV) podem contribuir para a presença de sinais clínicos e severidade da infecção (Baneth *et al.*, 2004; Hartmann *et al.*, 2013). A diferenciação entre a infecção por *Babesia* spp. e *M. haemofelis* é complexa, uma vez que ambas infecções causam sinais clínicos semelhantes durante a fase aguda, com alterações laboratoriais semelhantes e com aparência similar em esfregaços sanguíneos. Assim, é aconselhável tratar simultaneamente para ambas as infecções (Schoeman *et al.*, 2001).

1.1.1.6. Diagnóstico

A. Alterações Laboratoriais

A principal alteração laboratorial num gato com babesiose é a presença de anemia hemolítica regenerativa hipocrômica macrocítica (Schoeman *et al.*, 2001; Taboada & Lobetti, 2006; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Hartmann *et al.*, 2013). Nos esfregaços sanguíneos é possível observar aumento da policromatofília, corpos de “Howell-Jolly”, eritrócitos nucleados e anisocitose (Schoeman *et al.*, 2001; Hartmann *et al.*, 2013). Embora menos frequente, também podem ser visualizados esferócitos, eritrócitos fagocitados por monócitos e a presença de parasitas no interior dos eritrócitos (Schoeman *et al.*, 2001; Hartmann *et al.*, 2013). Secundariamente, podem-se obter resultados positivos no teste de Coombs e observar autoaglutinação (Schoeman *et al.*, 2001; Hartmann *et al.*, 2013).

A anemia hemolítica imunomediada em gatos é raramente documentada e, quando presente, é secundária à infecção por *M. haemofelis* ou FeLV ou após terapêutica de patologias da tiróide (Schoeman *et al.*, 2001). No estudo realizado por Schoeman *et al.* (2001) nove dos 56 gatos infectados naturalmente por *B. felis* apresentavam-se positivos ao teste de autoaglutinação, mas seis destes gatos estavam co-infectados com FeLV.

Ao contrário da babesiose canina, os gatos infectados por *Babesia* spp. não apresentam alterações a nível dos glóbulos brancos nem trombocitopenia (Schoeman *et al.*, 2001; Taboada & Lobetti, 2006; Hartmann *et al.*, 2013).

No que diz respeito às alterações bioquímicas, é comum observar-se o aumento da ALT (Schoeman *et al.*, 2001; Hartmann *et al.*, 2013). A concentração total de bilirrubina está frequentemente aumentada, principalmente devido à hemólise, no entanto o dano hepatocelular secundário e colestase intrahepática são factores que também podem contribuir para a hiperbilirrubinemia (Schoeman *et al.*, 2001; Hartmann *et al.*, 2013).

Na babesiose felina é ainda comum observar-se hipergamaglobulinemia devido à gamopatia policlonal (Schoeman *et al.*, 2001; Taboada & Lobetti, 2006; Hartmann *et al.*, 2013).

B. Métodos Parasitológicos

O esfregaço sanguíneo é a técnica de referência usada no diagnóstico de *Babesia* spp. apresentando uma sensibilidade elevada na presença de parasitemia moderada a elevada. Os parasitas são identificados em esfregaços finos na máxima ampliação sob óleo, usando corantes Romanowsky (azul de metileno e eosina) ou Giemsa (Hartmann *et al.*, 2013). No entanto em casos de parasitemia baixa ou intermitente torna-se difícil avaliar a presença de infecção apenas por microscopia, sendo recomendado nestes casos o uso de métodos moleculares (Solano-Gallego & Baneth, 2011).

C. Métodos Serológicos

O teste de imunofluorescência indirecta (IFI) é a técnica serológica mais utilizada no diagnóstico de babesiose canina. No entanto, podem ocorrer reacções cruzadas entre diferentes espécies de *Babesia* e outros protozoários (Solano-Gallego & Baneth, 2011). O imunoensaio ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) tem sido principalmente usado em estudos epidemiológicos (Solano-Gallego & Baneth, 2011).

Até ao momento não existem técnicas serológicas comerciais para o diagnóstico da babesiose felina (Hartmann *et al.*, 2013).

D. Métodos Moleculares

A técnica de reacção em cadeia da polimerase (PCR) é um método molecular de diagnóstico sensível e específico, permitindo o diagnóstico definitivo de babesiose em gatos através da detecção de material genético do parasita em amostras de sangue (Hartmann *et al.*,

2013). Esta técnica é particularmente útil na detecção de animais com baixos níveis de parasitemia e na diferenciação entre as várias espécies de *Babesia* e outros hemoprotozoários morfológicamente indistinguíveis, como é o caso do *Cytauxzoon felis* e de *M. haemofelis* (Schoeman *et al.*, 2001; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Hartmann *et al.*, 2013).

A eficácia da técnica de PCR depende de diversos factores: (i) dos “primers” (sequência de nucleótidos iniciadoras) utilizados; (ii) do número de cópias; (iii) do método de extração de ADN; (iv) da origem das amostras biológicas; e (v) dos protocolos de PCR utilizados (Maia & Campino, 2008). Com o objectivo de aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico, diferentes técnicas como a PCR em tempo real (qPCR), nested ou semi-nested PCR, e PCR-RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) têm sido utilizadas. A qPCR é mais sensível que a PCR convencional, sendo usada para estudar a cinética da infecção e facilitar a monitorização da carga parasitária durante e após o tratamento (Maia & Campino, 2008; World Organisation for Animal Health [OIE], 2008; Gramiccia, 2011).

1.1.1.7. Tratamento

Os gatos infectados por *B. felis* deverão ser tratados, uma vez que esta espécie provoca uma infecção severa e muitas vezes fatal se não for tratada. A resposta à terapêutica é geralmente positiva, embora as recidivas sejam comuns, sendo necessário na maioria das vezes tratamentos repetidos ou prolongados (Hartmann *et al.*, 2013). No entanto, muitos fármacos que são utilizados no tratamento etiológico da babesiose não são eficazes em gatos infectados por *B. felis* (Hartmann *et al.*, 2013). O fosfato de primaquina (0,5 mg/kg, SID, PO, durante um a três dias) é o fármaco recomendado na terapêutica da *B. felis* (Solano-Gallego & Baneth, 2011). Contudo, e apesar de reduzir a parasitemia, este medicamento não elimina o parasita (Schoeman *et al.*, 2001; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Hartmann *et al.*, 2013). Outros fármacos têm sido testados, nomeadamente a rifampicina e o trimetoprim-sulfadiazina, contudo a sua eficácia é menor que a do fosfato de primaquina (Taboada & Lobetti, 2006; Hartmann *et al.*, 2013).

No estudo realizado por Baneth *et al.* (2004), um dos gatos infectado por *B. canis* foi tratado com dipropionato de imidocarb (fármaco eficaz no tratamento de babesiose canina) com uma única dose de 2,5mg/kg via intramuscular (IM) e obteve boa resposta, tendo recuperado ao fim de 12 dias.

O tratamento de suporte, tal como administração de fluidos endovenosos, transfusões de sangue e o uso de anti-inflamatórios deve ser associado ao tratamento etiológico (Solano-Gallego & Baneth, 2011).

1.1.1.8. Saúde Pública

A babesiose humana causada por várias espécies de *Babesia* é uma infecção zoonótica emergente (Solano-Gallego & Baneth, 2011). A esplenectomia é um importante factor de risco para o desenvolvimento natural de babesiose e potencialmente fatal em humanos (Solano-Gallego & Baneth, 2011).

Na Europa, há casos reportados de humanos esplenectomizados infectados por *B. divergens* (presente no gado) tendo sido fatal na maioria dos casos (Birkenheuer, 2012). A babesiose humana causada por *B. microti* (agente da babesiose nos roedores), *B. bovis* e *B. canis* também já foi reportada (Solano-Gallego & Baneth, 2011; Birkenheuer, 2012). Apesar de não estar provado que os animais (cão, gato e bovinos) possam actuar como reservatórios, estes podem servir como veículo de transporte de carraças infectadas (Solano-Gallego & Baneth, 2011).

1.1.2. *Hepatozoon* spp.

1.1.2.1. Etiologia

Os parasitas protozoários do género *Hepatozoon* pertencem ao subfiló Apicomplexa, subordem Adeleorina e à família Hepatozoidae (Baneth, 2006a; Baneth, 2011; Pawar *et al.*, 2012). Mais de 340 espécies *Hepatozoon* encontram-se descritas em anfíbios, reptéis, marsupiais e mamíferos (Baneth *et al.*, 2013).

A espécie *H. canis* foi reportada pela primeira vez em 1905, tendo sido chamada de *Leukocytozoon canis* quando foi encontrada no sangue de um canídeo e pouco tempo depois numa carraça (Baneth, 2011). *H. canis* é o agente da hepatozoonose canina tanto no Velho Mundo como no Mundo Novo com tropismo para tecidos hemolinfáticos como o fígado, baço, medula óssea e linfonodos (Jittapalpong *et al.*, 2006; Baneth, 2011).

A hepatozoonose felina foi pela primeira vez descrita por Patton em 1908 na Índia e a espécie infectante foi chamada de *Leukocytozoon felis domesticus* (Baneth, 2011; Baneth *et al.*,

2013). Este parasita felino foi mais tarde transferido para o género *Hepatozoon* e considerou-se na altura que a espécie que afectava os gatos era indistinguível da espécie infectante dos canídeos, devido à grande semelhança morfológica do parasita observado no sangue destes animais (Baneth *et al.*, 2013).

1.1.2.2. Ciclo de vida e transmissão do parasita

O ciclo de vida do parasita *Hepatozoon* é heteroxeno (Urquhart *et al.*, 1996; Vilcins *et al.*, 2009) e apresenta duas fases de reprodução, uma sexuada e uma assexuada. A fase assexuada ocorre no hospedeiro vertebrado intermediário (anfíbios, mamíferos, pássaros e répteis) e inclui a merogonia seguida de gametogonia, enquanto a reprodução sexuada seguida de esporogonia ocorre no hospedeiro invertebrado definitivo (carraças, insectos e pulgas) (Urquhart *et al.*, 1996; Baneth, 2011; Giannitti *et al.*, 2012).

A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre após ingestão do hospedeiro artrópode hematófago infectado (Baneth, 2011; Pawar *et al.*, 2012). No hospedeiro vertebrado, os esporozoítos (forma infectante) libertam-se dos esporocistos no intestino e penetram a parede intestinal. Os esporozoítos invadem as células mononucleares e disseminam-se por via sanguínea ou linfática para os órgãos alvo (Baneth, 2011). Posteriormente, ocorre o processo de merogonia em diferentes órgãos viscerais, que varia de acordo com a espécie infectante e pode incluir órgãos hematopoiéticos, tecidos muscular esquelético e cardíaco (Giannitti *et al.*, 2012). Este processo leva à formação de merontes que contêm microrganismos individuais alongados, os merozóitos, que se reproduzem por divisão binária (Baneth, 2011). Existem dois tipos de merontes, os que contêm aproximadamente 20-30 micromerozoitos e os que contêm até quatro macromerozoitos. Os macromerozoitos libertam-se do meronte maturo e invadem novas células para formar novos merontes, contendo micro ou macromerozóitos. Os micromerozóitos libertam-se do meronte maturo e invadem neutrófilos e monócitos. Nestas células ocorre o processo de gametogonia com a formação de gamontes (Baneth, 2011).

O hospedeiro definitivo ao alimentar-se do sangue do hospedeiro vertebrado infectado ingere leucócitos que contêm gamontes. No intestino do vector, os gamontes libertam-se dos leucócitos e ocorre a gametogénese com a formação de gâmetas distintos com posterior fertilização e formação do zigoto. Através do processo de esporogonia ocorre, a partir do zigoto, a formação de oócitos contendo milhares de esporocistos. A perpetuação do ciclo do

parasita ocorre quando um novo hospedeiro intermediário ingerir o vector infectado (Baneth, 2011).

Os gamontes e merontes de *H. canis* e *H. felis* são morfologicamente distinguíveis. O meronte *H. felis* é redondo a oval com um comprimento de 39 µm por 34,5 µm e rodeado por uma membrana espessa que a separa do tecido circundante. Contém longos merozoítos dispersos sem qualquer arranjo dentro do meronte, constituídos por núcleos rectangulares que assumem toda a largura do merozóito correspondente. O meronte *H. canis* é de menor tamanho (30,6 µm por 28,9 µm) e os merozoítos dentro dos merontes estão dispostos em círculo em torno do núcleo central (Baneth *et al.*, 2013). O gamonte *H. felis* apresenta um núcleo redondo enquanto o núcleo do gamonte *H. canis* é mais alongado e em forma de “ferradura”. Os gamontes *H. felis* são também relativamente mais pequenos (10,5 µm) e menos evidentes no interior dos leucócitos, não sendo frequente a sua detecção em esfregaços sanguíneos (Kubo *et al.*, 2006; Baneth *et al.*, 2013).

O processo de merogonia de ambos parasitas ocorre em tecidos diferentes, enquanto os merontes de *H. canis* se encontram nas células do sistema hematopoiético, os merontes de *H. felis* encontram-se com maior frequência nos tecidos musculares, tais como o miocárdio e músculos esqueléticos (Baneth *et al.*, 1998).

No caso dos canídeos, a transmissão de *H. canis* pode ocorrer tanto pela ingestão da carraça *R. sanguineus*, como por transmissão transplacentária, embora a primeira via de transmissão seja a mais comum (Baneth *et al.*, 2013). Normalmente é no estadio de ninfa que *R. sanguineus* adquire os gamontes circulantes no sangue do hospedeiro vertebrado infectado e passam o parasita transtetadialmente quando é feita a muda (de ninfa para a forma adulta). Não tem sido descrita a transmissão transovárica, ou seja, da carraça adulta fêmea para os ovos (Baneth, 2006a).

Tendo em conta que a disseminação de *H. canis* numa população canina jovem errante é rápida, a disseminação de *H. felis* será provavelmente semelhante (Baneth *et al.*, 2013). A elevada prevalência encontrada entre a infecção por *Hepatozoon* e felinos com acesso ao exterior sugere que a transmissão do parasita é feita por: (i) ectoparasitas, tais como ácaros, carraças, piolhos ou pulgas; (ii) carnivorismo, como já descrito na transmissão de algumas espécies de *Hepatozoon* spp.; ou (iii) via transplacentária (Ortuño *et al.*, 2008; Baneth *et al.*,

2013). Contudo, até ao momento não existe nenhum vector comprovado de *H. felis* (Baneth *et al.*, 2013).

1.1.2.3. Epidemiologia

A hepatozoonose em gatos domésticos tem sido reportada em vários países incluído Brasil, Espanha, Estados Unidos da América (E.U.A), França, Índia, Israel, Nigéria e países da África do Sul (Baneth, 2011). Esta infecção tem sido principalmente reportada em áreas onde a infecção canina também está presente (Baneth, 2011; Baneth *et al.*, 2013).

Na última década realizaram-se vários inquéritos epidemiológicos de modo a determinar a prevalência da infecção por *Hepatozoon* spp. em gatos. No estudo de Jittapalapong *et al.* (2006) realizado em zonas endémicas de hepatozoonose canina e felina em Bangkok, Tailândia, os autores obtiveram uma prevalência de 32,3% de infecção por *H. canis* através da técnica de PCR numa amostra de 300 gatos. Posteriormente, e devido ao desenho de “primers” mais específicos, foi possível detectar infecções por *H. felis* em gatos, tendo sido Tabar *et al.* (2008) os primeiros investigadores a determinar a prevalência por este agente (4%) em 100 gatos residentes em Barcelona, Espanha. Mais recentemente, Baneth *et al.* (2013), verificaram que ambas espécies, *H. canis* e *H. felis* têm capacidade de infectar os gatos domésticos, embora a prevalência de *H. felis* seja superior.

Em Portugal, Vilhena *et al.* (2013) obtiveram uma prevalência de infecção por *H. felis* de 15,6% (50/320) em gatos domésticos residentes do Norte e Centro de Portugal o, que, juntamente com os dados de estudos realizados em Espanha permite concluir que a infecção por *Hepatozoon* é muito difundida na população felina da Península Ibérica (Ortuño *et al.*, 2008; Vilhena *et al.*, 2013).

1.1.2.4. Patogenia

A hepatozoonose canina está associada com as condições imunológicas do hospedeiro. Vários factores estão implicados no desenvolvimento da infecção tais como alterações genéticas dos neutrófilos, imaturidade do sistema imunitário em cachorros entre os 4 a 6 meses de idade, condições ou tratamentos imunossupressivos e co-infecções (Baneth *et al.*, 1998; Baneth, 2006a). A hepatozoonose tem sido reportada em cães com infecções

concomitantes tais como anaplasmose, babesiose, ehrliquiose, leishmaniose, parvovirose e toxoplasmose (Baneth *et al.*, 1998; Baneth, 2006a; 2011).

Tal como observado nos cães, a infecção por *Hepatozoon* spp. nos gatos pode ser considerada oportunista, uma vez que apenas em situações de imunossupressão ou de “stress” é que se manifesta (Baneth *et al.*, 1998). Co-infecções com FIV, FeLV e *M.haemofelis* têm sido reportadas (Baneth *et al.*, 2013). Nos animais imunodeprimidos co- infectados por *Hepatozoon* spp. observa-se uma intensificação da parasitémia e o aumento da actividade das enzimas lactato desidrogenase (LDH) e creatina quinase (CK), associado às lesões a nível do tecido muscular provocadas pelo parasita (Kubo *et al.*, 2006).

1.1.2.5. Sinais clínicos

A maioria dos gatos infectados apresentam infecções subclínicas, provavelmente devido à ausência de uma forte resposta inflamatória ao redor dos merontes presentes no tecido muscular (Kubo *et al.*, 2006; Baneth *et al.*, 2013). Contudo, já foram reportados casos de miosites e miocardites (Baneth *et al.*, 2013). De um modo geral, os sinais clínicos descritos em gatos com hepatozoonose são inespecíficos, e incluem letargia, anorexia, estomatite, gengivite e pirexia (Baneth *et al.*, 1998). A perda de peso, hipersalivação, ulceração da mucosa lingual e linfadenomegália também já foram reportados (Baneth, 2006a).

1.1.2.6. Diagnóstico

Como primeira abordagem, o diagnóstico de hepatozoonose felina pode ser feito através da observação de alterações laboratoriais, tais como o aumento da actividade sérica das enzimas musculares CK e LDH (Baneth *et al.*, 1998; 2013; Kubo *et al.*, 2006).

Apesar do nível de parasitémia ser normalmente baixa na hepatozoonose felina, com menos de 1% de neutrófilos e monócitos infectados, o exame directo de esfregaços sanguíneos corados com Diff-Quik ou Giemsa permite a observação de gamontes no interior de leucócitos (Baneth, 2006a; Baneth *et al.*, 2013) (figura 2). A visualização de merontes pode ser feito por histopatologia de biópsias de tecidos musculares infectados (Baneth *et al.*, 2013).



Figura 2 - Observação da forma gamonte de *Hepatozoon* spp.(seta) no citoplasma de um neutrófilo de um gato doméstico através de um esfregaço sanguíneo corado com Giemsa (Baneth, 2006a).

A detecção do parasita em amostras de sangue através de técnicas de biologia molecular apresenta uma sensibilidade superior à do exame directo. No estudo realizado por Jittapalapong *et al.* (2006) por microscopia convencional apenas se observaram gamontes em 0,7% dos gatos analisados, enquanto por PCR detectou-se a presença do ADN do parasita em 32% dos animais da amostra estudada. A PCR apresenta a mais-valia de permitir identificar a espécie de *Hepatozoon* responsável pela infecção (Baneth, 2006a).

A combinação de métodos parasitológicos, pouco invasivos e não dispendiosos (esfregaços sanguíneos), com métodos moleculares (amplificação e posterior sequenciação) aumenta a sensibilidade de diagnóstico de *Hepatozoon* spp. (Ortuño *et al.*, 2008).

1.1.2.7. Tratamento

A hepatozoonose felina tem sido tratada com doxiciclina (5 mg/kg BID, PO) ou com oxitetraciclina (50 mg/Kg BID, PO) associada com uma única dose oral de primaquina (2 mg/Kg) (Baneth, 2006a). No caso de canídeos infectados com *H. canis* é administrado dipropionato de imidocarb durante 14 dias até se observar ausência de gamontes na circulação sanguínea (Baneth, 2011). O prognóstico de cães com baixa parasitémia e tratados é geralmente favorável, apesar de na maioria das vezes ser necessário tratamentos repetidos com dipropionato de imidocarb. O prognóstico nos cães com elevada parasitémia é reservado e muitas vezes vai depender da resposta à doença concomitante (Baneth, 2011).

1.1.2.8. Saúde Pública

A importância zoonótica de *Hepatozoon* spp. ainda não é conhecida. Apenas um caso de infecção com este parasita foi reportado num individuo proveniente das Filipinas que

apresentava anemia e icterícia. O parasita foi observado no sangue, mas não foi detectado nos outros órgãos analisados, nomeadamente fígado e medula óssea (Baneth, 2006a).

1.1.3. *Leishmania* spp.

1.1.3.1. Etiologia

A leishmaniose é doença parasitária, causada por protozoários intracelulares pertencentes ao género *Leishmania* (família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida) e transmitidos pela picada de um insecto vector flebotomíneo e que afecta o homem, animais domésticos e silvestres em quase todo o mundo (Lainson & Shaw, 1987; Baneth, 2006b; Diakou *et al.*, 2009; Center for Food Security & Public Health [CFSPH], 2009; Trainor *et al.*, 2010; World Health Organization [WHO], 2010; Observatório Português das Leishmanioses [ONLeish], 2013).

Todas as espécies do género *Leishmania* são protozoários pleomórficos que apresentam duas formas distintas: a forma amastigota, no hospedeiro vertebrado, e a forma promastigota, no hospedeiro invertebrado. Ambas as formas apresentam um núcleo, um cinetoplasto (genoma mitocondrial) e um flagelo. A forma amastigota, intracelular, apresenta um corpo oval ou redondo de 2,5 a 6,8 µm de diâmetro com um cinetoplasto em forma de bastão associado a um flagelo rudimentar, e encontra-se dentro dos fagolisossomas das células fagocíticas mononucleares dos hospedeiros vertebrados (figura 3). A forma promastigota, extracelular, apresenta um corpo fusiforme (15-30 µm) com um flagelo longo e livre na extremidade anterior, e é encontrada no intestino dos vectores artrópodes (figura 4) (Urquhart *et al.*, 1998; Baneth, 2006b; Gramiccia, 2011; Bates, 2013).

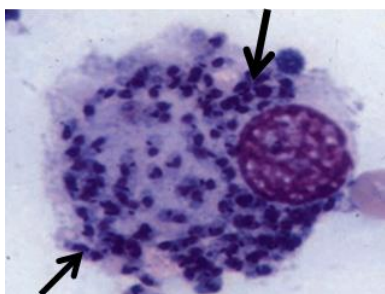


Figura 3: Formas amastigotas (setas) no citoplasma de um macrófago de um canídeo (Baneth & Solano-Gallego, 2012).

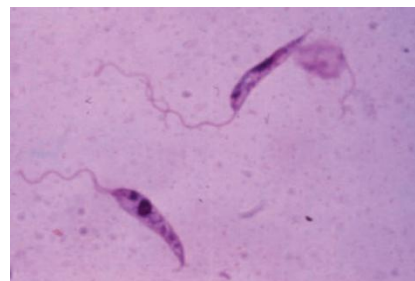


Figura 4: Forma promastigota do parasita em cultura (Baneth & Solano-Gallego, 2012)

1.1.3.2. Ciclo de vida e transmissão do parasita

Os parasitas do género *Leishmania* são difásicos que completam o seu ciclo de vida em dois hospedeiros: um vertebrado e um invertebrado (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

A transmissão do parasita aos hospedeiros vertebrados é feita por flebótomos da subfamília Phlebotominae, do género *Lutzomyia* no Novo Mundo, e do género *Phlebotomus* no Velho Mundo, sendo *P. perniciosus* e *P. ariasi* as espécies comprovadamente vectores de *L. infantum* em Portugal (figura 5) (Killick-Kendrick, 1999; Baneth, 2006b; Maroli *et al.*, 2007; Campino & Maia, 2010). Estes insectos são de pequenas dimensões, com um comprimento de 2 a 3 cm, e todas as espécies do género *Leishmania* são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas uma vez que apenas elas são hematófagas (Killick-Kendrick, 1999; Bates, 2007; CFSPH, 2009; ONLeish, 2013).



Figura 5 - *Phlebotomus perniciosus*, vector de *Leishmania infantum* em Portugal (ONLeish, 2013).

Os flebótomos adultos apresentam actividade crepuscular e nocturna. Na bacia do mediterrâneo, os flebótomos são principalmente activos nos meses quentes, e especificamente em Portugal a época de actividade ocorre geralmente entre Maio a Outubro, com o pico de actividade entre Julho e Agosto (Killick-Kendrick, 1999; Baneth, 2006b; CFSPH, 2009; Gramiccia, 2011; ONLeish, 2013). A sobrevivência do parasita durante os meses frios é principalmente sustentada no hospedeiro vertebrado, uma vez que não há transmissão transovárica de *Leishmania* spp. e os flebótomos adultos apresentam um curto período de vida (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Mendonça *et al.*, 2011).

Quando um flebotomíneo fêmea efectua uma refeição hematófaga num hospedeiro vertebrado infectado por *Leishmania*, adquire os protozoários na forma amastigota. Após ingestão, e já na porção posterior do intestino do vector, as formas amastigotas são libertadas dos macrófagos infectados e diferenciam-se em promastigotas. As formas promastigotas

sofrem várias alterações morfológicas e funcionais ao longo do intestino do vector, diferenciando-se nas formas infectantes para o hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas metacíclicas, as quais se alojam no segmento anterior do estômago do vector (Baneth, 2006b; Bates, 2007).

O flebótomo ao alimentar-se num novo hospedeiro vertebrado inocula os promastigotas metacíclicos na camada interna da pele do hospedeiro, provocando uma resposta inflamatória local. Inicialmente, aparecem os neutrófilos e eosinófilos e posteriormente os macrófagos que fagocitam o parasita. Este diferencia-se então na forma amastigota (não móvel) e multiplica-se dentro do fagolisossoma (Killick-Kendrick, 2002; Solano-Gallego et al., 2009; Bates, 2013). Os amastigostas continuam a sua multiplicação por divisão binária, levam à ruptura de macrófagos e invadem qualquer órgão que contenha células do sistema reticuloendotelial (Ferrer, 2002; Baneth, 2006b; Solano-Gallego et al., 2009). A infecção dissemina-se rapidamente, iniciando-se na pele e estendendo-se para os linfonodos, baço e medula óssea (órgãos do sistema hemolinfático) (Ferrer, 2002).

Apesar dos flebótomos serem o único vector comprovado de *Leishmania* spp., encontram-se descritas outras vias independentes deste, apesar do seu papel na epidemiologia da leishmaniose ainda não ser muito claro (Solano-Gallego et al., 2011; Campino & Maia, 2012). Encontram-se descritos casos de transmissão através de transfusões sanguíneas a partir de doadores de sangue infectados, transmissão vertical e transmissão venérea (Killick-Kendrick, 2002; CFSPH, 2009; Dantas-Torres et al., 2010; Solano-Gallego et al., 2011; Pennisi et al., 2013). A transmissão horizontal entre cães, através da mordida ou de feridas abertas, e a transmissão através de outros artrópodes, como as carraças (*R. sanguineus* e *Dermacentor variabilis*) e as pulgas (*Ctenocephalides felis*) continuam por comprovar. No entanto, a transmissão horizontal poderá explicar a presença de casos clínicos em áreas não endémicas onde não existem vectores (CFSPH, 2009; Dantas-Torres et al., 2010; Otranto & Dantas-Torres, 2010; Solano-Gallego et al., 2011).

1.1.3.3. Epidemiologia

As leishmanioses são endémicas em 98 países, tanto do Novo como no Velho Mundo, com mais de 350 milhões de pessoas em risco de contrair a infecção (WHO, 2010). Nos humanos, a leishmaniose distingue-se em três formas de acordo com as manifestações clínicas e as espécies envolvidas: leishmaniose cutânea (LC); leishmaniose mucocutânea; e

leishmaniose visceral (LV). Esta última é a mais severa e é principalmente causada pelas espécies *L. donovani* e *L. infantum* (sinónimo de *L. chagasi* no Novo Mundo) (Baneth, 2006b; CFSPH, 2009; Gramiccia, 2011). A incidência estimada de leishmaniose humana é de 2 milhões de casos: 0,5 milhões de LV e 1,5 milhões de LC (WHO, 2010).

Os canídeos são hospedeiros e reservatórios de *L. infantum*, sendo o cão a espécie mais importante na epidemiologia da leishmaniose zoonótica visceral, mantendo o parasita no ciclo doméstico (Grevot *et al.*, 2005; Baneth, 2006b; Maia *et al.*, 2008; Maia *et al.*, 2009; CFSPH, 2009; Campino & Maia, 2010; Gramiccia, 2011; Maia & Campino, 2011). Os cães são muito susceptíveis a este parasita, no entanto, em áreas endémicas, um largo número de cães infectados e seropositivos não desenvolvem sinais clínicos, mas continuam a ter a capacidade de transmitir o parasita ao vector (Cardoso *et al.*, 2010). Ainda nos cães, a infecção pode ser subclínica, autolimitante ou severa, sendo muitas das vezes fatal. Apesar da elevada prevalência de infecções subclínicas, as doenças concomitantes e/ou imunossupressoras podem levar à progressão clínica da doença (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

A leishmaniose canina constitui um grave problema veterinário e de Saúde Pública (Grevot *et al.*, 2005; Baneth, 2006b; Nasereddin *et al.*, 2008; Maia *et al.*, 2008; 2009; Campino & Maia, 2010; Maia & Campino, 2011; Solano-Gallego *et al.*, 2011). Esta infecção é endémica em mais de 70 países, estando presente em regiões do Sul da Europa (bacia do mediterrâneo), África, Ásia, América do Sul e Centro, tendo sido reportada nos E.U.A (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Nos animais, ao contrário dos humanos, a distinção entre espécies que causam LV e LC não é observada, sendo comum os cães apresentarem simultaneamente manifestações cutâneas e sistémicas (Grevot *et al.*, 2005; Baneth, 2006b; CFSPH, 2009).

Os valores de seroprevalência em cães de Portugal, Espanha, Itália e França apontam para a existência de 2,5 milhões de animais infectados (Campino & Maia, 2010). Apesar da maioria dos cães infectados sem sintomatologia revelar anticorpos anti-*Leishmania*, infecções experimentais evidenciaram a ausência de anticorpos em animais parasitados, sugerindo que estudos epidemiológicos baseados apenas na detecção de anticorpos circulantes podem subestimar o número de cães infectados (Campino & Maia, 2010).

Em Portugal Continental, e tendo como base estudos de seroprevalência realizados nos últimos 20 anos, a região de Trás-os-Montes e Alto Douro, a sub-região da Cova da Beira, o

concelho da Lousã, a região de Lisboa e Setúbal, o concelho de Évora e o Algarve são consideradas endémicas de leishmaniose canina, no entanto são detectados casos esporádicos da doença em todo o território continental (figura 6) (ONLeish, 2013). Em 2009 foi realizado o primeiro inquérito seroepidemiológico nacional de leishmaniose canina tendo-se obtido uma prevalência geral de 6,31% (Cortes *et al.*, 2012). Castelo Branco, Portalegre e Beja, foram os distritos mais afectados com uma prevalência superior a 10%, enquanto Aveiro, Braga e Viana do Castelo foram os distritos que apresentaram o menor número de cães seropositivos (inferior a 1%) (Cortes *et al.*, 2012).

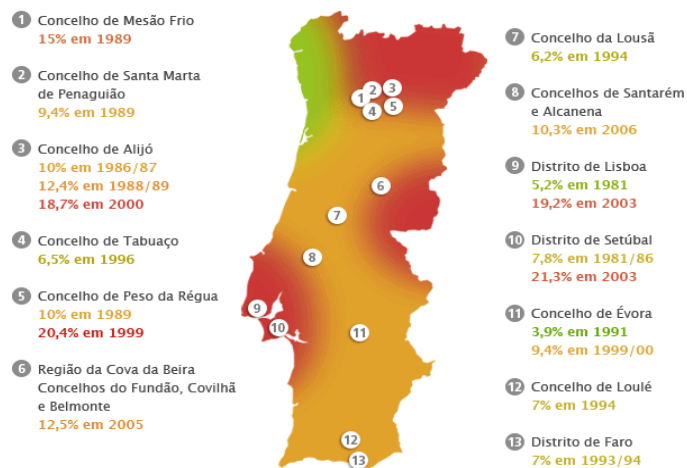


Figura 6 - Mapa de prevalência de leishmaniose canina em Portugal (ONLeish, 2013)

A leishmaniose em gatos domésticos foi descrita pela primeira vez em 1912 em Argélia, tendo sido detectada num gato de quatro meses de idade que coabitava na mesma casa com um cão e uma criança com LV (Gramiccia, 2011). Nos gatos, têm sido descritos casos esporádicos de leishmaniose, sendo as manifestações cutâneas as mais prevalentes, normalmente sem envolvimento visceral (Navarro *et al.*, 2010).

Diferentes espécies de *Leishmania* têm sido encontradas como causa de leishmaniose felina: *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* no Novo Mundo, e *L. infantum* tanto no Novo como no Velho Mundo (Rüfenacht, 2010; Gramiccia, 2011; Maia & Campino, 2011). Nos últimos anos, vários casos de leishmaniose felina causados por *L. infantum* têm sido descritos em países do mediterrâneo, endémicos desta parasitose, como Espanha, França, Itália e Portugal, assim como, na América do Sul e no Médio Oriente (Maia

et al, 2008; Cardoso *et al.*, 2010; Maia *et al.*, 2010; Maia & Campino, 2011). A prevalência da infecção por *Leishmania* spp. obtida em gatos residentes em diferentes áreas onde a infecção é endêmica, variou entre 0,3% a 61% (Pennisi, 2002; Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Maia *et al.*, 2008; 2010; Nasereddin *et al.*, 2008; Tabar *et al.*, 2008; Diakou *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2010; Coelho *et al.*, 2010; Ayllón *et al.*, 2011; Maia & Campino, 2011; Sobrinho *et al.*, 2012; Pennisi *et al.*, 2013b; Vilhena *et al.*, 2013).

O primeiro rastreio de leishmaniose felina em Portugal foi realizado por Maia *et al.* (2008) na região metropolitana de Lisboa (RML), fora da época de transmissão vectorial de *Leishmania*, tendo-se detectado ADN de *L. infantum* no sangue de 30,4% (7/23) dos gatos errantes analisados. Mais tarde, foram realizados em Portugal vários estudos epidemiológicos sobre a infecção por *Leishmania* spp. em gatos, tendo a prevalência variado de 0 a 20,3% sugerindo que os felinos que vivem em áreas endémicas são frequentemente expostos ou infectados com o parasita (Rosa, 2009; Cardoso *et al.*, 2010; Duarte *et al.*, 2010; Maia *et al.*, 2010; Carreira, 2012; Garrido, 2012; Ramos, 2012; Pinto, 2013; Vilhena *et al.*, 2013).

O aumento do número de infecções e casos de doença juntamente com os resultados obtidos em diversos estudos de prevalência, sugerem que os gatos podem actuar como hospedeiro reservatório secundário de *L. infantum* em vez de hospedeiro acidental (Nasereddin *et al.*, 2008; Cardoso *et al.*, 2010; Gramiccia, 2011; Cardia *et al.*, 2013; Vilhena *et al.*, 2013).

Os autores que reconhecem o gato como reservatório secundário justificam-no pelo facto de serem animais naturalmente susceptíveis à infecção por *L. infantum*, normalmente sem desenvolverem sinais clínicos (portadores assintomáticos) e por apresentarem o parasita no sangue periférico e pele, sugerindo que são frequentemente expostos ao parasita através do vector (Martín-Sánchez *et al.*, 2006; Maia *et al.*, 2010; Maia & Campino, 2011).

Maroli *et al.* (2007) e Silva *et al.* (2010) demonstraram experimentalmente, através da técnica de xenodiagnóstico, que gatos infectados naturalmente podem transmitir o parasita a vectores competentes de *L. infantum*.

Por outro lado, os parasitas isolados até ao momento a partir de punções de linfonodos e medula óssea de gatos residentes em áreas endémicas, foram identificados como *L. infantum* zimodeme MON-1, o zimodeme responsável pela maioria dos casos de leishmaniose canina e

humana na bacia do mediterrâneo (Maroli *et al.*, 2007; Maia *et al.*, 2008; Nasereddin *et al.*, 2008; Maia & Campino, 2011).

No entanto mais estudos têm de ser desenvolvidos para determinar a persistência de *Leishmania* nos gatos naturalmente infectados, pelo menos até à próxima época de transmissão, tal como acontece nos cães que mantêm presente a infecção subclínica por longos períodos de tempo (Maia & Campino, 2011).

Na maioria dos estudos realizados em felinos não foi encontrada uma relação entre factores como a raça e o género com a infecção por *Leishmania* spp. (Pennisi, 2002; Nasereddin *et al.*, 2008; Tabar *et al.*, 2008; Diakou *et al.*, 2009; Ayllón *et al.*, 2011; Pennisi *et al.*, 2013). No entanto, Cardoso *et al.* (2010) e Sobrinho *et al.* (2012) observaram uma associação significativa entre géneros, mostrando que os machos são estatisticamente mais susceptíveis à infecção e mais predispostos a apresentarem sinais clínicos, sem ainda haver uma explicação para este acontecimento. A idade também não tem sido considerada um factor significativo na susceptibilidade à infecção, embora gatos com mais de dois anos de idade se encontrem mais predispostos a serem infectados (Pennisi *et al.*, 2002; Cardoso *et al.*, 2010; Sobrinho *et al.*, 2012).

1.1.3.4. Patogenia

A capacidade dos amastigostas de sobreviverem e de se replicarem dentro dos macrófagos está intimamente relacionada com a resposta imunitária do hospedeiro (Ferrer, 2002; Baneth, 2006b; Grammicia, 2011).

Os macrófagos desempenham um papel central no controlo da infecção (Pennisi *et al.*, 2013). As citocinas, interferão gama (IFN- γ), interleucina dois (IL-2) e factor de necrose tumoral alfa (TNF- α), secretadas pela activação das células T, estimulam a morte intracelular dos amastigotas através da produção de radicais oxidativos tóxicos para o parasita (Ferrer, 2002; Baneth, 2006b; Solano-Gallego *et al.*, 2009; Verneuil, 2013; Pennisi *et al.*, 2013b).

Em cães, a leishmaniose é uma infecção multisistémica com um amplo espectro de sinais clínicos, variando de infecção subclínica a severa, reflectindo o balanço entre uma resposta imune protectora mediada por células e uma resposta humoral não protectora. Os linfócitos T CD4+ têm assim um papel importante, uma vez que podem fazer com que o sistema imunitário avance para uma resposta Th1 (mediada por células) ou para uma resposta

Th2 (humoral). A susceptibilidade dos cães à infecção está associada com uma forte resposta humoral não-protectora e a uma reduzida imunidade mediada pelas células T (Ferrer, 2002; Baneth, 2006b; Solano-Gallego *et al.*, 2009). A resposta humoral exacerbada é considerada ineficaz no combate à leishmaniose e conduz ao aparecimento de sinais clínicos.

Nos animais susceptíveis à infecção, os sinais clínicos aparecem entre os três meses e os sete anos após infecção. O desenvolvimento da doença é acompanhado por uma depleção dos linfócitos T nos órgãos linfoides e pela proliferação de linfócitos B produtores de anticorpos. Existe também uma proliferação de células plasmáticas, macrófagos e histiócitos resultando numa linfadenomegália generalizada, hepatoesplenomegália e hiperglobulinemia (Ferrer, 2002; Baneth, 2006b).

A exuberante actividade das células B, com a libertação massiva de imunoglobulinas IgG e IgM, leva a formação de grandes quantidades de complexos imunes que se depositam nas paredes dos vasos sanguíneos e rins podendo causar vasculites, poliartrites, uveítes e glomerulonefrites (Ferrer, 2002; Baneth, 2006b; Verneuil, 2013).

Nos cães considerados resistentes, os parasitas permanecem localizados na pele (ou atingem apenas o linfonodo regional). Estes animais permanecem assintomáticos devido a uma fraca resposta humoral (Ferrer, 2002; Baneth, 2006b).

No que diz respeito à leishmaniose felina, alguns estudos relacionam a presença de um certo grau de resistência natural à infecção com factores genéticos, os quais permitem o controlo da infecção, nomeadamente através de uma forte resposta imunitária celular, responsável pela eliminação do parasita, ou pela manutenção do animal infectado num estado subclínico (Diakou *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2010; Ferrer & Roura, 2010; Maia *et al.*, 2010). Navarro *et al.* (2010) compararam a resposta imunitária desenvolvida em gatos infectados por *Leishmania* que apresentavam lesões cutâneas, com os que apresentavam lesões oculares, mucocutâneas e viscerais. Estes autores verificaram que os animais com manifestações cutâneas localizadas tinham conseguido controlar a infecção através de uma resposta inflamatória mediada pelas células T e constituída por numerosos linfócitos e poucos macrófagos com baixo número de parasitas, enquanto nos animais que apresentavam manifestações sistémicas, a resposta inflamatória, associada a uma resposta imunitária celular reduzida, caracterizava-se por um escasso número de linfócitos e um grande

número de macrófagos e células gigantes multinucleadas, contendo um elevado número de amastigotas (Navarro *et al.*, 2010).

Factores como o “stress”, agentes imunossupressivos (FIV e FeLV), fármacos imunossupressores ou neoplasias podem induzir uma resposta imune celular ineficaz, predispondo para a progressão da infecção e aparecimento de sinais clínicos (Grevot *et al.*, 2005; Maroli *et al.*, 2007; Ferrer & Roura, 2010; Navarro *et al.*, 2010; Sobrinho *et al.*, 2012; Pennisi *et al.*, 2013b). No entanto, a possível predisposição de gatos infectados com retrovírus (FIV e FeLV) desenvolverem doença é ainda controverso (Ferrer & Roura, 2010; Sobrinho *et al.*, 2012; Pennisi *et al.*, 2013b).

1.1.3.5. Sinais clínicos

As manifestações cutâneas são os sinais clínicos mais frequentemente observados na leishmaniose felina e muitas vezes as únicas encontradas ao exame físico (Grammiccia, 2011; Pennisi *et al.*, 2013b). Os sinais mais comuns são: dermatites ulcerativas (figura 7) ou nodulares na face, nariz, pavilhão auricular, lábios e pálpebras; pápulas e crostas nos pavilhões auriculares (figura 8 e 9); alopecia difusa; nódulos cutâneos na cabeça ou extremidades; e ausência de prurido (Rüfenacht *et al.*, 2010; Grammiccia, 2011; Pennisi *et al.*, 2013b). As lesões oculares como conjuntivites, blefarites e/ou queratites também têm sido reportadas (Navarro *et al.*, 2010). Outros sinais clínicos e alterações laboratoriais reportados em gatos com leishmaniose são anorexia, perda de apetite, pirexia, vômitos, diarreia, icterícia, uveítes, linfadenomegalia, hipergamaglobinemia, anemia, leucopenia, proteinúria, e insuficiência renal (Rüfenacht *et al.*, 2010; Cardoso *et al.*, 2010; Cardia *et al.*, 2013; Grammiccia, 2011). Apesar da LV não ser comum em gatos, o fígado, baço, linfonodos e rim são os órgãos mais afectados (Ferrer & Roura, 2010).



Figura 7 - Úlcera cutânea num gato com leishmaniose (Baneth, 2006b)



Figura 8 - Presença de crostas e pústulas no pavilhão auricular num gato com leishmaniose (Rüfenacht *et al.*, 2010).



Figura 9 - Presença de crostas, pústulas, eritema e despigmentação no plano nasal (Rüfenacht *et al.*, 2010).

A ausência de sinais patognomónicos implica que se inclua leishmaniose felina como diagnóstico diferencial em gatos com infeções cutâneas e oculares que vivam ou tenham viajado para áreas endémicas (Navarro *et al.*, 2010; Grammicia, 2011; Cardia *et al.*, 2013).

1.1.3.6. Diagnóstico

Na LV humana e na leishmaniose canina recomenda-se o isolamento e identificação do parasita a partir de biopsias de tecidos infetados juntamente com o diagnóstico serológico e molecular (OIE, 2008).

Na prática clínica, o diagnóstico de leishmaniose felina pode ser realizado através de um exame clínico adequado e da detecção do parasita por métodos parasitológicos e/ou moleculares. Até ao momento, não existem testes serológicos comerciais para o diagnóstico de leishmaniose felina (Silva *et al.*, 2010; Maia *et al.*, 2010; Grammicia, 2011; Pennisi *et al.*, 2013b).

A. Métodos Parasitológicos

O exame citológico permite a visualização ao microscópio das formas amastigotas em esfregaços corados de amostras obtidas a partir de biopsias de órgãos/tecidos infectados, como a medula óssea, linfonodos e pele (Maia & Campino, 2008; Grammiccia, 2011). Os esfregaços são corados com o corante Giemsa ou corante Leishman e as formas amastigotas aparecem livres ou dentro de monócitos, macrófagos e neutrófilos (Maia & Campino, 2008). Costa *et al.* (2010) e Sobrinho *et al.* (2012) compararam a sensibilidade do exame directo para diagnosticar a infecção por *Leishmania* spp. em gatos residentes em áreas endémicas de LV, utilizando diferentes amostras biológicas (linfonodos, medula óssea, baço e fígado). Em ambos os estudos, verificou-se que a detecção das formas amastigotas foi superior em amostras de linfonodos poplíteos. Conclui-se assim que, estes deverão ser os tecidos de primeira escolha para a realização de biopsia aspirativa a fim de melhorar a sensibilidade do diagnóstico directo em gatos (Costa *et al.*, 2010; Sobrinho *et al.*, 2012).

A análise histopatológica de órgãos infectados corados com hematoxilina e eosina também tem sido usada na detecção das formas amastigotas (Maia & Campino, 2008; Navarro *et al.*, 2010). O diagnóstico histopatológico tem sido usado em casos clínicos de gatos com sinais dermatológicos e oftalmológicos de etiologia desconhecida (Grammiccia, 2011).

A cultura *in vitro* de diferentes tecidos aumenta a sensibilidade da detecção do parasita, apresentando uma especificidade de 100%, sendo a única técnica que permite isolar os parasitas (Maia & Campino, 2008; Grammiccia, 2011). No entanto, é uma técnica pouco utilizada devido ao tempo que demora para se obter os resultados (entre uma a cinco semanas), à susceptibilidade de contaminação microbiológica, ao facto de estar dependente da carga parasitária e ao facto de não existir um meio cultura “universal” em que todas as espécies de *Leishmania* cresçam com facilidade (Maia & Campino, 2008; OIE, 2008; Grammiccia, 2011).

B. Métodos Serológicos

Os métodos serológicos mais frequentemente utilizados para detectar anticorpos anti-*Leishmania* em gatos com suspeita de leishmaniose felina incluem a IFI, ELISA e o teste de aglutinação directa (DAT) (Grammiccia, 2011).

De acordo com os estudos realizados no Sul da Europa, os títulos de anticorpos obtidos em gatos infectados por *Leishmania* spp. são mais baixos que na leishmaniose canina (Diakou *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2010; Gramiccia, 2011). Resultados semelhantes foram obtidos por Costa *et al.* (2010) ao usarem a técnica de ELISA para detectar anticorpos anti-parasita em gatos residentes em áreas endémicas de leishmaniose canina. No estudo realizado por Sobrinho *et al.* (2012), 70% dos gatos com diagnóstico parasitológico directo positivo eram seronegativos.

No estudo de Maia *et al.* (2010) utilizou-se a técnica serológica de IFI para detectar anticorpos específicos em 76 gatos da amostra, tendo-se considerado seropositivo apenas um animal. Estes resultados sugerem que, os testes serológicos, válidos para o diagnóstico de leishmaniose canina, são pouco sensíveis e pouco fiáveis na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em gatos e, do ponto de vista epidemiológico, podem subestimar o número real de gatos infectados e representar um potencial risco de propagação e transmissão de *Leishmania* aos vectores (Maia *et al.*, 2010).

Por outro lado, a falta ou baixa produção de anticorpos específicos poderá estar relacionado com o facto da forma clinica mais comum na leishmaniose felina ser a forma cutânea, não existindo um desequilíbrio do sistema imunitário com consequente produção exacerbada de anticorpos (Maia *et al.*, 2008; 2010)

C. Métodos Moleculares

Os métodos moleculares são usados para o diagnóstico e/ou identificação das espécies de *Leishmania* não só em casos activos de infecção, como também na monitorização após o tratamento (Baneth, 2006b; Maia & Campino, 2008; Gramiccia, 2011). O diagnóstico por PCR pode ser feito a partir de ADN extraído de diferentes tipos de amostra como sangue total, “buffy coat”, punção de baço, conjuntiva, linfonodos, medula óssea e de pele (Maia & Campino, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos em vários estudos onde se utilizou a PCR a partir de diferentes tecidos de cães infectados são por vezes conflituosos (Maia & Campino, 2008). Nos gatos este fenómeno também foi reportado num estudo realizado na região de Abruzzo em Itália por Vita *et al.* (2005), em que se verificou uma falta de correlação entre os resultados positivos para *Leishmania* a partir de aspirados de linfonodos e os obtidos a partir de amostras de

sangue. Este acontecimento pode ser explicado pela distribuição heterogénea da *Leishmania* em cada tecido e pela carga parasitária, a qual está associada ao tropismo do parasita (Vita *et al.*, 2005; Maia & Campino, 2008). Assim, resultados falsos negativos podem surgir aquando da utilização de sangue periférico para detecção de *Leishmania* spp.. Por outro lado, falsos positivos também podem ocorrer se a recolha de sangue for realizada em épocas de transmissão, devido à contaminação natural ou infecção transitória (Maia & Campino, 2008). No entanto, os resultados de PCR positivos, utilizando amostras de sangue periférico obtidas fora da época de transmissão, indicam uma infecção “verdadeira” (Maia *et al.*, 2010; Maia & Campino, 2011).

1.1.3.7. Tratamento

Não há ainda estudos sólidos sobre a melhor terapia para a leishmaniose felina. As informações disponíveis sobre o tratamento baseiam-se principalmente em relatos de casos individuais, nem sempre com um acompanhamento adequado (Pennisi *et al.*, 2013b)

Contudo, o alopurinol (10-20 mg/Kg, SID ou BID, PO) parece ser o fármaco mais eficaz (Ferrer & Roura, 2010; Pennisi *et al.*, 2013b). Como acontece nos cães, a infecção não é completamente eliminada, podendo os sinais clínicos voltar a aparecer depois de se parar o tratamento (Pennisi *et al.*, 2013b).

A administração de antimonio de meglumina (5-50 mg/Kg, SID, PO) durante 30 dias também tem sido reportada (Rüfenacht *et al.*, 2010; Pennisi *et al.*, 2013b). Nódulos cutâneos focais têm sido removidos cirurgicamente, mas lesões cutâneas mais difusas têm sido tratadas com antifúngicos e antibióticos administrados topicamente ou por via parenteral (fluconazol, metronidazol e/ ou espiramicina) (Rüfenacht *et al.*, 2010, Pennisi *et al.*, 2013b).

A maioria dos gatos controlam a infecção com a ajuda do tratamento anti-*Leishmania* embora em alguns animais a infecção progrida com o aparecimento de sinais clínicos sistémicos graves, tais como a insuficiência renal (Ferrer & Roura, 2010).

O prognóstico da leishmaniose felina é reservado e o sucesso do tratamento é muitas vezes dificultado pela presença de infecções concomitantes como é o caso do FIV e/ou FeLV (Ferrer & Roura, 2010; Rüfenacht *et al.*, 2010).

1.1.3.8. Saúde Pública

No sul da Europa, a LV causada por *L. infantum* é uma zoonose que afecta principalmente crianças e adultos imunodeprimidos (ONLeish, 2013).

Os cães são considerados importantes reservatórios peridomésticos de infecção por *L. infantum* para os humanos (Solano-Gallego *et al.*, 2011). A transmissão de *L. infantum* de canídeos para pessoas através do vector é considerada a principal via de infecção nos humanos (Baneth, 2006b). A posse de cães com leishmaniose não constitui um risco acrescido de infecção para os donos, mas o risco de transmissão é inferior se os cães estiverem em tratamento (ONLeish, 2013). Embora a espécie de *Leishmania* responsável pela infecção em gatos seja a mesma que infecta os cães e humanos, não há informação sobre o risco associado a donos com gatos infectados (Pennisi *et al.*, 2013b).

1.2. Doenças causadas por bactérias

1.2.1. *Anaplasma* spp.

1.2.1.1. Etiologia e Epidemiologia

As bactérias do género *Anaplasma*, pertencentes à família Anaplasmataceae, ordem Rickettsiales, são bactérias gram-negativas, intracelulares obrigatórias, aeróbias, geralmente pleomórficas, com forma cocóide e não móveis (Cohn, 2003; Diniz & Breitschwerdt, 2012). Ao contrário de outras baterias gram-negativas, os membros desta família carecem de parede celular e são extremamente sensíveis a mecanismos de “stress” como a congelação, refrigeração e mudanças de osmolaridade (Diniz & Breitschwerdt, 2012).

A espécie *Anaplasma phagocytophilum* é o agente responsável pela anaplasrose granulocítica em humanos e animais domésticos (Diniz & Breitschwerdt, 2012). Este agente era conhecido anteriormente como *Ehrlichia phagocytophilum* em ruminantes, *E. equi* em equinos e “agente da erliquiose granulocítica humana” em humanos (Billeter *et al.*, 2007; Diniz & Breitschwerdt, 2012). Com a nova reclassificação taxonómica, esta espécie foi removida do género *Ehrlichia* e passou para o género *Anaplasma*.

As bactérias do género *Anaplasma* encontram-se dentro de vacúolos no citoplasma de células hematopoiéticas imaturas ou maduras de hospedeiros mamíferos. A espécie *A. phagocytophilum* infecta granulócitos com maior tropismo para os neutrófilos, sendo raro em eosinófilos (Diniz & Breitschwerdt, 2012).

O ADN de *A. phagocytophilum* tem sido detectado em amostras de sangue de gatos naturalmente infectados na Dinamarca, Finlândia, Irlanda, Itália, Reino Unido, Suécia e Suíça e mórulas consistentes com *A. phagocytophilum* têm sido observadas em neutrófilos de gatos naturalmente infectados no Brasil, Itália e Suíça (Lappin & Breitschwerdt, 2012). Em áreas endémicas, são frequentemente detectados anticorpos contra esta espécie em soro de gatos (Lappin & Breitschwerdt, 2012).

Em Portugal, no estudo realizado por Alves *et al.* (2009) em 51 gatos residentes na região de Lisboa e Évora obteve-se uma seroprevalência de 13,5%. Mais recentemente, Vilhena *et al.* (2013) amplificaram ADN de *Anaplasma* spp./*Ehrlichia* spp. em dois gatos domésticos provenientes do Norte e Centro de Portugal.

Apesar de incomum, foi recentemente detectado por exame directo e confirmado por técnicas moleculares a infecção de um gato por *A. platys* (Lima *et al.*, 2010).

1.2.1.2. Ciclo de vida e transmissão da bactéria

A bactéria *A. phagocytophilum* é transmitida aos hospedeiros vertebrados (mamíferos) por carraças do género *Ixodes* (Diniz & Breitschwerdt, 2012), sendo a espécie *I. ricinus* a mais comum na Europa (Santos *et al.*, 2004; Heikkilä *et al.*, 2010). Em Portugal, os principais vectores de anaplasmosose são *I. ricinus* (figura 10) e *I. ventralloii* (Santos *et al.*, 2004). Estas carraças alimentam-se de três hospedeiros, ou seja, em cada estágio de desenvolvimento alimentam-se em diferentes hospedeiros, transmitindo a bactéria transestadialmente (de um estágio para o outro) (Urquhart *et al.*, 1996; Baneth, 2010; Diniz & Breitschwerdt, 2012). A transmissão transovárica não ocorre, sendo a bactéria mantida no ambiente pelos hospedeiros vertebrados (Heikkilä *et al.*, 2010).



Figura 10 - *Ixodes ricinus*, um dos principais vectores de anaplasmosose em Portugal (adaptado de http://www.eurospiders.com/Ixodes_ricinus.htm).

A transmissão da bactéria ocorre 36 a 48 horas após a ligação da carraça à pele do hospedeiro vertebrado (Greig & Armstrong, 2006; Baneth, 2010). Após a picada do vector, as bactérias penetram na pele do hospedeiro e propagam-se através do sangue e da linfa, sendo o período de incubação de uma a duas semanas (Greig & Armstrong, 2006). As bactérias aderem aos neutrófilos através de uma molécula membranar (P-selectina) que se encontra na superfície dos neutrófilos e actua como receptor para estes organismos. Por endocitose entram para o interior de fagossomas citoplasmáticos (Greig & Armstrong, 2006; Baneth, 2010). A bactéria *A. phagocytophilum* tem a capacidade de impedir a fusão fagossoma-lisossoma e de inibir a apoptose celular (Greig & Armstrong, 2006; Baneth, 2010). Estes mecanismos permitem que a bactéria persista no interior da célula e se multiplique por divisão binária (Greig & Armstrong, 2006).

A multiplicação por divisão binária dentro de vacúolos produz 20 ou mais organismos, formando a mórula. Estes organismos podem ser classificados em dois tipos: células reticuladas e células densas tubulares. Uma única mórula raramente apresenta os dois tipos de bactérias (Diniz & Breitschwerdt, 2012; Allison & Little, 2013). O aumento do número de organismos no interior da célula pode provocar a sua ruptura, levando à libertação das bactérias para a circulação com infecção de novas células (Greig & Armstrong, 2006). As células infectadas encontram-se no sangue periférico e em tecidos do sistema fagocítico mononuclear (baço, fígado, medula óssea) (Greig & Armstrong, 2006).

Vários mamíferos são infectados por *A. phagocytophilum* e, na Europa, os roedores e os veados são reservatórios naturais (Diniz & Breitschwerdt, 2012). Vários estudos sugerem que as aves migratórias também possam actuar como reservatório, contribuindo para a propagação e distribuição geográfica da infecção (Heikkilä *et al.*, 2010; Diniz &

Breitschwerdt, 2012). Os canídeos e os humanos são considerados hospedeiros acidentais desta espécie (Baneth, 2010).

1.2.1.3. Patogenia

Apesar da prevalência de infecção por *A. phagocytophilum* em canídeos e humanos ter vindo a aumentar, o diagnóstico de anaplasmoze felina continua a ser pouco frequente (Heikkilä *et al.*, 2010). Com base nos sinais clínicos e laboratoriais, a patogênese da doença felina é muito semelhante à infecção em canídeos (Lappin & Breitschwerdt, 2012).

A anaplasmoze canina apresenta geralmente um quadro agudo auto-limitante, não existindo relatos de mortes provocadas por esta infecção (Baneth, 2010; Diniz & Breitschwerdt, 2012).

No cão a patogênese de *A. phagocytophilum* parece estar associada à supressão da produção de citocinas, à formação de auto-anticorpos e à invasão das células precursoras da hematopoiese (Diniz & Breitschwerdt, 2012). Nos gatos experimentalmente infectados verificou-se a produção de anticorpos antinucleares e um aumento da expressão da citocina IFN- γ , sugerindo que a resposta imunitária possa contribuir para os sinais clínicos manifestados (Lappin & Breitschwerdt, 2012).

1.2.1.4. Sinais clínicos

As manifestações clínicas de anaplasmoze em felinos são semelhantes às observadas nos canídeos. Em ambas as espécies, a manifestação mais comum é a presença de pirexia aguda com inapetência e letargia, devendo ser considerada como diagnóstico diferencial em gatos que apresentem síndrome febril agudo com exposição prévia a carraças (Heikkilä *et al.*, 2010). Outros sinais inespecíficos reportados em gatos com anaplasmoze foram: taquipneia, hiperestesia, dores musculares e articulares, claudicação, rigidez cervical, linfadenomegália, gengivite, descarga ocular, vômitos e alterações neurológicas (tremores, incoordenação e convulsões) (Billeter *et al.*, 2007; Heikkilä *et al.*, 2010). A anaplasmoze causa imunossupressão pelo que muitos dos sinais descritos são causados por infecções oportunistas (Heikkilä *et al.*, 2010).

1.2.1.5. Diagnóstico

A. Alterações Laboratoriais

A alteração hematológica mais comum na infecção felina por *A. phagocytophilum* é a trombocitopenia leve a moderada (Heikkilä *et al.*, 2010). A presença de anemia, linfopenia e neutrófilia com desvio à esquerda estão reportadas em gatos com anaplasmose (Heikkilä *et al.*, 2010; Lappin & Breitschwerdt, 2012). A hiperglicemia e gamopatia policlonal são as alterações do perfil bioquímico mais frequentemente observadas (Heikkilä *et al.*, 2010).

B. Visualização Microscópica

Na visualização ao microscópio de esfregaços sanguíneos as bactérias podem aparecer no citoplasma de neutrófilos infectados como inclusões individuais ou em mórulas (figura 11) (Heikkilä *et al.*, 2010). Em gatos experimentalmente infectados por *A. phagocytophilum* as inclusões intracitoplasmáticas são observadas sete a nove dias após a infecção (Heikkilä *et al.*, 2010). A percentagem de células infectadas varia de 1% a 24% e as mórulas apenas são observadas na fase aguda de infecção (Heikkilä *et al.*, 2010). A detecção destas inclusões é um método de diagnóstico rápido, no entanto a sua sensibilidade é moderada sendo frequentemente necessário recorrer a outros métodos para confirmar a infecção (Lappin & Breitschwerdt, 2012).

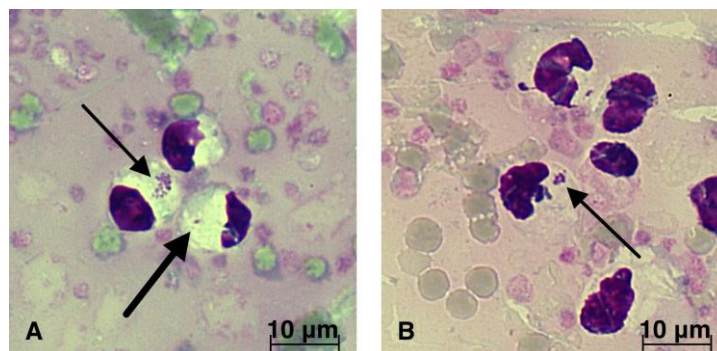


Figura 11 - Esfregaços sanguíneos (A e B) corados com inclusões no interior de neutrófilos (setas) de um gato com anaplasmose (Coloração de Giemsa) (Heikkilä *et al.*, 2010).

C. Métodos Serológicos

A presença de anticorpos anti-*Anaplasma* spp. pode ser detectada por IFI, ELISA e “Western blot” (Heikkilä *et al.*, 2010). Em gatos experimentalmente infectados, verificou-se

que a seroconversão ocorre 14 dias após a infecção e os títulos de anticorpos permanecem elevados durante meses, mesmo após antibioterapia (Heikkilä *et al.*, 2010).

Alguns gatos podem apresentar sinais clínicos antes do desenvolvimento de anticorpos, resultando em falsos negativos, sendo necessário repetir os testes ao fim de duas a três semanas para avaliar se houve seroconversão (Neer *et al.*, 2002; Lappin & Breitschwerdt, 2006).

Um número significativo de falsos positivos pode ocorrer devido à reacção cruzada com outros organismos, sendo sempre recomendada a confirmação da infecção por métodos moleculares (Lappin & Breitschwerdt, 2012).

D. Métodos Moleculares

A PCR feita a partir de amostras de sangue periférico, medula óssea ou biópsias esplénicas apresenta elevada especificidade e sensibilidade na detecção da infecção na fase aguda (Heikkilä *et al.*, 2010). Em gatos infectados experimentalmente o ADN de *A. phagocytophilum* foi amplificado a partir de amostras de sangue e medula óssea sete dias após a infecção (Heikkilä *et al.*, 2010).

Quando há suspeita de anaplasrose é imprescindível a amplificação do material genético, usando “primers” específicos para a espécie ou para o género com posterior sequenciação dos produtos obtidos (Lappin & Breitschwerdt, 2012).

1.2.1.6. Tratamento

Os antibióticos de escolha para o tratamento da anaplasrose são as tetraciclina, principalmente a doxiciclina (10mg/Kg, SID, PO) (Billeter *et al.*, 2007; Heikkilä *et al.*, 2010; Lappin & Breitschwerdt, 2012). Na fase aguda, a resposta ao tratamento é rápida e podem ser observadas melhorias ao fim de 24-48 horas, embora a infecção possa persistir por meses (Heikkilä *et al.*, 2010). Já foram reportados casos de gatos infectados que recuperaram sem tratamento (Heikkilä *et al.*, 2010).

1.2.1.7. Saúde Pública

Apesar de *A. phagocytophilum* afectar também humanos (hospedeiros acidentais), não existe associação entre a infecção humana e o contacto com felinos. No entanto, se existir um

controlo de vectores nos gatos domésticos, o risco de infecção por *Anaplasma* spp. para os humanos é minimizado (Lappin & Breitschwerdt, 2012).

1.2.2. *Bartonella* spp.

1.2.2.1. Etiologia

As bactérias do género *Bartonella* são de pequeno tamanho, gram negativas intracelulares facultativas que infectam mamíferos e artrópodes (Brunt *et al.*, 2006; Chomel *et al.*, 2006; Pennisi *et al.*, 2009; Guptill, 2010; Stutzer & Hartmann, 2012; Pennisi *et al.*, 2013a). Mais de 22 espécies de *Bartonella* têm sido descritas em mamíferos, estando filogeneticamente relacionadas com os géneros *Rickettsia*, *Brucella*, *Agrobacterium* e *Afipia* (Guptill, 2010; Pennisi *et al.*, 2013a). Mais de 14 espécies de *Bartonella* são consideradas zoonóticas ou potencialmente zoonóticas e vários estudos têm demonstrado que os animais de companhia servem como reservatórios (Ketring *et al.*, 2004; Dietrich *et al.*, 2010; Guptill, 2010).

Várias espécies de *Bartonella* spp. têm a capacidade de infectar os gatos domésticos: *B. bovis*, *B. clarridgeiae*, *B. henselae*, *B. koehlerae*, *B. quitana*, *B. vinsonii* subespécie *berkhoffii* (Brunt *et al.*, 2006; Guptill, 2010; Stutzer & Hartmann, 2012; Pennisi *et al.*, 2013a), sendo estes animais considerados reservatórios primários de *B. clarridgeiae*, *B. henselae* e possivelmente de *B. koehlerae* (Brunt *et al.*, 2006; Chomel *et al.*, 2006; Guptill, 2010).

B. henselae, agente causador da doença da arranhadura do gato em humanos, é uma das zoonoses mais frequentes em países industrializados adquirida a partir de animais de companhia, sendo potencialmente fatal em humanos imunocomprometidos (Stutzer & Hartmann, 2012; Pennisi *et al.*, 2013a).

O papel de *B. clarridgeiae* em gatos naturalmente infectados não está ainda completamente definido, no entanto sabe-se que esta espécie é também responsável pela doença da arranhadura do gato em humanos e por endocardites da válvula aórtica e infecções hepáticas nos cães (Tuzio *et al.*, 2005; Chomel *et al.*, 2006; Stutzer & Hartmann, 2012).

Existem poucos casos documentados de gatos domésticos infectados por *B. koehlerae*, embora o primeiro caso de infecção humana por este agente tenha sido reportado recentemente em Israel (Chomel *et al.*, 2006).

A espécie *B. quintana* tem sido isolada de felinos selvagens e o seu ADN tem sido amplificado a partir de pulgas de gato e carraças. Os felinos infectados são assintomáticos e a patogenicidade desta espécie continua desconhecida, tal como a capacidade dos gatos transmitirem o agente aos humanos (Chomel *et al.*, 2006; Stutzer & Hartmann, 2012)

Alguns casos de *B. bovis* têm sido reportados em gatos nos E.U.A, no entanto desconhece-se se esta bactéria pode causar sinais clínicos em gatos e qual o papel dos gatos na epidemiologia deste organismo (Chomel *et al.*, 2006; Stutzer & Hartmann, 2012).

Existem relatos de infecções mistas por diferentes espécies de *Bartonella* e por diferentes estirpes de *B. henselae* em gatos (Guptill, 2010).

1.2.2.2. Ciclo de vida e transmissão da bactéria

A transmissão de *B. henselae* ao hospedeiro felino é realizada através das fezes da pulga *Ctenocephalides felis*, conhecida como a pulga do gato (figura 12) (Guptill *et al.*, 2004; Guptill, 2010; Ebani *et al.*, 2011; Pennisi *et al.*, 2013a).



Figura 12 - Pulga do gato, *Ctenocephalides felis*, principal vector artrópode de *Bartonella henselae* (Birtles, 2010).

A pulga fica infectada quando se alimenta do sangue de um gato infectado e no intestino do vector a bactéria multiplica-se, sendo excretada com as fezes (Tuzio *et al.*, 2005; Brunt *et al.*, 2006; Chomel *et al.*, 2006; Haubenstricker, 2010; Stutzer & Hartmann, 2012). No meio ambiente a bactéria *B. henselae* pode persistir nas fezes durante pelo menos nove dias (Brunt *et al.*, 2006; Haubenstricker, 2010; Pennisi *et al.*, 2013a). O gato infecta-se quando ingere as fezes infectadas durante o “grooming” (Guptill, 2010).

O trauma cutâneo causado pela arranhadura de um gato infectado é o principal modo de transmissão da bactéria para outros animais, incluindo humanos. O prurido, causado pela infestação de pulgas, leva o gato a coçar-se, com conseqüente contaminação das unhas com as

fezes do vector contendo *B. henselae* (Stutzer & Hartmann, 2012; Pennisi *et al.*, 2013a). No estudo de Oskouizadeh *et al.* (2010) foi detectado por PCR a presença de *B. henselae* na saliva de gatos domésticos, alertando para uma possível transmissão da bactéria aos humanos através da mordida.

A presença de pulgas no meio ambiente é necessária para a manutenção da infecção dentro da população felina (Brunt *et al.*, 2006; Guptill, 2010; Pennisi *et al.*, 2013a). Na ausência de pulgas a transmissão de *B. henselae* não ocorre, mesmo na presença de gatos infectados, pelo que se pode concluir que, sem a presença de fezes de pulga contaminadas, não ocorre transmissão através de mordidas, arranhaduras ou por fómites (areão, pratos de comida e bebedouros) (Guptill, 2010; Pennisi *et al.*, 2013a). A transmissão venérea, transplacentária e neonatal também não se encontram documentadas (Brunt *et al.*, 2006; Guptill, 2010; Pennisi *et al.*, 2013a).

Vários estudos experimentais demonstraram que a transmissão de *Bartonella* spp. se pode processar sem interferência do vector, encontrando-se descritos casos por transfusão de sangue contaminado e por transmissão mecânica por inoculação parenteral (intradérmica, subcutânea, intramuscular ou intravenosa) da bactéria, de sangue de gato infectado ou de fezes de pulga infectadas (Kordick *et al.*, 1999; Guptill, 2010; Stutzer & Hartmann, 2012; Pennisi *et al.*, 2013a).

O ADN de várias espécies de *Bartonella* já foi detectado em diferentes espécies de carraças, principalmente em *I. ricinus*. Nesta espécie de carraça também já foi demonstrada a transmissão transtesticular de *B. henselae* e a migração e multiplicação da bactéria nas glândulas salivares e a sua capacidade infectante (Chomel *et al.*, 2006; Cotté *et al.*, 2008; Dietrich *et al.*, 2010; Guptill, 2010; Breitschwerdt, 2011; Ebani *et al.*, 2011; Pennisi *et al.*, 2013a).

1.2.2.3. Epidemiologia

O género *Bartonella* apresenta uma distribuição mundial com elevada prevalência em países com clima quente e húmido onde as condições são mais favoráveis para os vectores artrópodes, principalmente pulgas (Glaus *et al.*, 1997; Chomel *et al.*, 2006; Pennisi *et al.*, 2009; 2013a; Guptill, 2010). As infecções em gatos têm sido documentadas em vários países

da Europa, Ásia, Oceânia e América, sendo as espécies *B. henselae* e *B. clarridgeiae* as mais frequentemente detectadas (Brunt *et al.*, 2006).

Na Europa, a prevalência de *Bartonella* spp. em gatos variou entre os 8% e os 67,7% (Glaus *et al.*, 1997; Guptillet *et al.*, 2004; Chomel *et al.*, 2006; Alves *et al.*, 2009; Ebani *et al.*, 2011; Pennisi *et al.*, 2013a).

A seroprevalência é mais elevada em gatos adultos, no entanto a prevalência de bacteriemia é mais elevada em animais jovens (menos de dois anos de idade) (Glaus *et al.*, 1997; Guptill *et al.*, 2004; Solano-Gallego *et al.*, 2006; Guptill, 2010). Além da idade jovem outros factores têm sido associados à presença de bacteriemia, nomeadamente a presença de pulgas no ambiente, acesso dos gatos ao exterior e locais com elevada população felina como gatis (Glaus *et al.*, 1997; Brunt *et al.*, 2006; Pennisi *et al.*, 2013a). Até ao momento não se verificou predisposição em relação à raça e ao género (Chomel *et al.*, 2006; Pennisi *et al.*, 2013a).

1.2.2.4. Patogenia

O género *Bartonella* tem tropismo endotelial e os seus organismos apresentam pequenas estruturas de superfície que permitem a adesão aos eritrócitos e células endoteliais do hospedeiro vertebrado, infectando uma ampla variedade de tecidos, particularmente a mucosa oral e respiratória, pele, nódulos linfáticos e tecidos oculares, gastrointestinais, esplénicos e hepáticos (Breitschwerdt *et al.*, 2005; Haubenstricker, 2010; Breitschwerdt, 2011). A localização dentro de eritrócitos e células do endotélio vascular protege os organismos da acção antimicrobiana das células do sistema reticulo-endotelial, facilitando a persistência oculta de infecção (Kordick *et al.*, 1999; Pennisi *et al.*, 2009; Guptill, 2010; Pennisi *et al.*, 2013a).

Estudos experimentais em gatos mostraram algumas alterações histopatológicas, nomeadamente: hiperplasia folicular de nódulos linfáticos e baço; infiltrados de linfócitos e células plasmáticas no fígado, coração, rins e olhos; presença de abscessos hepáticos; microabscessos esplénicos; e ainda inflamação piogranulomatosa no fígado, baço, rins, coração e linfonodos (Kordick *et al.*, 1999; Brunt *et al.*, 2006; Stutzer & Hartmann, 2012; Pennisi *et al.*, 2013a).

Os gatos jovens infectados experimentalmente mantêm a bacteriemia por *B. henselae* e *B. clarridgeiae* até 465 dias (Pennisi *et al.*, 2009; Chomel *et al.*, 2006; Guptill, 2010; Pennisi *et al.*, 2013a). Frequentes rearranjos genéticos e alterações das proteínas da membrana externa são considerados factores importantes para a persistência da bacteriemia (Kordick *et al.*, 1999; Pennisi *et al.*, 2009; Guptill, 2010; Pennisi *et al.*, 2013a), o que por sua vez facilita a propagação do organismo através de vectores artrópodes (Dietrich *et al.*, 2010).

A bacteriemia é intermitente, possivelmente devido a sequestros da bactéria em tecidos com libertação cíclica para a corrente sanguínea (Muñana *et al.*, 2001). No estudo desenvolvido por Kordick *et al.* (1999) o ADN de *Bartonella* spp. foi detectado em tecido cerebral com ausência de isolamento da bactéria no sangue e no estudo realizado por Muñana *et al.* (2001) isolou-se *B. henselae* a partir de culturas de células do sistema nervoso central (SNC). A localização da bactéria nas células do SNC do hospedeiro contribui possivelmente para o desenvolvimento da infecção latente, facilitando assim a sobrevivência do agente patogénico por períodos prolongados (Muñana *et al.*, 2001).

A reinfeção por diferentes estirpes de *B. henselae* pode ocorrer em gatos naturalmente infectados, como reportado num estudo onde se isolou diferentes estirpes de *B. henselae* a partir do mesmo gato em diferentes alturas (Pennisi *et al.*, 2013a). Os gatos infectados experimentalmente demonstram imunidade protectora quando infectados com estirpes homólogas de *Bartonella*, mas falta de protecção imunitária contra reinfeções com isolados heterólogos de *Bartonella* (Guptill, 2010). Assim, o nível de bacteriemia e o grau de susceptibilidade para a reinfeção varia consoante a estirpe e espécie de *Bartonella* presente (Guptill, 2010).

A falta ou incompleta protecção cruzada entre isolados de *Bartonella*, provavelmente devido à variação genética, dificulta o desenvolvimento de vacinas eficazes contra este organismo (Guptill, 2010).

1.2.2.5. Sinais clínicos

A maioria dos gatos infectados por *Bartonella* spp. permanecem assintomáticos (Varanat *et al.*, 2011; Stutzer & Hartmann, 2012). Os sinais clínicos observados a partir de infecções experimentais por *B. henselae* foram: curtos períodos de pirexia; anorexia e letargia; moderada anemia transitória; linfadenopatia localizada ou generalizada; moderados sinais

neurológicos (nistagmos, exagerada ou ausência de resposta a estímulos, comportamentos agressivos, tremores e convulsões); falhas reprodutivas; sopro cardíaco; efusão pleural e pericárdica; e icterícia (Kordick & Breitscherdt, 1997; Kordick *et al.*, 1999; Muñana *et al.*, 2001; Breitschwerdt *et al.*, 2005; Tuzio *et al.*, 2005; Brunt *et al.*, 2006; Chomel *et al.*, 2006; Guptill, 2010; Varanat *et al.*, 2011; Stutzer & Hartmann, 2012; Pennisi *et al.*, 2013a). A severidade dos sinais clínicos variou ainda com a estirpe usada na inoculação (Pennisi *et al.*, 2009).

Os gatos naturalmente infectados são principalmente animais clinicamente saudáveis portadores da bactéria (Chomel *et al.*, 2006; Pennisi *et al.*, 2009; 2013a). No entanto, já foram descritos casos esporádicos de endocardite, miocardite, infecções oculares (conjuntivites, uveítes) e linfadenopatias (Brunt *et al.*, 2006; Chomel *et al.*, 2006; Pennisi *et al.*, 2009; Haubenstricker, 2010; Varanat *et al.*, 2011; Stutzer & Hartmann, 2012; Pennisi *et al.*, 2013a).

A endocardite foi descrita em três gatos infectados por *B. henselae*. No primeiro caso observaram-se elevados títulos de anticorpos e ADN de *B. henselae* na válvula aórtica com a confirmação de endocardite após necropsia e o segundo caso foi diagnosticado por electrocardiografia e detecção de ADN de *B. henselae* na válvula aórtica. No terceiro caso o gato, do qual se isolou *B. henselae* a partir do sangue, apresentava sopro cardíaco grau III/IV e lesão valvular com diagnóstico de endocardite da válvula mitral, sinais clínicos que desapareceram após o tratamento bactericida. Com estes estudos concluiu-se que a endocardite infecciosa em gatos pode ser causada por *B. henselae* (Varanat *et al.*, 2011; Stutzer & Hartmann, 2012; Pennisi *et al.*, 2013a). O género *Bartonella* também tem sido associado como responsável por endocardites em humanos e cães (Chomel *et al.*, 2003; Varanat *et al.*, 2011)

No estudo realizado por Varanat *et al.* (2011) observou-se a presença de miocardites piogranulomatosas e miosites diafragmáticas em análise post-mortem de dois gatos infectados por *B.henselae* (figura 13).

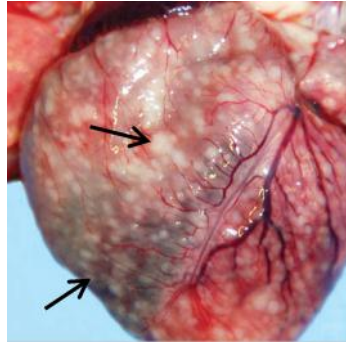


Figura 13 - Análise pos-mortem de uma gata de 9 meses infectada por *Bartonella henselae*: granulomas distribuídos por todo miocárdio (setas) (Varanat *et al.*, 2011).

Nos estudos realizados por Lappin & Black (1999) e Lappin *et al.* (2000) detectou-se a produção local de anticorpos anti-*Bartonella* spp. em fluidos oculares (humor aquoso) de gatos com uveíte, sugerindo a associação entre infecção por *Bartonella* spp. e a presença de uveítes (Ketring *et al.*, 2004; Brunt *et al.*, 2006; Stutzer & Hartmann, 2012). A produção local de anticorpos também ocorreu em animais saudáveis após inoculação experimental da bactéria (Lappin *et al.*, 2000; Brunt *et al.*, 2006; Stutzer & Hartmann, 2012). O envolvimento da *Bartonella* spp. em infecções oculares felinas é estabelecido após se descartar outras causas que possam levar ao aparecimento de uveítes, tais como, FIV, FeLV, toxoplasmose, e através da detecção de anticorpos e da resposta à terapêutica (Lappin & Black, 1999; Ketring *et al.*, 2004).

A claudicação e dor à palpação dos membros foram observadas em gatos com osteomielites e poliartrites recorrentes associadas à infecção por *B. vinsonii berkhoffi* (Pennisi *et al.*, 2013). Esta espécie é encontrada com maior frequência em canídeos e a infecção por este organismo deve ser considerada como diagnóstico diferencial em osteomielite felina (Chomel *et al.*, 2006; Stutzer & Hartmann, 2012).

De acordo com Glaus *et al.* (1997), os animais seropositivos apresentam, em comparação com gatos infectados seronegativos, uma maior probabilidade de desenvolver doenças renais e infecções do trato urinário, estomatites e linfadenopatia (Kordick *et al.*, 1999; Brunt *et al.*, 2006; Pennisi *et al.*, 2013). Por outro lado, os animais co-infectados por FIV e *Bartonella* spp. apresentam uma maior predisposição para desenvolver linfadenopatia e gengivites do que os gatos seropositivos para cada agente isolado (Ueno *et al.*, 1996).

A elevada prevalência de exposição à *Bartonella* spp. na população de gatos domésticos faz com que seja necessário mais investigações epidemiológicas de modo a

determinar se existe uma verdadeira associação entre a infecção por *Bartonella* spp. e algumas alterações neurológicas, estomatites, uveítes e pirexia, uma vez que até a data não existe uma associação estatisticamente significativa entre infecção activa de *Bartonella* spp. e determinadas condições clínicas (Brunt *et al.*, 2006; Guptill, 2010).

1.2.2.6. Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial de *Bartonella* spp. baseado na cultura bacteriana, serologia e/ou métodos moleculares é apenas requerido para felinos dadores de sangue, gatos domésticos que coabitem com pessoas imunodeprimidas e nos casos de diagnóstico de *Bartonella* em humanos que convivam com gatos (Pennisi *et al.*, 2013a). Na prática clínica estes métodos não são realizados em animais sem suspeita de infecção (Tuzio *et al.*, 2005).

A. Cultura

O isolamento da bactéria por cultura de sangue ou de tecidos é a técnica de referência ou “gold standard”, sendo a mais fiável para o diagnóstico definitivo de *Bartonella* spp. No entanto, é uma técnica com algumas limitações, nomeadamente, o longo período de incubação (6-8 semanas) devido ao crescimento lento da bactéria. A presença de falsos negativos pode ocorrer devido: (i) à presença de bacteriemia intermitente com ausência de bactérias na amostra enviada para cultura; (ii) ao número de organismos presentes na amostra estar abaixo do limite de sensibilidade do ensaio; e (iii) à possível morte bacteriana durante o transporte para o laboratório (Tuzio *et al.*, 2005; Brunt *et al.*, 2006; Guptill, 2010; Haubenstricker, 2010; Ebani *et al.*, 2011). Por outro lado, uma cultura positiva apenas indica que se isolou o organismo da amostra enviada para o laboratório, não sendo possível determinar se os sinais clínicos presentes no gato resultam da infecção pelo agente (Brunt *et al.*, 2006; Haubenstricker, 2010).

B. Métodos Serológicos

Estudos baseados na detecção de anticorpos apresentam um valor limitado, porque a presença de anticorpos apenas indica exposição e não necessariamente infecção activa. Para além disso, existe reacção cruzada entre diferentes espécies e estirpes de *Bartonella* spp., como por exemplo, anticorpos anti-*B. henselae* geralmente têm reacção cruzada com *B. clarridgeiae* (Brunt *et al.*, 2006; Pennisi *et al.*, 2013a).

Os anticorpos IgG persistem em gatos experimentalmente infectados por períodos prolongados (Guptill, 2010). Os anticorpos IgM são encontrados em gatos natural e experimentalmente infectados, mas a sua presença parece não estar relacionada com a bacteriemia (Pennisi *et al.*, 2013a).

As técnicas serológicas mais comumente usadas na detecção de anticorpos anti-*Bartonella* spp. são a IFI e a ELISA (Brunt *et al.*, 2006; Guptill, 2010).

A serologia é mais usada para diagnóstico de exclusão do que para confirmação de infecção, uma vez que a presença de resultados falsos positivos é bastante comum e o valor preditivo positivo (VPP) da IFI em gatos bacteriêmicos é baixo (39% a 46%), enquanto a presença de falsos negativos já é raro, sendo o VPP elevado (87% a 97%) (Brunt *et al.*, 2006; Guptill, 2010; Pennisi *et al.*, 2013). No entanto, resultados negativos não excluem a presença de infecção (Brunt *et al.*, 2006).

C. Métodos Moleculares

A amplificação de ADN de *Bartonella* spp. por PCR é um método de diagnóstico específico e sensível usado em muitos estudos, e tem a vantagem, em relação aos restantes métodos de diagnóstico, de identificar a espécie e/ou a estirpe de *Bartonella* presente por sequenciação do produto de reacção, e dos resultados estarem disponíveis mais rapidamente que os resultados da cultura de sangue (Guptill, 2010; Haubenstricker, 2010; Ebani *et al.*, 2011). No entanto, resultados falsos negativos podem ocorrer devido à bacteriemia intermitente, à administração prévia de antibióticos, ausência de ADN na amostra e inibição ou interferência de substâncias presentes na mesma (Haubenstricker, 2010). Por outro lado, os resultados positivos indicam a presença de ADN da bactéria, mas não prova que o microrganismo esteja vivo (Brunt *et al.*, 2006; Guptill, 2010; Haubenstricker, 2010)

O ADN de *Bartonella* spp. pode ser amplificado a partir de amostras de sangue, humor aquoso, líquido cefalorraquidiano, aspirados de linfonodos e secreções da mucosa oral (Brunt *et al.*, 2006; Pennisi *et al.*, 2009; 2013a). Pennisi *et al.* (2009) testaram três amostras clínicas diferentes de modo a determinar qual a mais sensível na detecção molecular de *B. henselae* e *B. clarridgeiae*, concluindo que as amostras de aspirados de linfonodos eram mais eficazes, seguida das amostras de sangue e das amostras de saliva. Os autores concluíram que a detecção de ADN por PCR utilizando a zaragatoa oral (procedimento fácil e rápido)

juntamente com amostras de sangue e/ou amostras de aspirados de linfonodos (difícil de se obter se os animais não apresentarem linfadenomegália) melhora a sensibilidade do diagnóstico.

Existem inúmeros “primers” utilizadas na PCR, variando o seu alvo consoante o laboratório. Os “primers”, que têm como alvo a amplificação do género, são úteis para detectar a presença de qualquer ADN de *Bartonella* spp. em amostras clínicas, enquanto “primers” mais específicos podem ser utilizados para determinar a espécie (Guptill, 2010).

Embora existam várias técnicas utilizadas no diagnóstico da bartonelose felina, não existe nenhuma 100% precisa para o diagnóstico de infecção activa de *Bartonella* spp. (Haubenstricker, 2010). A presença de sinais clínicos compatíveis com a infecção, a exclusão de outras causas com sintomatologia semelhante, o isolamento da bactéria através de cultura, a amplificação do seu material genético por métodos moleculares, a detecção de anticorpos específicos e a resposta ao tratamento são critérios que podem ajudar no diagnóstico (Brunt *et al.*, 2006; Pennisi *et al.*, 2013a). No entanto, os antibióticos usados para o tratamento desta infecção são geralmente de amplo espectro de acção, sendo efectivos na eliminação de outros organismos que causam síndromes semelhantes à bartonelose e, portanto, mesmo com todos estes critérios, o diagnóstico clínico de bartonelose felina não é definitivo (Brunt *et al.*, 2006).

1.2.2.7. Tratamento

As estratégias terapêuticas utilizadas em gatos com bartonelose são baseadas em estudos *in vitro* e no esquema de tratamento utilizado na bartonelose humana (Stutzer & Hartmann, 2012; Pennisi *et al.*, 2013a).

Vários antibióticos têm sido usados em gatos infectados natural e experimentalmente com *Bartonella* spp., tais como a doxiciclina, amoxicilina, amoxicilina e ácido clavulânico, enrofloxacina, eritromicina e azitromicina. Todavia nenhum mostrou ser eficaz na eliminação definitiva da infecção, sendo frequentes as recidivas (Guptill, 2010; Stutzer & Hartmann, 2012; Pennisi *et al.*, 2013a).

O tratamento de rotina com antibióticos pode induzir a resistência antimicrobiana, uma vez que a eliminação da bacteriemia não é garantida (Guptill, 2010; Pennisi *et al.*, 2013a). Assim, o tratamento deverá ser reservado exclusivamente para animais positivos a *Bartonella* spp. com sinais clínicos evidentes ou para gatos jovens que convivam com pessoas de risco,

tais como indivíduos imunocomprometidos ou crianças. O tratamento de escolha neste tipo de casos é a doxiciclina (Stutzer & Hartmann, 2012). O tratamento de portadores saudáveis não deverá ser considerada uma medida efectiva para a eliminação do risco zoonótico (Tuzio *et al.*, 2005; Guptill, 2010; Pennisi *et al.*, 2013a).

1.2.2.8. Saúde Pública

Muitas infecções por *Bartonella* spp. são zoonóticas e as mais reportadas incluem a doença da arranhadura do gato, angiomatose bacilar, endocardites e neuroretinites causadas por *B. clarridgeiae*, *B. henselae*, *B. koehlerae*, *B. quitana* (Brunt *et al.*, 2006; Guptill, 2010).

B. henselae é o mais comum agente patogénico transmitido por gatos a humanos (Stutzer & Hartmann, 2012). Nos estudos realizados até ao momento, a seroprevalência de *B. henselae* em pessoas saudáveis variou entre 3,6% a 6%, podendo ser mais elevada em alguns grupos de população específicos, tais como veterinários ou crianças (Stutzer & Hartmann, 2012).

A transmissão de *B. henselae* para os humanos pode ocorrer directamente através do trauma cutâneo causado pela arranhadura do gato ou pela sua mordida, ou indirectamente pelo contacto de feridas abertas com a saliva de gatos infectados (após “grooming”) ou com as fezes contaminadas de *C. felis* (Chomel *et al.*, 2006; Haubenstricker, 2010; Oskouizadeh *et al.*, 2010; Stutzer & Hartmann, 2012). A transmissão directa aos seres humanos pela picada da pulga do gato não foi comprovada experimentalmente, sendo principalmente hipotética (Chomel *et al.*, 2006).

1.2.3. Ehrlichia spp.

1.2.3.1. Etiologia

As bactérias do género *Ehrlichia*, família Anaplasmataceae, ordem Rickettsiales são gram-negativas e pleomórficas (Cohn, 2003; Vicent-Johnson, 2004). Estes organismos intracelulares obrigatórios são encontrados em vacúolos dentro do citoplasma de células hospedeiras eucarióticas (Cohn, 2003).

A espécie *E. canis* é o agente etiológico da erliquiose monocítica canina (Baneth, 2010; Little, 2010). No final de 1980, a erliquiose foi identificada como uma doença

potencialmente fatal em humanos (Cohn, 2003; Vicent-Johnson, 2004) e mais tarde, em 1986, foi reportado o primeiro caso em felinos. Desde então vários casos de erliquiose felina têm sido detectados em todo o mundo através de técnicas moleculares e serológicas (Ayllón et al., 2009).

1.2.3.2. Ciclo de vida e transmissão da bactéria

As espécies do género *Ehrlichia* infectam principalmente os leucócitos (monócitos, macrófagos e granulócitos) do sangue, fígado, baço, medula óssea, linfonodos, pulmão, rins e sistema nervoso central, onde se replicam dentro de vacúolos citoplasmáticos para formar mórulas, tal como acontece com a bactéria *A. phagocytophilum* (Alleman, 2005; Allison & Little, 2013). As mórulas podem conter muitos ou apenas alguns organismos individuais, que podem ser classificados de dois tipos: células reticuladas e células densas tubulares. Uma única mórula raramente apresenta os dois tipos de bactérias (Allison & Little, 2013). A sobrevivência e multiplicação do organismo nas células infectadas está relacionada com a capacidade do organismo impedir a fusão fagossoma-lisossoma (Neer & Harrus, 2006).

A transmissão de *E. canis* é feita principalmente pela carraça *R. sanguineus* (figura 14) (Cohn, 2003; Freire et al., 2009; CFSPH, 2013). A distribuição da infecção por *E. canis* está intimamente relacionada com a presença e densidade dos seus vectores, tendo estes um impacto directo na prevalência da doença numa dada região (Cohn, 2003; Breitschwerdt, 2011). Os canídeos são reservatórios de *E. canis* (Cohn, 2003; Neer & Harrus, 2006).



Figura 14 - *Rhipicephalus sanguineus*, carraça do cão, principal vector de *Ehrlichia canis* (Baneth, 2006a)

Embora *R. sanguineus* seja também o vector da erliquiose felina, ainda se desconhece o mecanismo de transmissão da bactéria em gatos (Ortuño *et al.*, 2005; Braga *et al.*, 2012). O reduzido número de casos de gatos diagnosticados com erliquiose pode ser explicado pelo facto de serem mais resistentes à infecção e de interagirem de forma diferente com o vector. A remoção frequente das carraças durante o “grooming” será uma das razões da prevalência de erliquiose felina ser baixa, dado que os vectores requerem um período mínimo de 24 a 48 horas de fixação para a transmissão do agente infeccioso (Breitschwerdt, 2009; Braga *et al.*, 2011).

As carraças ao realizarem uma refeição sanguínea de um hospedeiro infectado ingerem leucócitos contendo *E. canis*, que se multiplica nos hemócitos e nas glândulas salivares do vector. Já fora do hospedeiro, os vectores fazem a muda (de larva para ninfa ou de ninfa para adulto) e transmitem o agente patogénico transtetadialmente (Cohn, 2003; Neer & Harrus, 2006; Dantas-torres, 2010). Uma vez infectada, a carraça é capaz de disseminar a infecção até 155 dias após a separação do seu hospedeiro (Breitschwerdt, 2009; Moreira, 2009). A transmissão das bactérias a um hospedeiro susceptível ocorre durante as refeições sanguíneas subsequentes da carraça (Hagiwara, 2009; Dantas-Torres, 2010). Não se encontra descrita a transmissão transovárica de *E. canis* (Cohn, 2003; Neer & Harrus, 2006; Dantas-torres, 2010).

A transmissão da infecção pode ser iatrogénica e por transfusões sanguíneas de um dador infectado (Neer & Harrus, 2006).

1.2.3.3. Epidemiologia

A distribuição geográfica de *E. canis* está dependente da distribuição do seu vector, *R. sanguineus*. Na Europa já foram detectadas infecções em vários países como Espanha, França e Itália (em canídeos e felinos), Grécia e Portugal (em canídeos) (European Cientific Counsel Companion Animal Parasites [ESCAAP], 2012)

A maioria dos felinos reportados com a infecção tem mais de um ano de idade, pelagem curta e são gatos domésticos. Não existe predisposição de sexo nem de raça, ao contrário do observado nos cães. (Cohn, 2003; Lappin & Breitschwerdt, 2006).

As co-infecções por *E. canis* com hemoparasitas ou outros agentes infecciosos, tais como *M. haemofelis*, *Cryptococcus neoformans*, FeLV e FIV têm sido descritos em gatos (Cohn, 2003; Lappin & Breitschwerdt, 2006; Baneth, 2010 Ayllón *et al.*, 2011). A exposição

prévia a diversos agentes patogénicos pode aumentar a severidade da co-infecção e dificultar a interpretação dos estudos seroepidemiológicos, o diagnóstico e o tratamento (Cohn, 2003; Ayllón et al., 2011; CFSPH, 2013).

1.2.3.4. Patogenia

Embora já tenham sido relatados casos de erliquiose em gatos e se tenha detectado ADN ou anticorpos anti-*E. canis* em amostras de sangue felino, pouco se sabe sobre a prevalência da infecção, manifestações da doença e recomendações de tratamento para estas infecções em gatos (Ortuño *et al.*, 2005; Breitschwerdt, 2009; Vieira *et al.*, 2011). Com base nos achados clínicos, laboratoriais e radiográficos, a patogénese da doença é muito semelhante à infecção de *E. canis* em cães (Lappin & Breitschwerdt, 2006).

A patogenicidade está associada com a desregulação do sistema imunitário e consequente produção exagerada e inefectiva de anticorpos (Irwin, 2007; Freire *et al.*, 2009).

Após um período de incubação de 8 a 20 dias e com base nos sinais clínicos e alterações clinicopatológicas, a infecção por *E. canis* pode-se desenvolver em três fases: aguda, subaguda e crónica (Cohn, 2003; Neer & Harrus, 2006; Freire *et al.*, 2009; Hagiwara *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2009; Baneth, 2010; Breitschwerdt, 2011). A fase aguda tem uma duração de uma a quatro semanas com sinais clínicos inespecíficos, tais como depressão, descarga ocular, letargia, perda de peso e alterações gastrointestinais (Cohn, 2003; Baneth, 2010; Vieira *et al.*, 2011). Animais imunocompetentes recuperam da infecção eliminando o agente por completo, enquanto a ausência de tratamento ou a sua ineficácia permite a progressão da infecção para a fase subclínica, que pode durar entre meses a anos. Os resultados de infecções experimentais indicam que o baço é o órgão que faz o sequestro destes organismos durante a infecção subclínica e acredita-se que tenha um papel importante no desenvolvimento da patogénese da doença (Neer & Harrus, 2006). Durante o desenvolvimento da infecção, repetidas recombinações ocorrem nas proteínas antigénicas presentes na membrana externa da bactéria levando a variações imunogénicas. As bactérias conseguem assim “ultrapassar” os mecanismos de defesa do hospedeiro, resultando em infecções persistentes (Neer & Harrus, 2006).

Nesta fase os animais permanecem assintomáticos, embora uma ligeira trombocitopenia possa persistir. Animais persistentemente infectados podem recuperar

espontaneamente ou desenvolver a forma crónica e grave da doença (Hagiwara *et al.*, 2009). As condições que conduzem ao desenvolvimento da doença crónica ainda continuam desconhecidas (Cohn, 2003; CFSPH, 2013).

1.2.3.5. Sinais clínicos

Os sinais clínicos variam de acordo com a duração da infecção, com a imunocompetência do hospedeiro e factores relacionados com o microrganismo (Freire *et al.*, 2009). Os sinais clínicos e os achados laboratoriais são similares em cães e gatos (Braga *et al.*, 2011). Esta infecção é frequentemente diagnosticada já numa fase mais avançada (fase crónica) com complicações associadas (Lappin & Breitschwerdt, 2006).

Os sinais clínicos mais frequentemente reportados e inespecíficos que aparecem tanto na fase aguda como crónica são: depressão, letargia, perda de peso, pirexia, descarga ocular, alterações gastrointestinais, linfadenomegália, esplenomegália e, em casos mais severos (fase crónica), hemorragias (principalmente petéquias, equimoses e epistaxis) associadas à trombocitopenia (Aguirré *et al.*, 2004; Hagiwara *et al.*, 2009; Baneth, 2010; Breitschwerdt, 2011; Allison & Little, 2013). Manifestações oculares, nomeadamente uveíte anterior, queratoconjuntivite, hifema, glaucoma, coriorretinite e deslocamento da retina, assim como poliartrite neutrofilica e polimiosite também têm sido descritas (Baneth, 2010; Breitschwerdt, 2009). Alterações neurológicas, tais como hiperestesia, espasmos musculares e défices dos nervos cranianos, estão associadas com a presença de vasculite, meningoencefalites e infiltração linfocítica ou hemorrágica do sistema nervoso central e periférico (Baneth, 2010; Breitschwerdt, 2011).

1.2.3.6. Diagnóstico

O diagnóstico da erliquiose é baseado na história clínica, nos sinais clínicos, nas alterações laboratoriais (hematológicas e bioquímicas) e nos testes serológicos e moleculares (Moreira *et al.*, 2009). Nos felinos existe grandes semelhanças a nível da apresentação dos sinais clínicos entre a infecção imunomediada e erliquiose, sendo relevante avaliar a presença de infecção por *E. canis* antes de se iniciar uma terapia imunossupressiva (Allison & Little, 2013).

Vários métodos com diferentes graus de sensibilidade e especificidade podem ser usados para detectar *Ehrlichia* spp. (Vieira *et al.*, 2011). A confirmação laboratorial pode ser dificultada pela baixa bacteriémia, pela existência de reacções cruzadas e pela presença de co-infecções (Allison & Little, 2013). Assim sendo, um correto diagnóstico é maximizado quando são usadas diferentes metodologias, tais como um cuidadoso exame microscópico dos esfregaços sanguíneos ou tecidos, testes serológicos, moleculares e cultura (Freire *et al.*, 2009; Allison & Little, 2013).

A. Alterações Laboratoriais

As alterações observadas a nível do hematócrito são: anemia (a mais frequente, geralmente não regenerativa em gatos com infecção crónica), leucopenia/leucocitose, neutrofilia/ neutropenia, linfocitose e monocitose (Lappin & Breitschwerdt, 2006). Nos gatos que apresentem citopénias, deve-se avaliar a medula óssea, uma vez que está descrita hipoplasia primária em animais com erliquiose (Lappin & Breitschwerdt, 2006).

Na erliquiose felina não são comuns as alterações bioquímicas. A hiperglobulínia é a alteração mais consistente e geralmente causada por uma gamopatia policlonal, podendo, no entanto, aparecer como gamopatia monoclonal (Cohn, 2003; Lappin & Breitschwerdt, 2006).

B. Visualização Microscópica

A observação microscópica de esfregaços sanguíneos, medula óssea e de linfonodos corados com Giemsa ou Diff-Quik podem ser usados na pesquisa de mórulas. As mórulas aparecem como ponteados azul-escuros ou inclusões roxas principalmente em monócitos, podendo ocasionalmente ser encontradas noutras células (CFSPH, 2013). A sensibilidade do exame directo depende não só de espécie de *Ehrlichia* e do hospedeiro vertebrado mas também da fase da infecção, sendo superior na fase aguda. As mórulas são raramente detectadas na fase crónica da infecção (Allison & Little, 2013). De modo a aumentar a probabilidade de detectar mórulas de *E. canis* no sangue periférico deve-se procurar no “buffy coat” (Allison & Little, 2013; CFSPH, 2013).

Até a data, existem poucas descrições de mórulas em leucócitos de sangue periférico de gatos domésticos (Allison & Little, 2013), sendo mais provável encontrar células

infectadas a partir de sangue colhido de veias auriculares do que a partir de vasos de maiores dimensões (Lappin & Breitschwerdt, 2006).

C. Cultura

As espécies de *Ehrlichia* podem ser isoladas em cultura, com excepção de *E.ewingii* uma vez que até ao momento não se encontrou nenhuma linha celular que suporte o seu crescimento (Allison & Little, 2013). Apesar do isolamento das bactérias ser fundamental para a completa descrição e caracterização das espécies/estirpes presentes nas amostras, não é comum, na prática clínica, usar a cultura como método de diagnóstico, devido à morosidade de obtenção do resultado (pode demorar até oito semanas para haver crescimento) (Neer *et al.*, 2002; Cohn, 2003; Neer & Harrus, 2006; Vieira *et al.*, 2010; Allison & Little, 2013; CFSPH, 2013). Até ao momento ainda não se isolou nenhuma espécie de *Ehrlichia* a partir de amostras biológicas de felinos (Vieira *et al.*, 2011).

D. Métodos Serológicos

Apesar dos métodos serológicos serem frequentemente utilizados no diagnóstico de erliquiose canina, as técnicas IFI ou “Western Blot” ainda não se encontram padronizadas para detecção de anticorpos felinos anti-*Ehrlichia* spp. (Neer *et al.*, 2002; Lappin & Breitschwerdt, 2006; CFSPH, 2013). Além disso, um número significativo de falsos positivos pode ocorrer devido à reacção cruzada com outros organismos do género *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia* (Neer *et al.*, 2002; Cohn, 2003; Ortuño *et al.*, 2005; Lappin & Breitschwerdt, 2006; Viera *et al.*, 2010; CFSPH, 2013).

A seroconversão ou títulos altos de anticorpos confirmam a presença de infecção (CFSPH, 2013). Tal como acontece na infecção por *A. phagocytophilum*, os sinais clínicos podem aparecer antes da seroconversão e um único resultado negativo num gato com infecção aguda não exclui a presença de bactéria (Lappin & Breitschwerdt, 2012).

E. Métodos Moleculares

As técnicas moleculares são usadas para confirmar a infecção activa por *Ehrlichia* spp. (Allison & Little, 2013). Os laboratórios comerciais frequentemente usam os “primers” genéricos e só em casos de amplificação é que usam “primers” específicos para a espécie

(Cohn, 2003). A PCR apresenta ainda a vantagem de permitir a detecção simultânea de organismos em casos de co-infecção (Allison & Little, 2013).

Resultados positivos confirmam a infecção por uma determinada espécie de *Ehrlichia* (elevada especificidade) ao contrário dos testes serológicos que apenas confirmam exposição (Neer *et al.*, 2002; Tabar *et al.*, 2008). Amostras de sangue para PCR devem ser recolhidas antes de se iniciar a antibioterapia para maximizar a probabilidade de detectar os organismos (CFSPH, 2013). Este método, além de ser usado no diagnóstico de erliquiose, ajuda na confirmação da eliminação da infecção após o tratamento (Breitschwerdt, 2011).

Quando os resultados são negativos a interpretação é mais complexa, uma vez que os testes moleculares de amostras clínicas envolvem determinadas limitações, tais como as variações da parasitemia. Resultados negativos em animais com sintomatologia compatível com erliquiose poderá apenas indicar que não se detectou material genético da bactéria na amostra analisada, e não deve ser interpretada como ausência de infecção (Allison & Little, 2013). A falha na amplificação de ADN em gatos seropositivos poderá estar relacionada com a eliminação dos microrganismos pelo sistema imunitário, pelo sequestro das bactérias noutros tecidos, pela baixa concentração de ADN na amostra, ou uma reacção cruzada da serologia com outros agentes (Ayllón *et al.*, 2009; 2011).

1.2.3.7. Tratamento

Apenas um número limitado de antibióticos são efectivos no tratamento de erliquiose (CFSPH, 2013). A terapêutica com tetraciclina, doxiciclina ou dipropionato de imidocarb tem sido usada em gatos com suspeita clínica de erliquiose monocítica (Lappin & Breitschwerdt, 2006). Embora haja pouca informação disponível sobre o tratamento em felinos, o grupo de estudo de “American College of Veterinary Internal Medicine” recomenda o uso de doxiciclina (10 mg/kg, SID, PO, durante 28 dias) no tratamento de gatos com suspeita de erliquiose (Neer *et al.*, 2002; Lappin & Breitschwerdt, 2006).

O dipropionato de imidocarb (5 mg/kg IM ou SC, duas injeções com intervalo de duas semanas) é utilizado como segunda opção no tratamento de *E. canis* (Neer *et al.*, 2002; Vincent-Johnson, 2004; Little, 2010; Allison & Little, 2013). Este fármaco é prescrito em animais intolerantes à doxiciclina ou em casos dos donos apresentarem dificuldades na administração oral (Vincent-Vicent-Johnson, 2004). A terapia combinada de dipropionato de

imidocarb e doxicilina é também utilizada quando há suspeita de co-infecção com *Babesia* spp. (Baneth, 2010). A enrofloxacina e outras quinolonas são ineficazes na eliminação de *E. canis* (Vincent- Johnson, 2004; Neer *et al.*, 2002).

A antibioterapia pode ser menos eficaz na fase crónica, sendo a resposta ao tratamento mais lenta (Vincent- Johnson, 2004; CFSPH, 2013). Alguns casos de erliquiose requerem terapia de suporte, tal como transfusões de sangue, suplementação nutricional, fluidoterapia ou antibióticos para controlo de infecções secundárias (Vincent-Johnson, 2004; Breitschwerdt, 2011; CFSPH, 2013)

A administração de corticosteróides ou outros fármacos imunossupressores deve ser evitada, uma vez que pode interferir com a eficácia terapêutica da doxiciclina (Breitschwerdt *et al.*, 2002; Breitschwerdt, 2009) e favorecer o reaparecimento de sinais clínicos em gatos com infecções subclínicas (Allison & Little, 2013).

1.2.3.8. Saúde Pública

A erliquiose é uma infecção com potencial zoonótico, tendo sido considerada potencialmente fatal em humanos no final de 1980. A partir desse ano houve necessidade de uma maior pesquisa sobre o agente causador desta infecção (Cohn, 2003). Apesar de não existir evidência de transmissão directa de *Ehrlichia* spp. entre animais infectados e o homem e vice-versa, os animais domésticos são susceptíveis aos mesmos organismos que afectam o homem, pelo que podem servir como sentinelas ou reservatórios em áreas endémicas (Neer *et al.*, 2002; Cohn, 2003).

1.3. Controlo de vectores

Os ectoparasitas incluem uma grande variedade de artrópodes que pertencem taxonomicamente à classe Arachnida (carraças e ácaros) e à classe Insecta (pulgas, mosquitos e flébotomos) (ESCAAP, 2010). Estes artrópodes são parasitas hematófagos com ciclos de vida complexos envolvendo estádios no meio ambiente e outros estádios em contacto com o hospedeiro (Marchiondo *et al.*, 2013). As infestações por estes ectoparasitas podem resultar em lesões cutâneas, induzir uma resposta imunopatológica e levar à transmissão de agentes patogénicos (vírus, bactérias e parasitas) (ESCAAP, 2010; Marchiondo *et al.*, 2013).

Para o controlo dos ectoparasitas, os animais de companhia são frequentemente tratados com desparasitantes externos que podem ser usados terapêuticamente, a fim de eliminar a infestação presente, ou profilacticamente para prevenir ou reduzir picadas (Beugnet & Franc, 2012; Marchiondo *et al.*, 2013). Na Europa, a infestação por pulgas é a mais comum entre a população canina e felina (5-10%), seguindo-se a infestação por carraças. No entanto, esta última é mais preocupante, devido ao papel das carraças como principais vectores de infecções zoonóticas (Beugnet & Franc, 2012).

Dentro dos desparasitantes externos, as substâncias activas que eliminam pulgas adultas são chamadas de insecticidas ou adulticidas, enquanto as que eliminam carraças são denominadas de acaricidas (Marchiondo *et al.*, 2013). Para além dos insecticidas-acaricidas, existem moléculas reguladores de crescimento de insectos (IGRs) que exercem a sua acção por interferir com o desenvolvimento dos ovos ou outras fases imaturas que ocorrem no meio ambiente (fora do hospedeiro) (Otranto & Dantas-Torres, 2010; Beugnet & Franc, 2012; Marchiondo *et al.*, 2013). Estes IGRs são aplicados em animais ou no meio ambiente, de forma isolada ou em combinação com insecticidas-acaricidas, como o fipronil, as permetrinas ou imidaclopride (Otranto & Dantas-Torres, 2010; Beugnet & Franc, 2012).

Nos gatos os desparasitantes externos são a única solução terapêutica e preventiva de infestação por carraças e pulgas, uma vez que não existem vacinas disponíveis para proteger os felinos dos agentes transmitidos por artrópodes (Beugnet & Franc, 2012).

1.3.1. Controlo de carraças

Sempre que sejam visíveis carraças no animal é importante removê-las para evitar a transmissão de agentes patogénicos (controlo mecânico) seguida de aplicação de acaricidas (ESCAAP, 2010). Depois da detecção e tratamento da infestação, deve-se iniciar um tratamento profilático (ESCAAP, 2010).

A prevenção com colares, “spot-on” e “sprays” são as formas mais comuns e mais eficazes no controlo de infestação de carraças nos animais de companhia, estando disponíveis no mercado vários produtos, que incluem permetrinas, amitraz, fipronil ou imidaclopride (Solano-Gallego & Baneth, 2011). Apesar dos felinos serem menos afectados por doenças transmitidas por carraças devido ao “grooming”, quando as carraças estão presentes devem ser controladas com acaricidas apropriados. Os piretróides sintéticos concentrados,

especialmente as permetrinas, ou as amidinas (amitraz) são tóxicos para felinos, sendo mais usado nesta espécie, como acaricida tópico, o fipronil (ESCAAP, 2010; Hartmann *et al.*, 2013).

Para além disso, para controlar e prevenir infestação de carraças é importante evitar ou limitar o acesso a zonas com alta densidade de carraças, principalmente nas épocas do ano com pico de actividade, e aplicar acaricidas de acção residual e resistentes a água (ESCAAP, 2010).

1.3.2. Controlo de pulgas

As pulgas são os ectoparasitas mais comuns em animais domésticos, sendo mais frequente a infestação em felinos do que em canídeos (Schnieder *et al.*, 2008). Em ambas as espécies é a pulga do gato, *C. felis*, a espécie infestante mais prevalente (Schnieder *et al.*, 2008). O risco de infestação depende do estilo de vida do animal (com acesso ou sem acesso ao exterior). Em áreas onde a reinfestação por pulgas é frequente, como em áreas de climas temperados e habitações com vários animais, recomenda-se a realização de profilaxia (ESCAAP, 2010).

Os animais infestados podem ser tratados com ectoparasitícidias administrados topicamente, por via oral ou sistémica (Rhodes, 2011). Os insecticidas tópicos imidaclopride (fórmulas “spot-on”), selamectina (fórmulas “spot-on”) e fipronil (“spray” ou fórmulas “spot-on”) são amplamente usados em felinos e canídeos (Schnieder *et al.*, 2008; Beugnet & Franc, 2012). Num estudo realizado com o objectivo de determinar a eficácia de vários produtos contra a infestação por *C. felis* em gatos, concluiu-se que aplicação tópica de imidaclopride é a mais eficaz na eliminação precoce de pulgas adultas, limitando o risco de transmissão de agentes patogénicos e de dermatites alérgicas (Schnieder *et al.*, 2008).

1.3.2.1. Maneio ambiental

As pulgas adultas representam apenas uma proporção muito pequena de população total de pulgas, pelo que o controlo dos estádios imaturos (fases de desenvolvimento fora do hospedeiro) deve ser sempre tido em consideração, especialmente em casos de infestações graves (ESCAAP, 2010). Além de tratar o animal, é importante a implementação de medidas de controlo do ambiente para uma eliminação eficaz de pulgas (Rhodes, 2011).

No mercado existem produtos específicos (adulticidas e/ou IGRs) para serem aplicados no meio ambiente sob a forma de nebulizadores ou pulverizadores. Contudo, existem produtos que se aplicam sobre o animal e que têm acção também no meio ambiente sobre os estádios imaturos (ovos, larvas e pupas) (ESCAAP, 2010). Estes produtos podem conter uma combinação de adulticida e IGRs (Rhodes, 2011; ESCAAP, 2010). O fipronil, que atua como inseticida e acaricida, pode ser combinado com S-metopreno (IGR) para actuar também sobre os estádios imaturos das pulgas (Beugnet & Franc, 2012), ou seja, a formulação “spot-on” actua no animal e indirectamente no meio ambiente envolvente.

A população de pulgas é maior em áreas onde os animais dormem ou passam a maior parte do tempo, e é nestas zonas onde deve ser feito o tratamento do meio ambiente (Rhodes, 2011). A eliminação das pupas pode ser difícil, uma vez que tendem a localizar-se em zonas de difícil acesso e são resistentes a muitos produtos (Rhodes, 2011; ESCAAP, 2010). Assim, para além da aplicação de produtos, é importante a aspiração e limpeza dos locais frequentados pelos animais da casa (Rhodes, 2011; ESCAAP, 2010). Um estudo revela que a aspiração mata 96% das pulgas adultas e 100% das fases imaturas (Rhodes, 2011).

No exterior (jardins de casa, terraços) a população de pulgas é mais prevalente em áreas costeiras e localizações com temperaturas diurnas moderadas e de elevada humidade (Rhodes, 2011). As medidas para controlo de infestação de pulgas no exterior envolvem a remoção de detritos orgânicos (folhas caídas, pilhas de madeira), a rega regular do relvado e o corte da vegetação para permitir a penetração de luz solar. Todas estas medidas inibem o desenvolvimento larval (Rhodes, 2011). Para além disso, deverão também ser aplicados “sprays” com uma combinação de inseticida e IGR em áreas sombreadas e protegidas frequentadas pelos animais, tais como boxes e outros compartimentos de abrigo (Rhodes, 2011).

1.3.3. Controlo de flebótomos

Os flebótomos são parasitas externos intermitentes e têm uma época de actividade que em áreas endémicas pode variar de ano para ano, consoante a região e disponibilidade de habitats adequados (ESCAAP, 2010). Em Portugal, os flebótomos estão activos entre os meses de Maio a Outubro, com pico de actividade em Julho e Agosto (ONLeish, 2013).

As medidas de prevenção contra as picadas de flebótomos recomendadas nos canídeos incluem a redução de exposição aos flebótomos e a aplicação de insecticidas com acção repelente (ESCAAP, 2010, ONLeish, 2013).

Vários estudos têm demonstrado que o uso regular destes compostos durante a época de actividade flebotomínica reduz significativamente o risco dos cães serem infetados por *L.infantum* (Maia & Campino, 2011; ESCAAP, 2010). Os piretróides sintéticos aplicados sob a forma de colar ou formulações “spot-on” são os produtos mais amplamente usados nos canídeos (Gramiccia, 2011).

Todos os canídeos infectados com leishmaniose e que residam em áreas endémicas devem estar protegidos contra a picada de flebótomos como medida de redução do risco de infecção em humanos e restantes animais, uma vez que, mesmo que se encontrem sob tratamento podem transmitir o parasita através dos vectores (Gramiccia, 2011).

Não existe nenhuma informação disponível sobre a prevenção da leishmaniose felina (Pennisi *et al.*, 2013) e a maior limitação no controlo da infecção nestes animais é a sua toxicidade aos piretróides (Maia & Campino, 2011).

2. Objectivos

Este estudo teve como objectivo geral determinar a prevalência de infecção por protozoários e bactérias transmitidas por vectores, tendo por base uma amostra de felídeos residentes na Região da Arrábida. O objectivo específico consistiu em determinar a relação das características intrínsecas e extrínsecas (idade, sexo, raça, pelagem, modo de vida, desparasitações, insecticidas, vacinações, presença de ectoparasitas e infecções concomitantes) dos animais da amostra com a presença dos diferentes agentes patogénicos identificados.

3. Material e Métodos

O presente estudo foi aprovado pelas comissões de Ética do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa e da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias de Lisboa.

Todos os proprietários dos gatos foram informados do estudo, tendo sido a participação dos felídeos (nomeadamente a colheita de sangue e utilização dos dados relativos ao paciente) autorizada pela assinatura de um consentimento informado (Apendice I).

3.1. Área geográfica de estudo

Este estudo foi realizado no Hospital Veterinário da Arrábida (HVA) situado em Vila Nogueira de Azeitão, região pertencente ao distrito de Setúbal (figura 15). A vila Nogueira de Azeitão faz parte de um grupo de localidades que constitui a região de Azeitão. Esta região apresenta uma população de 18.921 habitantes (Câmara Municipal de Setúbal [CMS], 2013)

Setúbal, capital de distrito, fica a 32 km de Lisboa na margem norte da foz do rio Sado ladeada pela Serra da Arrábida. Esta cidade apresenta uma população de 121.185 habitantes com uma área de 170,57 km² dividida em 8 freguesias (CMS, 2013). Toda a região de Setúbal apresenta um clima misto, subtropical e mediterrânico, com fracas amplitudes térmicas devido à sua proximidade com o mar e a presença dos rios Tejo e Sado. O período de insolação é bastante elevado ao longo de todo o ano e a precipitação é reduzida (CMS, 2013).

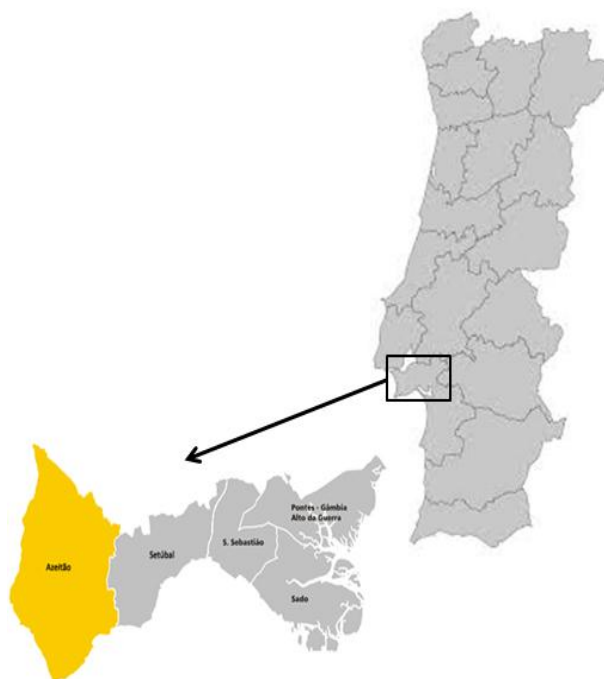


Figura 15 - Mapa de Portugal Continental com o distrito de Setúbal e a região de Azeitão em evidência (adaptado da CMS, 2013).

3.2. Caracterização da amostra

A população em estudo foi constituída por 104 gatos que se apresentaram ao Hospital Veterinário da Arrábida, entre o início do mês de Abril e o fim do mês Junho de 2013, por motivos cirúrgicos, médicos ou para “check-up” anual (desparasitações e vacinações). Durante a recolha da amostra foi preenchido um questionário pelos proprietários e concluído pelo médico veterinário, de modo a se obter informações sobre a idade, sexo, raça, ambiente e exposição de artrópodes, desparasitações, insecticidas, vacinações, sinais clínicos, alterações laboratoriais e presença de vírus imunossupressores felinos (FIV e FeLV) (Apendice II).

3.2.1. Critérios de inclusão

Para efeitos do estudo, visando o objectivo geral, utilizou-se apenas como critério de inclusão, gatos com idade superior a 3 meses e provenientes da região da Arrábida.

4. Protocolo Clínico

4.1. Colheita e Processamento de sangue periférico

Após tricotomia e assepsia com álcool etílico a 70% obtiveram-se, por venopunção de veias periféricas (veia cefálica, veia femoral ou veia jugular), amostras de sangue periférico. Para a recolha das amostras foram utilizadas seringas de 2 ml e agulhas de 25 G, colhendo-se cerca de 2 ml de sangue por gato, no qual uma pequena quantidade de amostra foi utilizada para impregnar uma área correspondente a uma moeda de 2 euros em papel de filtro (Whatman® número 3) e o restante foi colocado num tubo de 1,5 ml. Posteriormente, cada papel de filtro e correspondente tubo foram identificados com o número da amostra e com a data da recolha (figura 16), tendo sido armazenados a 4°C e a -20° C, respectivamente, até serem analisados.

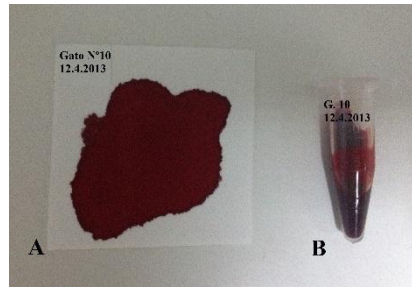


Figura 16 – Papel de filtro impregnado com sangue periférico (A) e tubo com amostra de sangue (B) (foto da autora).

4.2. Pesquisa de ADN de *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp., *Hepatozoon* spp. e *Leishmania infantum* através da técnica de reacção em cadeia da polimerase (PCR)

Para realização da PCR foram executados vários passos. Como primeiro passo, foi feita a extracção do ADN directamente do papel de filtro, seguida de um controlo de qualidade de extracção através da quantificação do ADN por espectrofotometria (Nanodrop 1000) e amplificação do gene constitutivo da β - actina felina.

Após a confirmação da extracção de ADN de cada amostra, foi realizada a amplificação do segmento do agente patogénico em estudo. Em todas as amplificações foram utilizados controlos positivos (previamente sequenciados e específicos para cada agente que se pretendia detectar) e controlos negativos. As técnicas de extracção de ADN e o PCR foram realizadas em áreas separadas, previamente desinfectadas com lixívia de forma a prevenir possíveis contaminações.

Todos os produtos de PCR, assim como um marcador de massa molecular de 100 pb de ADN, foram corridos por electroforese em gel de agarose a 1,5% a 120 V e 400 mA, durante 60 minutos (excepto para *Bartonella* spp. e *Hepatozoon* spp. em que se usou 130 V durante 80 min), observados no transiluminador e fotografados no sistema UVIDOC.

Após a visualização dos produtos de PCR, os que apresentavam uma quantidade suficiente de ADN foram enviados para sequenciação. Alguns dos produtos foram purificados antes de serem enviados.

4.2.1. Extracção de ADN a partir de papel de filtro impregnado com sangue periférico

Para a extracção do ADN a partir de sangue impregnado em papel de filtro utilizou-se um método rápido comercial (Kit Citogene®, Citomed), de acordo com as instruções do fabricante.

Deste modo, utilizaram-se 2 discos do papel de filtro, de 4 mm de diâmetro cada, os quais foram a incubar num tubo de 1,5 ml em 150 µl de tampão de lise e 1,5 µl de Proteinase K (20 mg/ml), durante 15 min a 65°C em placa térmica, seguida de uma incubação a 55°C durante 2 horas, em banho-maria, invertendo os tubos a cada 30 minutos. Terminada a incubação, retiraram-se as amostras do banho-maria, deixando o lisado arrefecer à temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado a cada amostra 100 µl de solução de precipitadora de proteínas e, de modo a obter uma mistura uniforme, usou-se o vórtex a velocidade elevada durante vinte segundos, seguindo-se uma centrifugação a 84 g, durante 15 min, a 4°C, para haver a formação de um “pellet” compacto de proteína.

Após a centrifugação, transferiu-se cerca de 220 µl de sobrenadante (ADN) para novos tubos contendo 300 µl de Isopropanol a 100% e a mistura, depois de invertida 50 vezes, foi centrifugada a 84 g, 5 min, a 4°C. Após rejeição do sobrenadante, adicionaram-se 300 µl de etanol a 70% e, para garantir a lavagem do “pellet”, inverteu-se suavemente o tubo várias vezes. Procedeu-se a nova centrifugação a 84 g, durante 1 min, a 4°C, seguido da rejeição do sobrenadante e colocação dos tubos com a tampa aberta numa posição invertida, sobre papel absorvente, na estufa a 52°C até que o ADN estivesse completamente seco, tendo sido posteriormente adicionado 30 µl de tampão de hidratação de ADN a cada amostra e incubado à temperatura ambiente durante a noite. No dia seguinte, as amostras foram armazenadas a -20°C até à realização das PCR.

4.2.2. Controlo de extracção de ADN-Amplificação de β-actina Felina

Com o objectivo de avaliar a eficácia da técnica de extracção de ADN realizou-se um controlo das amostras, após a extracção, através da amplificação do gene constitutivo da β-actina felina, usando os “primers” Bet Fel1: 5'CCATTTTCTGTTCCGCCTTA3', e Bet Fel2: 3'CAACGGGCTCCTTAGTCAGA5' (Ramos, 2012).

Para cada amostra (3 µl de ADN), preparou-se 22 µl de mistura de reacção constituída por 12,3 µl de água bidestilada, 5 µl de tampão de reacção [tampão NH₄ (5X): 160mM (NH₄)₂SO₄; 670mM Tris-HCl; pH 8.8 (25°C)], 2 µl de solução de Mg²⁺ (25mM MgCl₂), 0,5 µl de dNTPs (10 mM), 1 µl de cada “primer” Bet Fel1 e Bet Fel2 (10 pmol/µl, cada), e 0,2 µl da enzima Taq polimerase (5U/µl).

Em todas as amplificações utilizou-se um controlo negativo e um positivo. O negativo foi constituído por 3 µl de água bidestilada em substituição do ADN, e o positivo por ADN genómico (1µl) obtido de uma amostra de baço de um gato.

As condições óptimas para a amplificação no termociclador (Thermo Electron Corporation® Px2 Termal Cycler) foram as seguintes: desnaturação de 5 min a 95°C, e 35 ciclos de 30 seg a 95°C (desnaturação); 30 seg a 56°C (ligação), e os últimos 30 seg a 72°C (elongação); após os 35 ciclos, a elongação final foi de 5 min a 72°C. Os produtos de amplificação, constituídos por 229 pb, foram visualizados num gel de agarose a 1,5 % em 1X tampão TAE corado com 0,2 µg/ml de brometo de etídio.

4.2.3. Pesquisa de ADN de *Babesia* spp.

Os “primers” escolhidos para a pesquisa de piroplasmose tiveram como referência o protocolo utilizado por Harrus *et al.* (2011), utilizando-se os “primers” Piro A: 5’ AATACCCAATCCTGACACAGGG 3’ e Piro B: 5’ TTAAATACGAATGCCCCCAAC 3’.

De acordo com o protocolo, para cada amostra (3 µl de ADN), preparou-se 22 µl de mistura de reacção constituída por 12,3 µl de água bidestilada, 5 µl tampão de reacção [tampão NH₄ (5X): 160mM (NH₄)₂SO₄; 670mM Tris-HCl; pH 8,8 (25°C)], 2 µl de solução de Mg²⁺ (25mM MgCl₂), 0,5 µl de dNTPs (10 mM), 1 µl de cada “primer” Piro A e Piro B (10pmol/µl cada) e 0,2 µl de enzima Taq polimerase (5U/µl). Utilizou-se 1 µl de ADN genómico de *Babesia* spp. como controlo positivo e 3 µl de água bidestilada como controlo negativo.

As condições óptimas para a amplificação por PCR foram as seguintes: uma desnaturação inicial a 94°C durante 3 min, seguido de 35 ciclos constituídos por uma desnaturação a 94°C durante 30 seg, ligação dos “primers” a 64°C durante 45 seg e uma extensão a 72°C durante 30 seg. Para finalizar este ultimo ciclo, uma extensão final a 72°C

durante 7 min. Os produtos de PCR, constituídos por 408 pb, foram visualizados num gel de agarose a 1,5 %, como descrito em 4.2.2.

4.2.4. Pesquisa de ADN de *Bartonella* spp.

Para a detecção de ADN de *Bartonella* spp. foram utilizados os “primers” Bart F: 5’ CTTTCAGATGATGATCCCAAGCCTTCTGGCG 3’ e Bart R: 5’ GAACCGACGACCCCCTGCTTGCAAAGCA 3’ (Maggi *et al.*, 2008)

Para cada amostra (3 µl de ADN) adicionou-se uma mistura de reacção de 22 µl constituída por 13 µl de água bidestilada, 5 µl de tampão de reacção [tampão NH₄ (5X): 160mM (NH₄)₂SO₄; 670mM Tris-HCl; pH 8,8 (25°C)], 2 µl de solução de Mg²⁺ (25mM MgCl₂), 0,5 µl de dNTPs (10 mM), 0,6 µl de cada “primer” Bart F e Bart R (10pmol/µl cada), e 0,3 µl de enzima Taq polimerase (5U/µl). No controlo positivo adicionou-se 1 µl de ADN genómico de *Bartonella* spp e no controlo negativo adicionou-se 3 µl de água bidestilada.

As condições óptimas para as amplificações por PCR foram: desnaturação inicial a 95°C durante 5 min, seguida de 55 ciclos com uma desnaturação a 95°C durante 15 seg, ligação dos “primers” a 66°C durante 15 seg. e extensão a 72°C durante 15 seg. A amplificação foi completada com uma extensão final a 72°C durante 1 min, obtendo-se assim produtos de amplificação de 600 pb com posterior visualização em gel de agarose a 1,5 %, como descrito em 4.2.2.

4.2.5. Pesquisa de ADN de *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp.

Para a detecção de ADN de *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp. foram utilizados os “primers” EHR 16SF: 5’ GGTACCYACAGAAGAAGTCC 3’ e EHR 16SR: 5’ TAGCACTCATCGTTTACAGC 3’ (Harrus *et al.* 2011)

Para cada amostra (3 µl ADN), preparou-se 22 µl de mistura de reacção constituída por 12,3 µl de água bidestilada, 5 µl tampão de reacção [tampão NH₄ (5X): 160mM (NH₄)₂SO₄; 670mM Tris-HCl; pH 8,8 (25°C)], 2 µl de solução de Mg²⁺ (25mM MgCl₂), 0,5 µl de dNTPs (10 mM), 1 µl de cada “primer” EHR 16SF e EHR 16SR (10pmol/µl cada) e 0,2 µl de enzima Taq polimerase (5U/µl). Como controlo positivo utilizou-se 1 µl de ADN genómico de *E. canis* e como controlo negativo 3 µl de água bidestilada.

Para amplificação das amostras foram usadas como condições ótimas: uma desnaturação inicial de 95°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos, que incluem uma desnaturação a 94°C durante 30 seg, ligação dos “primers” a 55°C durante 30 seg e uma extensão a 72°C durante 90 seg, e uma extensão final a 72°C durante 5 min. Os produtos de amplificação constituídos por 345 pb foram visualizados em gel de agarose a 1,5% como anteriormente descrito para *Babesia* spp.

4.2.6. Pesquisa de ADN de *Hepatozoon* spp.

Os “primers” utilizados para amplificação de ADN de *Hepatozoon* spp. foram: Hep F: 5' ATACATGAGCAAAATCTCAAC 3' e Hep R: 5' CTTATTCCATGCTGCAG 3' (Harrus *et al.*, 2011).

Para a sua realização preparou-se, para cada amostra (3 µl de ADN), 22 µl de mistura de reacção constituída por 12,3 µl de água bidestilada, 5 µl tampão de reacção [tampão NH₄ (5X): 160mM (NH₄)₂SO₄; 670mM Tris-HCl; pH 8,8 (25°C)], 2 µl de solução de Mg²⁺ (25mM MgCl₂), 0,5 µl de dNTPs (10 mM), 1 µl de cada “primer” Hep F e Hep R (10pmol/µl cada) e 0,2 µl de enzima Taq polimerase (5U/µl). Para o controlo positivo utilizou-se 1 µl de ADN genómico de *Hepatozoon* spp. e para o controlo negativo 3 µl de água bidestilada.

No termociclador, para a amplificação das amostras, foram utilizadas as seguintes condições: uma desnaturação inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 34 ciclos que incluía uma desnaturação a 95°C durante 20 seg, ligação de “primers” a 56°C durante 30 seg e uma extensão a 72°C durante 90 seg. A amplificação terminou com uma extensão final a 72°C durante 5 min. Os produtos de amplificação constituídos por 626-666 pb foram visualizados num gel de agarose a 1,5 %.

4.2.7. Pesquisa de ADN de *Leishmania infantum*

Na pesquisa de ADN de *Leishmania infantum* utilizaram-se os “primers” MC1 (5' GTTAGCCGATGGTGGTCTTG 3') e MC2 (5' CACCCATTTTTCCGATTTTG 3'), desenhados a partir de uma sequência de ADN cinetoplastideal (Cortes *et al.*, 2004).

Para a amplificação preparou-se para cada amostra uma reacção com 25 µl de volume que continha 3µl de ADN da amostra e 22 µl de mistura de reacção. Esta era constituída por 7,3 µl de água bidestilada, 5 µl de tampão de reacção [tampão NH₄ (10X): 160mM

(NH₄)₂SO₄; 670mMTris-HCl; pH 8,8 (25°C)], 3 µl de solução Mg²⁺ (25mM MgCl₂), 0,5 µl dNTPs (10mM), 3 µl de cada “primer” MC1 e MC2 (5 pmol/µl) e 0,2 µl da enzima Taq Polimerase (5U/µl). Como controlo negativo, foram utilizados 5 µl de água bidestilada em vez de ADN e, como controlo positivo, 2 µl de ADN extraído de uma cultura de massa de promastigotas de *L. infantum*.

As condições óptimas para o PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 2 min, seguido de 30 ciclos que consistia na desnaturação a 94°C durante 20 seg, ligação de “primers” a 60°C durante 20 seg e extensão a 72°C durante 30 seg, e para finalizar uma extensão final a 72°C durante 5 min. Posteriormente, os produtos de amplificação constituídos por 447 pb foram visualizados por electroforese em 1,5% de gel de agarose.

4.3. Purificação de fragmentos de ADN a partir de gel de agarose

Após a visualização dos produtos de PCR verificou-se a necessidade de utilização da técnica de purificação em alguns produtos de amplificação de *Bartonella* spp. e de *Hepatozoon* spp. A purificação dos produtos de PCR foi realizada diretamente a partir do gel de agarose, com o “Kit” comercial “High Pure PCR Product Purification Kit” (Roche® Mannheim, Alemanha) de acordo com as instruções do fornecedor:

Este “kit” baseia-se na ligação específica do ADN amplificado a uma fibra de vidro existente na coluna de purificação, na presença de tiocianato de guanidina. O ADN é purificado através de uma série de lavagens e centrifugações, com o objectivo de remover “primers”, nucleótidos e outros sais resultantes da PCR. Por último, o ADN é eluído usando uma solução de baixa concentração salina.

Para aplicar o protocolo de purificação, as bandas específicas (600 pb para *Bartonella* spp. e 626-666 bp para *Hepatozoon* spp.) foram cortadas com uma lâmina de bisturi esterilizada e colocadas, separadamente, em tubos de 1,5 ml. Adicionou-se 300 µl de tampão de ligação a cada tubo, levou-se ao vórtex e incubou-se em banho-maria a 56°C durante 10 min. Após o gel estar totalmente dissolvido, adicionou-se 150 µl de Isopropanol, homogeneizou-se no vórtex e passou-se o conteúdo para a coluna de purificação combinada com o tubo de recolha. As amostras foram centrifugadas a 80g durante 1 minuto. De seguida, realizou-se uma dupla lavagem, durante 1 min a 80g, com 500 µl e 200 µl de tampão de lavagem respectivamente. Para finalizar, o produto já purificado foi eluído da coluna de

purificação para um novo tubo de 1,5 ml com 100 µl de tampão de eluição e centrifugado a 80g durante 1 min.

4.4. Sequenciação e Análise dos segmentos de ADN purificados

O ADN amplificado e o purificado foram enviados para sequenciação (empresa StabVida, Portugal), utilizando como iniciadores de sequenciação os mesmos “primers” utilizados na amplificação do agente patogénico em causa.

A análise das sequências nucleotídicas obtidas foi realizada por comparação por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) com as sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Um nível de homologia maior ou igual a 95% foi aceite como indicativo de elevado grau de confiança.

5. Análise Estatística

Todos os dados obtidos dos 104 gatos domésticos estudados foram armazenados no software Microsoft Excel 2013®. Para a análise estatística utilizou-se o programa informático SPSS. Statistics 21.0 (IBM SPSS Modeler). Para análise dos dados recorreu-se aos seguintes testes estatísticos: o teste de Mann-Whitney para relacionar os resultados moleculares com a variável idade; e o teste Qui-quadrado para relacionar os resultados moleculares com as variáveis pelagem, vacinação e presença de ectoparasitas. O teste exacto de Fisher foi utilizado quando não estavam reunidas as condições para a realização do teste Qui-quadrado, usando um nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

6. Resultados

6.1. Caracterização da amostra

A amostra em estudo foi constituída por 104 gatos domésticos, dos quais 56 (53,8%) eram fêmeas e 48 (46,15%) eram machos. Das 56 fêmeas, 13 (12,5%) eram inteiras e 43 (41,3%) eram esterilizadas. Nos machos, 19 (18,3%) eram inteiros e 29 (27,8%) eram castrados (figura 17).

A idade mínima neste grupo foi de 3 meses e a idade máxima foi de 19 anos e uma mediana de 4 anos.

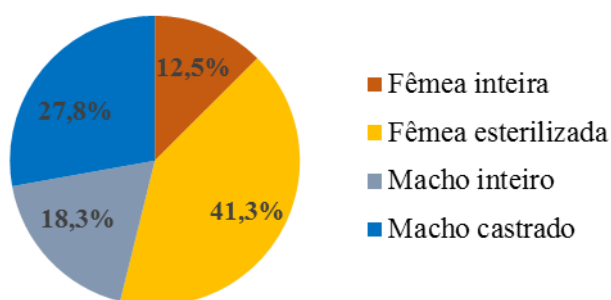


Figura 17 - Caracterização da amostra quanto ao sexo (frequência relativa, n=104).

A raça predominante foi o Europeu comum com 86 (82,7%) gatos, seguido do Persa com 7 (6,7%) animais, o Ragdoll com 3 (2,9%) animais e em *Ex aequo* as raças Siamês, Bengala, Main Coon e cruzado de Persa com apenas 2 (1,9%) animais (figura 18). Em relação ao comprimento do pêlo, 91 (87,5%) gatos apresentavam pelagem curta e 13 (12,5%) longa (figura 19).

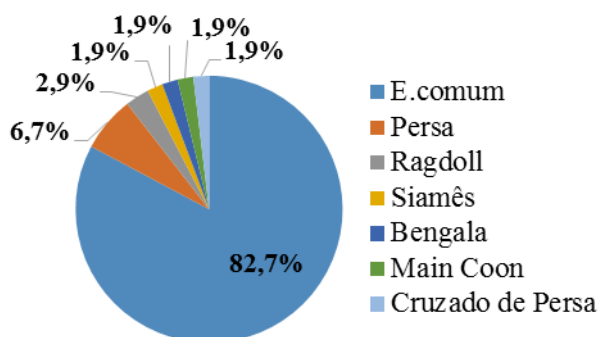


Figura 18 - Caracterização da amostra quanto à raça (frequência relativa, n=104)

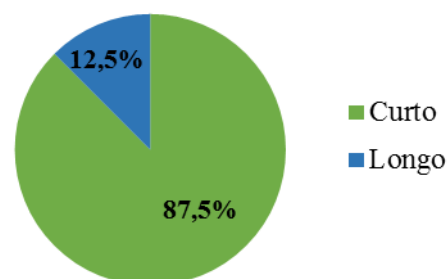


Figura 19 - Caracterização da amostra quanto à pelagem (frequência relativa, n=104)

A maioria dos animais, 84 gatos (80,7%), tinham contacto com outros animais de estimação, 18 (17%) não conviviam com nenhum outro animal de estimação e houve apenas num gato que não se conseguiu obter estes dados. Dos 103 gatos em estudo nenhum fazia deslocações dentro e fora de Portugal e apenas num gato não se obteve informação.

Dos 104 gatos em estudo, 39 (37,5%) viviam exclusivamente no exterior, 41 (39,4%) acesso ao exterior (estavam dentro e fora de casa), 23 (22,1%) eram gatos exclusivamente de

interior (não tinham qualquer contacto fora da habitação) e apenas num gato não se conseguiu obter dados sobre o seu estilo de vida (figura 20).

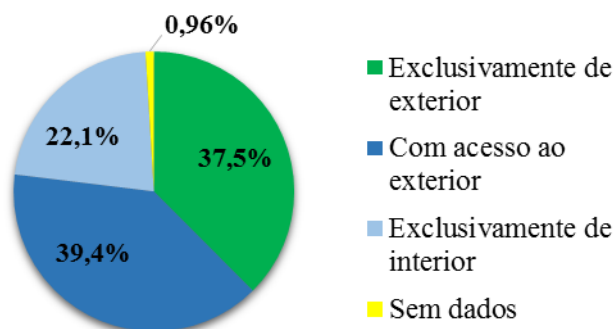


Figura 20 - Caracterização da amostra quanto ao estilo de vida (frequência relativa, n=104)

Em relação à desparasitação externa, 71 (68,2%) gatos faziam prevenção contra os ectoparasitas e a maioria regularmente (uma vez por mês), e apenas 32 (30,7%) não eram desparasitados. Os ectoparasiticidas usados foram: imidaclopride (Advantage®), imidaclopride e moxidectina (Advocate®), selamectina (Stronghold®) e fipronil e (S)-metopreno (Frontline Combo®) (figura 21). Na prevenção contra endoparasitas, 72 (69,2%) animais eram desparasitados internamente e a maioria de forma regular (três em três meses), enquanto 31 (29,8%) gatos não recebiam qualquer tipo de medida profilática para os parasitas internos. Os endoparasiticidas usados foram: milbemicina oxima e praziquantel (Milbemax®), emodepside e praziquantel (Profender®) e fenbendazol (Panacur®) (figura 22). Tanto para a desparasitação externa como para a desparasitação interna, não se obteve dados num gato. Nenhum proprietário respondeu positivamente no questionário sobre o uso de insecticidas para o ambiente.

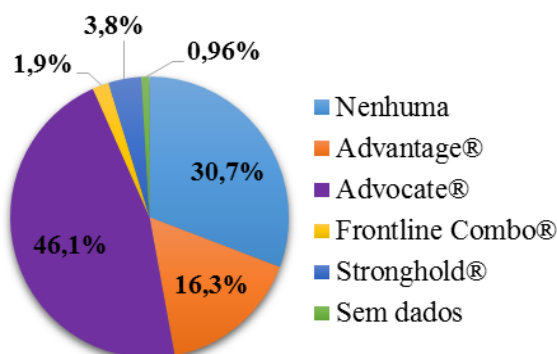


Figura 21 - Caracterização da amostra quanto ao tipo de desparasitação externa (frequência relativa, n=104)

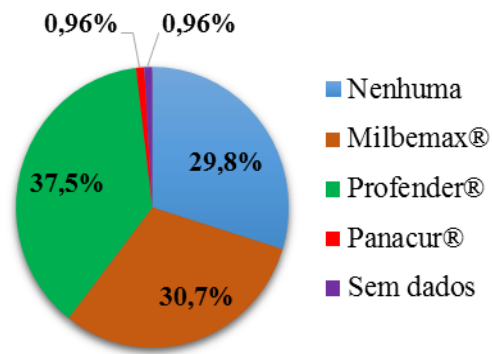


Figura 22 - Caracterização da amostra quanto ao tipo de desparasitação interna (frequência relativa, n=104)

Em relação ao estado vacinal, 59 (56,7%) dos animais não eram vacinados, 44 (42,3%) tinham a vacinação em dia e apenas num dos gatos não se obtiveram dados sobre o estado vacinal. No momento da recolha de sangue, observaram-se ectoparasitas em 53 (51%) animais, dos quais 35 (33,6%) estavam infestados com pulgas e carraças, 18 (17,3%) apresentavam apenas pulgas e um gato tinham apenas carraças.

Todos os animais presentes no estudo eram assintomáticos. Relativamente à presença de vírus imunossupressores felinos, dos 44 (42,3%) gatos testados para FIV e FeLV, apenas um era FIV positivo.

6.2. Resultados da pesquisa de ADN de *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp., *Hepatozoon* spp. e *L. infantum* através da técnica de PCR

O gene da β -actina felina foi amplificado em todas as amostras (figura 23).

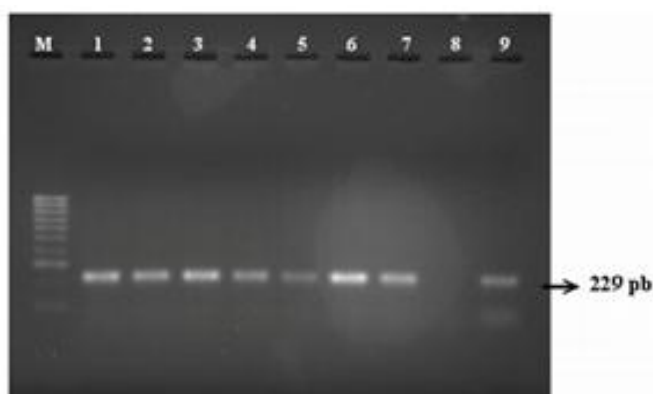


Figura 23 – Electroforese em gel de agarose com os resultados da amplificação do gene da β -actina felina: M – marcador de 100pb; colunas 1-7 - amostras positivas; coluna 8 – controlo negativo; coluna 9 – controlo positivo (foto da autora).

Baseado na amplificação de ADN por PCR foram detectados 18 gatos (17,3%) positivos a pelo menos um dos agentes estudados, incluindo 3 animais (2,8%) co- infectados com dois agentes (Tabela 1).

Os agentes amplificados foram: *Hepatozoon* spp. (n=11), *Bartonella* spp. (n=5), *Leishmania infantum* (n=4) e *Babesia* spp. (n=1). Após a sequenciação das amostras que possuíam quantidade suficiente de ADN amplificado, as espécies identificadas foram *H. felis* (n=4) e *B. henselae* (n=1). Dos gatos co-infetados, dois apresentavam co-infecção com

Hepatozoon spp. e *L. infantum*, e um estava co-infetado com *B. henselae* e *Babesia* spp.. Os géneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* não foram detetadas na amostra em estudo.

Tabela 1 - Prevalência de infecções simples e de co-infecções por agentes patogénicos transmitidos por vectores em 104 gatos da região da Arrábida detectados por PCR convencional.

Agente (s)	Nº Gatos positivos	Prevalência (%)
Infecções simples	15	14,4
<i>Bartonella</i> spp.	4	3,8
<i>Hepatozoon</i> spp.	5	4,8
<i>H. felis</i>	4	3,8
<i>L. infantum</i>	2	1,9
Co-infecções	3	2,9
<i>Hepatozoon</i> spp. + <i>L. infantum</i>	2	1,9
<i>Babesia</i> spp.+ <i>B. henselae</i>	1	0,96
Total	18	17,3

6.2.1. *Babesia* spp.

Apenas um dos 104 gatos estudados foi positivo por PCR para *Babesia* spp. e encontrava-se co-infetado por *B. henselae* .

Esta fêmea inteira de três meses de idade, cruzado de Persa e com pêlo longo, tinha acesso ao exterior, não era vacinada nem desparasitada, quer externa quer internamente, e no dia da colheita de sangue apresentava carraças. Após avaliação estatística não se encontraram associações significativas entre a variável infecção por piroplasmas e as variáveis em estudo.

6.2.2. *Hepatozoon* spp.

O ADN de *Hepatozoon* spp. foi amplificado em 10,6% (n =11) dos animais analisados (figura 24). Dos 11 animais positivos a *Hepatozoon* spp., foi possível sequenciar quatro amostras e identificar a espécie presente em cada amostra como *H. felis* (3,8%).



Figura 24 – Electroforese em gel de agarose com os resultados da amplificação de *Hepatozoon* spp.: M – marcador 100pb; colunas 1-9 – amostras negativas; colunas 10-13 amostras positivas; coluna 14 - controlo negativo; coluna 15 – controlo positivo (foto da autora)

6.2.2.1. Fatores intrínsecos dos animais positivos a *Hepatozoon* spp.

Na amostra em estudo observou-se que a idade média de gatos positivos a *Hepatozoon* spp. era de 4,6 anos com um I.C 95% [2,6-6,6] anos de idade. A idade mínima nestes animais positivos foi de 8 meses e a idade máxima foi de 10 anos.

Todos os animais positivos para *Hepatozoon* spp. eram da raça Europeu comum e de pêlo curto. Cinco dos gatos eram do sexo feminino (duas fêmeas eram inteiras e três eram esterilizadas) e seis do sexo masculino (três inteiros e três castrados).

Não se obtiveram diferenças estatisticamente significativas entre os factores intrínsecos idade e pelagem e a infecção por *Hepatozoon* spp. (tabela 2).

Tabela 2 - Resultados estatísticos obtidos a partir do teste de Mann-Whitney e teste Exacto de Fisher das variáveis intrínsecas e extrínsecas com a presença de infecção por *Hepatozoon* spp., *Leishmania infantum*, *Bartonella* spp.: p = índice de significância ($p < 0,05$).

	<i>Hepatozoon</i> spp.	<i>Leishmania infantum</i>	<i>Bartonella</i> spp.
	p	p	p
Idade	0,932	0,051	0,187
Pelagem	0,351	1	0,494
Vacinação	0,022	0,634	0,39
Carrças	0,008	0,118	1
Pulgas	0,052	0,618	0,363

6.2.2.2. Factores extrínsecos dos animais positivos a *Hepatozoon* spp.

A maioria dos animais positivos a *Hepatozoon* spp eram animais exclusivamente de exterior (n=8), dois viviam dentro de casa e tinham acesso ao exterior e apenas um dos animais permanecia unicamente em casa (partilhava o espaço com mais gatos).

Relativamente à profilaxia ectoparasiticida, quatro dos gatos eram desparasitados com Advantage®, dois com Advocate® e um com Frontline Combo®. Seis dos animais eram desparasitados externamente todos os meses e um semestralmente. Seis dos gatos eram desparasitados internamente com Milbemax® e um com Profender®. Quatro dos animais recebiam profilaxia endectocida a cada três meses, dois eram desparasitados contra os parasitas internos duas vezes por ano e um dos animais era apenas uma vez por ano. Quatro dos animais não recebiam qualquer profilaxia antiparasitária.

Dez dos animais não eram vacinados e apenas um tinha plano de vacinação. Em relação à presença de ectoparasitas, oito dos animais positivos apresentavam carraças e pulgas e um apresentava apenas pulgas. A não vacinação ($p=0,022$) e a presença de carraças ($p=0,008$) apresentaram uma associação estatisticamente significativa com a presença de infeção por *Hepatozoon* spp. (tabela 2).

6.2.3. *Leishmania infantum*

Dos 104 gatos em estudo, 3,8% (n=4) dos animais foram positivos por PCR para *L. infantum* (figura 25).



Figura 25 – Electroforese em gel de agarose com os resultados da amplificação de *Leishmania infantum*: M – marcador 100pb; colunas 1-20 e 22-25 – amostras negativas; coluna 21 – amostra positiva; coluna 26 – controlo negativo; 27 – controlo positivo (foto da autora).

6.2.3.1. Fatores intrínsecos dos animais positivos a *L.infantum*

A idade média dos animais positivos à *L. infantum* foi de 7,5 anos com um I.C 95% [4,4-10,5]. A idade mínima neste grupo de animais positivos foi de 6 anos e a máxima de 10 anos.

Os dados amostrais sugerem que os animais mais velhos apresentam uma maior tendência para serem positivos. Verifica-se contudo que, as diferenças de idades entre os animais PCR positivos e negativos não foram estatisticamente significativas (tabela 2).

Dos quatro gatos positivos a *L. infantum*, três eram do sexo feminino (duas esterilizadas e uma inteira) e apenas um era sexo masculino e castrado. Todos os animais eram da raça Europeu Comum e de pêlo curto.

No entanto, a influência da pelagem com a presença de infecção não mostrou ser estatisticamente significativa (tabela 2).

6.2.3.2. Fatores extrínsecos dos animais positivos a *L.infantum*

Dos felídeos infectados por *L. infantum*, três viviam exclusivamente no exterior e um vivia dentro de casa mas tinha acesso à rua.

Todos os animais eram animais desparasitados externa e internamente. Dois recebiam como profilaxia contra os ectoparasitas Advantage® e os outros dois Advocate®. O esquema de desparasitação externa destes animais era mensal (n=3) ou semestral (n=1). Dois dos animais eram desparasitados contra endoparasitas com Milbemax® e dois com Profender®. No que diz respeito à frequência de desparasitação interna, três dos animais eram desparasitados a cada três meses e um a cada seis meses.

Dos animais positivos, três não eram vacinados, três apresentavam carraças e três apresentavam pulgas. No entanto estas variáveis não mostraram influência estatisticamente significativa para a presença de infecção por *L. infantum* (tabela 2).

6.2.4. *Bartonella* spp.

Cinco dos gatos (4,8%) foram positivos para *Bartonella* spp. (figura 26). Apenas numa das amostras foi possível caracterizar a espécie por sequenciação, identificando-a como *B. henselae* (0,96%).



Figura 26 – Electroforese em gel de agarose com os resultados da amplificação de *Bartonella* spp.: M – Marcador 100pb; colunas 1-24 – amostras negativas; coluna 25 – amostras positivas; coluna 26 – controlo negativo; coluna 27 – controlo positivo (foto da autora).

6.2.4.1. Fatores intrínsecos dos animais positivos a *Bartonella* spp.

Na amostra em estudo verificou-se que a idade dos felídeos positivos à *Bartonella* spp. foi de 2,7 anos com um I.C 95% compreendido entre [0,5-4,7] anos de idade. A idade mínima neste grupo de animais positivos foi de 3 meses e a máxima de 5 anos.

Apesar da maioria dos animais infectados por *Bartonella* spp. serem jovens, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as idades dos animais positivos e negativos para *Bartonella* spp. (tabela 2).

Os gatos positivos a *Bartonella* spp. eram todos do sexo feminino, quatro das gatas eram esterilizadas e apenas um era inteira. Em relação à raça, quatro animais eram de raça Europeu Comum e pêlo curto e apenas um era cruzado de Persa de pêlo longo.

Não se observou associação estatisticamente significativa entre o tipo de pelagem e estar infectado pelo agente (tabela 2).

6.2.4.2. Fatores extrínsecos dos animais positivos a *Bartonella* spp.

Relativamente ao estilo de vida, três dos gatos infectados a *Bartonella* spp. viviam dentro de casa e tinham acesso ao exterior, um permanecia exclusivamente dentro de casa (sem convívio com outros animais) e um permanecia exclusivamente no exterior.

Apenas um dos animais era desparasitado externamente com Frontline Combo® a cada três meses e internamente com Milbemax® de 6 em 6 meses.

Dos cinco animais positivos para *Bartonella* spp., quatro não eram vacinados, dois apresentavam carraças e quatro tinham pulgas. Contudo, não se observou uma associação estatisticamente significativa entre a presença de ADN de *Bartonella* spp. e a presença de ectoparasitas e a vacinação (tabela 2).

6.2.5. Co-infecção

Dos 18 animais infetados, três estavam co-infetados por dois agentes. O animal co-infetado com *B. henselae* e *Babesia* spp. foi abordado anteriormente (6.2.1). Os outros dois gatos apresentavam co-infecção com *Hepatozoon* spp. e *L. infantum*. Estes dois animais eram do sexo feminino, uma inteira e outra esterilizada, com seis e dez anos, respectivamente. Ambas as gatas eram de raça Europeu Comum de pêlo curto, vivam exclusivamente no exterior e faziam a desparasitação externa de forma regular (uma vez por mês) com Advantage® e desparasitação interna com Milbemax® (três em três meses). Não eram vacinadas e na altura da recolha de sangue ambas apresentavam ectoparasitas (pulgas e carraças). Estas duas gatas conviviam juntas e eram mãe e filha.

A tabela 3 representa a base de dados (variáveis intrínsecas e extrínsecas) dos 18 animais positivos a pelo menos um dos agentes estudados.

Tabela 3 - Descrição dos 18 casos positivos por PCR a pelo menos um dos agentes em estudados: A- anos, FI- fêmea inteira; FE- fêmea esterilizada; MI- macho inteiro; MC- macho castrado; E.C- Europeu Comum; C.P- cruzado de Persa; C- carraças; P- pulgas.

Gato	Idade (A)	Sexo	Raça	Pelagem	Estilo de vida	D.E	Frequência D.E	D.I	Frequência de D.I	Vacinação	Ectoparasitas	<i>Babesia</i> spp.	<i>Hepatozoon</i> spp.	<i>L.infantum</i>	<i>Bartonella</i> spp.
1	6	FI	E.C	Curta	Exterior	Advantage®	1 vez por mês	Milbemax®	3 em 3 meses	Não	C e P		Positivo	Positivo	
6	5	MI	E.C	Curta	Exterior	Advantage®	1 vez por mês	Milbemax®	3 em 3 meses	Não	C e P		Positivo		
9	6	MI	E.C	Curta	Exterior	Advantage®	1 vez por mês	Milbemax®	3 em 3 meses	Não	C e P		Positivo		
17	10	FE	E.C	Curta	Exterior	Advantage®	1 vez por mês	Milbemax®	3 em 3 meses	Não	C e P		Positivo	Positivo	
22	6	FE	E.C	Curta	Exterior	Advocate®	6 em 6 meses	Profender®	6 em 6 meses	Não	C e P			Positivo	
25	5	FE	E.C	Curta	Interior	Frontline Combo®	3 em 3 meses	Milbemax®	6 em 6 meses	Sim	P				Positivo
26	1	MC	E.C	Curta	Interior	Frontline Combo®	1 vez por mês	Milbemax®	6 em 6 meses	Sim	Não		Positivo		
28	5	FE	E.C	Curta	Exterior	Advocate®	6 em 6 meses	Profender®	6 em 6 meses	Não	C e P		Positivo		
35	8	MC	E.C	Curta	Acesso ao exterior	Advocate®	1 vez por mês	Profender®	3 em 3 meses	Sim	Não			Positivo	
45	0,67	FE	E.C	Curta	Acesso ao exterior	Não	-	Não	-	Não	Não		Positivo		
49	3	MC	E.C	Curta	Acesso ao exterior	Advocate®	1 vez por mês	Milbemax®	Anualmente	Não	P		Positivo		
56	8	MC	E.C	Curta	Exterior	Não	-	Não	-	Não	C e P		Positivo		
60	5	MI	E.C	Curta	Exterior	Não	-	Não	-	Não	C e P		Positivo		
64	1	FI	E.C	Curta	Exterior	Não	-	Não	-	Não	C e P		Positivo		
70	0,25	FI	C.P	Longa	Acesso ao exterior	Não	-	Não	-	Não	C	Positivo			Positivo
77	3	FE	E.C	Curta	Acesso ao exterior	Não	-	Não	-	Não	P				Positivo
78	3	FE	E.C	Curta	Acesso ao exterior	Não	-	Não	-	Não	P				Positivo
98	2	FE	E.C	Curta	Exterior	Não	-	Não	-	Não	C e P				Positivo

7. Discussão

O presente estudo teve como objectivo determinar a prevalência de agentes patogénicos transmitidos por vectores artrópodes em gatos residentes na região da Arrábida. Para tal, foi estudada uma amostra de 104 gatos domésticos com mais de três meses de idade, tendo-se obtido uma prevalência total de 17,3 % (n=18). Quinze dos animais estavam infectados por um único agente, tendo-se detectado co-infecção por dois agentes em apenas três gatos. Nenhum animal do estudo se encontrava infectado por *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp.

Não se verificou uma relação estatisticamente significativa entre a idade dos gatos infectados e a presença dos agentes estudados. No entanto, no caso da infecção por *L. infantum* a idade média dos gatos infetados foi de 7,5 anos e, apesar de não terem sido observadas diferenças estatisticamente significativas, o valor ($p=0,051$) foi muito próximo do nível de significância, sugerindo que os animais mais velhos apresentam uma maior probabilidade de serem infectados por *Leishmania*, provavelmente por terem tido mais tempo para entrarem em contacto com os flebótomos (Cardoso *et al.*, 2010; Maia & Campino, 2011; Sobrinho *et al.*, 2012).

A maioria dos gatos positivos em estudo viviam ou tinham acesso ao exterior (apenas dois permaneciam exclusivamente dentro de casa), e portanto eram gatos com elevada exposição aos vectores artrópodes. De facto, no caso da infecção por *Hepatozoon* spp., observou-se uma relação estatisticamente significativa entre a presença de carraças (oito dos gatos positivos encontravam-se infestados com estes artrópodes) com a infecção por este parasita, o que corrobora os resultados obtidos por Ortuño *et al.* (2008). No estudo de Baneth *et al.* (2013) observou-se uma associação significativa entre o estilo de vida dos animais com a presença de infecção por *Hepatozoon* spp., onde gatos de exterior ou com acesso ao exterior eram mais afetados do que os animais que viviam exclusivamente dentro de casa.

Além disso, a maioria dos gatos positivos do presente estudo, apresentavam ectoparasitas ao exame físico, apesar de alguns deles receberem tratamento profilático contra parasitas externos. Estes dados enfatizam a importância de alertar os proprietários que, para além de uma desparasitação adequada no animal, é necessário um controlo ambiental, como a remoção de detritos orgânicos, corte e rega regular do relvado e aplicação de insecticidas

ambientais com lavagens regulares dos locais mais frequentados pelos animais, para uma eliminação eficaz destes vectores (ESCAAP, 2010).

Curiosamente, e apesar de todos os gatos positivos por *Bartonella* spp., e *Babesia* spp. se encontrarem infestados por carrças e/ou pulgas no momento da recolha de sangue, não foi encontrada uma associação entre a infecção por estes agentes com a presença de ectoparasitas

A detecção de ADN dos agentes em estudo foi predominante em gatos de raça Europeu comum de pêlo curto, possivelmente porque esta raça era a mais prevalente na amostra em estudo.

Relativamente à associação entre a presença de infecção e a não vacinação, apenas para o parasita *Hepatozoon* spp. é que se verificou uma maior susceptibilidade dos gatos não vacinados. No entanto, não existe plano de vacinação para este parasita e esta associação pode estar relacionada com o facto dos animais que são vacinados serem na maioria das vezes gatos cujos proprietários têm uma maior preocupação com a sua saúde, restringindo não só o acesso ao exterior, mas mantendo um esquema de desparasitação externa e interna actualizado.

7.1. Prevalências

7.1.1. *Babesia* spp.

A babesiose felina é menos comum que a babesiose canina e tem sido principalmente reportada em áreas costeiras na África do Sul (Baneth *et al.*, 2004). Vários casos de infecção por *Babesia* spp. em gatos já foram reportados na Europa, inclusivé em Portugal. No estudo realizado recentemente no Norte e Centro do País, Vilhena *et al.*, (2013) obtiveram uma prevalência de infecção por *Babesia* spp. de 9,4% . No presente estudo apenas se detectou ADN de *Babesia* spp. num animal, representando um prevalência de 1% no total da amostra estudada. Esta diferença de prevalências dever-se-á possivelmente à técnica de PCR usada no estudo de Vilhena *et al.* (2013), a qPCR, que apresenta uma maior sensibilidade comparativamente com a técnica de PCR convencional utilizada no presente estudo (Maia & Campino, 2008).

7.1.2. *Hepatozoon* spp.

A infecção por *Hepatozoon* spp. é frequentemente reportada na espécie canina e muito raramente na espécie felina (Vilhena *et al.*, 2013). Em Portugal, casos de infecção por *H. canis* e por *H. felis* encontram-se reportados em gatos do Sul e Centro e Norte do País, respectivamente (Vilhena *et al.*, 2013).

No presente estudo, a prevalência de gatos infectados por *Hepatozoon* spp., 10,6% (11/104), foi semelhante ao resultado obtido por Vilhena *et al.* (2013) de 15,6% (50/320). Este valor foi mais elevado que os 4% de prevalência obtida por Tabar *et al.* (2008), e semelhante ao obtido por Ortuño *et al.* (2008) com 16% de prevalência. Num estudo recentemente desenvolvido por Baneth *et al.* (2013) foi detectada uma prevalência de 36% (55/152) em gatos domésticos em Israel, sendo a grande maioria animais de exterior ou com acesso ao mesmo.

Dos 11 gatos positivos a *Hepatozoon* spp, só foi possível sequenciar quatro produtos de PCR amplificados, onde se confirmou a presença de *H. felis* (3,8%). Este foi o primeiro estudo a reportar infecção por *H. felis* em gatos no distrito de Setúbal e o segundo em Portugal.

Os resultados obtidos no presente trabalho juntamente com os estudos realizados em Portugal e Espanha, indicam que a hepatozoonose felina é muito difundida nos gatos da Península Ibérica (Ortuño *et al.*, 2008; Tabar *et al.*, 2008; Vilhena *et al.*, 2013).

7.1.3. *Leishmania infantum*

A infecção por *L.infantum* em gatos tem sido descrita em muitos países Europeus, principalmente em países na base do mediterrâneo, mostrando uma ampla distribuição geográfica. As prevalências de infecção em gatos em habitats peridomésticos variaram entre 0,3% a 61% (Pennisi, 2002; Martin-Sánchez *et al.*, 2007; Maia *et al.*, 2008; 2010; Nasereddin *et al.*, 2008; Tabar *et al.*, 2008; Diakou *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2010; Coelho *et al.*, 2010; Ayllón *et al.*, 2011; Maia & Campino, 2011; Sobrinho *et al.*, 2012; Pennisi *et al.*, 2013b; Vilhena *et al.*, 2013).

No presente estudo observou-se uma prevalência de 3,8% (4/104) em gatos assintomáticos, semelhante ao resultado de 3% (3/100) encontrado por Tabar *et al.* (2008) em

Barcelona, mas superior ao estudo de Ayllón *et al.* (2011) em gatos errantes e domésticos na cidade de Madrid, onde se registou uma prevalência de 0,6% (4/680) através da PCR. Comparativamente às prevalências obtidas em vários estudos desenvolvidos em Portugal, utilizando a mesma técnica molecular (PCR convencional) e o mesmo tipo de amostra (sangue periférico impregnado em papel de filtro), Maia *et al.* (2008) realizaram na RML um rastreio de infecção por *Leishmania* spp. em gatos errantes assintomáticos, tendo-se obtido uma prevalência de 30,4 % (7/23). Posteriormente, o mesmo grupo realizou um estudo semelhante em gatos domésticos, tendo obtido uma prevalência de 20,3% (28/138) (Maia *et al.*, 2010). No presente estudo a prevalência foi mais baixa do que estes estudos realizados em 2008 e 2010 mas mais elevada que os estudos de Carreira (2012) e de Ramos (2012) em que se obteve uma prevalência de 1,2% (1/86) na RML e de 0,5% (1/217) na região de Olhão, respectivamente.

A prevalência deste estudo foi também superior a um estudo recentemente reportado por Vilhena *et al.* (2013) com 0,3% (1/320) de prevalência de gatos do Norte e Centro de Portugal com ADN de *Leishmania* em sangue periférico detetado por qPCR. Apesar da técnica usada por Vilhena *et al.* (2013) ser mais sensível, a prevalência neste presente estudo foi mais elevada provavelmente pelas diferenças relativamente as áreas geográficas em estudo (Norte e Centro do país versus Sul) (Vilhena *et al.*, 2013). Já no estudo de Garrido (2012) obteve-se por qPCR uma prevalência de 10% (4/40) em gatos domésticos e errantes na RML e em Viseu, respectivamente, e recentemente no estudo desenvolvido no concelho de Cascais por Pinto (2013) obteve-se uma prevalência de 4,9% (10/204). As oscilações observadas nas prevalências de infecção ao longo dos anos estão provavelmente relacionadas com a actividade flebotomínica e o número de vectores infectados.

Por outro lado, o sangue periférico não é o tecido de primeira escolha para o diagnóstico de leishmaniose como já demonstrado em canídeos e felinos, uma vez que os parasitas raramente são encontrados em circulação sanguínea (Vita *et al.*, 2005; Maia & Campino, 2008) e dependendo das alturas de recolha de amostra podem-se obter valores de prevalência distintos, como verificado no estudo realizado na cidade de Lisboa (Maia *et al.*, 2010).

A leishmaniose além de ser um grave problema médico-veterinário, constitui um crescente problema de Saúde Pública principalmente nos países da bacia Mediterrânica (como Espanha Itália e Portugal). Em Portugal, desde 2000 a 2009 foram diagnosticados,

laboratorialmente na Unidade de Leishmanioses do IHMT, 173 novos casos de LV humana e o aparecimento de novos factores imunossupressores, como o vírus da imunodeficiência adquirida (VIH), contribui para o aumento significativo de casos em adultos (Campino & Maia, 2010). O número de casos de leishmaniose canina tem vindo a aumentar em Portugal e desde 2002 esta zoonose encontra-se incluída no grupo das infecções de notificação obrigatória durante as campanhas de vacinação anti-rábica (Campino & Maia, 2010). Nestes últimos anos, a leishmaniose felina tem vindo a aumentar, particularmente em áreas endémicas de leishmaniose canina. A importância epidemiológica dos gatos na leishmaniose continua controversa, existindo ainda autores que consideram estes animais hospedeiros acidentais, enquanto outros consideram os gatos hospedeiros reservatórios secundários, sendo necessário mais estudos para provar a capacidade infectante do gato para o vector de forma natural (sem ser laboratorialmente) e para determinar a persistência de *Leishmania* spp. dos gatos naturalmente infectados, tal como acontece nos cães que mantêm presente a infecção subclínica por longos períodos de tempo (Maia *et al.*, 2008; Maia & Campino, 2011).

Os gatos deste estudo provêm de uma região (zona da Arrábida, Setúbal) que apresenta todas as condições favoráveis para a presença e desenvolvimento destes vetores: (i) clima misto (subtropical e mediterrânico); (ii) fracas amplitudes térmicas com proximidade com o mar e rio Tejo e Sado; (iii) períodos de insolação bastante elevado ao longo de todo o ano; e (iv) precipitação reduzida (CMS, 2013). A prevalência de infecção por *L. infantum*, obtida neste estudo, mostrou que nesta zona endémica para leishmaniose canina, os gatos estão frequentemente expostos aos flebótomos e que mesmo infectados mantêm-se assintomáticos.

Os piretróides sintéticos são os produtos mais amplamente usados nos canídeos para o controlo de flebótomos tendo sido eficaz na redução da incidência de leishmaniose canina e humana (Gramiccia, 2011). No entanto, nos gatos este controlo torna-se limitado pela toxicidade desta espécie aos piretroides e, até à data, ainda não existe no mercado nenhum produto testado para os gatos para protecção contra este vector (Maia & Campino, 2011; Pennisi *et al.*, 2013b).

7.1.4. *Bartonella* spp.

Muitos estudos têm reportado elevadas prevalências de gatos infectados por *Bartonella* spp. em áreas onde as condições são mais favoráveis para a presença de vetores

artrópodes, especialmente as pulgas (Guptill, 2010; Haubenstriker, 2010). Estas áreas caracterizam-se por apresentarem um clima quente e húmido (como os países do Mediterrâneo) (Guptill, 2010; Haubenstriker, 2010).

A prevalência de *Bartonella* spp. neste estudo de 4,8% (5/104) foi superior à dos estudos realizados por Tabar *et al.* (2008) e por Ayllon *et al.* (2011) com prevalência de 1% (1/100) na população felina em Barcelona e de 0,3% (2/680) em gatos errantes e gatos domésticos da cidade de Madrid, respectivamente. No entanto, estudos anteriores realizados também em Espanha, mostraram prevalências moleculares de 20% (8/40) através da PCR convencional (Solano-Gallego *et al.*, 2006), diferindo bastante dos resultados obtidos neste estudo, possivelmente devido não só ao tamanho reduzido da amostra de gatos testados no estudo espanhol, como também à população estudada (metade dos animais apresentava uma ampla variedade de sinais clínicos).

Em Portugal, Alves *et al.* (2009) obtiveram por PCR uma prevalência de bacteriemia de 67,7% (25/51) em gatos domésticos e errantes da região de Lisboa e Évora. Esta elevada prevalência pode ser provavelmente devido ao facto da maioria dos animais serem de exterior ou ter acesso ao mesmo, e ao facto de apresentarem um elevado número de pulgas (Alves *et al.*, 2009).

Apenas se conseguiu realizar a sequenciação de um produto de PCR e verificou-se a presença de *B. henselae*, a espécie mais comum na população felina e humana. Este agente é também o mais comum a ser transmitido do gato para o homem. (Brunt *et al.*, 2006).

Como descrito na literatura (Chomel *et al.*, 2006; Varanat *et al.*, 2011; Pennisi *et al.*, 2009; 2013a; Stutzer & Hartmann, 2012), neste estudo os gatos bacteriémicos eram assintomáticos, representando um risco para a saúde pública, principalmente para pessoas imunodeprimidas ou crianças (Brunt *et al.*, 2006; Pennisi *et al.*, 2013a). É importante os médicos veterinários alertarem os proprietários sobre a existência desta infecção e recomendar um programa adequado de controlo de pulgas no animal e no meio ambiente através do uso de ectoparasiticidas para redução do risco zoonótico (Brunt *et al.*, 2006; Kaplan *et al.*, 2009).

7.2. Co-infecção

Neste estudo foram observados três gatos co-infectados por dois agentes em estudo, dois co-infectados por *L. infantum* e *Hepatozoon* spp. e um co-infectado por *Babesia* spp. e *B. henselae*.

Os dois gatos co-infectados com os mesmos agentes eram mãe e filha, ambas assintomáticas, e partilhavam o mesmo espaço, sendo gatas de exterior e, como tal, apresentavam um maior contacto com vectores artrópodes. No estudo recente realizado no Norte e Centro de Portugal por Vilhena *et al.* (2013) observou-se co-infecção de um dos gatos em estudo por estes dois agentes, tendo obtido uma prevalência mais baixa (0,3%) comparativamente à obtida neste estudo (1,9%). A co-infecção por estes dois agentes também se encontra reportada noutros países (Baneth *et al.*, 1998; Baneth, 2006; 2011; Tabar *et al.*, 2008).

O único animal co-infectado com *Babesia* spp. e *B. henselae* era uma fêmea inteira muito jovem (três meses de idade), com acesso ao exterior. Este gato não fazia qualquer tipo de desparasitação, e, no momento da recolha de sangue, não apresentava qualquer tipo de sinal clínico, mas tinha carraças. A idade jovem (< 1 ano), o acesso ao exterior e a presença de pulgas no ambiente são importantes factores de risco para infecção por *B. henselae* (Brunt *et al.*, 2006; Pennisi *et al.*, 2013). Apesar do papel das carraças na epidemiologia de *B. henselae* ainda não estar bem esclarecido, têm sido detectadas carraças contendo material genético desta bactéria (Chomel *et al.*, 2006; Cotté *et al.*, 2008; Dietrich *et al.*, 2010; Guptill, 2010; Breitschwerdt, 2011; Ebani *et al.*, 2011; Pennisi *et al.*, 2013). A idade jovem (< 3 anos) é também um factor de risco para a infecção por *Babesia* spp. (Vilhena *et al.*, 2013).

8. Conclusão

Este estudo, que consistiu na detecção molecular de protozoários e bactérias em gatos da região da Arrábida (Setúbal), veio demonstrar que os gatos podem ser infectados por agentes patogénicos que afectam frequentemente os cães.

Mais estudos e com maior número de animais testados são necessários para melhor definir a importância clínica destes agentes patogénicos em gatos, assim como para, determinar as possíveis influências das co-infecções no diagnóstico, prognóstico e tratamento, e para definir o papel epidemiológico dos gatos nas infecções zoonóticas.

As doenças transmitidas por vectores deverão também ser estudadas na população felina errante devido ao facto de: (i) ser uma população de elevado risco de contacto com artrópodes; (ii) não receber cuidados médico-veterinários (nem tratamento profilático contra ectoparasitas); (iii) ser uma população subnutrida, o que contribui para a susceptibilidade de algumas DTV; e (iv) poderem actuar como reservatórios para a transmissão de agentes patogénicos para outros animais domésticos e humanos (principalmente proprietários).

Desta forma, este trabalho veio alertar as instituições médico-veterinárias para a importância destas infecções nos gatos, especialmente felinos que tenham contacto frequente com o exterior e sem protecção contra ectoparasitas, e que, apesar de serem infecções na maioria das vezes assintomáticas, devem ser incluídas nos diagnósticos diferenciais, especialmente em áreas endémicas. Para além disso, veio realçar a importância dos gatos na Saúde Pública, devido ao carácter zoonótico de alguns dos agentes abordados. Assim, é importante sensibilizar médicos veterinários, profissionais de saúde e sobretudo os proprietários dos animais domésticos para um controlo profilático regular dos animais e do meio ambiente envolvente, com o objectivo de manter os animais livres de infestações por ectoparasitas e, desta forma, evitar possíveis transmissões de agentes zoonóticos.

Na bacia mediterrânica, nomeadamente em Portugal, alguns vectores, como as carraças e as pulgas, têm-se mostrado activos durante todo o ano, levando os animais a estarem em risco de ficarem infectados por alguns agentes (como *Ehrlichia* spp. e *Bartonella* spp.) durante todo o ano. A actividade prolongada destes vectores destaca a necessidade de implementação de medidas profiláticas regulares e durante todo o ano, sendo primordial para a redução da circulação de agentes patogénicos. No caso dos vectores de *Leishmania* spp. no

mercado só existem insecticidas/repelentes para a administração em canídeos, sendo necessário num futuro próximo tentar obter um produto em substituição aos piretróides para protecção dos gatos contra estes vectores. Além disso, mais estudos deveriam ser desenvolvidos sobre o papel das carraças e pulgas como vectores na transmissão deste protozoário.

9. Referências Bibliográficas

Aguirré, E., Tesouro, M., Amusatogui, I., Rodríguez-Franco, F. & Sainz, A. (2004). Assessment of feline ehrlichiosis in central Spain using serology and a polymerase chain reaction technique. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1026,103-105.

Alleman, A.R. (2005).The diagnosis and treatment o tick borne diseases in dogs. In *IVIS Proceeding of the North American Veterinary Conference*. EUA: Orlando, Florida.

Allison, R.W. & Little, S.E. (2013). Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. *Veterinary Clinical Pathology*, 1-18. Referência: 10.1111/vcp.12040.

Alves, A., Milhano, N., Santos-Silva, M., Santos, A., Vilhena, M. & Sousa, R. (2009). Evidence of *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in domestic, shelter and stray cat blood and fleas, Portugal. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(2), 1-3.

Ayllón, T., Diniz, P.P.V., Breitschwerdt, E.B., Villaescusa, A., Rodriguez-Franco, F. & Sainz, A. (2011). Vector-Borne Diseases in Client-Owned and Stray Cats from Madrid, Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. Referência: 10.1089/vbz.2011.0729.

Ayllón, T., Villaescusa, A., Tesouro, A.M. & Sainz, A. (2009). Serology, PCR and culture of *Ehrlichia/Anaplasma* species in asymptomatic and symptomatic cats from central Spain. *Journal Compilation. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15(2), 4-5.

Baneth, B. (2006b). Leishmaniasis. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of Dog and Cat* (3ªEd., pp. 685-690). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.

Baneth, G. & Solano-Gallego, L. (2012). Canine Leishmaniosis. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of Dog and Cat* (4ªEd., pp. 737). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.

Baneth, G. (2006a). Hepatozoonosis. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of Dog and Cat* (3ªEd., pp. 698-705). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.

Baneth, G. (2010). Ehrlichial and Anaplasma infections. In *IVIS Proceedings of the 35th World Small Animal Veterinary Congress*. Geneva, Suíça.

- Baneth, G. (2011). Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. *Veterinary Parasitology*, 181, 3-11.
- Baneth, G., Aroch, I., Tal, N. & Harrus, S. (1998). *Hepatozoon* species infection in domestic cats: A retrospective study. *Veterinary Parasitology*, 79, 123-133.
- Baneth, G., Kenny, J.M, Tasker, S., Anug, Y., Shkap, V., Levy, A., *et al.* (2004). Infection with a Proposed New Subspecies of *Babesia canis*, *Babesia canis* subsp. *presentii*, in Domestic Cats. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1), 99-105.
- Baneth, G., Sheiner, A., Eyal, O., Hahn, S., Beaufils, J-P., Anug, Y., *et al.* (2013). Redescription of *hepatozoon felis* (apicomplexa: hepatozoidae) based on phylogenetic analysis, tissue and blood form morphology, and possible transplacental transmission. *Parasites & Vectors*, 6, 102. Referência: 10.1186/1756-3305-6-102.
- Bates, P.A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sandflies. *International Journal for Parasitology*, 37, 1097–1106.
- Beugnet, F. & Franc, M. (2012). Insecticide and acaricide molecules and/or combinations to prevent pet infestation by ectoparasites. *Trends in Parasitology*, 28(7).
- Beugnet, F. & Marie, J.-L. (2009). Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Veterinary Parasitology*. Referência: 10.1016/j.vetpar.2009.03.028.
- Billeter, S.A., Spencer, J.A., Griffin, B., Dykstra, C.C. & Blagburn, B.L. (2007). Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in domestic felines in the United States. *Veterinary Parasitology*, 147, 194–198.
- Birkenheuer, A.J. (2012). Babesiosis. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of Dog and Cat* (4^aEd., pp. 784). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Birtles, R. (2010). Bartonella infections in cats: “harmless” parasites or agents of disease? Emerging and newly recognised Infectious Diseases in cats. Acedido em 10 de Novembro de 2013 em <http://www.fleatickrisk.com/sitecollectiondocuments/2010-proceedings-merial-symposium-ISFM-amsterdam170610.pdf>.
- Braga, M.S.C.O., André, M.R., Freschi, C.R., Teixeira, M.C.A. & Machado, R.Z. (2012). Molecular and serological detection of *Ehrlichia* spp. in cats on São Luís Island, Maranhão, Brazil. *Rev.Bras.Parasitol.Vet.*, 21(1), 37-41.

- Breitschwerdt, E.B. & Kordick, L.D. (2000). *Bartonella* Infection in Animals: Carriership, Reservoir Potential, Pathogenicity, and Zoonotic Potential for Human Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(3), 428-438.
- Breitschwerdt, E.B. (2009). Canine and Human Anaplasmosis and Ehrlichiosis. In IVIS (Ed.) *Proceeding of the Latin American Veterinary Conference*, 16-19 Outubro 2009. Lima, Peru.
- Breitschwerdt, E.B. (2011). Canine Ehrlichiosis. In IVIS *Proceedings of the 36th World Small Animal Veterinary Congress*, 14-17 Oct. 2011. Jeju, Korea.
- Breitschwerdt, E.B., Levine, F.J., Radulovic, S., Hanby, B.S., Kordick, L.D. & Perle L.D.M.K. (2005). *Bartonella henselae* and *Rickettsia* Seroreactivity in a Sick Cat Population from North Carolina. *Intern.J.Appl. Res.Vet.Med*, 2(4).
- Brunt, J., Guptill, L., Kordick, L.D., Kudrak, S. & Lappin, R.M. (2006). American Association of Feline Practitioners 2006 Panel report on diagnosis, treatment, and prevention of *Bartonella* spp. infections. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 8, 213-226.
- Câmara Municipal de Setúbal [CMS] (2013). Setubal, Municipio participado. Acedido em 14 de Agosto de 2013 em <http://www.mun-setubal.pt/pt/categoria/localizacao-e-caracteristicas/2>.
- Campino, L. & Maia, C. (2010). Epidemiologia das leishmanioses em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 23, 859-864.
- Cardia, D., Camossi, L., Neto, L., Langoni, H. & Bresciani, K. (2013). Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. infection in cats from Brazil. *Veterinary Parasitology*. Referência: 10.1016/j.vetpar.2013.07.017.
- 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., Yisaschar-Mekuzas, Y., Rodrigues, F.T, Costa, A., Machado, J., Diz-Lopes, D., *et al.* (2010). Canine Babesiosis in Northern Portugal and Molecular characterization of vector-borne co-infections. *Parasites & Vectors*, 3:27.

- Cardoso, L., Costa, A., Tuna, J., Vieira, L., Eyal, O., Yisaschar-Mekuzas, Y., *et al.* (2008). *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* infections in dogs from northern Portugal. *Veterinary Parasitology*, 156, 199-204.
- Carreira, J.M. (2012). Determinação da prevalência da leishmaniose felina na área metropolitana de Lisboa. Monografia de Licenciatura em Ciências Biomédicas. Universidade do Algarve.
- Center for Food Security & Public Health [CFSPH] (2009). Leishmaniasis (Cutaneous and Visceral). Zoonotic Species, Institute for International Cooperation in Animal Biologics, Iowa State University, College of Veterinary Medicine. Acedido em 10 Setembro 2013 em <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/leishmaniasis.pdf>.
- Center for Food Security & Public Health [CFSPH] (2013). Ehrlichiosis and Anaplasmosis: Zoonotic Species, Institute for International Cooperation in Animal Biologics, Iowa State University, College of Veterinary Medicine. Acedido em 30 Agosto 2013 em <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/ehrlichiosis.pdf>.
- Chomel, B.B., Boulouis, J.H., Maruyama, S. & Breitschwerdt, B.E. (2006). *Bartonella* Spp. in Pets and Effect on Human Health. *Emerging Infectious Diseases*, 12(3).
- Coelho, D.M.W., Richini-Pereira, B.V., Langoni, H. & Bresciani, S.D.K. (2010). Molecular detection of *Leishmania* sp. in cats (*Felis catus*) from Andradina Municipality, São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. Referência: 10.1016/j.vetpar.2010.10.052.
- Cohn, L.A. (2003). Ehrlichiosis and relate infections. *Veterinary clinics of North America small animal practice*, 33, 863-884.
- 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 the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98, 12-17.
- Cortes, R., Vaz, Y., Neves, R., Maia, C., Cardoso, L., Campino, L. (2012). Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Veterinary Parasitology*. Referência: 10.1016/J.vetpar.2012.04.028.

- Costa, T. A., Rossi, C. N., Laurenti, M. D., Gomes, D., Vides, J. P., Sobrinho, L. S.V., *et al.* (2010). Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 47, 213-217.
- Cotté, V., Bonnet, S., Rhun, D., Naour, E., Chauvin, A., Boulous, H-J., *et al.* (2008). Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. *Emerging Infectious Diseases*, 14(7).
- Dantas-Torres, F. (2010). Biology and ecology of the Brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors*, 3, 6.
- Dantas-Torres, F., Lorusso, V., Testini, G., Paiva-Cavalcanti, M., Figueredo, A.L., Stanneck, D., *et al.* (2010). Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. *Parasitol Res*, 106, 857-860.
- Diakou, A., Papadopoulos, E. & Lazarides, K. (2009). Specific anti-*Leishmania* spp. antibodies in stray cats in Greece. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11, 728-730.
- Dietrich, F., Schmidgen, T., Maggi, G.R., Richter, D., Matuschka, R.F., Vonthein, R., *et al.* (2010). Prevalence of *Bartonella henselae* and *Borrelia burgdorferi* *Sensu Lato* DNA in *Ixodes ricinus* Ticks in Europe. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 76(5), 1395-1398.
- Diniz, P.P. & Breitschwerdt, B.E. (2012). *Anaplasma phagocytophilum* Infection (Canine Granulocytotropic Anaplasmosis). In C.E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of Dog and Cat* (4^aEd., pp. 244- 254). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Duarte, A., Castro, I., Fonseca, I.M.P., Almeida, A., Carvalho, L.M.M., Meireles, J., *et al.* (2010). Survey of infectious and parasitic disease in stray cats at the Lisbon Metropolitan Area, Portugal. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12, 441-446.
- Ebani, V.V., Bertelloni, F. & Fratini, F. (2011). Occurrence of *Bartonella henselae* types I and II in Central Italian domestic cats. *Research in Veterinary Science*. Referência: 10.1016/j.rvsc.2011.07.013.
- European Cientific Counsel Campanian Animal Parasites [ESCCAP] (2010). Ectoparasitos Control de insectos y garrapatas que parasitan a perros y gatos (Guía ESCCAP nº3). Acedido em 30 de Outubro 2013 em http://www.esccap.org/uploads/docs/22hejwfvj_esguian3_ectoparasitos_altausb.pdf.

European Cientific Counsel Campanion Animal Parasites [ESCCAP] (2012). Control de enfermedades transmitidas por Vectores en perros y Gatos (Guía ESCCAP nº5). Acedido em 30 de Outubro 2013 em http://www.esccap.org/uploads/docs/a2wchx2h_2012_G5.pdf.

Ferrer, L. & Roura, X. (2010). Leishmaniosis felina: ¿anécdota o enfermedad emergente? Acedido em 15 Setembro 2013 em <http://argos.portalveterinaria.com/noticia/6329/>.

Ferrer, L. (2002). The pathology of canine leishmaniasis. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution, Proceedings of the second international canine leishmaniasis fórum 2002, Sevilla, Spain.

Freire M.N., Azevedo T.S., Cunha M.O., Guerra E.F.C., Rocha A.A.F., Moura S.B., *et al.* (2009). Canine Ehrlichiosis: Clinical, Hematological and Serological Investigation of 100 dogs – 640. In IVIS Proceedings of the World Small Animal Veterinary Congress 2009 - São Paulo, Brazil.

Garrido, J.M.C.B.G. (2012). Contribuição para o estudo da prevalência da infecção por *Leishmania infantum* em gatos domésticos e errantes nos distritos de Lisboa e Viseu. Tese de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Universidade Tecnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária.

Giannitti, F., Diab, S.S., Uzal, F.A., Fresneda, K., Rossi, D., Talmi-Frank, D., *et al.* (2012). Infection with a *Hepatozoon* sp. closely related *Hepatozoon felis* in a wild Pampas gray fox (*Lycapolex – Pseudalopex – gymnocercus*) co-infected with canine distemper vírus. *Veterinary Parasitology*, 186, 497-502.

Glaus, T., Hofmann-Lehmann, R., Greene, C., Glaus, B., Wolfensberger, C. & Lutz, H. (1997). Seroprevalence of *Bartonella henselae* Infection and Correlation with Disease Status in Cats in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11), 2883-2885.

Gramiccia, M. (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*, 181(1), 23-30.

Greig, B. & Armstrong, J.P. (2006). Canine Granulocytotropic Anaplasmosis (A.phagocytophilum infection). In C.E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of Dog and Cat* (3ªEd. pp. 219- 223). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.

- Grevot, A., Jaussaud, H. P., Marty, P., Pratlong, F., Ozon, C., Haas, P., Breton, C. & Bourdoiseau, G. (2005). Leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in a FIV and FeLV positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods. *Parasite*, número 12, 271-275.
- Guptill, L. (2010). Bartonellosis. *Veterinary Microbiology*, 140, 3-4.
- Guptill, L., Wu, C.C., HogenEsch, H., Slater, N.L., Glickman, N., Dunham, A., *et al.* (2004). Prevalence, Risk Factors, and Genetic Diversity of *Bartonella henselae* Infections in Pet Cats in Four Regions of the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(2), 652-659.
- Hagiwara, M.K., Manoel, C.S., Stricagnolo, C.R., Brandão, L. & Labruna, M. (2009). Controlo of Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME) in Akennel – 857. In IVIS Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary Congress 2009 - São Paulo, Brasil.
- Harrus, S., Perlman-Avrahami, A., Mumcuoglu, K.Y., Morick, D., Eyal, O. & Baneth, G. (2011). Molecular detection of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma platys*, *Candidatus Midichloria mitochondrii* and *Babesia canis vogeli* in ticks from Israel. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(3), 459-463.
- Hartmann, K., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., *et al.* (2013). Babesiosis in Cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15, 643-646.
- Haubenstricker, S. (2010). Bartonella Infection: An Underrecognized Threat. Acedido em 20 de Setembro 2013 em <http://www.vetlearn.com/veterinary-technician/bartonella-infection-an-underrecognized-threat-ce-test>.
- Heikkilä, H.M., Bondarenko, A., Mihalkov, A., Pfister, K. & Spillmann, T. (2010). *Anaplasma phagocytophilum* infection in a domestic cat in Finland: Case report. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52(62), 1-5.
- Irwin, P.J. (2007). Pups pcrs and platelets: *Ehrlichia* and *Anaplasma* infectins of dogs in Australia. *Proceedings of the Word Small Animal Veterinary Association 2007 - Sydney, Austrália*.

- Jittapalapong, S., Rungphisutthipongse, O., Maruyama, S., Schaefer, J.J. & Stich, R.W. (2006). Detection of *Hepatozoon canis* in Stray Dogs and Cats in Bangkok, Thailand. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1081, 479–488.
- Kaplan, E.J., Benson, C., Holmes, H.K, Brooks, T.J., Pau, A. & Masur H., *et al.* (2009). Guidelines for Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in HIV-Infected Adults and Adolescents: Recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. Acedido em 30 de Novembro de 2013 em <http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr5804.pdf>.
- Ketring, L.K., Zuckerman, E.E. & Jr.Hardy, D.W. (2004). *Bartonella*: A New Etiological Agent of Feline Ocular Disease. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 40.
- Killick-Kendrick, R. (1999). The Biology and Control of Phlebotomine Sand Flies. *Clinics in Dermatology*, 17, 279-289.
- Killick-Kendrick, R. (2002). The Life-cycles of *Leishmania* in the sand fly and transmission of leishmaniasis by bite. *Canine Leishmaniasis: moving towards a solution*, Proceedings of the second international canine leishmaniasis fórum 2002, Sevilla, Spain.
- Kordick, L.D & Breitscherdt, B.E (1997). [Abstract] Relapsing bacteremia after blood transmission of *Bartonella henselae* to cats. *American Journal of Veterinary Research*, 58(5).
- Kordick, L.D., Brown, T.T., Shin, K. & Breitschwerdt, B.E. (1999). Clinical and Pathologic Evaluation of Chronic *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* Infection in Cats. *Journal Clinical Microbiology*, 37(5), 1536-1547.
- Kubo, M., Miyoshi, N. & Yasuda, N. (2006). Hepatozoonosis in Two Species of Japanese Wild Cat. *J. Vet. Med. Sci*, 68(8), 833-837.
- Lainson, R. & Shaw, J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution. *Leishmaniasis in Biology and Medicine*, 1, 1-120.
- Lappin, R.M & Black C.J. (1999). [Abstract] *Bartonella* spp. infection as a possible cause of uveitis in a cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 214(8).
- Lappin, R.M. & Breitschwerdt, B.E (2006). Feline Mononuclear Ehrlichiosis. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of Dog and Cat* (3rdEd., pp. 224- 227). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.

- Lappin, R.M. & Breitschwerdt, B.E. (2012). *Anaplasma phagocytophilum* Infection (Feline Granulocytotropic Anaplasmosis). In C.E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of Dog and Cat* (4^aEd., pp. 254- 256). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Lappin, R.M; Kordick, L.D., Breitschwerdt, B.E. (2000). [Abstract] *Bartonella* spp. antibodies and DNA in aqueous humour of cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 2(1), 61-68.
- Lima, M.L., Soares, P.T., Ramos, C.A., Araújo, F.R., Ramos, R.A., Souza, II., *et al.* (2010). Molecular detection of *Anaplasma platys* in a naturally-infected cat in Brazil. *Braz J. Microbiol.*, 41(2), 381-5.
- Little, S.E (2011). Recent Developments in Canine Ehrlichiosis. In IVIS (Ed.) *Proceeding of the Latin American Veterinary Conference, 24-26 Outubro 2011*. Lima, Peru.
- Little, S.E. (2010). Implementing successful flea control programs. In IVIS (Ed.) *Proceeding of the Latin American Veterinary Conference, 25-27 Outubro 2010*. Lima, Peru.
- Maggi, R.G., Diniz, P.P., Cadenas, M.B. & Breitschwerdt, E.B. (2008). The Use of Molecular Diagnostic Techniques to detect *Anaplasma*, *Bartonella* and *Ehrlichia* species in Arthropods or Patients. *International CVBD symposium*.
- Maia, C. & Campino, L. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 158, 274-287.
- Maia, C. & Campino, L. (2011). Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends in Parasitology*, 27(8), 341-344.
- Maia, C., Gomes, J., Cristóvão, J., Nunes, M., Martins, A., Rebêlo, E., *et al.* (2010). Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Veterinary Parasitology*. Referência: 10.1016/j.vetpar.2010.08.030.
- Maia, C., Nunes, M. & Campino, L. (2008). Importance of Cats in Zoonotic Leishmaniasis in Portugal. *VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES*, 8 (4), 555-559.
- Marchiondo, AA., Holdsworth, A.P., Fourie, L.J., Rugg, D., Hellmann, K., Snyder, D.E, *et al.* (2013). *Word Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P)* second edition: Guidelines for evaluation the efficacy of parasiticides for the treatment,

prevention and control of flea and tick infestations on dogs and cats. *Veterinary Parasitology*, 194, 84-97.

Maroli, M., Pennisi, M.G., Muccio, T.D., Khoury, C., Gradoni, L. & Gramiccia, M. (2007). Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, 145, 357-360.

Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O. & Morillas-Márquez, F. (2006). Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. *Veterinary Parasitology*. Referência:10.1016/j.vetpar.2006.11.005.

Moreira, M.A.B., Lopes, P.A., Sultanum, C.A.R., Ferraz, A.S. & Gonzalez, R. (2009). Comparative Evaluation of Two Serological Methods for Detection of *Ehrlichia canis* Antibodies in Dogs – 43. In *IVIS Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary Congress 2009 – São Paulo, Brasil*.

Munana, K.R., Vitek, S.M., Hegarty, B.C., Kordick, D.L. & Breitschwerdt, E.B. (2001). Infection of Fetal Feline Brain Cells in Culture with *Bartonella henselae*. *INFECTION AND IMMUNITY*, 69(1), 564–569.

Nasereddin, A., Salant, H. & Abdeen, Z. (2008). Feline leishmaniasis in Jerusalem: Serological investigation. *Veterinary Parasitology*. Referência: 10.1016/j.vetpar.2008.09.022.

Navarro, J.A., Sánchez, J., Peñafiel-Verdú, C., Buendía, A.J., Altimira, J. & Vilafranca, M. (2010). Histopathological Lesions in 15 Cats with Leishmaniosis. *J. Comp. Path.* Referência:10.1016/j.jcpa.2010.03.003.

Neer, T. & Harrus, S. (2006). Canine Monocytotropic Ehrlichiosis and Neorickettsiosis (*E.canis*, *E.chaffeensis*, *E.ruminantium*, *N.sennetsu*, and *N.risticii* infections). In C.E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of Dog and Cat* (3rdEd., pp. 205- 216). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.

Neer, T., Breitschwerdt, E.B., Greene, R.T. & Lappin, M.R. (2002). Consensus statement on Ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16, 309-315.

Observatório Português das Leishmanioses [ONLeish] (2013). Observatório Nacional das Leishmanioses. Acedido em 10 Setembro 2013 em <http://www.onleish.org/index.php>.

- Ortuño, A., Castellà, J., Criado-Fornelio, A., Buling, A. & Barba-Carretero, C.J. (2008). Molecular detection of a *Hepatozoon* species in stray cats from a feline colony in North-eastern Spain. *The Veterinary Journal*, 177, 134-135.
- Ortuño, A., Gauss, C., García, F. & Gutierrez, J. (2005). Serological evidence of *Ehrlichia* spp. exposure in cats from northeastern Spain. *Journal of veterinary medicine - Series B - Infectious diseases and veterinary public health*, 52, 246-248.
- Oskouizadeh, K., Zahraei-Salehi, T. & Aledavood, S.J. (2010). Detection of *Bartonella henselae* in domestic cats' saliva. *Iranian Journal Microbiology*, 2(2), 80-84.
- Otranto, D. & Dantas-torres, F. (2010). Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives. *Parasites & Vectors*, 3 (2).
- Pawar, R.M., Poornachandar, A., Srinivas, P., Rao, K.R., Lakshmikantan, U. & Shivaji, S. (2012). Molecular characterization of *Hepatozoon* spp. infection in endangered Indian wild felids and canids. *Veterinary Parasitology*, 186, 475-479.
- Pearce, K.L., Radecki, V.S., Brewer, M. & Lappin, R.M. (2006). Prevalence of *Bartonella henselae* antibodies in serum of cats with and without clinical signs of central nervous system disease. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 8, 315-320.
- Pennisi, M.G (2002). A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution, Proceedings of the second international canine leishmaniasis fórum 2002, Sevilla, Spain.
- Pennisi, M.G., Camera, E., Giacobe, L., Orlandella, M.B., Lentini, V., Zummo, S. & Fera, T.M. (2009). Molecular detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in clinical samples of pet cats from Southern Italy. *Research in Veterinary Science*. Referència: 10.1016/j.rvsc.2009.11.005.
- Pennisi, M.G., Hartmann, K., Lloret, A., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., *et al.* (2013b). Leishmaniosis in Cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15, 638-642.
- Pennisi, M.G., Marsilio, F., Hartmann, K., Lloret, A., Addie, D., Belák, S., *et al.* (2013a). *Bartonella* Species Infection in Cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15, 563-569.

- Pinto, P.M.F. (2013). Prevalência da infecção por *Leishmania* spp. em gatos residentes no Concelho de Cascais. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Faculdade de Medicina Veterinária.
- Ramos, C.P.G. (2012). A importância da infecção por *Leishmania* spp. e *Dirofilaria immitis* em gatos na região de Olhão. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária.
- Rhodes, S. (2011). Educating Clients About Fleas. Acedido em 20 de Outubro 2013 em <http://www.vetlearn.com/veterinary-technician/educating-clients-about-fleas-test>.
- Rosa, N. J. G. C. (2009). Rastreio de dirofilariose e de leishmaniose em gatos da área metropolitana de Lisboa. Tese de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária.
- Rüfenacht, S., Sager, H., Müller, N., *et al.* (2005). Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland. *Veterinary Record*, 156, 542-545.
- Santos, A.S., Santos-Silva, M.M., Almeida, V.C., Bacellar, F. & Dumler, J.S. (2004). Detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in Ixodes ticks (Acari: Ixodidae) from Madeira Island and Setubal District, mainland Portugal. *Emergence of infectious diseases*, 10(9), 1643- 8.
- Santos-Silva, M.M., Beati, L., Santos, A.S., Sousa, R., Núncio, M.S., Melo, P., *et al.* (2011). The hard-tick fauna of mainland Portugal (Acari: Ixodidae): an update on geographical distribution and known associations with hosts and pathogens. *Exp. Appl. Acarol*, 55, 85-121.
- Schnieder, T., Wolken, S. & Mencke, N. (2008). Comparative Efficacy of Imidacloprid, Selamectin, Fipronil-(S)-Methoprene, and Metaflumizone against Cats Experimentally Infested with *Ctenocephalides felis*. *Veterinary Therapeutics*, 9(3).
- Schoeman, T., Lobetti, G.R., Jacobson, S.L. & Penzhorn, L.B. (2001). Feline babesiosis: signalment, clinical pathology and concurrent infections. *Jl S.Afr.vet.Ass.*, 72(1), 4–11.
- Shaw, S.E. (2008). Understanding Transmission of Infection by Ticks and New Strategies for Control. In *IVIS Proceedings of the 33rd World Small Animal Veterinary Congress 2008 – Dublin, Ireland*.

- Silva, S.M., Rabelo, P.F-B., Gontijo, N.F., Ribeiro, R.R., Melo, M.N., Ribeiro, V.M., *et al.* (2010). First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from naturally infected cats from Brazil. *Veterinary Parasitology*. Referência: 10.1016/j.vetpar.2010.08.005.
- Solano-Gallego, L. & Baneth, G., (2011). Babesiosis in dogs and cats—Expanding parasitological and clinical spectra. *Veterinary Parasitology*, 181, 48-60.
- Solano-Gallego, L.K., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., *et al.* (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 165, 1-18.
- Stützer, B. & Hartmann, K. (2012). Chronic Bartonellosis in Cats: What are the potential implications? *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 14, 612-621.
- Tabar, M-D., Altet, L., Francino, O., Sánchez, A., Ferrer, L. & Roura, X. (2008). Vector-borne infections in cats: Molecular study in Barcelona area (Spain). *Veterinary Parasitology*, 151, 332-336.
- Taboada, J. & Lobetti, R. (2006). Babesiosis. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of Dog and Cat* (3rdEd., pp. 725- 735). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.
- Trainor, K.E., Porter, B.F., Logan, K.,S., Hoffman, R.J. & Snowden, K.F. (2010). Eight Cases of Feline Cutaneous Leishmaniasis in Texas. *Vet Pathol*, 47(6), 1076-1081.
- Tuzio, H., Edwards, D., Elston, T., Jarboe, L., Kudrak, S., Richards, J., *et al.* (2005). Feline zoonoses guidelines from the American Association of Feline Practitioners. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 7, 243-274.
- Ueno, H., Hohdatsu, T., Muramatsu, Y., Koyama, H. & Morita, C. (1996). Does Coinfection of *Bartonella henselae* and FIV Induce Clinical Disorders in Cats? *Microbiol. Immunol.*, 40(9), 617-620.
- Urquhart, G., Armour, J., Duncan, J., Dunn, A. & Jennings, F. (1996). *Parasitologia Veterinária* (2ndEd.). Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, S.A.
- Varanat, M., Broadhurst, J., Linder, E.K., Maggi, G.R. & Breitschwerdt, B.E. (2011). Identification of *Bartonella henselae* in 2 Cats With Pyogranulomatous Myocarditis and

Diaphragmatic Myositis. Veterinary Pathology. Referência: DOI: 10.1177/0300985811404709.

Verneuil, M. (2013). Leishmaniose oculaire féline : à propos d'un cas. Ocular leishmaniasis in a cat: Case report. J. Fr. Ophthalmol. Referência: 10.1016/j.jfo.2012.09.006

Vieira, R.F.C., Biondo, A.W., Guimarães, A.M.S., Santos, A.P., Santos, R.P., Dutra, L.H., *et al.* (2011). Rev. Bras. Parasitol. Vet., 20(1), 1-12.

Vilcins, I-M.E., Ujvari, B., Old, J.M. & Deane, E. (2009). Molecular and Morphological Description of a *Hepatozoon* Species in Reptiles and Their Ticks in the Northern Territory, Australia. J.Parasitol., 95(2), 434-442.

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 & Vectors, 6, 99. Referência: 10.1186/1756-3305-6-99.

Vincent-Johnson, N.A. (2004). Canine and Feline Ehrlichiosis. Acedido a 28 de Agosto 2013 em <https://www.vetlearn.com/standards-of-care/canine-and-feline-ehrlichiosis>.

Vita, S., Santori, D., Aguzzi, I., Petrotta, E. & Luciani, A. (2005). Feline leishmaniasis and ehrlichiosis: Serological investigation in Abruzzo Region. Veterinary Research Communications, 29(2), 319-321.

World Health Organization [WHO] (2010). Controlo of the Leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22–26 March 2010.

World Organization for Animal Health [OIE] (2008). Leishmaniosis. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008. Acedido em 17 Setembro 2013 em http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.08_Leishmaniosis.pdf.

Apendice I – Termo de responsabilidade e certificado de autorização dos proprietários dos animais testados para protozoários e bactérias transmitidos por vectores artrópodes

**Termo de Responsabilidade e Certificado de Autorização de participação no projecto
VectorFel**

Eu, _____, proprietário/a do Felino
“ _____ ”, autorizo a sua participação no Projecto VectorFel, nomeadamente a colheita de sangue periférico pelo médico veterinário e a utilização dos dados referentes ao meu animal, atestando ter sido informado/a das condições do mesmo.

____ de _____ de _____

(assinatura do proprietário/a)

Apêndice II – Inquérito apresentado aos proprietários dos gatos testados.

Inquérito dirigido aos proprietários dos gatos do Hospital Veterinário da Arrábida (HVA)



Projecto Vectorfel

Parte I – Preenchido pelos proprietários

Nome do animal _____ Idade _____ Raça _____

Sexo

Macho inteiro Macho castrado Fêmea inteira Fêmea esterilizada

Área de residência (Cidade/País) _____

Modo de vida do seu gato?

- Gato doméstico sem acesso ao exterior
- Gato doméstico com acesso ao exterior
- Gato de exterior
- Gato errante (gato de rua)

Tem mais algum animal em casa?

- Sim. Quais? _____
- Não

Faz desparasitação externa (carraças/pulgas) ao seu gato?

- Sim
- Não

Com que frequência desparasita externamente o seu gato?

- 1 vez por mês
- 3 em 3 meses
- 6 em 6 meses
- Anualmente

Nos últimos 3 meses, que tipo de desparasitação externa fez?

- Activyl®
- Advantage®
- Advocate®
- Frontline Combo®
- Frontline®
- Program®
- Stronghold®
- Outros. Qual? _____

Costuma aspirar/limpar/desinfectar a cama do seu gato?

- Sim
 Não

Se sim, com que frequência? _____ vez (es) por mês

Usa algum inseticida para o ambiente?

- Sim
 Não

Se sim, qual o inseticida usado pela ultima vez?

- Biokill
 Ectokill
 Raid
 Outro. Qual? _____

Faz desparasitação interna (parasitas intestinais)?

- Sim
 Não

Com que frequência desparasita internamente o seu gato?

- 1 vez por mês
 3 em 3 meses
 6 em 6 meses
 Anualmente

Nos últimos 3 meses, que tipo de desparasitação interna fez?

- Drontal Plus®
 Milbemax®
 Panacur®
 Profender®
 Strongid®
 Outros, Qual? _____

Os restantes animais de casa são também desparasitados externamente de forma regular?

- Sim Não

E internamente?

- Sim Não

Quando viaja o seu gato acompanha-o?

- Sim Algumas vezes Raramente Não

Se sim, quando foi a última vez que viajou e local?

Na sua opinião, acha que as pulgas transmitem doenças?

- Sim, aos animais
- Sim, aos animais e ao Homem
- Não transmitem
- Não sei

Na sua opinião, acha que as carraças transmitem doenças?

- Sim, aos animais
- Sim, aos animais e ao Homem
- Não transmitem
- Não sei

Obrigado pela sua Colaboração!! ☺

Parte II – Preenchido pelo Médico Veterinário

Presença de carraças ao exame físico? Sim Não

Presença de pulgas ao exame físico? Sim Não

Quando foi realizada a recolha de amostra de sangue o gato apresentava sinais clínicos?

- Sim Não

Se sim, quais os sinais clínicos apresentados?

- | | | |
|--|--|--|
| <input type="checkbox"/> Febre | <input type="checkbox"/> Perda de peso | <input type="checkbox"/> Hemorragias |
| <input type="checkbox"/> Letargia | <input type="checkbox"/> Linfadenopatia | <input type="checkbox"/> Claudicação |
| <input type="checkbox"/> Perda de apetite | <input type="checkbox"/> Alterações Neurológicas | <input type="checkbox"/> Lesões cutâneas |
| <input type="checkbox"/> Lesões oculares | <input type="checkbox"/> Vômito e/ou Diarreia | <input type="checkbox"/> Icterícia |
| <input type="checkbox"/> Estomatite | <input type="checkbox"/> Alterações Cardíacas | |
| <input type="checkbox"/> Atrofia muscular | <input type="checkbox"/> Mucosas Pálidas | |
| <input type="checkbox"/> Outros. Qual/quais? _____ | | |

Há quanto tempo o gato apresenta sintomatologia?

Pessoas que tiveram contacto com o animal apresentaram alguma sintomatologia?

- Sim Não

Se sim, Qual/quais os sinais apresentados? _____

Foram realizados exames laboratoriais (Hemograma e Perfil Bioquímico)? Sim

Não

Se **sim**, **Quais** **as** **alterações** **apresentadas?**

Foram realizados exames complementares? Sim Não

Se sim, Quais foram os exames realizados e quais as alterações observadas em cada um deles?

Ecografia abdominal _____

Raio x _____

Ecocardiografia _____

Outros _____

Foi realizado algum teste serológico? Sim Não

Se sim, Qual (com indicação dos resultados)?

Foi realizada cultura de sangue? Sim. Resultados:

Não

Foram realizados testes FIV e FeLV? Sim Não

Se sim, Quais os resultados?

FIV _____ FeLV _____

No caso de gato sintomático:

Foi instituído algum tratamento? Sim Não

Se sim, Qual o tratamento instituído? _____

Houve melhorias? Sim. Quanto tempo depois do início do tratamento? _____ Não