

Ana Rita Patrocínio Monteiro

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE CANINA
NA ZONA DA ARRÁBIDA**

Orientadora: Dra. Ângela Paula Neves Rocha Martins

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Departamento de Medicina Veterinária

Lisboa

2010

Ana Rita Patrocínio Monteiro

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE CANINA
NA ZONA DA ARRÁBIDA**

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

Orientadora: Dra. Ângela Paula Neves Rocha Martins
Co-orientador: Dr. Jacinto José Carneiro Gomes

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Departamento de Medicina Veterinária

Lisboa

2010

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que de uma ou outra forma apoiaram e tornaram possível este momento, nomeadamente:

- Dra. Ângela Martins, Orientadora de estágio;
- Dr. Jacinto Gomes, Co-orientador de estágio;
- Equipa do Hospital Veterinário da Arrábida e equipa do Laboratório Nacional Investigação Veterinária;
- Ana Rita Mendes e Helena Bergano, colegas de estágio;
- Aos meus queridos pais José Monteiro e Maria Geraldo e irmãos António, João, Luciano e Paulo e respectivos filhos e esposas;
- Eng.^a Ana Sousa e Teresa Charrua;
- Ana Rita Caseiro, Ana Filipa Oliveira, Carla Cardoso, Hélio Cruz, Joaquim Sousa, Luís Santana, Nádia Duarte, Nuno Vazão, Patrícia Ivo, Rui Reis, Sandra Duarte e demais amigos que me acompanharam nesta caminhada.

O meu sincero OBRIGADA!

RESUMO

A Leishmaniose canina é uma zoonose endémica provocada por um protozoário do género *Leishmania* cujo ciclo de vida requer a existência de um hospedeiro intermediário, o flebótomo e de um hospedeiro definitivo, o cão. É uma doença sistémica cuja sintomatologia clássica inclui a anorexia, letargia, poliúria e polidipsia, lesões cutâneas, linfadenomegália, epistaxis e onicogribose. Muitos animais podem estar infectados mas permanecerem assintomáticos. O diagnóstico deve ser feito pela conjugação da sintomatologia clínica, resultados hematológicos e bioquímicos e resultados laboratoriais como testes serológicos e/ou provas de biologia molecular. Existem várias formas de tratamento da doença, no entanto nenhum protocolo leva à cura parasitológica da doença, mas apenas à remissão da sintomatologia. Várias medidas preventivas podem ser levadas a cabo, como o uso de coleiras insecticidas e num futuro próximo a possível vacinação. O estudo epidemiológico apresentado utilizou uma amostra de 60 cães, aos quais foi realizado um exame clínico e recolha de sangue para análise de hemograma, parâmetros bioquímicos e análise laboratorial, com o fim de se diagnosticar Leishmaniose canina na zona da Arrábida. Foram diagnosticados 34 animais infectados, dos quais 13 eram portadores assintomáticos descobertos pelo uso das técnicas de Imunofluorescência Indirecta, Teste de Aglutinação Directa e *Polymerase Chain Reaction*.

Palavras - chave: Leishmaniose; *Leishmania*; Flebótomo; Antimoniais pentavalentes; Miltefusina.

ABSTRACT

Canine leishmaniasis is a zoonotic endemic disease caused by a protozoan of the genus *Leishmania* whose life cycle requires the existence of an intermediate host, the phlebotomine sandfly and a definitive host, the dog. Is a systemic disease whose classical symptoms include anorexia, lethargy, polyuria and polydipsia, skin lesions, lymphadenomegaly, onychogryphosis and epistaxis. Many animals can be infected, but remain asymptomatic. The diagnosis should be done by combining clinical symptoms, haematological and biochemical results and laboratory results as serological tests and/or molecular tests. There are several forms of treatment of the disease, however, none lead to parasitological cure, but only the remission of simptomatology. Several preventive measures can be undertaken, as the use of insecticides collars and in the near future the possibly vaccination. The epidemiological study presented used a sample of 60 dogs, which were performed a clinical examination, blood sampling for analysis of blood count, biochemical parameters and laboratory analysis in order to diagnose canine leishmaniasis in the area of Arrábida. Were diagnosed in 34 animals of which 13 were asymptomatic discovered by using the *Indirect Immunofluorescence*, *Direct Agglutination Test* and *Polymerase Chain Reaction*.

Keywords: Leishmaniasis, *Leishmania*, Phlebotomine sandfly, Pentavalent antimonials; Miltefusine.

ÍNDICE GERAL

I. Introdução	8
II. Revisão Bibliográfica	10
1. Leishmaniose canina	10
1.1.Etiologia	10
1.2.Transmissão	11
1.3.Patogenia	15
1.4.Epidemiologia	16
1.5.Manifestações Clínicas	17
1.6.Diagnóstico	21
A. Diagnóstico Clínico	22
B. Diagnóstico Laboratorial	23
1.7.Tratamento	28
1.8.Controlo e Profilaxia	31
1.9.Prognóstico	33
III. Estudo Epidemiológico da Leishmaniose canina na Zona da Arrábida	34
1. Material e Métodos	34
2. Resultados	35
3. Discussão	43
4. Conclusão	47
IV. Bibliografia	49
V. Anexos	I
1. Identificação individual da população total observada no HVA	I
2. Sintomatologia clínica apresentada pela população total recolhida pelo exame clínico durante as consultas efectuadas no HVA	III
3. Resultados de hemograma obtidos pelo HVA de cada animal após recolha de sangue para tubo de EDTA.	V
4. Resultados das bioquímicas e DNAtch obtidos após recolha durante a consulta para tubo de Heparina e tubo Seco respectivamente no HVA.	IX
5. Resultados laboratoriais obtidos no LNIV	XI

6. Compilação de resultados da população de cães infectados	XIII
---	------

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Forma promastigota.	11
Figura 2. Forma amastigota dentro de um macrófago.	11
Figura 3. Ciclo de Vida da Leishmaniose canina.	13
Figura 4. Alopecia simétrica a fazer o contorno dos olhos e nariz.	18
Figura 5. Onicogribose.	18
Figura 6. Caquexia.	19
Figura 7. Epistaxis unilateral.	19
Figura 8. Resultados da IFI visualizados ao microscópio de fluorescência. À esquerda: Coloração verde fluorescente correspondente a uma amostra positiva à Lcan. À direita: Ausência de fluorescência correspondente a uma amostra negativa à Lcan.	25
Figura 9. Placa de DAT dividida em 3 secções com titulações de 1/100, 1/200, 1/400 e 1/800. Cada rectângulo vermelho na horizontal corresponde a um animal diferente. As reacções representadas pela bolinha azul representam resultados negativos (-), ao passo que as reacções dispersas azuis representam reacções de aglutinação, isto é, reacções positivas (+).	26

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribuição de idades da população total e população infectada	36
Gráfico 2. Sinais clínicos clássicos de Lcan na amostra de animais infectados com Lcan.	38
Gráfico 3. Distribuição dos resultados do perfil hematológico e bioquímico dos animais infectados por Lcan.	39
Gráfico 4. Distribuição dos resultados do DNAtch da tabela 6 expressos graficamente.	40
Gráfico 5. Distribuição das titulações da IFI.	43
Gráfico 6. Distribuição das titulações do DAT.	43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de <i>Leishmania spp.</i> no Novo e Velho Mundo.	10
Tabela 2. Alguns protocolos terapêuticos utilizados no tratamento da Lcan.	31
Tabela 3. Distribuição de idades da população total e população infectada.	36
Tabela 4. Frequência de raças na população total e infectada por Lcan.	37
Tabela 5. Resultados do DNAtch.	40
Tabela 6. Resultados das titulações obtidas pelo DNAtch.	40
Tabela 7. Titulações de IFI e DAT nos animais infectados.	42

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - Percentagem

µm – Micrómetro

ALT – Alanina Aminotransferase

APTT – Tempo de Tromboplastina Parcial Activada

AST – Aspartato Aminotransferase

CF – Citometria de Fluxo

DAT – Teste de Aglutinação Directa

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay

HE – Hemoxicilina e Eosina

HVA – Hospital Veterinário da Arrábida

IFI – Imunofluorescência Indirecta

IFN – Interferão

IL – Interleucina

IM – Intramuscular

IRC – Insuficiência Renal Crónica

IV – Intravenosa

Kg – Kilograma

LNIV – Laboratório Nacional de Investigação Veterinária

Lcan – Leishmaniose canina

LC – Leishmaniose cutânea

LMC – Leishmaniose mucocutânea

LV – Leishmaniose visceral

mg – miligrama

PCR – Polymerase Chain Reaction

PD – Polidipsia

PDF – Produtos de Degradação do Fibrinogénico

PT – Tempo de Protrombina

PU – Poliúria

RNA – Ácido ribonucleico

Sc - Subcutânea

Th – T helper

TNF – Factor de Necrose Tumoral

UPC – Ratio Urinário de Proteína/Creatinina

VO – Via Oral

INTRODUÇÃO

Após ter completado com sucesso os cinco anos de Licenciatura em Medicina Veterinária com Mestrado Integrado, na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, o estágio curricular foi realizado na Vetarrábida – Hospital Veterinário da Arrábida (HVA) e Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV). O estágio teve início a 6 de Outubro de 2009 e terminou a 26 de Fevereiro de 2010 sob a orientação da Dra. Ângela Martins e acompanhamento do co-orientador Dr. Jacinto Gomes.

Esta prática hospitalar permitiu adquirir uma experiência clínica e prática adequada na execução de medicina preventiva, consultas de clínica geral, consultas de urgências, manejo pré e pós-cirúrgico e manejo de internados. Possibilitou também aprender a trabalhar em equipa, estabelecer e melhorar o contacto directo com os proprietários, desenvolver um raciocínio clínico e de aprender a trabalhar e usar de forma adequada uma série de ferramentas utilizadas nos meios de diagnóstico.

A prática laboratorial teve o objectivo de complementar o estágio hospitalar, sobretudo na prática de exames laboratoriais que no hospital não se encontram ao nosso alcance, como é o exemplo de Testes de Imunofluorescência Indirecta (IFI), Testes de Aglutinação Directa (DAT) e reacção em cadeia de *Polimerase Chain Reaction* (PCR). O estágio no laboratório ocasionou o contacto com uma realidade diferente da prática da clínica.

A leishmaniose canina (Lcan) foi o tema escolhido para a dissertação da Tese de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, pois para além de ser um tema de interesse da autora e de grande debate em Medicina Veterinária e Saúde Pública, surgiu a hipótese de fazer um trabalho de investigação mais aprofundado no departamento de Parasitologia do LNIV, tendo a oportunidade de executar algumas das diferentes técnicas de diagnóstico da respectiva parasitose.

Para dar corpo a esta dissertação foi feito um estudo epidemiológico na zona da Arrábida que usou uma amostra de 60 cães. Foi realizado um exame clínico detalhado a todos os animais e posterior recolha de sangue para análise de hemograma, parâmetros bioquímicos e análise laboratorial de forma a diagnosticar Lcan.

Este trabalho teve como objectivos diagnosticar Lcan na zona da Arrábida, a animais sintomáticos e assintomáticos, de forma a avaliar a situação actual desta doença nos canídeos da região e a experimentação da prática clínica e laboratorial por parte da autora, permitindo o contacto directo com diferentes realidades da veterinária e a utilização de diversos meios de

diagnóstico. A dissertação da Tese encontra-se dividida em duas partes. A primeira parte é constituída por uma revisão bibliográfica exaustiva acerca da Lcan e a segunda parte por um estudo epidemiológico realizado na zona da Arrábida. Aqui são apresentados os resultados de uma recolha de material decorrentes da prática clínica no hospital ao longo do estágio e subsequente análise no LNIV.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. LEISHMANIOSE CANINA

1.1. ETIOLOGIA

A Leishmaniose é uma doença causada por um protozoário flagelado do género *Leishmania* da ordem Kinetoplastida e da família Tripanossomatidae, que necessita de um hospedeiro intermediário invertebrado hematófago, como vector, e de um hospedeiro vertebrado definitivo (Ciaramella & Corona, 2003).

Existem cerca de 30 espécies diferentes no género *Leishmania* no Velho e Novo Mundo (tabela 1). Cerca de 20 dessas espécies são responsáveis pela ocorrência de doença em Humanos e nos animais, nomeadamente o cão, sendo por isso zoonóticas (Greene, 2006).

A doença causada pelas várias espécies *Leishmanias* nos humanos encontra-se dividida em três formas de acordo com as manifestações clínicas: Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Mucocutânea (LMC) e Leishmaniose Visceral (LV) (Greene, 2006). Nos cães os achados clínicos são semelhantes aos que ocorrem na LV encontrada nos humanos com complicações cutâneas (Ciaramella & Corona, 2003).

Tabela 1. Espécies de *Leishmania* no Novo e Velho Mundo (Adaptado de Greene, 2006).

Leishmaniose	Velho Mundo	Novo Mundo
Visceral	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. chagasi</i> (<i>L. infantum</i>)
Cutânea	<i>L. aethiopica</i> <i>L. major</i> <i>L. infantum</i> <i>L. tropica</i>	<i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. venezuelensis</i> <i>L. (Viannia) braziliensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. shawi</i>
Mucocutânea		<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i>

O principal agente etiológico responsável pela LV é a *L. infantum* na zona Mediterrânica e Norte da África, *L. donovani* e *L. infantum* na Ásia e África e *Leishmania chagasi*/*L. infantum* no Velho Mundo (Ciaramella & Corona, 2003).

Em Medicina Veterinária, a Leishmaniose causada pela *L. infantum* é a mais importante, pois para além da doença ser, na maioria dos casos, severa e fatal para o cão este é ainda o reservatório da doença para os humanos (Solano-Galego et al., 2009).

1.2. TRANSMISSÃO

Como referido anteriormente, as *Leishmania spp.* requerem dois hospedeiros para completar o seu ciclo de vida. No vector o parasita ocorre sob a forma promastigota e no vertebrado ocorre sob a forma amastigota (Ciaramella & Corona, 2003). Estas formas têm características morfológicas diferentes:

- Promastigotas: são encontradas no intestino do hospedeiro invertebrado, têm 10 a 15 μm de comprimento, caracteriza-se pela sua forma alongada, presença de um único núcleo, cinetoplasto e de um longo flagelo com cerca de 20 μm (figura 1);
- Amastigotas: encontram-se dentro dos macrófagos do hospedeiro vertebrado, têm cerca de 2 a 5 μm de diâmetro, forma oval, possui um único núcleo excêntrico, um cinetoplasto e flagelo rudimentar (figura 2) (Ciaramella & Corona, 2003; Green, 2006).

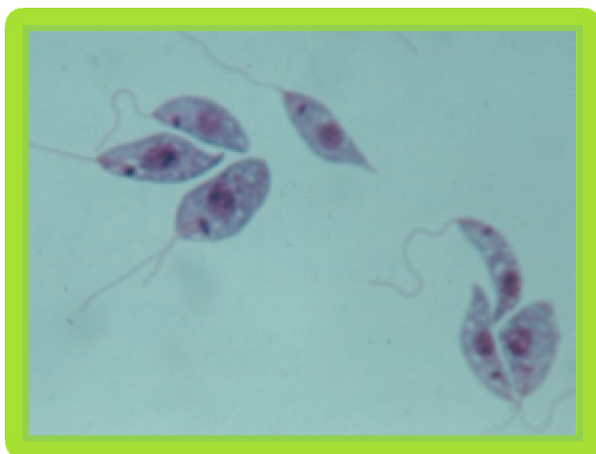


Figura 1. Forma promastigota (Adaptado de Roze, 2005).

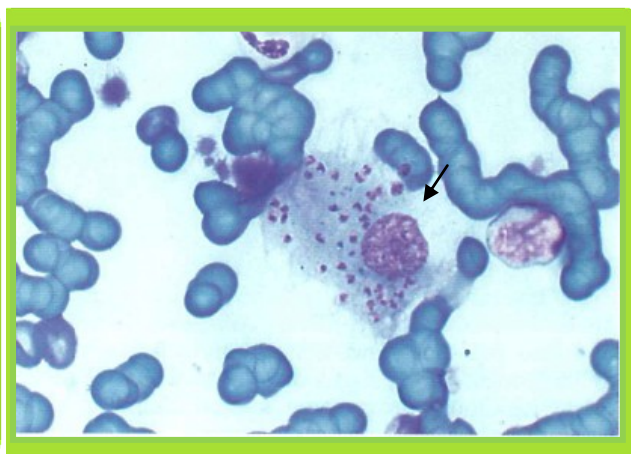


Figura 2. Formas amastigotas dentro de um macrófago (Adaptado de Linda, 2001).

Os vectores da doença são insectos dípteros da família *Psychodidae* da qual 6 géneros são reconhecidos, no entanto apenas 2 géneros têm importância na transmissão da *L. infantum*, o género *Phlebotomus* nos países do Velho Mundo e o género *Lutzomyia* nos países do Novo Mundo (Bates, 2007; Freitas et al., 2005; Greene, 2006). Morfologicamente, estes insectos têm cerca de 2 a 3 mm e dependem da alimentação de sangue para a maturação dos seus ovos (Ciaramella & Corona, 2003). Apenas as fêmeas são hematófagas, logo só elas transmitem a doença. Estas encontram-se presentes em climas tropicais durante todo o ano ou nos meses quentes dos climas temperados, como Portugal, tendo uma actividade crepuscular e nocturna e podem percorrer distâncias entre os 200 e os 2500 metros (Solano-Galego et al., 2009).

No ciclo de vida (figura 3) as formas amastigotas são ingeridas pela fêmea vector onde se transformam em promastigotas nos intestinos. Dos intestinos, as formas promastigotas migram em direcção ao hipostoma e são inoculadas na pele do hospedeiro final aquando da alimentação da fêmea. Após a inoculação na pele, os promastigotas são fagocitados pelos macrófagos cutâneos, isto é, pelas células de Langerhans onde sofrem uma transformação para a forma de amastigotas (Ciaramella & Corona, 2003).

Usualmente a transmissão entre cães e de cães para humanos requer um vector invertebrado, no entanto estão já documentadas outras formas da transmissão de doença na ausência do vector. A transmissão pode ser possivelmente garantida por outros ectoparasitas do cão, particularmente a pulga *Ctenocephalides felis felis* e a carraça *Rhipicephalus sanguineus*. As carraças são referidas como possíveis vectores, pois são amplamente distribuídos e abundantes e possuem uma elevada taxa de reprodução e de longevidade de vida, sendo por isso capazes de manter uma elevada densidade populacional (Coutinho et al., 2005).

A transfusão de sangue é uma prática comum e importante no exercício da clínica e geralmente usada em situações de emergência, implicando alguns riscos na transmissão de doenças, deste modo, em 2005 foi realizado um estudo experimental, cujo objectivo foi verificar o potencial risco de transmissão da Lcan através da transfusão de sangue proveniente de animais assintomáticos ou oligoassintomáticos, usando hamsters como modelo experimental (Freitas et al., 2005).

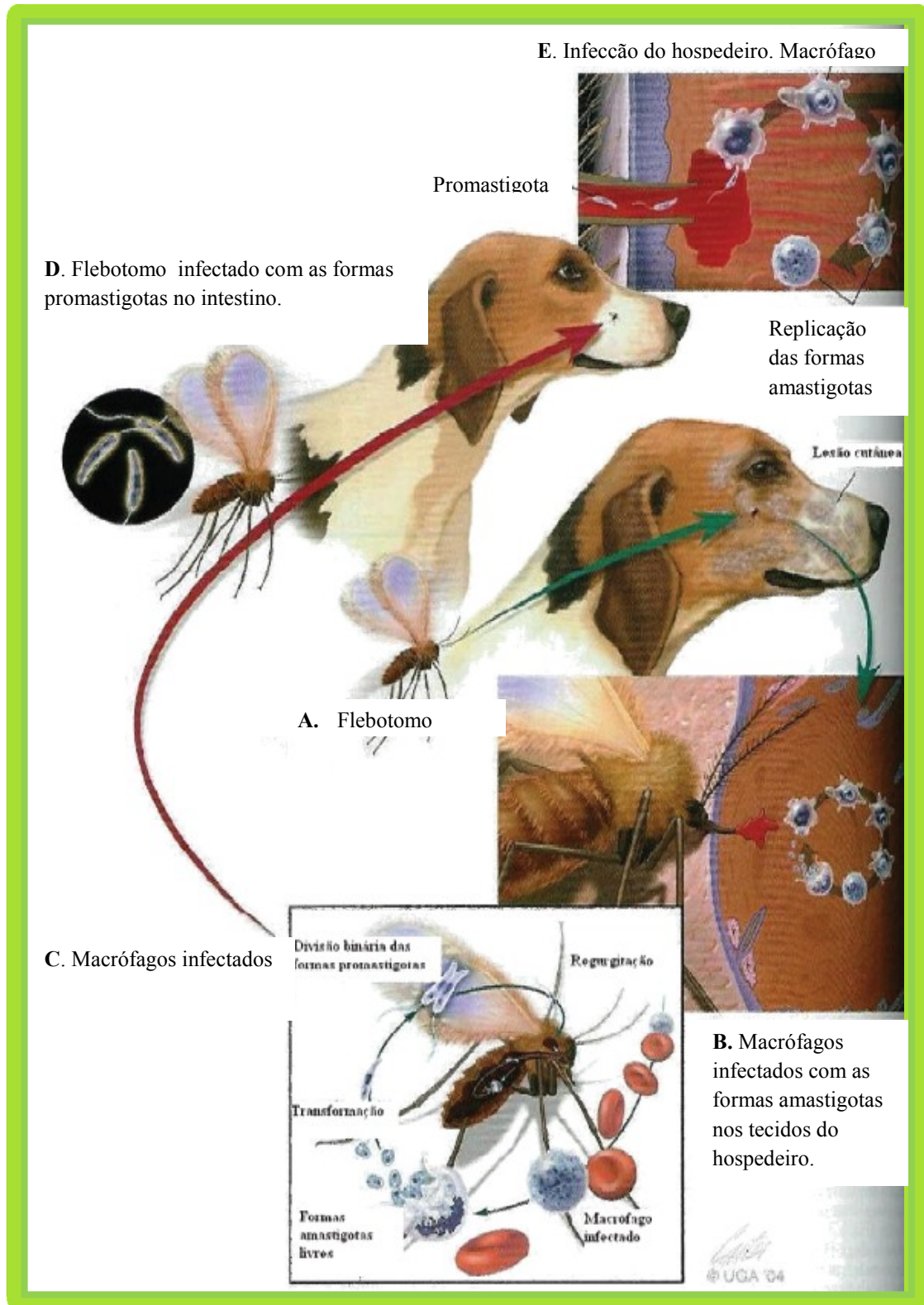


Figura 3. Ciclo de Vida da Leishmaniose canina (Adaptado de Greene, 2006)

Este estudo demonstrou que a Lcan pode ser experimentalmente transmitida via sangue total ou por fracções de células mononucleares infectadas, desde que a forma

amastigota esteja presente (Freitas et al., 2005). Para além deste estudo experimental, foi documentado no Norte da América a transmissão de *Lcan* através de sangues provenientes de bancos de sangue (Freitas et al., 2005).

Um estudo documentado em 2009 demonstrou que a transmissão venérea pode ocorrer na ausência de vector invertebrado. A *L. chagasi* tem tropismo para o aparelho genital masculino, nomeadamente epidídimo, prepúcio e glândulas penianas resultando da inflamação deste órgão. Ao contrário das fêmeas, nestas não foram observadas quaisquer tipos de lesões no seu aparelho genital. Estes resultados levaram à conclusão de que a transmissão venérea é unidireccional, isto é, de machos infectados para fêmeas susceptíveis. Neste mesmo estudo é referida ainda, a possibilidade das fêmeas poderem transmitir via placentária a *Lcan* aos seus fetos durante o período de gestação (Silva et al., 2009; Santos, 2009).

Da mesma forma que vários tipos de transmissão podem ocorrer na ausência de hospedeiro vertebrado, muitas espécies de mamíferos podem ser infectadas pela *Leishmania* sp., O principal hospedeiro definitivo e reservatório da doença é o cão doméstico (*Canis familiaris*) (Roze, 2005) no entanto, alguns mamíferos como o gato e os equinos são considerados hospedeiros acidentais da doença. A infecção pela *L. infantum* também já foi reportada em canídeos selvagens como raposas (*Vulpes vulpes*) e javalis (*Stus scrofa*) na Europa e Médio Oriente (Greene, 2006).

A infecção por *L. infantum* em gatos (*Felis catus domesticus*) foi pela primeira vez descrita em 1912 na Algéria, mais recentemente foram reportados casos em Espanha, Itália, França, Brasil e em 1994 um caso em Portugal. Neste caso, foram observadas formas amastigotas em lesões cefálicas nodulares e nos linfonodos poplíteos. Um estudo mais recente, feito com 23 gatos de rua na área metropolitana de Lisboa, demonstrou que 7 desses 23 gatos apresentavam-se infectados sem no entanto manifestarem qualquer sintomatologia clínica típica de Leishmaniose e manifestando uma resposta de anticorpos anti-*Leishmania* baixa. Há desta forma uma subestimação do número real de animais infectados. Estes animais tornam mais fácil a transmissão e difusão da doença (Maia et al., 2008).

A infecção de equinos também ocorreu, sendo já descrita na América Central, América do Sul, Alemanha, Espanha e em 2005 em Portugal. Tal como acontece com os gatos, os equinos mostram baixos níveis de anticorpos anti-*Leishmania* suportando a hipótese de ocorrer apenas LC (Rolão et al., 2005). A infecção por *L. infantum* nos gatos e equinos ocorre de forma acidental, não representando os mesmos riscos para a saúde pública que representam os cães como reservatório da doença para os humano, no entanto face à elevada

população de gatos comparada com a de equinos, os gatos poderão ter maior importância epidemiológica (Maia, Nunes & Campino, 2008).

1.3. PATOGENIA

Nem todos os cães que se infectam com *Leishmania* spp., após a sua inoculação na derme, desenvolvem a doença. A resposta imunitária iniciada pelos cães no momento da infecção parece ser um dos factores mais determinantes no desenvolvimento dessa infecção e na sua progressão de um estado assintomático para um estado sintomático (Santos, 2009).

Cães com Lcan sintomática têm sido associados a alterações imunológicas que envolvem duas populações de células T helpers (Th) diferentes, as Th1 e Th2. As células Th1 estão envolvidas na resposta imunitária celular e em alguma resposta imunitária humoral. Estas células estão envolvidas na secreção de interleucina 2 (IL-2), interferão γ (IFN γ) e factor de necrose tumoral (TNF) que activam os macrófagos de forma a destruírem as formas amastigotas intracelulares (Santos, 2009). As células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 e, para além disso, estimulam a diferenciação das células B e a produção de anticorpos IgG. Estes dois tipos de resposta geralmente ocorre em simultâneo, mas normalmente só uma prevalece (Roze, 2005; Barbiéri, 2006; Baneth, 2008).

Tem sido observado uma hipergaglobulinémia em animais infectados devido à elevada produção de anticorpos secundária à estimulação das células Th2. No entanto, estes anticorpos não são protectores e podem ainda ter efeitos nocivos pela deposição de complexos imunes em vários órgãos (Roze, 2005). Os elevados níveis de anticorpos IgG têm sido associados com as desordens patofisiológicas e com a fase activa da doença, no entanto a falta destes anticorpos não significa que não haja infecção assim como, animais assintomáticos podem desenvolver anticorpos anti-*Leishmania* durante anos sem desenvolverem a doença (Iniesta et al., 2004).

Está ainda documentado que cães naturalmente infectados com *L. infantum* tiveram uma redução de ambas as populações de células CD4⁺ e CD8⁺ e o seu aumento após tratamento da infecção, no entanto não está directamente demonstrado o envolvimento das células CD8⁺ na LV (Santos, 2009).

1.4. EPIDEMIOLOGIA

A Lcan é uma zoonose endémica em mais de 88 países e é de extrema importância em Medicina Veterinária e Saúde Pública. Ocorre principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do Velho e Novo Mundo, colocando mais de 350 milhões de pessoas em risco. A incidência é de 2 milhões novos casos por ano, 0,5 milhões de LV e 1,5 milhões de LC. As populações mais afectadas são sobretudo populações carenciadas que habitam nas zonas rurais e sub-urbanas (Solano-Galego et al., 2009).

Os países da bacia do Mediterrâneo e os da América do Sul são os que têm uma maior prevalência da doença em cães (Miranda et al, 2008). Na bacia do mediterrâneo os países mais afectados são a Itália, França, Espanha e Portugal com uma prevalência de 14,5 a 24%, 3 a 17%, 5 a 18% e 8,5% respectivamente. Nestes países, estima-se que em 15 milhões de cães, 2,5 milhões, isto é 16,7% estão infectados. Já na América do Sul os países com maior prevalência são a Venezuela com 33% e o Brasil com 36% (Moreno & Alvar, 2002).

Com o aumento do aquecimento global, aumento do turismo a longas distâncias e expansão do comércio ocorre também uma dispersão de microorganismos e reintrodução de doenças de zonas endémicas para zonas não endémicas (Dujardin et al., 2008). Desde 1995, ocorreram focos isolados da infecção em zonas não endémicas da Europa, havendo já um número de casos reportados bastante elevados. Registaram-se 21 na Áustria, 20 na Bélgica, 236 na Alemanha, 3 na Suécia, 2 na Suíça, 42 na Holanda e 54 em Inglaterra (Roze, 2005).

Além dos factores atrás descritos, a urbanização das áreas sub-urbanas, o aumento do número de famílias com jardim e o elevado número de cães de rua também são factores de extrema importância na expansão da doença. Dada a importância destes factores, foi realizado em 2002, um estudo serológico na área de Lisboa. Este estudo envolveu uma amostra de 374 cães, dos quais 277 eram cães domésticos e 97 eram cães de rua. Foi recolhido de cada animal, uma amostra de sangue para análise do respectivo soro por IFI e uma aspiração do linfonodo poplíteo para posterior cultura em meio Novy, Nicolle & MacNeal. Os resultados deram uma taxa de prevalência de infecção de 18.4% (51/277) e 21.6% (21/97), dos quais 39.21% e 28.27% eram assintomáticos, para cães domésticos e cães de rua respectivamente. Com estes resultados, podemos constatar a importância dos animais de rua na transmissão da doença em zonas urbanas (Cortes et al., 2007).

Outros factores de risco como sexo, raça e idade também têm sido avaliados. Um estudo realizado em 2007 mostrou que existe uma maior proporção de cães machos doentes (Miranda et al, 2008), no entanto outros estudos não observaram qualquer diferença na

proporção de machos e fêmeas doentes. Já em relação à prevalência da doença em determinadas raças, vários estudos consideram que há uma maior predisposição da doença no Pastor Alemão, Rottweiler e Boxer e pouca predisposição para o Yorkshire terrier e Caniche. Os autores justificam a baixa predisposição destas raças, pelo facto de viverem geralmente dentro de casa. Quanto à idade, observa-se uma distribuição bimodal, com um primeiro pico de infecção entre os 2 a 4 anos de idade e um segundo pico de infecção em animais com idade superior ou igual a 7 anos (Miranda et al., 2008; Moreno & Alvar, 2002). Estes estudos são ainda contraditórios nos resultados obtidos, já que o risco de prevalência da doença para cada um dos factores, depende muito da actividade do animal e do local onde habita, ocorrendo uma maior ou menor exposição ao vector (Moreno & Alvar, 2002).

1.5. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A Lcan é uma doença sistémica que afecta inúmeros órgãos, tecidos e fluidos biológicos que se manifestam por uma grande variedade de sinais. Esses sinais são por vezes inespecíficos e variam consoante os mecanismos patogénicos, órgão afectado e resposta imunitária. A sintomatologia clássica encontrada ao exame físico inclui caquexia, letargia, poliúria/polidipsia (PU/PD), lesões cutâneas, linfadenomegália generalizada, perda de peso progressiva, atrofia muscular, intolerância ao exercício, lesões oculares, epistaxis, onicogribose, anorexia, vômito e diarreia (Solano-Galego, 2009). A grande variedade de sintomatologia e o longo período de incubação da doença (3 meses a 6 anos) torna o diagnóstico por vezes difícil (Roze, 2005).

As **lesões cutâneas** são muito comuns e podem ser localizadas ou difusas e geralmente não pruríticas. As lesões difusas incluem alopecia simétrica, seborreia seca com descamação e hiperqueratose. As lesões localizadas podem ocorrer sob a forma de lesões nodulares, alopecia simétrica geralmente peri-orbital, desenhando uma espécie de óculos, despigmentação do nariz, lábios e gengivas (figura 4), úlceras nas zonas de pressão, mucosas e junções mucocutâneas, hiperqueratose e onicogribose (figura 5) (Roze, 2005; Blavier et al., 2001). Alguns autores têm reportado casos de glossite papular com a presença de múltiplas lesões papulares na superfície da língua das quais foram isoladas inúmeras formas amastigotas (Pugliese et al., 2006).



Figura 4. Alopécia simétrica a fazer o contorno dos olhos e nariz (Fotografia original).



Figura 5. Onicogrifose (CLWG,2007).

Linfadenomegalia ocorre em múltiplos linfonodos superficiais, estes chegam a aumentar 2 a 6 vezes o seu tamanho normal e ocasionalmente assemelham-se ao que ocorre num linfossarcoma. Esplenomegalia é frequentemente observada e possível de se detectar à palpação (Greene, 2006).

Perda de peso e atrofia muscular são os sinais mais comuns da Lcan. A perda de peso pode ocorrer mesmo que o apetite se mantenha. Deve-se a uma falha renal, que é geralmente acompanhada de caquexia (figura 4), depressão, PU/PD, vômito e diarreia (Greene, 2006). A atrofia muscular poderá ser o resultado de um processo auto-imune. Esta inicia-se nos músculos da face (temporal e mastigatório) dando uma aparência ao animal de cão envelhecido (Roze, 2005).

As **lesões oculares** estão reportadas em aproximadamente 25% dos animais afectados pela doença (Roze, 2005). Estas lesões podem ser uni ou bilaterais e localizam-se frequentemente no segmento anterior. Por vezes, os sinais oculares são os únicos sinais da doença observados pelo proprietário (69.3%) e podem permanecer durante e após o tratamento (Pugliese et al., 2006). As lesões mais observadas são blefarite, queratoconjuntivite, queratite e uveíte. A queratite normalmente superficial com erosões epiteliais, úlceras, neovascularização e eventualmente pigmentação. As lesões que raramente

ocorrem incluem distrofia corneal, exoftalmia e estrabismo. Glaucoma e panoftalmite são complicações severas que ocorrem secundariamente a uveíte anterior (Roze, 2005). Secundariamente à hipertensão sistémica, embora seja raro (5.7%), pode dar-se o deslocamento da retina e/ou hemorragias, tortuosidade arterial retinal e hifema (Solano-Galego et al., 2009).

Alterações hemostáticas como trombocitopénia, trombocitopatia, tempo de trombotoplastina parcial activada (APTT) e tempo de protrombina (PT) aumentados e aumento dos produtos de degradação do fibrinogénico (PDF) têm sido encontrados em animais infectados com *Lcan* dando a indicação de que a *Leishmania spp.* afecta a hemostase primária, coagulação e fibrinólise (Ciaramella et al., 2004). Estas alterações são secundárias a uma hepatite crónica pela presença do parasita no fígado (Blavier et al., 2001) e manifestam-se mais frequentemente por epistáxis (figura 5), geralmente unilateral e intermitente, petéquias e úlceras hemorrágicas (Pugliese et al., 2006). No entanto, hematúria e diarreia hemorrágica já foram reportadas em casos mais graves (Ciaramella et al., 2004). Em 1997 foi reportado um caso de efusão pericárdica e trombose aórtica com diminuição dos valores de antitrombina III e fibrinogénico em dois cães infectados (Pugliese et al., 2006).



Figura 6. Caquexia (Fotografia original).



Figura 7. Epistáxis unilateral (Adaptado de Greene, 2006).

Numa fase mais avançada da doença, ocorre frequentemente um **envolvimento renal**. O estado geral do animal agrava-se bastante, os animais podem apresentar anorexia,

PU/PD, vômito e episódios de diarreia (OnLeish, 2008). A doença renal também pode ser a única manifestação clínica em cães doentes e pode progredir de uma proteinúria moderada, resultado de uma glomerulonefrite, para um síndrome nefrótico ou insuficiência renal crônica (IRC). Glomerulonefrite e nefrite intersticial são os achados patológicos mais comuns, no entanto a amiloidose é rara. A glomerulonefrite é geralmente membranoproliferativa e/ou mesangioproliferativa e é resultado da deposição de complexos imunes circulantes (Solano-Galego et al., 2009). Se não diagnosticada e tratada a tempo, as lesões podem progredir e levar à IRC. Esta é uma manifestação muito severa da doença e a principal causa de morte do animal com Lcan (Blavier et al., 2002; Ikeda-Garcia et al., 2006). A lesão renal também se pode manifestar pelo edema periférico, ascite, proteinúria e níveis de ureia e creatinina elevados (Ciaramella & Corona, 2003).

Outras manifestações clínicas menos comuns incluem as colites e enterites hemorrágicas, hepatite crônica, problemas respiratórios e cardíacos e lesões a nível do aparelho reprodutor. As **colites e enterites hemorrágicas**, embora raras foram observadas em alguns casos. Os animais doentes apresentam diarreia hemorrágica ou mucolítica acompanhada de tenesmo e aumento da frequência de defecação. Ao exame endoscópico é visível uma hiperémia extensiva da mucosa com a possível presença de pequenas úlceras e à biopsia revela uma infiltração de plasmócitos, histiócitos, e *Leishmanias* spp. amastigotas (Pugliese et al., 2006; Blavier et al., 2001). A presença de diarreia tem sido associada a doença renal ou hepática, no entanto alguns casos de diarreia confirmam a presença do parasita na mucosa intestinal. Estudos em que reportam estes casos têm sugerido a biópsia rectal como um possível meio de diagnóstico da doença mesmo na ausência de colite (Adamama-Moraitou et al., 2007).

As **lesões hepáticas** têm sido descritas em modelos roedores e humanos, no entanto em cães natural e experimentalmente infectados, estas têm sido pouco descritas (Rallis et al., 2005). As lesões são apenas encontradas em cerca de 5% dos animais doentes e ocorre quando a *Leishmania* spp. se multiplica nos macrófagos hepáticos dando origem a uma hepatite crônica (Ikeda-Garcia et al., 2006). As manifestações clínicas são pouco específicas e vão de vômito, PU/PD, anorexia e perda de peso (Ciaramella & Corona, 2003). As alterações hemostáticas atrás descritas também podem ser secundárias a lesões de hepatite crônica (Blavier et al., 2001).

Os **sinais respiratórios** são raros e pouco documentados. Apenas oito casos de rinite e dois de pneumonia foram descritos e foram associados a infecções oportunistas como consequência de uma imunossupressão que afecta os animais doentes (Blavier et al., 2001). As **lesões cardiovasculares** são raras e quando ocorrem, aparecem sob a forma de pericardite fibrosa, granulomas e tromboembolismo geralmente associados a lesões glomerulares (Blavier et al., 2001). Dos casos reportados até à data, apenas um foi objecto de estudo e a correlação directa entre a presença de lesões no miocárdio e as formas amastigotas da *Leishmania* foram indiscutivelmente demonstradas. Para além disso, o animal apresentava ainda edema subcutâneo devido à presença de hipoalbuminémia resultado de uma nefropatia coexistente, com perda de proteína (López-Pena et al., 2009).

Alguns cães naturalmente infectados desenvolvem **lesões genitais** associadas à presença de formas amastigotas. É possível observar nos machos alguns granulomas localizados no ápice ou corpo do pénis, petéquias em torno da porção central ou em toda a superfície do pénis e ainda equimoses na sua mucosa ou sub-mucosa do epidídimo, prepúcio e glândulas penianas em machos. Nas fêmeas, têm sido reportados granulomas e pequenos nódulos na sub-mucosa no vestíbulo da vagina e pele da vulva. Também alguns casos de aborto entre os 40 e 50º dia de gestação foram descritos, o que sugere a transmissão vertical da mãe para o feto (Pugliese et al., 2006).

Os sinais clínicos atrás descritos além de variáveis e inespecíficos são semelhantes a muitas outras patologias, desta forma existem muitos diagnósticos diferenciais possíveis. Estes incluem Lcan, hepatozoonose, erlichiose, babesiose, neoplasia cutânea, alergia alimentar, dermatite alérgica ou infecciosa, demodecose, sarna sarcóptica e tumor venéreo transmissível (TVT) (Ciaramella & Corona, 2003; Gomes et al., 2006).

1.6. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da Lcan é realizado principalmente por duas razões: confirmar a presença de infecção ou para fins de estudos epidemiológicos. Este é um processo muito complexo e difícil dada a presença de sinais clínicos muito variáveis e inespecíficos, no entanto em áreas endémicas e em animais sintomáticos este torna-se mais fácil que em casos esporádicos ou animais assintomáticos. Numa primeira fase, isto é no diagnóstico clínico, é importante saber os dados epidemiológicos da região, anamnese, exame físico e meios de diagnóstico complementares da prática clínica como análises de sangue, urianálise e exames de imagiologia. Para um diagnóstico definitivo, são necessários métodos laboratoriais que por

norma não se encontram ao alcance da prática clínica. Os métodos laboratoriais dividem-se por sua vez em métodos parasitológicos, métodos serológicos e métodos moleculares, os quais vão ser descritos mais à frente.

A. DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Obter uma história clínica detalhada do animal é muito importante. O local onde habita, o tipo de vida e função do animal, os possíveis movimentos nas áreas endémicas e quais os sinais clínicos observados pelo proprietário são questões pertinentes que devem ser colocadas ao longo do exame físico (Roze, 2005). Os sinais clínicos frequentemente observados durante o exame físico e consistentes com Lcan incluem perda de peso, astenia, alterações dermatológicas, PU/PD, epistáxis e ornicogribose. A anamnese em conjunto com um exame físico consistente são de uma grande ajuda no diagnóstico etiológico da doença e permitem ao Médico Veterinário decidir que meios complementares de diagnóstico deverá usar (CLWG, 2007).

Exames hematológicos, bioquímicos e de imagem têm sido considerados de valor limitado no diagnóstico da Lcan por mostrar resultados inespecíficos, no entanto estes são muito importantes para avaliar o estado clínico do animal (Costa-Val et al., 2006; Medeiros et al., 2008).

As alterações mais comuns são anemia normocítica, normocrómica e não regenerativa, trombocitopénia e leucocitose (Medeiros et al., 2008). A anemia ocorre em cerca de 50 a 70% dos casos e as possíveis causas são perda de sangue devido a epistáxis e úlceras de pele, hemólise, inflamação generalizada, insuficiência renal, sequestro de eritrócitos e hipoplasia ou aplasia da medula óssea (Costa-Val et al., 2006). A trombocitopénia é resultado de uma alteração da parede vascular devido à deposição de complexos imunes. Para além disto, também ocorrem distúrbios da trombocitopoese, aumento da destruição plaquetária e comprometimento da função renal e hepática. A leucocitose ocorre quando um quadro de infecção bacteriana secundária se instalou (Medeiros et al., 2008).

Os parâmetros bioquímicos são úteis para avaliar sobretudo a função renal e hepática ao mesmo tempo que nos permite obter informações acerca do desenvolvimento da resposta imunitária. A função renal é avaliada pela determinação dos níveis de ureia e creatinina no sangue que se encontram anormalmente elevados e pela presença de proteinúria após urianálise (Gama et al., 2008). Deve ainda ser realizada uma ecografia renal que na presença de IRC evidencia uma redução do tamanho dos rins e uma perda de definição cortico-

medular. O avanço da doença leva à perda contínua da arquitectura renal e aumento da ecogenicidade em relação ao baço (Gama et al., 2008). A lesão hepática por norma não é muito severa e manifesta-se pelo aumento da actividade das enzimas hepáticas (Rallis et al., 2005) e pode levar ainda a alterações hemostáticas que se manifestam bioquimicamente pelo PT e APTT aumentados e aumento dos PDF (Ciaramella et al., 2004). A activação da resposta por parte do sistema imunitário é avaliada pela hiperproteinémia que decorre da activação da resposta humoral com a activação dos linfócitos B e consequente aumento da produção de anticorpos (Medeiros et al., 2008), no entanto hipoalbuminémia pode estar presente devido à perda de proteínas por nefropatia, doença hepática ou má nutrição (Ikeda-Garcia et al., 2006).

B. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial da Lcan pode ser realizado usando diferentes técnicas laboratoriais, que por sua vez podem ser técnicas directas pela visualização directa do parasita ou técnicas indirectas como testes imunológicos. A escolha da técnica depende da razão pela qual é feita (tratamento, controlo, estudos epidemiológicos, etc.), da rapidez, sensibilidade, especificidade, facilidade e custo.

Métodos Parasitológicos

A *observação microscópica* directa das formas amastigotas do parasita a partir de esfregaços obtidos da aspiração de tecidos ou órgãos infectados, como medula óssea, linfonodos, pele ou sangue periférico corados com Giemsa ou Leishman é uma forma segura, simples e rápida e pouco traumática para os animais (Laurenti, 2009). As formas amastigotas podem encontrar-se livres ou inclusas em monócitos, macrófagos e neutrófilos (Maia & Campino, 2008). A observação de esfregaços a partir da medula óssea e linfonodos podem induzir a falsos negativos, sobretudo em animais assintomáticos dado o reduzido número de parasitas (Gomes et al., 2006), no entanto a densidade de parasitas no esfregaço pode ser estimado pela contagem do número de amastigotas em relação aos glóbulos brancos (Maia & Campino, 2008).

As formas de *Leishmania spp.* podem ainda ser visualizadas através da *análise histopatológica* de biópsias dos mesmos órgãos referidos anteriormente (Gomes et al., 2006). Após recolha, as amostras são coradas com hemoxicilina e eosina (HE) e procura-se a presença das formas amastigotas dentro das células (Maia & Campino, 2008). No entanto, este método de diagnóstico é limitado pela sua baixa sensibilidade, resultados frequentemente

inconclusivos e por requerer amostras de tecidos repetidas e um profissional experiente (Gomes et al., 2006, 31). Por forma a detectar ou confirmar a presença do parasita nos tecidos em que a análise pela HE deu negativa, a *imunohistoquímica* pode ser usada como uma ferramenta suplementar (Solano-Galego et al., 2009; Maia & Campino, 2008).

Outros métodos convencionais para o diagnóstico parasitológico incluem a *cultura in vitro* e *xenodiagnóstico*. O primeiro consiste na cultura em meio difásico de aspirados ou fragmentos de tecidos (Gomes et al., 2006) ao passo que, o segundo consiste na detecção e isolamento da *Leishmania* em vectores após a sua alimentação de animais suspeitos (Maia & Campino, 2008). Ambos são métodos bastante específicos, no entanto não são recomendados pois requerem um trabalho laboratorial muito longo e no caso do segundo requer ainda a criação laboratorial de vectores artrópodes em insectários (CLWG, 2007; Costa-Val et al., 2006).

Métodos Serológicos

As técnicas parasitológicas empregues na observação directa dos parasitas são na sua maioria técnicas invasivas e com baixa sensibilidade, de modo que os métodos serológicos são utilizados como recurso (Ferreira et al., 2007). A serologia detecta a presença de anticorpos anti-*Leishmania* presentes em circulação, uma vez que animais infectados desenvolvem uma resposta imune humoral. Existem várias técnicas, no entanto as mais utilizadas são a IFI, o DAT e o Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Ferreira et al., 2007).

Uma elevada concentração de anticorpos está geralmente associada com elevado parasitismo e doença, no entanto a seroconversão da doença demora cerca de 3 a 5 meses a ocorrer (CLWG, 2007), deste modo, alguns cães apresentam-se seronegativos durante esse período o que leva à ocorrência de falsos negativos. Quer assim dizer que elevados níveis de anticorpos são indicativos de infecção, mas a ausência ou baixos níveis de anticorpos não significam necessariamente ausência de infecção (Solano-Galego et al., 2009). No entanto, problemas com falsos positivos também podem ocorrer devido a reacções cruzadas com outras doenças, como Erlichiose, Rickettsiose e Toxoplasmose (Gomes et al., 2006).

A *IFI* é considerada um dos melhores testes de diagnóstico serológico e é frequentemente usada para estudos epidemiológicos, estudos da prática clínica e seguimento de tratamento. Nas amostras positivas, os resultados apresentam-se com uma coloração verde fluorescente ao microscópio de fluorescência, ao passo que as amostras negativas, os resultados apresentam uma coloração vermelha. Este teste, dependendo do antígeno usado, tem uma elevada especificidade e sensibilidade, isto é, 94.7% e 85.5% respectivamente. A IFI tem a limitação de requerer alguém com experiência, requer várias titulações e um microscópio de fluorescência que é relativamente caro (Maia & Campino, 2008).

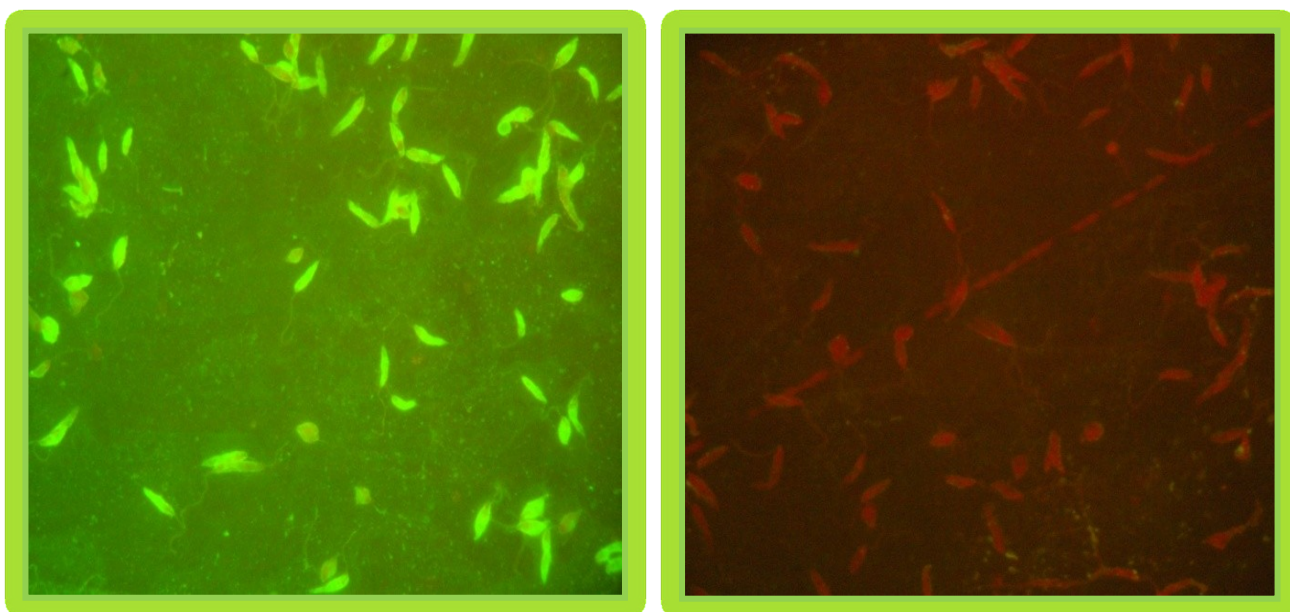


Figura 8. Resultados da IFI visualizados ao microscópio de fluorescência. À esquerda: coloração verde fluorescente correspondente a uma amostra positiva à Lcan. À direita: ausência de fluorescência correspondente a uma amostra negativa à Lcan. (Fotografias originais)

O *DAT* é um teste que usa uma suspensão de antígenos distribuídos por vários poços com fundo em “V” aos quais se adiciona soro do animal. Se o animal for positivo à doença forma-se uma reacção de aglutinação e vice-versa. Este é um método que não exige material de elevado custo e é igualmente sensível e específico, isto é, entre 70.6 a 100% e 84.9 a 100% respectivamente, no entanto tem a desvantagem de exigir várias titulações e os resultados apenas são observados ao fim de 18 horas (Maia & Campino, 2008).

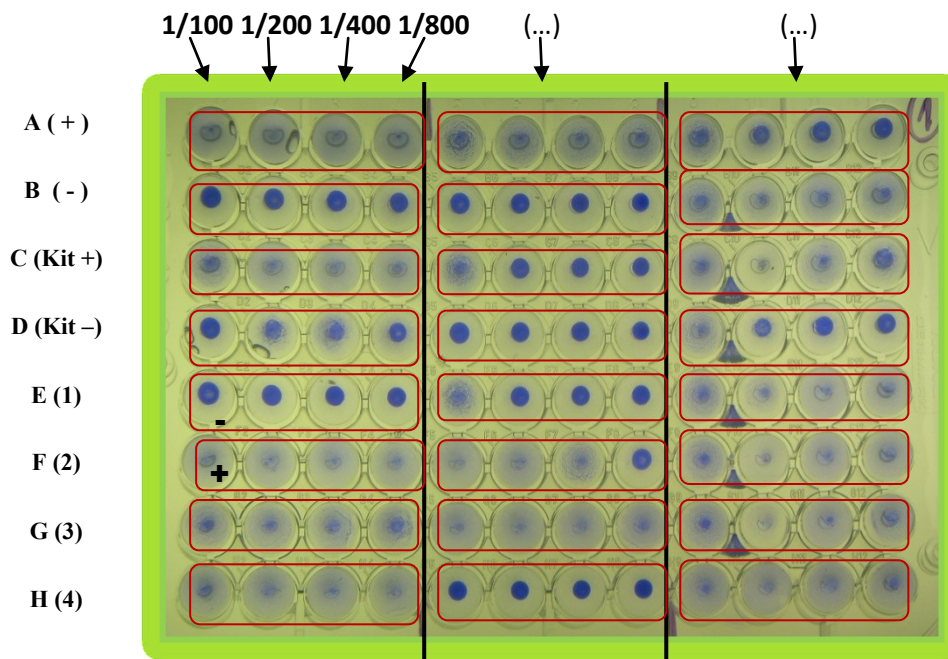


Figura 9. Placa de DAT dividida em 3 secções com titulações de 1/100, 1/200, 1/400 e 1/800. Cada rectângulo vermelho na horizontal corresponde a um animal diferente. As reacções representadas pela bolinha azul representam resultados negativos (-), ao passo que as reacções dispersas azuis representam reacções de aglutinação, isto é, reacções positivas (+). (Fotografia original)

O *ELISA* é um método que quantifica um antígeno imobilizado numa superfície sólida pelo uso de um anticorpo específico com uma enzima ligada de forma covalente, o resultado da ligação antígeno-anticorpo leva a uma reacção colorida que é medida por um espectrofotómetro (Abbas & Lichtman, 2005). Este é um método relativamente simples e fácil e tem uma sensibilidade de 94.1 a 100% e especificidade de 100% (Maia & Campino, 2008).

Recentemente foi descrito o uso da *Citometria de Fluxo (CF)* como um método serológico inovador para a detecção de *Leishmania* spp. (Andrade et al., 2009). A CF é uma técnica de contagem, análise e classificação de partículas microscópicas suspensas num fluido (Maia & Campino, 2008). As células em suspensão são incubadas com anticorpos fluorescentes e a sua ligação ao antígeno resulta numa reacção fluorescente analisada através de um citómetro de fluxo que detecta a fluorescência de células individuais (Abbas & Lichtman, 2005). Este método tem sido bastante utilizado pela sua rapidez, fiabilidade e capacidade de analisar diversas partículas em segundos de forma separada e com propriedades específicas (Maia & Campino, 2008).

Métodos Moleculares

O diagnóstico da Lcan baseado na reacção em cadeia do *PCR* tem mostrado resultados mais confiáveis, não só na detecção da infecção como na monitorização de tratamento quando comparado com os métodos serológicos (Maia & Campino, 2008). A PCR baseia-se na amplificação *in vitro* da sequência de nucleótidos específicos presentes no ácido desoxirribonucleico (DNA) circular do parasita. Este é um método bastante específico e sensível para várias amostras de tecidos (Gomes et al., 2006). A extracção de DNA pode ser feita a partir de amostras de sangue total, da fracção leucocitária (buffy coat), fluidos biológicos, medula óssea, linfonodos e pele. De acordo com diversos estudos, a PCR dos linfonodos é usada como primeira linha na detecção e seguimento terapêutico (Maia & Campino, 2008), no entanto a PCR de exsudados conjuntivais tem mostrado ser um método não invasivo e com resultados bastantes consistentes, já as amostras de sangue, apesar de fáceis de obter, não são as melhores para determinar DNA de *Leishmania* spp., pois o patogéneo não é abundante em circulação como é na pele ou linfonodos (Baneth & Aroch, 2008).

Estudos epidemiológicos têm mostrado que os cães podem ser seronegativos e positivos à PCR e vice-versa. Este conflito de resultados são consequência da presença de cães assintomáticos que foram expostos à *Leishmania* spp., mas que ainda não tiveram tempo de desenvolver infecção. É recomendado uma monitorização contínua dos cães que não apresentam sinais clínicos com repetição dos testes a cada 3 meses. Cães sintomáticos geralmente são positivos a ambos os métodos, no entanto um resultado negativo à PCR de um cão suspeito e com sinais clínicos evidentes, significa que tem a infecção mas ainda não ocorreu doença. Com isto pode-se concluir que a Lcan é um bom exemplo de doença em que a infecção não é igual a doença clínica (Baneth & Aroch, 2008).

A interpretação da PCR deve ser feita de forma cautelosa e em combinação com métodos serológicos sobretudo em animais assintomáticos e a decisão do tratamento de cães saudáveis e apenas positivos ao PCR não é recomendado (Solano-Galego et al., 2009).

Teste de Montenegro

O teste de Montenegro é um teste que consiste na inoculação intra-dérmica de uma suspensão com promastigotas inactivados diluídos em fenol. Esta suspensão injecta-se em diferentes locais da pele e após 48 a 72 horas observam-se os resultados. Se positivo é de esperar um endurecimento do local da injeção de aproximadamente 5 mm de diâmetro, se

negativo não ocorre nenhuma reacção. Este é um teste simples e barato e tem a vantagem de se poder fazer no campo a um elevado número de animais em simultâneo (Maia & Campino, 2008).

1.7. TRATAMENTO

Desde os primeiros casos de Leishmaniose quer em cães quer em humanos que o tratamento tem sido alvo de muitos estudos. Um tratamento de sucesso pode ter significados diferentes, isto é, para o Médico Veterinário e proprietário, tratamento de sucesso significa que houve remissão de sintomatologia clínica, no entanto se nos referirmos a um parasitologista, este só considera que há sucesso no tratamento quando há cura parasitológica, ou seja, quando há eliminação completa do parasita no hospedeiro (Baneth & Shaw, 2002).

Vários estudos e várias drogas têm sido utilizadas no tratamento da Leishmaniose, quer em cães quer em humanos. Na tabela 2 apresentam-se vários protocolos terapêuticos que são frequentemente utilizados na prática clínica.

Antimoniais Pentavalentes – Glucantime ®

O Glucantime ® tem sido no passado e mantém-se no presente o grupo de fármacos mais utilizado no tratamento da Leishmaniose. A sua forma de actuação é através da inibição de enzimas que requerem a oxidação de ácidos gordos e glicolíticos (Greene, 2006). O protocolo mais comum é a administração de 100 mg/ kg por dia, durante 3 a 4 semanas, por via subcutânea ou intramuscular, no entanto a primeira é preferida. Oitenta por cento do fármaco é excretado via renal após 9 horas da sua administração. Dada a via de excreção, um dos efeitos adversos deste fármaco é a nefrotoxicidade, para além da dor no local de injeção e se administrado por via intramuscular da possível formação de fibrose ou abscessos locais (Baneth & Shaw, 2002). Apesar de algumas desvantagens, este grupo de fármacos reduzem rapidamente os sinais clínicos (Moritz et al., 1999).

Alopurinol – Zyloric ®

O alopurinol é um fármaco derivado das purinas bastante usado em medicina humana e em medicina veterinária para a prevenção de cálculos de urato. Tem sido mais recentemente usado para o tratamento da Leishmaniose (Rose, 2005). Este incorpora-se no ácido ribonucleico (RNA) leishmanial e leva a uma falha na translação proteica. É administrado via oral numa dose de 15 a 30 mg/kg, duas vezes ao dia, por um longo período

de tempo, produzindo uma remissão dos sinais clínicos semelhantes aos antimoniais pentavalentes (Baneth & Shaw, 2002). Os efeitos secundários são raros, no entanto a função hepática e renal devem de ser monitorizadas. Após o uso prolongado podem ocorrer xantúria e urólitos de xantina, sobretudo em animais com a função renal comprometida (Plevraki et al., 2006).

Combinação dos Antimoniais Pentavalentes com Alopurinol

A combinação dos antimoniais pentavalentes com o alopurinol tem sido objecto de estudo e comumente usados pelo sinergismo que actuam entre ambos. Esta combinação tem mostrado de forma eficaz a remissão dos sinais clínicos e permite uma terapia mais curta com os antimoniais pentavalentes, diminuindo os efeitos tóxicos do fármaco e os seus custos, visto este ser mais caro que o alopurinol (Manna et al., 2009).

O tratamento inicia-se com um ciclo de antimoniais pentavalentes a uma dose de 100 mg/kg por dia, durante 20 dias, em combinação com 15 a 30 mg/kg duas vezes ao dia de alopurinol. Após o primeiro ciclo de 20 dias, o tratamento mantém-se com o alopurinol na mesma dose e frequência (Baneth & Shaw, 2002).

Miltefosina – Milteforan ®

Pertence ao grupo dos alquifosfolípidos e são um novo agente anti-tumoral que induzem a morte celular por apoptose e pela alteração do metabolismo da membrana plasmática. Alguns estudos feitos em animais infectados naturalmente e com doença renal, mostraram uma boa resolução da sintomatologia, inclusive redução da carga parasitária quantificada por PCR em tempo real. A miltefosina é administrada oralmente a uma dose de 2 mg/kg por dia, durante 28 dias. Não há evidências de alterações renais e hepáticas, no entanto podem ocorrer efeitos gastrointestinais de carácter moderado como vômito e diarreia (Barrientos et al., 2007).

Antibacterianos:

Anfotericina B

É um antibiótico antifúngico derivado dos polienos, cujo mecanismo de acção se baseia em provocar a permeabilização da membrana plasmática do parasita pela interacção com o ergosterol, formando poros aquosos que favorecem a perda dos constituintes celulares e levam à morte do parasita pela lise osmótica (Barrientos et al., 2007). A anfotericina B é

administrada a uma dose de 0.5 mg/kg, 2 a 3 vezes por semana via endovenosa, durante aproximadamente 2 meses (Solano-Galego et al., 2009).

Este fármaco mostrou uma grande eficácia na remissão dos sinais clínicos, no entanto o seu uso é limitado em medicina veterinária pela dificuldade de administração e por induzir nefrotoxicidade através da vasoconstrição renal (Baneth & Shaw, 2002).

Aminosidas

É um antibiótico aminoglicosídico que mostra bons resultados na remissão dos sinais clínicos mas que não é muito recomendado dada a sua alta nefrotoxicidade e ototoxicidade. Este é administrado por via intramuscular numa dose de 10 a 20 mg/ kg por dia, durante 14 a 30 dias (Baneth & Shaw, 2002).

Pentaminas

É uma diamina aromática utilizada no tratamento de infecções por tripanossoma e durante muitos anos foi o tratamento de segunda eleição de Leishmaniose. O seu mecanismo de acção está relacionado com a interacção com o RNA e desorganização do DNA. O tratamento é feito por via intramuscular profunda a uma dose de 4 mg/kg por dia durante 5 a 7 semana ou durante 20 doses feitas em dias alternados (Barrientos et al., 2007). Os efeitos adversos incluem irritação muscular no local da injeção e podem induzir hipotensão, taquicardia e vômito (Baneth & Shaw, 2002).

Outros fármacos:

Outros fármacos como metronidazol, quinolonas (enrofloxacina e marbofloxacina) e antifúngicos (quetoconazol e fluconazol) têm sido estudados no tratamento da Leishmaniose em humanos, cães e animais de laboratório. Estes têm-se mostrado menos eficazes quer na remissão dos sinais clínicos, quer na cura parasitológica quando comparados com outros protocolos terapêuticos, não sendo ainda muito utilizados na prática clínica (Barrientos et al., 2007).

Aos animais que se encontram doentes com compromisso da função renal e hepática, pode ser necessário fazer um tratamento sintomático e ainda complementar o tratamento instituído com fluidoterapia, de forma a restaurar a necessidade de fluidos e o equilíbrio ácido-base (Greene, 2006).

Tabela 2. Alguns protocolos terapêuticos utilizados no tratamento da Lcan.

Principio Activo	Nome Comercial	Dose recomendada	Posologia	Via de administração
Antimoniais pentavalentes	Glucantime®	75 a 100 mg/kg/dia	3 a 4 semanas	SC
Alopurinol	Zyloric®	20 mg/kg/dia	1 a 12 meses	VO
Antimoniais pentavalentes mais Alopurinol	Glucantime® + Zyloric®	1º Ciclo: 100 mg/kg/dia de Glucantime + 15 a 30 mg/kg/2x dia de Alopurinol 2º Ciclo: 15 a 30 mg/kg/2x dia de Alopurinol	1º Ciclo: 20 dias 2º Ciclo: 1 a 12 meses	SC + VO
Miltefosina	Milteforan®	2 mg/kg/dia	28 dias	VO
Anfotericina B	Fungizone	0.5 a 0.8 mg/kg/2 a 3 x/semana	2 meses	IV
Aminosidas	Gabrocol®	10 a 20 mg/kg/dia	14 a 30 dias	IM
Pentaminas		4 mg/kg/dia	5 a 7 semanas ou 20 doses alternadas	IM

Legenda: SC – subcutânea, VO – via oral, IV – intravenosa, IM – intramuscular.

1.8. CONTROLO E PROFILAXIA

O controlo da Leishmaniose é complicada pela diversidade de vectores, parasitas e hospedeiros reservatórios e as intervenções variam muito de acordo com a epidemiologia da região (Killick-Kendrick, 1999). O controlo implica a intervenção em 2 frentes: controlo do vector e controlo do hospedeiro reservatório/ definitivo.

Controlo do Vector

As medidas implementadas para o controlo dos vectores podem ser tomadas através de soluções insecticidas para casas, meio ambiente e animais. Esta é uma medida preventiva que deve ser levada a cabo, mas não é a que oferece melhores resultados, visto actuar apenas no estado adulto do flebótomo e não nas suas formas larvares. A solução mais usada é a aplicação directa das soluções no animal e várias são as formulações com que podem ser aplicadas. Insecticidas tópicos para protegerem o cão contra os insectos incluem soluções, *spot-on*, *sprays* e colares. *Sprays* que contenham Permetrina e Piriproxifeno são recomendados de 3 em 3 semanas em cães adultos e de 2 em 2 semanas em cachorros, já os *spot-on* que contenham Imidacloprida e Permetrina são recomendados de 4 em 4 semanas. Os colares impregnados com Deltametrina libertam o insecticida gradualmente e distribuem-se gradualmente no tecido adiposo subcutâneo, durante 1 a 2 semanas, e têm em condições óptimas, um efeito protector de 6 a 8 meses (Alexander & Maroli, 2003; Green, 2006).

Para a eliminação total dos vectores, medidas drásticas teriam de ser aplicadas, como a destruição completa do seu habitat seguida da criação de condições que impeçam o retorno do insecto (Killick-Kendrick, 1999).

Controlo dos hospedeiros reservatórios/definitivos

Os efeitos do controlo da Lcan nos hospedeiros reservatórios em áreas endémicas têm sido controversos e geralmente pouco eficazes. Programas de abate de animais sintomáticos e seropositivos têm sido propostos mas não têm sido usados, não só pela inaceitabilidade por parte dos proprietários, como também pela elevada taxa de animais assintomáticos e infectados (Roze, 2005; Greene, 2006).

Algumas medidas preventivas podem ser levadas a tomadas pelo proprietário, como: manter o animal dentro de casa durante o crepúsculo até amanhecer, reduzir os microhabitats favoráveis aos insectos, como águas paradas, usar insecticidas no ambiente e usar repelentes de insectos directamente no cão. Outra medida preventiva que poderá vir um dia ser levada a cabo é a vacinação do animal. Este método ainda se encontra a ser estudado e tem sido até agora o que promete resultados mais promissores (Solano-Galego et al., 2009).

Existem 3 tipos de vacinas: as vacinas inactivadas (primeira geração), vacinas vivas atenuadas (segunda geração) e vacinas purificadas a partir de fracções de DNA (terceira geração) (Dantas-Torres, 2006). As vacinas de terceira geração são as que têm apresentado

maior sucesso, nomeadamente as que têm origem em fracções de DNA da *L. donovani*. (Solano-Galego et al., 2009).

De uma forma geral, a forma mais eficaz de controlar a Lcan, é a união de todas as medidas preventivas exercidas sobre os cães e medidas ambientais para controlar o vector. Ao mesmo tempo deve procurar realizar-se melhor o diagnóstico de forma a identificar correctamente os animais infectados e animais doentes e encontrar uma vacina eficaz, capaz de controlar a expansão da doença canina e humana.

1.9. PROGNÓSTICO

Esta é uma doença que até aos dias de hoje o tratamento não é possível e na maioria das vezes os animais sofrem recidivas. Desta forma, o prognóstico é tido como reservado e depende de diversos factores, como resposta individual à terapêutica instituída, resposta imunitária, deterioração do estado geral, envolvimento renal e diagnóstico precoce da doença. O proprietário deverá ser alertado de que apenas ocorrerá a remissão dos sinais clínicos, nunca a cura parasitológica (Solano-Galego et al., 2009).

III. RASTREIO DA LEISHMANIOSE CANINA NA ZONA DA ARRÁBIDA

O presente estudo de prevalência da Lcan na zona da Arrábida, concelho de Setúbal, surgiu durante a realização de um estágio curricular no Hospital Veterinário da Arrábida complementado por um estágio no departamento de Parasitologia do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária de Lisboa. O estágio teve a duração de 5 meses e durante esse período foi possível observar um elevado número de cães infectados com sintomatologia e resultados laboratoriais variáveis.

1. MATERIAL E MÉTODOS

Durante o estágio hospitalar que decorreu entre 6 de Outubro de 2009 e 15 de Janeiro de 2010, foi feita a colheita de 60 amostras de sangue de cães de variadas raças, sexo e idade (tabela I do anexo). Esta colheita foi realizada após um exame clínico detalhado não apenas a cães suspeitos de serem portadores da infecção, mas também a cães não suspeitos que por algum outro motivo compareceram no hospital. As recolhas de sangue foram feitas por punção venosa, na veia jugular e sob as devidas condições de assepsia.

Após recolha, os sangues foram colhidos para dois tubos de EDTA, um tubo de Heparina e um tubo seco. Das amostras de sangue total colhidas para tubo de EDTA, uma foi utilizada para a realização de hemograma no hospital e outra foi refrigerada para posterior análise no LNIV. As amostras em tubo de Heparina foram sujeitas a uma centrifugação e uma parte do soro serviu para fazer medição de parâmetros bioquímicos¹ e outra parte foi congelado para posterior estudo serológico no LNIV. Por fim, as amostras colhidas em tubo seco foram mandadas para análise imunológica/ perfil de hemoparasitas em Laboratório certificado². O perfil de hemoparasitas consistiu na análise serológica para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* (titulação de 1/80, 1/160, 1/240 e 1/320), anti-*Babesia canis*, anti-*Rickettsia conorii* e anti-*Ehrlichia canis*.

Aos animais que apresentaram comprometimento renal foi realizada uma colheita de urina e medição do rácio de proteína/creatinina na urina, o UPC, que quantifica o grau de proteinúria. No caso de um animal em tratamento prolongado com alopurinol, foi ainda realizada uma ecografia e radiografia abdominal para pesquisa de cálculos de xantina.

¹ Tratando-se de um estudo epidemiológico, criou-se um modelo de parâmetros bioquímicos padrão constituídas por Ureia, Creatina, Proteínas Totais, Albulinas e ALT.

² DNAtch. Investigação Científica e Análises Moleculares, Lda.

Na componente laboratorial foram utilizados 3 meios de diagnóstico, nomeadamente a técnica de IFI, DAT e PCR. Para a análise por IFI e DAT foi utilizado soro recolhido após centrifugação do tubo de Heparina e conservado por congelação em tubos de *ependorf*. Depois do soro se encontrar descongelado foram efectuadas titulações de 1/50, 1/100 e 1/200 na IFI e titulações de 1/100, 1/200, 1/400 e 1/800 no DAT. Os resultados obtidos por ambos os testes, inclusive PCR, encontram-se descritos na tabela V do anexo.

até 1/200 e 1/800 respectivamente. Após a obtenção e *screening* dos resultados obtidos pelos métodos serológicos, foi realizado a PCR apenas aos animais suspeitos positivos dada a técnica ser relativamente dispendiosa, morosa e requerer um técnico experiente. Este teste foi feito pela extracção de DNA a partir de amostras de sangue total recolhido em tubo de EDTA e conservado aproximadamente a 5°C no frigorífico.

Concluído todo o trabalho clínico e laboratorial, foi efectuado um estudo de estatística descritiva da Lcan na zona da Arrábida. Inicialmente são apresentados os dados estatísticos, no qual é feita uma correlação entre a prevalência da idade, sexo e raça da amostra estudada. Posteriormente é feita uma correlação dos sinais clínicos com os resultados laboratoriais apresentados pela população de animais infectados sintomáticos e assintomáticos.

Os dados obtidos foram trabalhados no programa Microsoft®EXCEL e foram expostos ao longo do trabalho pela forma de gráficos através da construção de tabelas inseridas nos anexos.

2. Resultados

No estudo foi feita a identificação individual da população dos 60 animais suspeitos e não suspeitos que se encontra descrita na tabela I do anexo. Do total, 34 destes animais se encontravam infectados o que corresponde a uma taxa de prevalência da infecção de 57%. Destes 34 animais infectados, 20 (33%) eram sintomáticos e 14 (23%) eram portadores assintomáticos, como se encontra descrito na tabela VI do anexo.

Da população de animais infectados, 82% (28/34) eram machos e 18% (6/34) eram fêmeas, ao passo que em relação à população total 67% (40/60) eram machos e 33% (20/60) eram fêmeas. Seja da população total ou da população de animais infectados, a proporção de machos é superior à proporção de fêmeas.

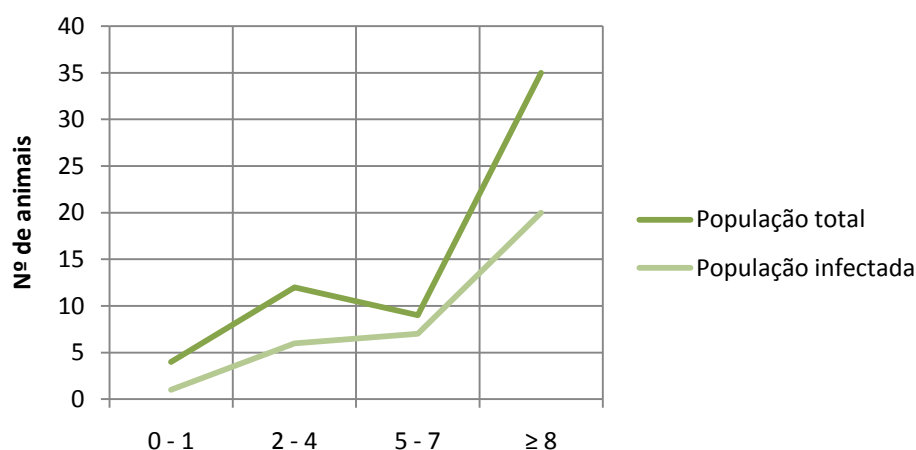
A população de animais deste estudo incluiu cães com idades compreendidas entre os 2 meses e os 16 anos. De forma a avaliar a variável idade quer da população total, quer da

população infectada, foi feita uma distribuição de idades em 4 grupos. Um primeiro grupo de cachorros com idades compreendidas entre os 0 meses e 1 ano, um segundo grupo com idades compreendidas entre os 2 e os 4 anos, um terceiro grupo de animais adultos com idades entre os 5 e os 7 anos e um último grupo de animais com idade igual ou superior a 8 anos. Estes dados encontram-se inseridos na tabela 3 e expressos numérica e estatisticamente no gráfico 1. Pode observar-se que, quer na população total, quer na amostra de animais infectados, a média de idades foi de 8 e 7 anos respectivamente. Quanto à frequência de idades pode observar-se através do gráfico 1 que não há qualquer distribuição bimodal, principalmente na população infectada e que há um aumento evidente no grupo de animais com idade igual ou superior a 8 anos.

Tabela 3. Distribuição de idades da população total e população infectada.

Idade (anos)	População total (n=60)	População infectada (n=34)
0-1	4 (7%)	1 (3%)
2-4	12 (20%)	6 (18%)
5-7	9 (15%)	7 (21%)
≥ 8	35 (58%)	20 (58%)

Gráfico 1. Distribuição de idades da população total e população infectada.



Quanto à prevalência das raças, constatou-se que do total da população, 68% (41/60) destes animais são de raça pura, 25% (15/60) são de raça indeterminada e aproximadamente 7% (4/60) são cruzamentos entre cães de raças puras com cães de raça indeterminada (tabela

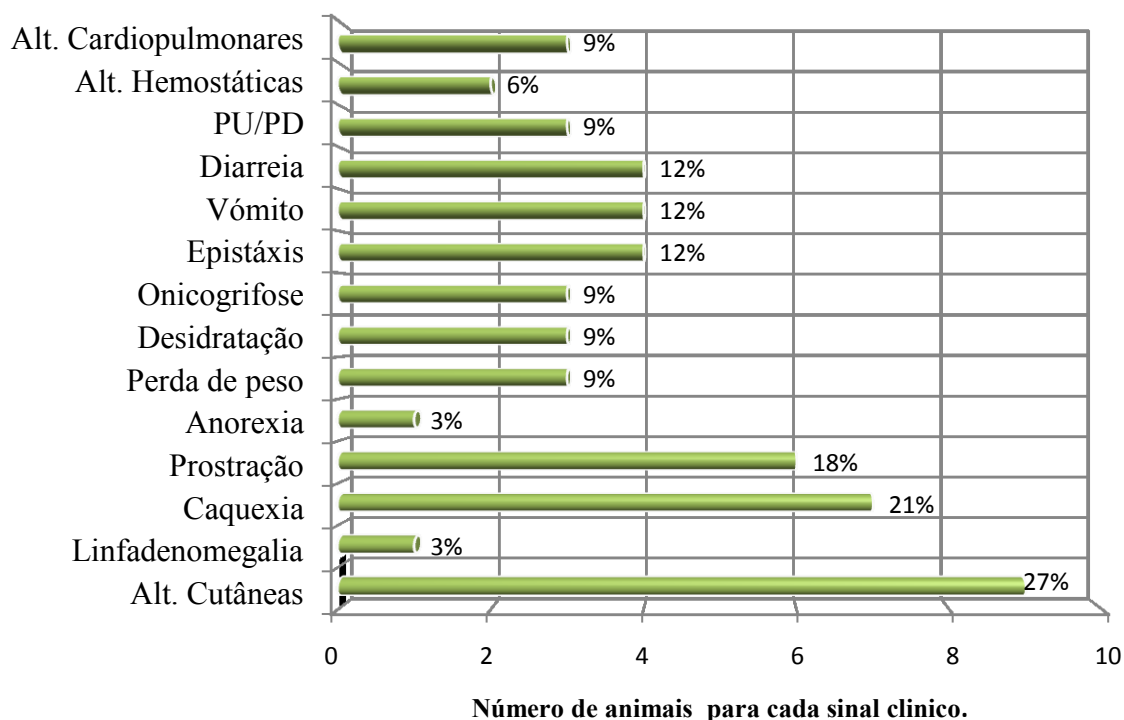
4). Os cães de raça pura foram os que tiveram maior afluência à clínica e verificou-se que estes também tiveram uma taxa de prevalência da infecção mais elevada. Da população infectada, 56% (19/34) eram de raça pura, 35% (12/34) de raça indeterminada e 9% (3/34) resultante de cruzamentos. No entanto, ao comparar ambas as populações podemos verificar que, para os animais de raça indeterminada e animais resultantes de cruzamentos, a taxa de prevalência da doença é bastante elevada, pois dos 15 animais de raça indeterminada da população total, 12 estavam infectados, o que resulta numa prevalência de 80% (12/15). Nos 4 animais cruzados, 3 estavam infectados o que resulta numa taxa de 75% (3/4) (tabela 4).

Tabela 4. Frequência de raças na população total e infectada por Lcan.

Raça	População total (n= 60)	População infectada (n=34)
Raça pura	41 (68%)	19 (56%)
Indeterminado	15 (25%)	12 (35%)
Cruzamentos	4 (7%)	3 (9%)

Apresentados os dados estatísticos da prevalência da idade, sexo e raça, segue-se a correlação entre a sintomatologia dos animais infectados com os resultados laboratoriais.

Durante a realização das consultas foi feito um registo da sintomatologia clássica coincidente com Lcan. Os sinais clínicos de cada animal estão descritos no anexo II e expressos pela sua frequência no gráfico 2. Os sinais clínicos frequentes foram as alterações cutâneas, como alopecia simétrica peri-orbital, prurido e descamação em 27% (9/34), seguido de caquexia e prostração em 21% (7/34) e 18% (6/34) respectivamente. Diarreia, vômito e epistaxis ocorreram na mesma proporção com uma frequência de 12% (4/34) e perda de peso, desidratação, onicogribose, PU/PD e alterações cardiopulmonares ocorreram numa proporção de 9% (3/34). Raro foi a linfadenomegalia em conjunto com a anorexia observando-se em apenas 6% (2/34) e 3% (1/34) respectivamente.

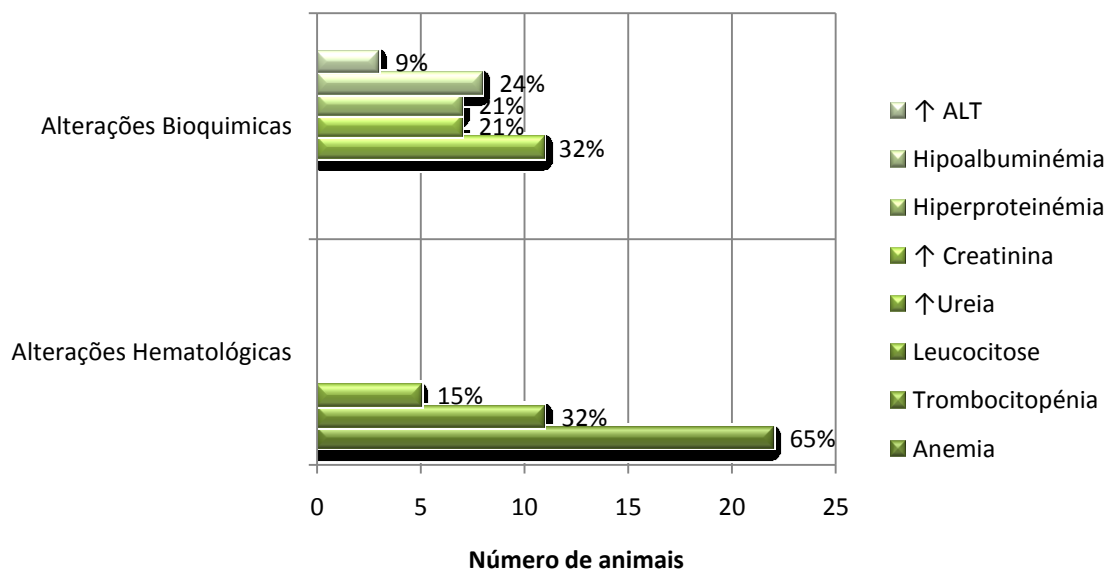
Gráfico 2. Sinais clínicos clássicos de Lcan na amostra de animais infectados

Os resultados dos exames complementares efectuados na clínica encontram-se compilados em forma de tabela nos anexos III e IV.

Na análise do perfil hematológico (gráfico 3), verificou-se que 65% (22/34) dos animais infectados tinham anemia normocítica normocrômica, 32% (11/34) apresentavam trombocitopenia e 15% (5/34) tinham leucocitose dos quais 12% (4/34) eram acompanhados de neutrofilia.

Os parâmetros bioquímicos são úteis para avaliar o comprometimento da função renal e hepática e existência da activação da resposta humoral. Do grupo de animais infectados, 32% (11/34) tinham um aumento significativo dos níveis de ureia e 21% (7/34) tinham um aumento dos níveis de creatinina. Observou-se hipoalbuminemia e hiperproteinemia em 24% (8/34) e em 21% (7/34) dos animais respectivamente, no entanto apenas 3 destes animais, isto é, 9% tinham simultaneamente ambas as alterações bioquímicas. Uma vez que a lesão hepática, por norma não é muito severa, fez-se a análise de apenas um parâmetro bioquímico, a ALT e apenas em 9% (3/34) dos animais infectados se verificou o seu aumento.

Gráfico 3. Distribuição dos resultados do perfil hematológico e bioquímico dos animais infectados por Lcan.



Da população total apenas 33% (20/60) eram suspeitos de serem portadores da infecção. No entanto, 23% (14/60) eram portadores assintomáticos detectados posteriormente após análise laboratorial no LNIV. De todos os animais suspeitos e adicionalmente aos resultados de perfil hematológico e bioquímico, foram enviadas para laboratório certificado, *DNATech*, um total de 22 amostras de sangue em tubo seco para pesquisa serológica de anticorpos anti-*Leishmania*, anti-*Babesia canis*, anti-*Rickettsia conorii* e anti-*Ehrlichia canis*.

Tendo em conta o número de amostras analisadas, 73% (16/22) mostraram resultados positivos para Lcan, 9% (2/22) mostraram ser portadores de febre de carraça causada por *Rickettsia conorii* e 4,5% (1/22) causada por *Ehrlichia canis*. Ocorreu ainda um caso de uma infecção mista com *Ehrlichia canis* e *Rickettsia conorii* (Tabela 5).

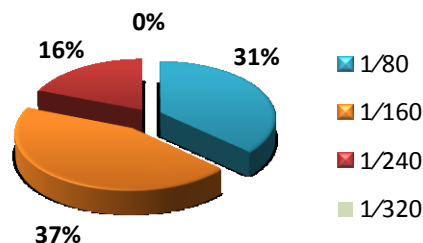
Tabela 5. Resultados do DNAtch.

Análise	N=22
Leishmaniose	16
Leishmaniose + <i>Ehrlichia canis</i>	0
Leishmaniose + <i>Rickettsia conorii</i>	0
Leishmaniose + <i>Babesia canis</i>	0
<i>Ehrlichia canis</i>	1
<i>Rickettsia conorii</i>	2
<i>Babesia canis</i>	0
<i>Ehrlichia canis</i> + <i>Rickettsia canis</i>	1
Negativos	2

Como já foi referido, a análise serológica de Leishmaniose consistiu em 4 titulações das quais 44% (7/16) foram positivos para a titulação 1/160, 37% (6/16) para a de 1/80, 19% (3/16) para 1/240 e por fim, não se observou qualquer resultado positivo para a titulação de 1/320 (Tabela 6, Gráfico 4).

Tabela 6. Resultados das titulações obtidos pelo DNAtch.

Titulação	N=16
1/80	6 (31%)
1/160	7 (37%)
1/240	3 (16%)
1/320	0 (0%)
Negativo	3 (16 %)

Gráfico 4. Distribuição dos resultados do DNAtch da tabela 6 expressos graficamente.

Foram efectuados exames ecográfico e radiográfico ao abdómen apenas ao animal número 57. Observou-se, ao exame ecográfico, uma perda da diferenciação córtico-medular acompanhada de uma diminuição do tamanho de ambos os rins. Ao exame radiográfico não se observaram quaisquer cálculos de xantina.

Para além dos exames complementares anteriores, foi feita uma análise de urina a 2 dos animais infectados, os animais números 26 e 57. Esta análise teve o intuito de medir o UPC cujos valores superiores a 0,5 são indicativos de proteinúria. Esta análise, assim como os exames ecográfico e radiográfico, não foram realizados aos restantes animais pois, para além de não terem o seu estado geral comprometido pela lesão renal, também havia uma contenção de custos por parte da maioria dos proprietários. As recolhas de urina aos dois animais foram efectuadas de diferentes formas. A urina do animal número 26 foi recolhida de forma livre ou micção natural³ e a do animal 57 foi recolhida por cistocentese⁴ eco-guiada. Os resultados foram para ambos os animais muito superiores a 0,5, isto é, de 4,4 para o animal 26 e 3,63 para o 57. Estes valores revelam a presença de uma proteinúria severa, traduzida pelo envolvimento glomerular grave.

Relativamente à terapêutica instituída após confirmação do diagnóstico, não vão ser apresentados nenhuns resultados estatísticos referentes às doses, frequência de administração e evolução terapêutica, uma vez que para além de ser um estudo direccionado à epidemiologia da doença, o tempo reduzido de estágio condicionou esta vertente impossibilitando a autora de seguir a evolução da terapêutica instituída. O protocolo preferido e geralmente seguido pelo HVA era a conjugação dos antimoniais pentavalentes administrados via subcutânea com o alopurinol administrado via oral. Consoante o estado geral do animal e evolução das lesões era realizada uma terapia complementar com corticosteróides.

No que se refere ao diagnóstico parasitológico efectuado no LNIV, foram utilizadas 3 técnicas diferentes, a IFI, DAT e PCR. Todas as 60 amostras de animais colhidas na clínica foram testadas por IFI e por DAT. Para ambos os métodos foi utilizado soro previamente obtido por centrifugação e posterior congelação. A PCR, por ser um método demorado e caro foi apenas realizado aos animais que mostraram ser positivos a todos os exames atrás descritos, quer da clínica quer do laboratório.

Durante a prática clínica, apenas 33% (20/60) dos animais eram suspeitos de ser portadores de Lcan. Após análise laboratorial foram detectadas as restantes 14 amostras

³ É isento de risco e deve ser realizada para um frasco de recolha de urina.

⁴ Consiste na punção da bexiga através da parede abdominal com agulha de 22 gauge.

positivas, em animais que não apresentavam qualquer suspeita na clínica e que são considerados assintomáticos, perfazendo uma prevalência total de 57% (34/60). Dos animais com sintomatologia, 16 deles mostraram positividade no DNAtch, IFI e DAT, os restantes 4 foram apenas positivos nos resultados de DNAtch. Dos animais assintomáticos, testados por IFI e DAT, o número 36 foi apenas positivo na IFI com uma titulação de 1/50. Este não apresentou qualquer sintomatologia, no entanto tinha os valores hematológicos e bioquímicos alterados.

Nas análises serológicas, observou-se para a IFI que a titulação de 1/50 ocorreu em maior número com uma frequência de 32% (11/34) dos animais, seguido dos animais suspeitos positivos⁵ com 24% (8/34). O resultado menos frequente foi o da maior titulação, isto é, a de 1/200 que ocorreu em 12% (4/34) dos casos. Quanto às titulações da DAT observou-se que as titulações 1/100 e 1/800 ocorreram em 35% (12/34) da população infectada, seguido das 1/200 e 1/400 com uma frequência de 9% (3/34) e 6% (2/34) respectivamente (tabela 6).

Apesar de não se poder correlacionar as titulações porque são técnicas diferentes, pode-se observar através da análise dos gráficos que existe uma elevada discrepância entre os resultados das titulações da IFI e do DAT. Um exemplo dessa discrepância é o resultado da maior titulação de ambos, isto é, a titulação de 1/200 na IFI ocorreu em apenas 12% dos casos, enquanto que a titulação de 1/800 esteve presente numa taxa de 35%.

Tabela 7. Titulações de IFI e DAT nos animais infectados.

IFI	Frequência para n=34	DAT	Frequência para n=34
-	4 (12%)	-	5 (15%)
S+	8 (24%)	1/100	12 (35%)
1/50	11 (32%)	1/200	3 (9%)
1/100	7 (20%)	1/400	2 (6%)
1/200	4 (12%)	1/800	12 (35%)

⁵ Amostras que apresentam fluorescência fraca.

Gráfico 5. Distribuição das titulações da IFI.

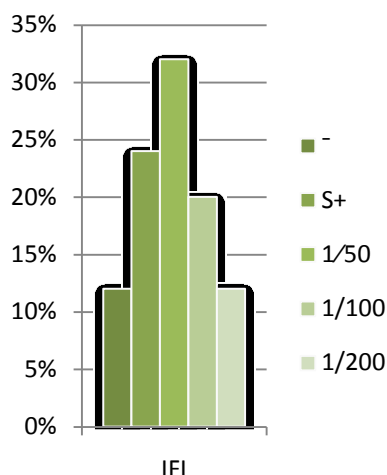
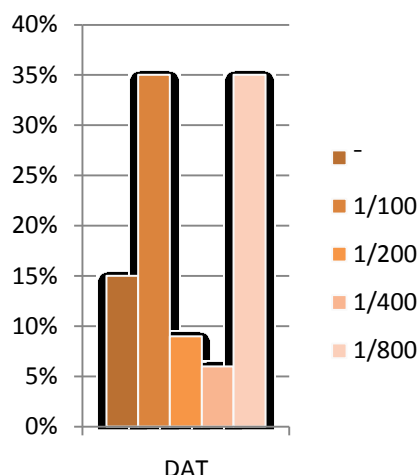


Gráfico 6. Distribuição das titulações do DAT.



Após análise serológica foi feito um PCR de 34 amostras de sangues totais correspondentes aos animais infectados sintomáticos e assintomáticos. No entanto, após duas repetições da técnica não se observaram resultados positivos para Lcan.

4. Discussão

O estudo epidemiológico elaborado durante o período de estágio curricular incidiu sobre uma amostra de 60 animais da espécie canina da zona da Serra da Arrábida. A amostra utilizada é relativamente pequena e de uma zona muito restrita, o que permite apenas fazer um estudo observacional da amostra e comparação com os dados da literatura.

Da população em estudo (n=60) determinou-se uma taxa de prevalência da doença de 57% (34/60) dos quais 33% (20/60) eram animais com sintomatologia e 23% (14/60) portadores assintomáticos. Como descrito na literatura, foi possível observar que os machos eram os mais afectados, talvez por existirem também em maior número quando comparados com as fêmeas (Miranda et al., 2008).

Relativamente à idade não foi observado, neste estudo, qualquer distribuição bimodal como se encontra descrito (Miranda et al., 2008; Moreno & Alvar, 2002). A média de idades dos animais levados à clínica foi de 8 anos, talvez por isso também a proporção de animais afectados tenham idades iguais ou superiores a 8 anos. Estes animais são possivelmente os

mais afectados pela fragilidade do seu sistema imunitário devido às suas condições de geriátrico e pelo facto de manifestarem mais facilmente lesão renal.

Quanto à prevalência das raças mais afectadas pela Lcan, constatou-se que as raças indeterminadas e animais resultantes de cruzamentos entre raças definidas tinham uma prevalência da doença bastante mais elevada quando comparados com os animais de raça pura. Os animais de raça pura representavam 68% (41/60) da amostra total e corresponderam a 56% (19/34) dos animais infectados por Lcan. Destes animais observou-se que as raças mais afectadas foram o Labrador, Pitbull e Bobtail.

A Lcan é uma doença sistémica que afecta inúmeros órgãos e que se manifesta por uma grande variedade de sintomas, muitas vezes inespecíficos (Solano-Galego, 2009). A sintomatologia clássica e também a mais frequente na amostra em estudo foram, as alterações cutâneas, anorexia e prostração.

As lesões cutâneas estiveram presentes em 27% da população infectada e as manifestações mais frequentes foram seborreia seca com descamação nas extremidades do pavilhão auditivo e alopecia simétrica peri-orbital. Onicogribose ocorreu apenas em 9% da população infectada. Caquexia e prostração foram sinais muito frequentes ocorrendo com frequências de 21 e 18% respectivamente. Alterações hemostáticas e gastrointestinais ocorreram na mesma proporção, isto é, em 12% da população sendo a epistaxis a alteração hemostática observada com maior frequência, da mesma forma que o vómito e diarreia foram as alterações gastrointestinais mais observadas.

O envolvimento renal demonstrado pela PU/PD foi pouco frequente, isto é, ocorreu numa taxa de apenas 9%. Este facto pode justificar-se pela falta de controlo do consumo de água e frequência de micção dos animais pelos proprietários, uma vez que a maior parte deles habitam na rua. Os principais sinais clínicos que levam os proprietários a dirigirem-se à clínica e que também podem ser sinais inespecíficos de envolvimento renal, são a prostração, anorexia, vómito e diarreia que foram bastante frequentes. Pela avaliação dos parâmetros bioquímicos, observou-se que ocorreu um aumento dos níveis de ureia em 32% dos animais, que nos leva a crer que havia comprometimento renal. Tudo isto contraria os apenas 9% de sintomatologia renal encontrado durante o exame clínico.

As alterações cardiopulmonares observaram-se com uma frequência de 9%. As manifestações mais frequentes foram taquicardia e taquipneia possivelmente pela ocorrência de anemia coexistente. Foram encontrados ainda 2 animais com doença cardíaca, no entanto não encontramos nenhuma ligação desta patologia com a Lcan. Estes 2 animais foram

considerados portadores assintomáticos, uma vez que a única alteração encontrada foi a doença cardíaca e ter sido descoberta acidentalmente pelos métodos laboratoriais de IFI e DAT.

A linfadenomegalia e anorexia estão descritas na literatura como sinais bastante frequentes (Greene, 2006), no entanto na nossa amostra ocorreram apenas com uma frequência de 6 e 3% respectivamente. As lesões oculares ocorrem regularmente (Roze, 2005), no entanto não há registo de nenhum animal com sintomatologia ocular na amostra estudada.

Os resultados revelados pelos exames complementares confirmaram a presença de anemia em cerca de 65% dos animais. A maioria dos animais com anemia tinha simultaneamente os valores de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina abaixo dos parâmetros considerados normais. Das possíveis causas de anemia em animais com Lcan, a epistáxis, a hemólise e a insuficiência renal são das causas que poderão estar na origem da maior parte das anemias da amostra em estudo. Trombocitopénia ocorreu em 32% dos animais infectados, possivelmente pela presença de hemorragias e comprometimento renal e hepático. Em nenhum dos casos foi realizada a medição dos níveis de PT, APTT e produtos de degradação de fibrinogénio, pois para além de nenhum animal se encontrar em risco de vida por alterações hemostáticas, também havia uma elevada contenção de custos por parte dos proprietários. Quanto à presença de leucocitose, foram observados 15% de animais com esta alteração hematológica, dos quais 12% eram acompanhados de uma neutrofilia.

Dentro dos parâmetros bioquímicos, constatou-se que dos animais infectados, 32% apresentaram um aumento dos níveis de ureia e 21% dos níveis de creatinina. Estes parâmetros permitem avaliar a função renal pelo que o seu aumento indicia um comprometimento. A avaliação da doença renal deve ser realizada ainda através do auxílio de um exame ecográfico, que nos permite obter uma imagem da estrutura dos rins, e de uma urianálise a partir de uma amostra de urina colhida por cistocentese eco-guiada. Em último recurso e na impossibilidade de realização de uma ecografia, a amostra de urina pode ser colhida de forma livre. Desta amostra de urina deve ser feita uma tira de urina e uma medição do UPC para quantificar o grau de proteinúria.

Como consequência à lesão renal, pode ocorrer uma hipoalbuminémia devido à perda de proteína por nefropatia (Ikeda-Garcia et al., 2006). No entanto, como consequência ao estabelecimento da resposta imunitária contra o parasita pode ocorrer simultaneamente à hipoalbuminémia uma hiperproteinémia. A hiperproteinémia ocorre pela activação da

resposta humoral com activação dos linfócitos B e consequente aumento da produção de imunoglobulinas (Medeiros et al., 2008). Verificou-se na nossa amostra que 24% dos animais apresentavam hipoalbuminémia e 21% apresentavam hiperproteínémia, no entanto apenas 9% tinham ambas as alterações simultaneamente.

As alterações hepáticas também foram avaliadas apesar de raramente ocorrerem. Quando ocorrem manifestam-se pelo aumento das enzimas hepáticas e diminuição das provas de coagulação (PT, APTT e PDF) (Rallis et al., 2005). Devido à existência de contenção de custos por parte dos proprietários fez-se apenas análises aos valores de ALT. Verificou-se que 9% dos animais tinham elevações dos níveis desta enzima como já havia sido descrito anteriormente na revisão bibliográfica.

Após exame clínico e análises hematológicas efectuadas no hospital, verificou-se que da nossa população de 60 animais, apenas 33% (20/60) dos animais eram suspeitos de serem portadores de Lcan. Sempre que ocorria uma suspeita era enviado para laboratório certificado uma amostra de sangue em tubo seco para pesquisa de Leishmaniose, *Babesia canis*, *Rickettsia conorii* e *Ehrlichia canis* por métodos serológicos obtendo-se resultados em pouco mais de 24 horas, permitindo instituir rapidamente uma terapia ou avaliar a evolução terapêutica por parte do clínico. Para além dos 20 animais suspeitos, foram enviadas mais duas amostras para pesquisa apenas de *Babesia canis*, *Rickettsia conorii* e *Ehrlichia canis*. Do total das 22 amostras analisadas, 16 mostraram positividade para a Lcan.

Quanto à terapêutica instituída, apesar de não serem apresentados resultados, observou-se que esta é condicionada pelo estado geral do animal e sobretudo pelas condições monetárias e possibilidades de deslocação à clínica. A conjugação dos antimoniais pentavalentes com o alopurinol é a opção de escolha pelo HVA pela sua rápida eficácia e por envolver menos custos, no entanto, quando não era possível a deslocação do proprietário diariamente à clínica estabelecia-se um tratamento com alopurinol e miltefosina, tratamento mais caro, mais lento na remissão da sintomatologia, com mais efeitos adversos, mas possível de ser realizado em casa.

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado por meio de técnicas parasitológicas, serológicas e/ou moleculares. Das técnicas parasitológicas a que mais se aplica na prática clínica é a observação directa das formas amastigotas do parasita a partir de esfregaços sobretudo dos linfonodos poplíteos (Maia & Campino, 2008). Durante o período de estágio hospitalar não foi observada nenhuma aspiração de linfonodos. Isto não se verificou porque, independentemente do resultado do esfregaço, era sempre enviada uma amostra de sangue

para DNAtch, uma vez que os resultados são mais rápidos, desta forma evitava-se não só, mais uma despesa ao proprietário, como também a realização de um procedimento invasivo.

Sendo as técnicas parasitológicas na sua grande maioria invasivas e com baixa sensibilidade, foram utilizadas para a realização deste estudo epidemiológico duas técnicas serológicas (IFI e DAT), para analisar toda a população, complementadas por uma técnica molecular (PCR) para analisar apenas as amostras positivas às técnicas serológicas.

Foram efectuadas titulações de 1/50, 1/100 e 1/200 na IFI e de 1/100, 1/200, 1/400 e 1/800 no DAT. Na IFI a titulação 1/50 foi a mais frequente com 11 resultados positivos das 34 amostras analisadas e a de menor frequência foi a titulação de 1/200. Quanto ao DAT pôde-se observar que as titulações 1/100 e 1/800 ocorreram em maior e na mesma frequência, isto é, em 12 das 34 amostras analisadas, seguido das 1/200 e 1/400 com menor frequência.

O PCR por ser um método caro e demorado foi apenas realizado aos animais que apresentavam simultaneamente sintomatologia compatível com Lcan, alterações nos perfis hematológicos e bioquímicos e resultados de DNAtch, IFI e DAT positivos. Foram deste modo, testadas 34 amostras de DNA extraído de sangue total dos respectivos animais. Após duas repetições da técnica não se observaram quaisquer resultados positivos para Lcan. Estes resultados negativos podem ser justificados pela ausência do agente em circulação sanguínea. Apesar de ser um método bastante específico e sensível para várias amostras, a causa mais provável foi o tipo de amostra usada. Segundo o que se encontra descrito na literatura o sangue total não é a amostra mais adequada para a técnica, uma vez que o parasita não é abundante em circulação sanguínea, como é por exemplo na pele ou linfonodos podendo ocorrer resultados negativos mesmo quando o animal manifesta doença (Baneth & Aroch, 2008).

5. Conclusão

O estudo epidemiológico da Lcan, demonstrou uma elevada prevalência da doença na zona da Arrábida. Verificou-se que 57% da população canina estudada encontrava-se infectada e que muitos dos cães infectados não manifestavam qualquer sintomatologia, sendo descobertos pelo estudo laboratorial. Estes animais assintomáticos constituem um elevado risco para a população canina, uma vez que são reservatórios e possibilitam a transmissão da doença.

Por ser uma doença sem sintomatologia patognomónica, o seu diagnóstico é muitas vezes difícil e de elevado custo, pelo que se torna necessária a conjugação de vários meios

complementares de diagnóstico para se obter a confirmação. No entanto, as condições sócio-económicas dos proprietários são actualmente uma grande condicionante, o que obriga ao médico veterinário a fazer uma selecção dos meios de diagnóstico utilizados, de forma a obter resultados fiáveis com rapidez e ao menor custo.

As condições económicas não condicionam apenas o diagnóstico da doença, mas também o tratamento estabelecido. O Médico Veterinário deverá sensibilizar o proprietário para o custo da doença, quer a nível de diagnóstico quer a nível do tratamento. O proprietário deverá estar consciente de que a cura total não existe, mas apenas a remissão da sintomatologia, pelo que poderão ocorrer recidivas que levam à necessidade de avaliações clínicas e laboratoriais frequentes de modo a se instituir uma novo ciclo terapêutico.

Apesar de ser uma zona endémica, há uma grande falta de informação da existência da Lcan na zona e possivelmente em todo o país por parte da população geral e que a maioria dos proprietários recebeu a informação da sua existência de com surpresa. O papel do Médico Veterinário é essencial para a informar e sensibilizar os proprietários acerca da existência da doença e formas de prevenção aquando da primeira vacinação/consulta.

IV. BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. (2005). Glossário. *Imunologia Celular e Molecular*. (5ª edição, pp. 499 e 502). São Paulo: Saunders Elsevier.
- Adamama-Moraitou, K.K., Rallis, T.S., Koytinas, A.F., Tontis, D., Plevraki, K., Kritsepi, M. (2007). Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: A prospective study. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, 76 (1), 53-57.
- Alexander, B., Maroli, M. (2003). Control of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 17, 1-18.
- Andrade, R.A., Araújo, M.S.S., Reis, A.B., Gontijo, C.M.F., Vianna, L.R., Mayrink, W, et al. (2009). Advances in flow cytometric serology for canine visceral leishmaniasis: Diagnostic applications when distinct clinical forms, vaccination and other canine pathogens become a challenge. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128, 79-86.
- Baneth, G., Aroch, I. (2008). Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. *The Veterinary Journal*, 175, 14-15.
- Baneth, G., Koutinas, A.F., Gallego-Solano, L., Bourdeau, P., Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, 24, 324-330.
- Baneth, G., Shaw, S.E. (2002). Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 106, 315-324.
- Barbiéri, C.L. (2006). Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 28, 329-337.
- Barrientos, M.M., Góngora, C.E., Torres, C.M., Corrales, G.M. (2007). Tratamiento. *Canis et Felis*, 89, 72-84.
- Bates, P.A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37, 1097-1106.
- Blavier, A., Keroack, S., Denerolle, Ph., Goy-Thollot, I., Chabanne, L., Cadore, J.L., et al. (2001) Atypical Forms of Canine Leishmaniosis. *The Veterinary Journal*, 162, 108-120.
- Canine Leishmaniasis Working Group (CLWG): Canine Leishmaniasis. (2007). Guidelines for Diagnosis, Staging, Therapy, Monitoring and Prevention. Disponível em: www.gruppoleishmania.org/files/veterinaria_2007_eng.pdf

- Ciaramella, P., Corona, M. (2003) Canine Leishmaniasis: Clinical and Diagnostic Aspects. *Compendiu*, 26, 359-367.
- Ciaramella, P., Pelagalli, A., Cortese, L., Pero, M.E., Corona, M., Lombardi, P., et al. (2004). Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical finding in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *The Veterinary Journal*, 169, 465-467.
- Cortes, S., Afonso, M.O., Alves-Pires, C., Campino, L. (2007). Stray Dogs and Leishmaniasis in Urban Areas, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 13, 1431-1432
- Costa-Val, A.P., Cavalcanti, R.R., Gontijo, N., F., Machalick, M., S., M., Alexander, B., Williams, P., et al. (2006). Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *The Veterinary Journal*, 174, 636-643.
- Coutinho, M.T.Z., Bueno, L.L., Sterzik, A., Fujiwara, R.T., Botelho, J.M., Maria, M., et al. (2005). Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 128, 149-155.
- Dantas-Torres, F. (2006). Leishmune® vaccine: The newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. *Veterinary Parasitology*, 141, 1-8.
- Dujardin, J.C., Campino, L., Cañavate, C., Dedet, J.P., Gradoni, L., Soteriadou, K. (2008). Spread of Vector-borne Diseases and Neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 1013-1017.
- Ferreira, E.C., Lana, M., Carneiro, M., Reis, A.B., Paes, D.V., Silva, E.S., et al. (2007). Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis presenting different clinical manifestations. *Veterinary Parasitology*, 146, 235-241.
- Freitas, E., Melo, M.N., Costa-Val, A.P., Michalick, M.S.M. (2005). Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology*, 137, 159-167.
- Gama, R.O.G, Laranjeira, D.F., Aguiar, P.H.P, Barrouin-Melo, S.M. (2009). Ultrasound evaluation of the kidneys of dogs with visceral leishmaniasis. 34th World Small Animal Veterinary Congress, São-Paulo, Brasil, 2009.

- Gomes, Y.M., Cavalcanti, M.P., Lira, R.A., Abath, F.G.C, Alves, L.C. (2006). Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *The Veterinary Journal*, 175, 45-52.
- Greene, C.E. (2006). Leishmaniasis. *Infectious diseases of the dog and cat*. (3th edition, pp. 685-698). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Ikeda-Garcia, F.A., Lopes, R.S., Ciarlini, P.C., Marques, F.J., Lima, V.M.F., Perri, S.H.V., et al. (2006). Evaluation of renal and hepatic functions in dogs naturally infected by visceral leishmaniasis submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Research in Veterinary Science*, 83, 105-108.
- Iniesta, L., Gállego, M., Portús, M. (2004). Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 103, 77-81.
- Killick-Kendrick, R. (1999). The biology and controlo f Phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, 17, 279-289.
- Laurenti, M.D. (2009). Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. *Bepa*, 6, 13-23.
- Linda, M, Keith, M. (2001). Small Animal Dermatology. *A Color Atlas and Therapeutic Guide*. (1st edition, p. 102), USA: W.B. Saunders Company.
- López-Pena, M., Alemañ, N., Muñoz, F., Fondevila, D., Suárez, M.L., et al. (2009). Visceral leishmaniasis with cardiac involvement in a dog: a case report. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 1-3.
- Maia, C., Campino, L. (2008). Metgods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 158, 274-287.
- Maia, C., Nunes, M., Campino, L. (2008). Importance of Cats in Zoonotic Leishmaniasis in Portugal. *Vector-Born and Zoonotic Diseases*, 8, 555-559.
- Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Picillo, E., Neglia, G., Vescio, F. (2009). Study of efficacy of miltefusine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. *The Veterinary Journal*, 182, 441-445.
- Medeiros, C.M.O., Melo, A.G.C., Lima, A.K.F., Silva, I.N.G., Oliveira, L.C., Silva, M.C. (2008). Perfil haematológico de cães com Leishmaniose visceral no município de Fortaleza, Ceará. *Ciência Animal*, 18, 43-50.

- Miranda, S., Roura, X., Picado, A., Ferrer, L., Ramis, A. (2008). Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. *Research in Veterinary Science*, 85, 35-38.
- Moreno, J., Alvar, J. (2002) Canine Leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, 18, 399-405.
- Moritz, A., Steuber, S., Greiner, M. (1999). Clinical follow-up examination after treatment of canine leishmaniasis. *Tokai J. Exp. Clin. Med*, 23, 279-283.
- OnLeish: Observatório Nacional das Leishmanioses (2008). *A Leishmaniose Canina*. Disponível em: <http://www.onleish.org/index.php?article=22&visual=3>
- Plevraki, K., Koutinas, A.F., Kaldrymidou, H., Roumpies, N., Papazoglou, L.G., Saridomichelakis, M.N. (2006). Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *J. vet. Intern. Med*, 20, 228-233.
- Pugliese, A., Di Pietro, S., Giudice, E. (2006). Clinical and Diagnosis Patterns of Leishmaniasis in the Dog. *Veterinary Research Communications*, 30, 39-43.
- Rallis, T., Day, M.J., Saridomichelakis, M.N., Adamama-Moraitou, K.K., Papazoglou, L., et al. (2005). Chronic Hepatitis Associated with Canine Leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a Clinicopathological Study of a 26 cases. *J. Comp. Path.*, 132, 145-152.
- Rolão, L., Martins, M.J., João A., Campino, L. (2005). Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite*, 12, 183-186.
- Roze, M. (2005). Canine Leishmaniasis. A spreading disease. Diagnosis and treatment. *EJCAP*, 15, 39-50.
- Santos, R.L. (2009). Genital lesions and venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. 34th World Small Animal Veterinary Congress, São-Paulo, Brasil, 2009.
- Silva, F.L., Oliveira, R.G., Silva, T.M.A., Xavier, M.N., Nascimento, E.F., Santos, R.L. (2009). Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 160, 55-59.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., et al. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 1651-18.

V. ANEXOS

Anexo 1. Identificação individual da população total observada no HVA.

Nº Animal	Nome	Raça	Sexo	Idade (anos)
1	Scoby	Indeterminado	Macho	6
2	Roque	Indeterminado	Macho	5
3	Jonas	Pitbull	Macho	2
4	Samba	Indeterminado	Macho	16
5	Zaruky	Basset Grifon	Macho	12
6	Luna	Rottweiler	Fêmea	6
7	Oscar	Boxer	Macho	11
8	Barbie	Bobtail	Fêmea	12
9	Alfa	Galgo x Leão da Rodésia	Fêmea	14
10	Afonso	Cocker Spaniel	Macho	12
11	Xuxa	Cocker Spaniel	Fêmea	14
12	Ribarina	Yorkshire-Terrier	Fêmea	9
13	Rafa	Pastor Alemão	Macho	2
14	Oscar	Indeterminado	Macho	16
15	Ninja	Labrador	Macho	9
16	Benji	Indeterminado	Macho	11
17	Bebe	Bobtail	Macho	12
18	Rei-má	Indeterminado	Macho	7
19	Sandy	Caniche	Fêmea	7
20	Ringo	Labrador	Macho	8
21	Dick	Braco Alemão	Macho	8
22	Tita	Labrador	Fêmea	8
23	Elvis	Pincher Anão	Macho	3
24	Vob	Pastor Alemão	Macho	3
25	Diana	Labrador	Fêmea	5
26	Aragon	Cruzado de Husky	Macho	8
27	Boneco	Yorkshire-Terrier	Macho	1
28	Marley	Yorkshire-Terrier	Macho	1
29	Pitucha	Indeterminado	Fêmea	8
30	Francisca	Buldogue Francês	Fêmea	11
31	Roger	Indeterminado	Macho	9
32	Preta	Dogue Alemão	Fêmea	11
33	Bolinhas	Serra da Estrela	Macho	2
34	Fix	Braco Alemão	Macho	2
35	Rex	Serra da Estrela	Macho	12
36	Langão	Serra da Estrela	Macho	10

37	Jara	Boxer	Fêmea	8
38	Luca	Indeterminado	Macho	3
39	Bobí	Caniche	Macho	8
40	Nala	Staforshire Bull Terrier	Fêmea	9
41	Bolinha	Pequinois	Macho	7
42	Tito	Indeterminado	Macho	12
43	Pit	Pitbull	Macho	1
44	Kuka	Weimareiner	Fêmea	2
45	Nancy	Labrador	Fêmea	11
46	Twice	Indeterminado	Macho	8
47	Patapufe	Caniche	Macho	4
48	Laica	Labrador	Fêmea	4
49	Quica	Bulldog Francês	Fêmea	0.16
50	Rex	Pastor Alemão	Macho	11
51	Mutty	Cruzado de Pudengo	Macho	3
52	Ninja	Indeterminado	Macho	7
53	Zooky	Cruzado de Caniche Toy	Macho	15
54	Zara	Indeterminado	Fêmea	9
55	Bia	Serra da Estrela	Fêmea	13
56	Simba	Indeterminado	Macho	14
57	Côco	Golden Retriever	Macho	13
58	Melly	Indeterminado	Fêmea	8
59	Trigo	Labrador	Macho	4
60	Yesterday	Indeterminado	Macho	7

Anexo 2. Sintomatologia clínica apresentada pela população total recolhida pelo exame clínico durante as consultas efectuadas no HVA.

Animal	Sinais Clínicos
1	Alopécia bilateral no ápice do pavilhão auricular
2	Seborreia seca com descamação
3	Alopécia circular na zona periocular e focinho com descamação epitelial, adenopatias, perda de peso
4	Controlo hepático
5	Doença cardiovascular
6	Claudicação do MPD, sintomatologia do Neurónio Motor Inferior
7	Anorexia, andamento em círculos, lesão central
8	Doença cardiovascular
9	Doença cardiovascular
10	Doença cardiovascular
11	Tumor no abdómen
12	Vómito com sangue, prostrada, taquipneica, T ^a 40.6 °C
13	Prostrado, taquicárdico, taquipneico, vômito, apático, T ^a 40.3 °C. Elevada quantidade de ectoparasitas
14	Alopécia generalizada no abdómen caudal característico de DAPP ¹
15	Controlo de plaquetas devido a trombocitopenia auto-imune
16	Mucosas pálidas e secas, prega de pele, perda de peso progressivo
17	Epistaxis unilateral esquerda. Suspeita de recidiva de Leishmaniose
18	Lesões cutâneas coincidentes com Leishmaniose, onicogribose
19	Ruptura do ligamento cruzado do Membro Posterior Direito
20	Epistaxis unilateral direita abundante desde há uma semana antes de vir à consulta
21	Estado geral normal. Tetraplegia repentina sem causa aparente
22	Prostrada, PU/PD, vômito, diarreia, abdómen doloroso à palpação
23	Controlo de plaquetas devido a trombocitopenia auto-imune
24	Alopécia periocular bilateral coincidente com lesões de Leishmaniose
25	Seborreia seca com descamação, dores durante locomoção, mucosas pálidas e secas
26	Emagrecimento progressivo, vômitos, fezes moles, T ^a 40.7 °C
27	Abdómen exposto por atropelamento
28	Vacinação
29	Destartarização
30	Análises de controlo de Leishmaniose visceral antiga
31	Obeso, vômitos, desconforto abdominal
32	Dilatação/ Torção gástrica

¹ DAPP- Dermatite alérgica por picada de pulga

33	Laceração necrosada do Membro Posterior Direito
34	Controlo de epilepsia
35	PU/PD, incontinência urinária
36	Chegou à urgência prostrado, sem respostas a estímulos externos, abdómen doloroso à palpação, parâmetros vitais diminuídos
37	Mastectomia total da cadeia mamária esquerda
38	Caquético, mucosas muito pálidas e secas, descamação periocular bilateral, seborreia seca generalizada, proveniente de canil
39	Controlo de epilepsia
40	Paralisia após embate contra a parede
41	Paralisia por compressão medular entre L1-L2
42	Prostrado e caquético
43	Anorexia, fezes moles, epistáxis, descamação epilabial, onicogribose
44	Caquexia e desidratação extrema. Pouco activa
45	Mastectomia total da cadeia mamária direita
46	Diarreia profusa, prostrado, pouco reactivo aos estímulos externos, T ^a 40.4 °C, proveniente de canil
47	Abdómen agudo, dificuldades de locomoção
48	Prostrada desde há dois dias, diminuição do apetite
49	Diarreia, perda de peso, T ^a 39.8 °C
50	Displasia da anca
51	Castração
52	Epistáxis unilateral esquerda, petéquias na mucosa labial
53	Convulsões, tremores, astenia, epilepsia
54	Lesões vaginais compatíveis com Tumor Venéreo Transmissível
55	Laceração da ponta da cauda
56	Síndrome vestibular periférico por otite média
57	Emagrecimento repentino, PU/PD, já lhe foi diagnosticado Leishmaniose em 2006, diminuição do apetite
58	Caiu das escadas, muito prostrada, anorética
59	Descamação periocular e epilabial coincidente com Leishmaniose cutânea
60	Caquético, proveniente de um canil, onicogribose

Anexo 3. Resultados de hemograma obtidos pelo HVA de cada animal após recolha de sangue para tubo de EDTA.

Animal	RBC (5.50-8.50)	HCT (37.-55.)	HGB (12.-18.)	MCV (60.-77.)	MCH (18.50-30.)	WBC (5.50-16.90)
1*	5.97	42.2	16.5*	70.6	27.59	57.9
2*	1.92	14.6	9.6	76.4	50.07	7.38
3*	4.07	25.0	11.1	61.4	27.31	6.68
4	5.97	40.0	15.1	67.0	25.35	4.78
5*	6.27	44.7	16.3	71.2	26.04	6.41
6	6.60	45.1	18.3	68.4	27.73	9.18
7	5.99	42.2	13.9	70.5	23.23	7.15
8*	6.15	44.9	15.4	73.1	25.02	18.21
9	3.70	27.4	16.5	73.9	44.58	7.26
10	4.31	30.1	14.4	69.9	33.37	3.82
11	4.74	30.9	11.0	65.2	23.20	32.21
12	4.89	37.3	21.4	76.3	43.73	15.25
13*	4.94	36.8	21.2	74.5	42.83	17.78
14*	3.29	15.9	9.7	48.2	29.41	8.79
15	2.89	22.2	12.7	76.8	43.89	7.96
16*	3.68	27.1	15.7	73.5	42.55	6.74
17*	3.22	25.1	12.8	78.0	39.93	9.62
18*	3.32	24.9	13.3	74.9	39.97	7.10
19	6.99	49.7	15.9	71.2	22.83	10.29
20*	2.50	18.5	10.6	73.8	42.21	6.44
21*	6.99	49.7	15.9	71.2	22.83	10.29
22	4.74	30.9	11.0	65.2	23.20	32.21
23*	3.78	29.0	16.3	76.7	43.18	13.87
24	6.98	49.2	16.5	70.4	23.66	12.79
25*	2.40	17.1	9.6	71.5	39.95	7.46
26*	3.45	22.6	12.2	65.4	35.29	6.36
27	3.42	26.5	17.3	77.7	50.51	16.25
28	4.40	30.3	16.8	68.9	38.27	25.14
29*	7.25	52.6	17.6	72.6	24.29	7.16
30*	3.1	25	6.6	62	----	2.24
31*	4.99	39.7	19.5	79.5	39.07	10.77
32	3.29	15.9	9.7	48.2	29.41	8.79
33	8.34	36.7	15.4	44.0	18.53	16.67
34	5.54	26.4	12.3	47.6	22.21	5.09
35*	7.81	40.9	13.8	52.4	17.63	5.16
36*	1.57	11.9	9.6	76.2	61.35	14.04
37*	2.79	21.8	14.6	78.0	52.42	14.46
38*	1.56	11.9	7.5	76.6	47.89	7.43
39*	3.24	24.6	16.9	75.9	52.15	9.36

40*	2.03	17.2	14.0	84.7	68.91	10.90
41*	1.14	9.3	12.3	81.7	----	9.88
42*	4.74	30.9	11.0	65.2	23.20	32.21
43*	6.79	46.9	14.9	69.1	21.96	5.64
44	4.54	33.0	11.8	72.7	25.93	27.54
45	7.19	37.8	14.3	52.6	19.87	15.95
46*	5.76	42.1	14.6	73.1	25.30	8.54
47	7.48	52.5	17.5	70.1	23.42	9.29
48	2.22	16.7	13.5	75.5	60.84	5.31
49	8.03	39.4	12.3	49.1	15.30	7.14
50	6.20	45.4	16.4	73.2	26.46	18.82
51*	7.62	56.5	17.9	74.2	23.54	12.44
52*	5.57	39.6	13.9	71.0	24.98	8.77
53*	5.73	41.3	14.7	72.1	25.65	10.84
54	6.46	37.4	11.3	57.9	17.56	11.14
55	7.05	50.5	16.2	71.6	22.90	14.77
56	6.26	47.4	17.8	75.7	28.36	8.23
57*	5.25	39.5	13.8	75.1	26.30	18.04
58	9.30	62.0	19.3	66.7	20.80	8.63
59*	6.27	43.8	14.6	69.9	23.34	8.56
60*	2.5	23.3	10.2	67.4	65.0	----

Legenda: RBC – Eritrócitos; HCT – Hematócrito; HGB – Hemoglobina; MCV – Volume Corpuscular Médio; MCH – Hemoglobina Corpuscular Média; WBC – Leucócitos; * - Animais infectados com Lcan; Animais com anemia; - Animais com leucocitose.

Continuação do anexo 3

Animal	NEU (2.-12.)	LINF (0.50-4.90)	MONO (0.30-2.)	EOS (0.10-1.49)	BASO (0.-0.10)	PLT (175.-500.)
1*	9.81	7.45	----	----	----	----
2*	4.10	2.38	0.75	0.10	0.05	115
3*	4.39	1.21	0.73	0.31	0.04	125
4	3.95	0.34	0.36	0.09	0.03	154
5*	4.00	1.23	0.74	0.40	0.04	306
6	5.71	1.67	0.84	0.87	0.09	472
7	4.66	1.30	0.93	0.25	0.02	320
8*	15.02	0.84	2.08	0.23	0.04	284
9	5.65	0.47	0.78	0.26	0.10	182
10	2.37	0.61	0.37	0.44	0.03	301
11	29.40	0.73	1.87	0.18	0.03	187
12	11.23	2.35	1.33	0.25	0.08	323
13*	14.10	0.67	2.68	0.20	0.12	203
14*	5.08	1.37	0.39	1.90	0.06	361
15	6.66	0.23	0.99	0.03	0.05	96
16*	4.77	0.81	0.92	0.18	0.05	211
17*	7.12	0.69	1.13	0.62	0.07	27
18*	4.03	0.87	0.91	1.23	0.06	248
19	7.60	1.30	0.92	0.45	0.02	324
20*	3.71	1.90	0.55	0.22	0.05	236
21*	7.60	1.30	0.92	0.45	0.02	324
22	29.40	0.73	1.87	0.18	0.03	187
23*	11.17	0.86	1.63	0.16	0.06	257
24	8.29	2.02	2.20	0.24	0.03	566
25*	4.65	0.80	0.70	1.27	0.05	49
26*	5.53	0.35	0.30	0.14	0.03	82
27	8.66	0.54	1.11	5.92	0.02	86
28	20.65	0.66	3.39	0.28	0.16	112
29*	4.52	2.05	0.46	0.12	0.02	256
30*	1.7	0.29	0.19	0.05	0.02	170
31*	9.38	0.44	0.73	0.17	0.07	329
32	5.08	1.37	0.39	1.90	0.06	361
33	12.60	1.01	1.07	1.91	0.09	345
34	3.04	0.85	0.58	0.61	0.01	362
35*	2.14	2.45	0.33	0.24	0.01	457
36*	12.34	0.46	0.95	0.22	0.07	251
37*	12.0	0.59	1.41	0.37	0.10	168
38*	5.90	0.47	0.95	0.05	0.06	217
39*	5.17	2.24	0.93	0.96	0.07	87
40*	9.24	0.58	0.80	0.20	0.07	291
41*	6.25	1.24	2.21	0.12	0.06	61

42*	29.40	0.73	1.87	0.18	0.03	187
43*	3.80	1.18	0.54	0.10	0.02	150
44	17.82	2.25	6.77	0.69	0.02	329
45	8.70	5.87	0.86	0.48	0.05	174
46*	5.57	1.72	1.07	0.14	0.04	321
47	6.94	1.63	0.57	0.11	0.05	312
48	3.86	0.77	0.53	0.11	0.04	246
49	3.07	3.23	0.34	0.49	0.01	507
50	14.15	2.14	2.04	0.44	0.05	586
51*	8.03	2.56	0.82	0.99	0.05	219
52*	6.43	1.36	0.54	0.44	0.01	58
53*	8.97	0.66	1.08	0.10	0.03	371
54	6.96	1.24	2.19	0.75	0.02	395
55	11.99	0.79	1.88	0.10	0.02	326
56	6.46	0.73	0.91	0.11	0.02	347
57*	14.40	1.44	1.92	0.25	0.04	515
58	6.10	1.58	0.60	0.34	0.01	290
59*	5.01	0.04	0.93	0.57	0.02	229
60*	----	----	----	----	----	135

Legenda: NEU – Neutrófilos; LINF – Linfócitos; MONO – Monocitos; EOS – Eosinófilos; BASO – Basófilos; PLT – Plaquetas; * - Animais infectados com Lcan;
 - Animais com neutrofilia; - Animais com trombocitopénia.

Anexo 4. Resultados das bioquímicas e DNAtch obtidos após recolha durante a consulta para tubo de Heparina e tubo Seco respectivamente no HVA.

Animal	Ureia (7.-27.)	Creatinina (0.5-1.8)	PT (5.2-8.2)	Globulinas (2.5-4.5)	Albuminas (2.3-4.)	ALT (10.-100.)	DNAtch
1*	13	0.9	6.1	3.1	3.0	103	Leish. + 1/80
2*	29	1.7	8.0	5.2	1.7	58	Leish. + 1/160
3*	48	1.8	10.8	8.4	2.4	10.0	Leish. + 1/160
4	11	0.6	7.0	3.5	3.5	10	----
5*	24	1.6	7.5	2.7	3.0	14	----
6	14	1.5	7.0	3.9	3.0	77	----
7	13	1.2	6.2	4.0	2.2	70	----
8*	12	1.2	6.8	4.0	2.8	10	----
9	50	1.6	6.2	3.3	2.9	136	----
10	23	0.7	7.0	4.1	2.9	37	----
11	35	1.7	6.9	5.2	1.8	800	----
12	12	0.5	5.6	3.5	2.1	10	----
13*	40	1.5	7.9	4.8	3.2	73	Leish. + 1/80
14*	61	2.5	5.4	2.5	2.9	30	----
15	23	0.9	7.9	5.5	2.4	18	Rickettsia +
16*	11	7.3	8.4	4.6	2.7	10	Rickettsia e Ehrlichia +
17*	19	1.1	8.3	4.9	3.4	13	Leish.+ 1/160
18*	15		6.1	3.6	2.5	85	Leish. + 1/160
19	9	0.6	6.8	3.5	2.9	10	----
20*	33	1.9	8.9	6.5	2.9	64	Leish. + 1/240
21*	9	0.6	6.4	3.5	2.9	10	----
22	52	2.3	7.4	5.5	1.9	10	----
23*	27	1.6	7.3	4.5	2.8	29	Rickettsia +
24	16	0.7	6.6	4.0	2.7	48	Leish. -
25*	26	1.1	5.6	4.0	1.6	10	Leish. + 1/160
26*	7	1.0	11.0	9.1	1.9	515	Ehrlichia +
27	21	0.8	5.0	3.5	1.7	10	----
28	61	2.5	5.4	2.5	2.9	30	----
29*	17	0.9	6.5	3.5	3.0	10	----
30*	13	0.9	8.9	6.5	2.5	10	Leish. + 1/80
31*	17	1.1	6.9	4.1	2.8	26	----
32	12	1.2	4.7	3.5	1.2	10	----
33	35	1.0	6.2	4.0	2.3	790	----
34	16	0.7	6.6	4.0	2.7	48	----
35*	12	1.2	6.8	4.0	2.8	10	----
36*	46	1.1	6.0	3.5	2.5	27	----
37*	19	0.8	7.0	4.6	2.4	54	----
38*	43	0.6	9.2	7.8	1.4	21	Leish. + 1/240

39*	24	1.0	6.5	3.5	3.0	30	----
40*	14	0.6	7.0	3.7	3.3	10	----
41*	17	0.5	5.8	3.4	2.4	108	----
42*	52	2.3	7.4	5.5	1.9	10	Leish. -
43*	21	0.8	5.0	3.5	1.5	10	Leish. + 1/80
44	23	0.9	5.9	4.2	1.8	131	----
45	13	1.4	7.9	5.4	2.5		----
46*	42	1.9	6.2	3.4	2.8	53	Leish. + 1/160
47	17	0.8	6.8	3.8	3.0	10	----
48	13	1.0	6.5	3.8	2.7	10	----
49	23	1.0	6.8	4.1	2.8	10	----
50	13	0.9	6.7	3.9	2.8	201	----
51*	15	1.2	6.7	4.0	2.7	10	----
52*	14	0.9	6.5	3.8	2.7	10	Leish. + 1/80
53*	20	0.7	6.3	3.7	2.5	10	----
54	6	0.8	6.1	4.2	1.9	10	----
55	21	0.7	6.3	3.7	2.6	39	----
56	20	0.8	6.6	3.6	3.0	10	----
57*	36	2.7	6.2	4.7	1.5	10	Leish. + 1/80
58	29	1.0	6.8	3.5	3.3	25	----
59*	15	0.9	7.6	5.1	2.5	10	Leish.+ 1/160
60*	33	1.9	9.3	3.4	4.1	112	Leish.+ 1/240

Legenda: PT – Proteínas Totais, ALT – Alanina Aminotransferase; * - Animais infectados; - Animais com níveis de ureia e creatinina aumentados; - Animais com hiperproteinémia; Animais com hipoalbuminémia; Animais com ALT aumentadas.

Anexo 5. Resultados laboratoriais obtidos no LNIV.

Animal	IFI	DAT	PCR
1	1/200	1/200	-
2	1/200	1/800	-
3	1/200	1/800	-
4	-	1/800	nr
5	S+	1/100	-
6	-	-	nr
7	-	-	nr
8	S+	1/100	-
9	-	-	nr
10	-	-	nr
11	-	-	nr
12	-	-	nr
13	S+	1/100	-
14	S+	1/100	-
15	-	-	nr
16	1/50	1/100	-
17	-	-	-
18	1/50	1/200	-
19	-	1/100	nr
20	1/50	1/100	-
21	1/200	1/800	-
22	-	-	nr
23	1/50	1/100	-
24	-	-	nr
25	1/100	1/800	-
26	1/50	1/100	-
27	-	-	nr
28	-	-	nr
29	1/50	1/200	-
30	1/50	1/800	-
31	1/50	1/400	-
32	-	-	nr
33	-	-	nr
34	S+	-	nr
35	1/50	1/800	-
36	S+	-	-

37	1/100	1/800	-
38	-	-	-
39	1/100	1/800	-
40	1/100	1/800	-
41	S+	1/100	-
42	S+	-	-
43	1/100	1/800	-
44	-	-	nr
45	-	-	nr
46	-	1/800	-
47	1/100	1/400	nr
48	-	1/800	nr
49	S+	-	nr
50	-	1/800	nr
51	1/50	1/100	-
52	1/100	1/800	-
53	S+	1/100	-
54	-	1/800	nr
55	-	-	nr
56	-	-	nr
57	-	-	-
58	1/100	1/800	nr
59	1/50	1/100	-
60	1/100	1/400	-

Legenda: IFI – Imunofluorescência Indirecta; DAT – Teste de Aglutinação Directa; PCR – Polymerase Chain Reaction; S+ - Suspeito positivo; nr – não realizado

Anexo 6. Compilação de resultados da população de cães infectados.

Número animal	Sinais Clínicos	Alterações Hematológicas	Alterações Bioquímicas	Resultado DNAtch	Resultado IFI	Resultado DAT	Observações
1	✓	x	x	1/80	1/200	1/200	Sintomático
2	✓	✓	✓	1/120	1/200	1/800	Sintomático
3	✓	✓	✓	1/160	1/200	1/800	Sintomático
5	x	x	x	----	S+	1/100	Assintomático
8	x	x	x	----	S+	1/100	Assintomático
13	✓	✓	✓	1/80	S+	1/100	Sintomático
14	✓	✓	✓	----	S+	1/100	Sintomático
16	✓	✓	x	Neg	1/50	1/100	Sintomático
17	✓	✓	x	1/160	-	-	Sintomático
18	✓	✓	✓	1/160	1/50	1/200	Sintomático
20	✓	✓	x	1/240	1/50	1/100	Sintomático
21	x	x	x	----	1/200	1/200	Assintomático
23	x	✓	x	Neg	1/50	1/100	Assintomático
25	✓	✓	✓	1/160	1/100	1/800	Sintomático
26	✓	✓	✓	Neg	1/50	1/100	Sintomático
29	x	x	x	----	1/50	1/200	Assintomático
30	✓	✓	✓	1/80	1/50	1/800	Sintomático
31	x	✓	x	----	1/50	1/400	Assintomático
35	x	x	x	----	1/50	1/800	Assintomático
36	x	✓	✓	----	S+	-	Assintomático
37	x	✓	✓	----	1/100	1/800	Assintomático
38	✓	✓	✓	1/240	-	-	Sintomático
39	x	✓	x	----	1/100	1/800	Assintomático
40	x	✓	x	----	1/100	1/800	Assintomático
41	x	✓	x	----	S+	1/100	Assintomático
42	✓	✓	✓	Neg	S+	-	Sintomático
43	✓	x	✓	1/80	1/100	1/800	Sintomático
46	✓	x	✓	1/160	-	1/800	Sintomático
51	x	x	x	----	1/50	1/100	Assintomático
52	✓	x	x	1/80	1/100	1/800	Sintomático
53	x	x	x	----	S+	1/100	Assintomático
57	✓	✓	✓	1/80	-	-	Sintomático
59	✓	x	✓	1/160	1/50	1/100	Sintomático
60	✓	✓	✓	1/240	1/100	1/400	Sintomático

Legenda: ✓ - Presente; x – Ausente; S+ - Suspeito positivo; Neg. - Negativo