



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**Clínica de animais de companhia**

**Cláudia Alexandra Quintino de Morais Zamite**

Orientação: Doutor Luís Martins

Coorientação: Dr. Luís Chambel

**Mestrado integrado em Medicina Veterinária**

Relatório de Estágio

Évora, 2015



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**Clínica de animais de companhia**

**Cláudia Alexandra Quintino de Morais Zamite**

Orientação: Doutor Luís Martins

Coorientação: Dr. Luís Chambel

**Mestrado integrado em Medicina Veterinária**

Relatório de Estágio

Évora, 2015

## *Agradecimentos*

À família e amigos próximos por me terem apoiado incondicionalmente durante estes últimos seis anos.

Ao Doutor Luís Martins, orientador interno, pelo tempo dispendido e apoio prestado na orientação do estágio curricular e elaboração do presente relatório.

Ao professor Saúl Semião-Santos pelas sugestões feitas.

A todos os membros da equipa do VetOeiras pelo carinho com que me receberam e por todos os conhecimentos que me transmitiram durante o estágio curricular, que contribuíram para o meu enriquecimento pessoal e profissional, enquanto estudante de medicina veterinária. Em especial, presto os meus sinceros agradecimentos ao Dr. Luís Chambel, orientador externo, pelo tempo dispendido, pela boa disposição transmitida no dia-a-dia e pelos conhecimentos partilhados.

Ao Sr. Luís pelo apoio técnico na recolha de dados de análises clínicas.

Aos meus colegas de estágio pelo espírito de equipa e interajuda.

Aos meus felinos, Poucaxuca, Loirinha e Pintas, que todos os dias me dão algo de especial.

E, às ondas do mar salgado e gelado da Ericeira, mais particularmente da Praia de Ribeira d'Ilhas, por me proporcionarem momentos de tranquilidade e me ajudarem a ultrapassar momentos mais difíceis.

## *Resumo*

O presente relatório é parte integrante do estágio curricular realizado no Hospital Veterinário Central da Linha de Cascais – VetOeiras. Na primeira parte descrevem-se brevemente as atividades desenvolvidas no decorrer do estágio, a nível casuístico, na área de clínica de animais de companhia. Na segunda parte desenvolve-se uma monografia sobre o tema “Leishmaniose canina”, constituída por uma revisão bibliográfica atualizada e uma análise retrospectiva de casos de canídeos acompanhados, em termos profiláticos e terapêuticos para infeção por *Leishmania infantum*, no VetOeiras, entre 2011 e 2015. A leishmaniose consiste numa doença parasitária, potencialmente fatal no cão, que é considerada endémica em várias regiões de Portugal e cujas estratégias profiláticas e terapêuticas atuais apresentam evidentes limitações. Tendo em conta os resultados obtidos, mais do que a utilização de repelentes de flebótomos e imunoprofiláticos, o pernoitar em ambiente interior parece ser determinante para prevenção da infeção.

**Palavras-chave:** estágio, clínica, leishmaniose, canídeos, prevenção.

## *Abstract*

### **Companion animal clinical practice**

The present report is an integrant part of the internship performed at the Hospital Veterinário Central da Linha de Cascais – VetOeiras. The first part is a brief description of the activities developed during the internship, with a description of cases observed in the small animal practice. The second parte consists of a monograph about the theme “Canine leishmaniosis”, with an updated literature review and a retrospective analysis of canine cases witch have been followed, in terms of prophylaxis and treatment, for *Leishmania infantum* infection, in VetOeiras, between 2011 and 2015. Leishmaniasis consists of a parasitic disease, potentially fatal for dog, that is considered as endemic in several regions of Portugal, whose actual profilactic and therapeutic strategies present evident limitations. Taking into account the obtained results, more than the use of sandflies repellants and immunoprophylactic measures, overnight housing seems to be crucial to prevent infection.

**Keywords:** internship, medicine, leishmaniasis, dog, prevention.

## **ÍNDICE GERAL**

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>I</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>II</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>II</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>V</b>
<b>Índice de tabelas</b> .....	<b>VI</b>
<b>Índice de gráficos</b> .....	<b>IX</b>
<b>Lista de abreviaturas, siglas e símbolos</b> .....	<b>X</b>
<b>I. Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>II. Relatório de atividades desenvolvidas durante o estágio curricular</b> .....	<b>1</b>
1. Casuística .....	2
1.1. Medicina preventiva .....	4
1.2. Clínica médica .....	7
1.2.1. Cardiologia .....	7
1.2.2. Pneumologia .....	8
1.2.3. Otorrinolaringologia .....	10
1.2.4. Urologia e nefrologia .....	10
1.2.5. Teriogenologia e neonatologia .....	10
1.2.6. Dermatologia .....	11
1.2.7. Doenças infetocontagiosas e parasitárias .....	13
1.2.8. Gastroenterologia .....	14
1.2.9. Estomatologia .....	15
1.2.10. Oncologia .....	16
1.2.11. Oftalmologia .....	17
1.2.12. Endocrinologia .....	18
1.2.13. Neurologia .....	19
1.2.14. Traumatologia .....	20
1.2.15. Ortopedia .....	20
1.2.16. Alergologia .....	22
1.2.17. Toxicologia .....	22
1.3. Clínica cirúrgica .....	24
<b>III. Monografia: Leishmaniose canina</b> .....	<b>26</b>
1. Revisão bibliográfica .....	26
1.1. Epidemiologia .....	26
1.2. Patogênese .....	32
1.3. Manifestações clínicas .....	37
1.4. Diagnóstico .....	39
1.4.1. Análises laboratoriais inespecíficas .....	40
1.4.1.1. Hematologia .....	40
1.4.1.2. Análise de perfil bioquímico sérico .....	40
1.4.1.3. Análise de proteínas séricas .....	41
1.4.1.4. Urinálise .....	41
1.4.2. Análises laboratoriais específicas .....	42

1.4.2.1. Testes de diagnóstico parasitológicos .....	42
1.4.2.2. Testes de diagnóstico serológicos .....	43
1.4.2.2.1 Imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio de imunoadsorção ligada a enzima (ELISA) .....	44
1.4.2.2.2 Teste de aglutinação direta (DAT) .....	45
1.4.2.2.3 Contraimuno-electroforese (CIE).....	46
1.4.2.2.4 Ensaio de imunodifusão (IDA).....	46
1.4.2.2.5 Imunocromatografia .....	46
1.4.2.2.6 Western blotting (WB) .....	46
1.4.2.2.7 Citometria de fluxo (CF) .....	47
1.4.2.2.8 Teste rápido de ELISA qualitativo .....	47
1.4.2.3. Provas de avaliação de imunidade celular.....	48
1.4.2.3.1 Teste de Montenegro ou Leishmanin skin test (LST) .....	48
1.4.2.3.2 Ensaio de proliferação de linfócitos (LPA).....	48
1.4.2.4. Testes de diagnóstico moleculares .....	49
1.4.2.4.1. Reação em cadeia da polimerase convencional .....	49
1.4.2.4.2. Reação em cadeia da polimerase em tempo real .....	49
1.4.3. Diagnóstico de infeção por <i>Leishmania infantum</i> em cães assintomáticos .....	50
1.5. Estadiamento clínico .....	50
1.6. Tratamento.....	51
1.7. Monitorização do tratamento e prognóstico.....	54
1.8. Prevenção .....	54
1.8.1. Controlo de vetores.....	55
1.8.2. Vacinação e administração de imunoestimulantes .....	58
1.8.3. Diagnóstico e tratamento de animais infetados .....	60
2. Estudo clínico retrospectivo de dados de pacientes caninos do VetOeiras que realizaram testes de diagnóstico de infeção por <i>Leishmania infantum</i> entre maio de 2011 e fevereiro de 2015.....	61
2.1. Objetivos .....	61
2.2. Material e métodos.....	61
2.3. Resultados obtidos.....	62
2.3.1. Caracterização dos pacientes quanto a possíveis fatores predisponentes .....	62
2.3.2. Métodos profiláticos utilizados antes e após o diagnóstico.....	63
2.3.1. Diagnóstico .....	66
2.3.2. Sinais clínicos e alterações clinicopatológicas.....	68
2.3.3. Relação entre sintomatologia e título de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> .....	72
2.3.4. Complicações e doenças concomitantes .....	73
2.3.5. Tratamentos.....	74
2.3.6. Número de meses ou anos vividos após o diagnóstico e idade aquando do óbito .....	76
2.4. Discussão de resultados .....	77
<b>IV. Conclusões.....</b>	<b>87</b>
<b>V. Bibliografia .....</b>	<b>89</b>
<b>VI. Anexos .....</b>	<b>A</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema ilustrativo das formas promastigota (a) e amastigota (b) de <i>Leishmania</i> . .	26
<b>Figura 2.</b> (a) Esquema ilustrativo de um inseto fêmea do género <i>Phlebotomus</i> . (b) Fotografia de uma fêmea de <i>Phlebotomus perniciosus</i> a exercer hematofagia.....	27
<b>Figura 3.</b> Esquema ilustrativo do ciclo de vida de <i>L. Infantum</i> com referência a outras possíveis vias de transmissão que não por flebótomos..	29
<b>Figura 4.</b> Mapa mostrando os resultados de vários estudos seroepidemiológicos relativamente às taxas de seroprevalência de leishmaniose visceral canina em diferentes regiões de Portugal .....	30
<b>Figura 5.</b> Esquema representativo da complexa interação entre as respostas mediadas pelas células Th1 e Th2 face à infeção por <i>Leishmania</i> ..	34
<b>Figura 6.</b> Esquemas representativos de proteínogramas séricos.....	41
<b>Figura 7.</b> Esfregaço, corado pelo método de <i>Giemsa</i> , de amostra de medula óssea de um cão naturalmente infetado por <i>L. Infantum</i> , evidenciando várias formas amastigotas do protozoário .....	42
<b>Figura 8.</b> Imagem de corte histológico de tecido subepitelial de conjuntiva canina, corado por imunohistoquímica, evidenciando a presença de formas amastigotas de <i>L. Infantum</i> . ....	42
<b>Figura 9.</b> Página 1 do formulário Epi Info® elaborado para preenchimento de dados dos pacientes do VetOeiras que realizaram testes de diagnóstico de LC, entre maio de 2011 e fevereiro de 2015. ....	A
<b>Figura 10.</b> Página 2 do formulário Epi Info® elaborado para preenchimento de dados dos pacientes do VetOeiras que realizaram testes de diagnóstico de LC, entre maio de 2011 e fevereiro de 2015. ....	B
<b>Figura 11.</b> Página 3 do formulário Epi Info® elaborado para preenchimento de dados dos pacientes do VetOeiras que realizaram testes de diagnóstico de LC, entre maio de 2011 e fevereiro de 2015. ....	B
<b>Figura 12.</b> Página 4 do formulário Epi Info® elaborado para preenchimento de dados dos pacientes do VetOeiras que realizaram testes de diagnóstico de LC, entre maio de 2011 e fevereiro de 2015. ....	C
<b>Figura 13.</b> Página 5 do formulário Epi Info® elaborado para preenchimento de dados dos pacientes do VetOeiras que realizaram testes de diagnóstico de LC, entre maio de 2011 e fevereiro de 2015. ....	C
<b>Figura 14.</b> Página 6 do formulário Epi Info® elaborado para preenchimento de dados dos pacientes do VetOeiras que realizaram testes de diagnóstico de LC, entre maio de 2011 e fevereiro de 2015. ....	D
<b>Figura 15.</b> Página 7 do formulário Epi Info® elaborado para preenchimento de dados dos pacientes do VetOeiras que realizaram testes de diagnóstico de LC, entre maio de 2011 e fevereiro de 2015. Após esta página, seguiram-se páginas semelhantes para recolha de informação relativa às monitorizações seguintes. ....	D

## **ÍNDICE DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Número de casos de canídeos e felídeos acompanhados em consulta, no internamento e número total de casos acompanhados durante o estágio curricular. ....	2
<b>Tabela 2.</b> Fi e fr (%) de casos de canídeos e felídeos acompanhados durante o estágio, relativamente às áreas de medicina preventiva, clínica médica e clínica cirúrgica.....	3
<b>Tabela 3.</b> Fi de exames complementares imagiológicos realizados em canídeos e felídeos durante o estágio curricular.....	3
<b>Tabela 4.</b> Fi de exames complementares, não imagiológicos, acompanhados, por espécie em que foram realizados.....	4
<b>Tabela 5.</b> Distribuição da casuística acompanhada, por espécie e no total de animais, relativamente às diferentes afeções cardíacas diagnosticadas. ....	8
<b>Tabela 6.</b> Distribuição da casuística acompanhada, por espécie e no total de animais, relativamente às diferentes afeções diagnosticadas na área da pneumologia. ....	9
<b>Tabela 7.</b> Distribuição da casuística acompanhada, por espécie e no total de animais, relativamente às diferentes afeções diagnosticadas na área da otorrinolaringologia. ....	10
<b>Tabela 8.</b> Distribuição da casuística acompanhada, por espécie e no total de animais, relativamente às diferentes afeções diagnosticadas pertencentes às áreas da urologia e nefrologia.....	10
<b>Tabela 9.</b> Distribuição da casuística acompanhada, por espécie e no total de animais, relativamente às diferentes afeções diagnosticadas na área da teriogenologia e neonatologia.....	11
<b>Tabela 10.</b> Distribuição da casuística acompanhada relativamente às diferentes afeções diagnosticadas na área da dermatologia. ....	12
<b>Tabela 11.</b> Distribuição das diferentes doenças infetocontagiosas e parasitárias diagnosticadas em canídeos, felídeos e no total de animais acompanhados durante o estágio curricular. 13	
<b>Tabela 12.</b> Distribuição das diferentes afeções na área da gastroenterologia diagnosticadas em canídeos, felídeos e no total de animais acompanhados durante o estágio curricular. ....	15
<b>Tabela 13.</b> Distribuição das diferentes afeções na área da estomatologia acompanhadas durante o estágio curricular. ....	16
<b>Tabela 14.</b> Distribuição das diferentes neoplasias diagnosticadas nos casos de canídeos, felídeos e no total de casos acompanhados durante o estágio curricular.....	17
<b>Tabela 15.</b> Distribuição das diferentes afeções oftalmológicas diagnosticadas nos casos de canídeos, felídeos e no total de casos acompanhados durante o estágio curricular. ....	18
<b>Tabela 16.</b> Distribuição das diferentes afeções endócrinas diagnosticadas nos casos de canídeos, felídeos e no total de casos acompanhados durante o estágio curricular. ....	18
<b>Tabela 17.</b> Distribuição das diferentes afeções diagnosticadas nos casos de canídeos, felídeos e no total de casos acompanhados durante o estágio curricular, na área da neurologia. ..	19
<b>Tabela 18.</b> Distribuição das diferentes causas de trauma nos casos de canídeos, felídeos e no total de casos acompanhados durante o estágio curricular. ....	20
<b>Tabela 19.</b> Distribuição das diferentes afeções abordadas na área da ortopedia, nos casos de canídeos, felídeos e no total de casos acompanhados durante o estágio curricular. ....	21

<b>Tabela 20.</b> Distribuição dos diferentes processos alérgicos abordados nos casos de canídeos, felídeos e no total de casos acompanhados durante o estágio curricular.....	22
<b>Tabela 21.</b> Frequências absolutas e relativas das diferentes toxicoses abordadas no seguimento dos casos de canídeos, felídeos e no total de casos acompanhados durante o estágio curricular.....	23
<b>Tabela 22.</b> Descrição do número de procedimentos cirúrgicos acompanhados em cada área cirúrgica.....	25
<b>Tabela 23.</b> Seroprevalência de infeção por <i>L. infantum</i> em cães, em alguns dos países europeus onde a LC é endémica.....	30
<b>Tabela 24.</b> Alterações encontradas na história clínica e exame físico de animais sintomáticos com LC.....	37
<b>Tabela 25.</b> Equivalência entre a Razão da amostra (Rz) obtida através do Kit LEISCAN® e o título determinado por IFI.....	45
<b>Tabela 26.</b> Periodicidade de aplicação dos diferentes produtos repelentes de <i>Phlebotomus</i> , utilizados antes da realização de testes de diagnóstico de LC, em animais que se revelaram infetados por <i>L. infantum</i> .....	65
<b>Tabela 27.</b> Taxa de infeção calculada em diferentes subgrupos de animais que realizavam profilaxia com diferentes produtos repelentes de <i>Phlebotomus</i> , em diferentes periodicidades de administração, no total de animais e nos subgrupos de animais que pernoitavam no exterior ou interior das habitações.....	65
<b>Tabela 28.</b> Tipos de reações adversas registadas após vacinação com CaniLeish®.....	66
<b>Tabela 29.</b> Fi e fr (%) das diferentes manifestações clínicas observadas no grupo de animais com diagnóstico positivo de infeção por <i>L. infantum</i> , no decorrer da doença.....	69
<b>Tabela 30.</b> Fi e fr (%) das diferentes alterações laboratoriais registadas no grupo de animais com diagnóstico positivo de infeção por <i>L. infantum</i> , no decorrer da doença.....	69
<b>Tabela 31.</b> Valores médios e desvios padrão relativos aos resultados obtidos no momento do diagnóstico, em análises hematológicas e bioquímicas séricas, no total de animais sem infeção diagnosticada (TSI), no total de animais com infeção diagnosticada (TI) e nos subgrupos de animais infetados assintomáticos (IA), oligossintomáticos (IO) e polissintomáticos (IP).....	71
<b>Tabela 32.</b> Doenças concomitantes diagnosticadas no grupo de animais com diagnóstico positivo de infeção por <i>L. infantum</i> .....	73
<b>Tabela 33.</b> Fi e fr (%) do tipo de evolução de estado geral em função do tipo de tratamento prescrito.....	74
<b>Tabela 34.</b> Classificação sintomática e resultado de titulação de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> antes e depois do início de tratamento com domperidona, no grupo de 11 animais infetados que receberam tratamento com este fármaco e cuja doença foi monitorizada posteriormente.....	75

<b>Tabela 35.</b> Número de anos vividos após diagnóstico positivo de infecção por <i>L. infantum</i> , no grupo de animais cujo óbito foi registado durante o período compreendido no presente estudo.....	77
<b>Tabela 36.</b> Número de anos vividos após o diagnóstico de infecção por <i>L. infantum</i> , no grupo de animais sem registo de óbito. ....	77
<b>Tabela 37.</b> Fi e fr (%) de raças de animais avaliados, no total de animais e no grupo de animais com diagnóstico positivo de infecção por <i>Leishmania infantum</i> , e percentagem de animais infetados entre animais da mesma raça avaliados.....	E
<b>Tabela 38.</b> Continuação da tabela anterior.....	F
<b>Tabela 39.</b> Fi e fr (%) das variáveis sexo, porte, comprimento do pelo, ambiente em que vivem predominantemente durante o dia, ambiente em que pernoitam e pertença a proprietários que têm o já tiveram outros animais com leishmaniose, no total de animais analisados e nos grupos de animais com diagnóstico positivo e negativo de infecção por <i>L. infantum</i> .....	F
<b>Tabela 40.</b> Fi e fr (%) de utilização de diferentes combinações de medidas profiláticas, utilizadas antes da realização de testes de diagnóstico de LC e % de infecção nos grupos que utilizaram as mesmas metodologias profiláticas. ....	G
<b>Tabela 41.</b> Fi e fr (%) das diferentes profilaxias utilizadas pelos animais com diagnóstico positivo e negativo de infecção por <i>L. infantum</i> , após realização de rastreio da doença. ....	G

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Percentagens de grupos de espécies dos diferentes animais acompanhados durante o estágio.....	2
<b>Gráfico 2.</b> Distribuição da fr, em percentagem, das diferentes áreas clínicas abordadas no estágio curricular durante o acompanhamento de casos de canídeos e felídeos em consultas e/ou no internamento.....	7
<b>Gráfico 3.</b> A - Percentagem de utilização de diferentes metodologias profiláticas antes da realização de testes de diagnóstico de LC. B- Percentagens de infeção correspondentes aos grupos de animais que utilizavam metodologias profiláticas do mesmo tipo.....	64
<b>Gráfico 4.</b> Esquema representativo da fr (%) do motivo de realização de testes de diagnóstico de infeção por <i>L. infantum</i> .....	66
<b>Gráfico 5.</b> Percentagens de animais sintomáticos e assintomáticos no grupo de animais com infeção e no grupo de animais sem infeção, no momento do diagnóstico.....	66
<b>Gráfico 6.</b> A- Percentagens de diagnóstico positivo e negativo de infeção por <i>Leishmania</i> no subgrupo de animais assintomáticos. B - Frequência relativa (%) de métodos de diagnóstico utilizados.....	67
<b>Gráfico 7.</b> A - Percentagens de diagnóstico positivo e negativo de infeção por <i>Leishmania</i> no subgrupo de animais sintomáticos. B - Frequência relativa (%) de métodos de diagnóstico utilizados .....	68
<b>Gráfico 8.</b> A- Distribuição da idade no momento do diagnóstico positivo de infeção por <i>L. infantum</i> , no total de animais com diagnóstico positivo e nos subgrupos de animais infetados sintomáticos e assintomáticos. B- Distribuição da idade ao diagnóstico positivo em animais sintomáticos, agrupando-os em cachorros (0-1 ano), jovens adultos (2-4 anos), adultos (5-6 anos) e idosos ( $\geq 7$ anos).....	68
<b>Gráfico 9.</b> Frequência relativa (%) dos resultados de titulações de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> (realizadas aquando do diagnóstico e em monitorizações da doença) no grupo de animais com diagnóstico positivo de infeção, subdividido em animais assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos.....	72
<b>Gráfico 10.</b> Gráfico ilustrativo da distribuição de idades aquando do óbito, relativas aos animais com diagnóstico positivo de LC e que faleceram no período compreendido neste estudo.....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍGLAS E SÍMBOLOS

<b>Ac</b> - Anticorpos	<b>FA</b> – Fosfatase alcalina
<b>ACTH</b> – <i>Adrenocorticotropic hormone</i> (hormona adrenocorticotrófica)	<b>FAST</b> – <i>Fast agglutination screening test</i>
<b>ADN</b> – Ácido desoxirribonucleico	<b>FeLV</b> – <i>Feline leukemia virus</i> (vírus da leucemia felina)
<b>ARN</b> – Ácido ribonucleico	<b>Fi</b> – Frequência absoluta
<b>AEM</b> – Agência europeia de medicamentos	<b>FIV</b> – <i>Feline immunodeficiency virus</i> (vírus da imunodeficiência felina)
<b>alb</b> - Albumina	<b>FML</b> – <i>Fucose-mannose ligand</i> (ligando de fucose-manose)
<b>ALT</b> – Alanina aminotransferase	<b>GGT</b> – Gama-glutamil transferase
<b>APMVEAC</b> - Associação portuguesa de médicos veterinários especialistas em animais de companhia	<b>glob</b> - Globulinas
<b>ATM</b> – Anquilose temporomandibular	<b>HCM</b> – Hemoglobina corpuscular média
<b>BCG</b> – Bacilo de <i>Calmette-Guerin</i>	<b>HDO</b> – <i>High definition oscilometry</i> (oscilometria de alta definição)
<b>BID</b> – <i>Bis in die</i> (Duas vezes por dia)	<b>HI</b> – Hospedeiro invertebrado
<b>CAMV</b> – Centro de atendimento médico-veterinário	<b>Htc</b> - Hematócrito
<b>CDC</b> - <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (Centros de control e prevenção de doenças)	<b>HV</b> – Hospedeiro vertebrado
<b>Células NK</b> – Células <i>natural killer</i>	<b>IA</b> - Infetados assintomáticos
<b>CE</b> – Corpo estranho	<b>IDA</b> – Imunodifusão em gel de agarose
<b>CF</b> – Citometria de fluxo	<b>IECA</b> - Inibidor da enzima conversora da angiotensina
<b>CI</b> – <i>Confidence interval</i> (intervalo de confiança)	<b>IFI</b> - Imunofluorescência indireta
<b>CIE</b> – Contraimunoeletroforese	<b>IFN-<math>\gamma</math></b> – Interferão $\gamma$
<b>CK</b> – Creatinina quinase	<b>fr</b> – Frequência relativa
<b>CLWG</b> - <i>Canine leishmaniasis working group</i> (grupo de trabalho na leishmaniose canina)	<b>IFRA</b> – Instituto de fisioterapia e reabilitação animal
<b>CMH</b> - Complexo major de histocompatibilidade	<b>IgG</b> – Imunoglobulina G
<b>DAPP</b> – Dermatite alérgica à picada da pulga	<b>IL-10</b> – Interleucina 10
<b>DAT</b> – <i>Direct agglutination test</i> (teste de aglutinação direta)	<b>IL-2</b> – Interleucina 2
<b>DDT</b> – Diclorodifeniltricloroetano	<b>IL-4</b> – Interleucina 4
<b>ELISA</b> - <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ensaio de imunoabsorção ligada a enzima)	<b>IO</b> – Infetados oligossintomáticos
	<b>IP</b> - Infetados polissintomáticos
	<b>IRIS</b> - <i>International renal interest society</i> (sociedade internacional de interesse renal)
	<b>IRS</b> – <i>Indoor residual spraying</i> (pulverização residual para interiores)
	<b>IS</b> – Índice de estimulação

**ISFM** – *International society of feline medicine* (associação internacional de medicina felina)

**ITS1** – *Internal transcribed spacer 1* (epaçador interno transcrito 1)

**kADN** – ADN cinetoplástico

**QCS** – Queratoconjuntivite seca

**LC** – Leishmaniose canina

**LDH** – Lactato desidrogenase

**LiESAp** – *Leishmania excreted/secreted antigen* (antigénio de excreção/secreção de *Leishmania infantum* purificado a partir de culturas de promastigotas)

**Linfócitos Th1** – Linfócitos *T-helper* (auxiliares) do tipo 1

**Linfócitos Th2** – Linfócitos *T-helper* (auxiliares) do tipo 2

**Linfócitos Treg** – Linfócitos T reguladores

**LPA** – *Lymphocyte proliferation assay* (ensaio de proliferação de linfócitos)

**LST** – *Leishmanin skin test* (teste de Montenegro)

**MCHC** – Concentração de hemoglobina corpuscular média

**Meio de cultura NNN** – Meio de cultura *Novy-MacNeal-Nicolle*

**NO** – Óxido nítrico

**OR** – *Odds ratio* (razão de possibilidades)

**OVH** - Ovariohisterectomia

**PAAF** – Punção aspirativa por agulha fina

**PCR** – *Polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

**Rácio UPC** - Rácio proteína/creatinina urinário

**rARN** – Ácido ribonucleico ribossómico

**RDW** – *Red cell distribution width* (índice de anisocitose)

**RLCC** – Rotura de ligamento cruzado cranial

**Rz** – Razão da amostra

**SID** – *Semel in die* (Uma vez por dia)

**SLA** – *Soluble leishmania antigens* (antigénios solúveis de *Leishmania*)

**Slc11a1** - *Solute carrier family 11 member a1*

**T4** - Tiroxina

**TAC** – Tomografia axial computadorizada

**TI** – Total de animais infetados

**TNF- $\alpha$**  - *Tumor necrosis factor  $\alpha$*  (fator  $\alpha$  de necrose tumoral)

**TGF- $\beta$**  – *Transforming and growth factor  $\beta$*  (fator  $\beta$  de crescimento e transformação)

**TPLO** – *Tibial plateau leveling osteotomy* (osteotomia de nivelamento do *plateau* tibial)

**TSH** – *Thyroid-stimulating hormone* (hormona estimulante da tiroide)

**TSI** – Total de animais sem infeção

**VCM** – Volume corpuscular médio

**WB** – *Western blotting*

## **I. Introdução**

O presente relatório de estágio foi elaborado no âmbito das atividades desenvolvidas durante o estágio curricular, sendo parte integrante do Mestrado integrado em Medicina Veterinária pela Universidade de Évora e encontra-se estruturando em duas partes.

Numa primeira parte encontram-se descritas as atividades desenvolvidas durante o estágio curricular que decorreu no Hospital Veterinário Central da Linha de Cascais (VetOeiras), sob orientação do Dr. Luís Chambel. O estágio teve a duração de cinco meses, com início a 22 de setembro de 2014 e termo a 22 de fevereiro de 2015, e as atividades acompanhadas centraram-se na área de clínica e cirurgia de animais de companhia e permitiram consolidar e aprofundar conhecimentos de medicina preventiva, medicina interna, imagiologia, cirurgia de tecidos moles e cirurgia ortopédica, abordados durante o Mestrado integrado em Medicina Veterinária.

Numa segunda parte encontra-se desenvolvida uma monografia sobre o tema “Leishmaniose canina”, constiuída por uma revisão bibliográfica atualizada e por uma abordagem retrospectiva do historial de canídeos sujeitos a testes de diagnóstico de infeção por *Leishmania* no VetOeiras, entre maio de 2011 e fevereiro de 2015. O interesse por este tema adveio da diversidade de casos de leishmaniose canina acompanhados durante os primeiros meses de estágio e por se tratar de uma doença de elevada importância em matéria de saúde pública, humana e veterinária.

## **II. Relatório de atividades desenvolvidas durante o estágio curricular**

No total foram realizadas mais de 940 horas de estágio, distribuídas por, pelo menos, oito horas diárias, de segunda a sexta-feira, mais 28 horas por mês em fins de semana, estagiando em, pelo menos, um sábado e um domingo por mês.

A equipa do VetOeiras é composta por onze médicos veterinários, com diferentes áreas de interesse preferencial, quatro enfermeiros veterinários e quatro auxiliares de ação médica veterinária. O facto de ser uma equipa multidisciplinar permitiu o acompanhamento de diferentes abordagens às mais variadas áreas clínicas.

O hospital veterinário VetOeiras encontra-se reconhecido pela associação internacional de medicina felina (ISFM) como uma *Cat Friendly Clinic*. Para que um centro de atendimento médico-veterinário (CAMV) integre este programa da ISFM tem de obedecer a certos requerimentos relativamente às suas instalações, equipamentos e procedimentos de manipulação e tratamento de gatos. Durante o estágio, desenvolveu-se familiarização com tais requerimentos que visam reduzir o *stress* dos felinos nas suas visitas ao veterinário. O *stress* é um fator que pode resultar em alterações no exame físico ou até mesmo impossibilitar a sua realização e conduzir a diagnósticos incorretos e tratamentos desnecessários, pelo que a sua redução é essencial para uma boa prática clínica em medicina felina.

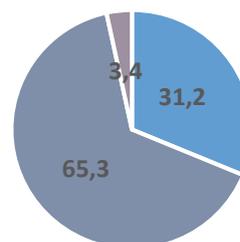
Periodicamente houve oportunidade de participar nas atividades do instituto de fisioterapia e reabilitação animal (IFRA), sediado nas antigas instalações do VetOeiras, que tem como diretora clínica a Dra. Carina Ferreira, e que dispõe de instalações exclusivas para a prática de

medicina física e fisioterapia veterinária. Entre os procedimentos acompanhados nesta área destacaram-se a hidroterapia, a laserterapia, a fototerapia, terapia com ultrassons, electroestimulação, massagem terapêutica e realização de exercícios articulares passivos e ativos, que têm como objetivos proporcionar fortalecimento muscular, reduzir a inflamação, induzir analgesia e estimular a regeneração neurológica periférica.

### 1. Casuística

Relativamente aos grupos de animais, por espécie, acompanhados em consultas e/ou internamento, durante o estágio, 65,3% corresponderam a canídeos (287 cães), 31,2% a felídeos (138 gatos) e apenas 3,4% corresponderam a animais de espécies exóticas (seis coelhos, uma tartaruga, cinco porquinhos da Índia, duas chinchilas e um papagaio) (gráfico 1). Na tabela 1 encontra-se ilustrado o número de consultas assistidas, o número de casos de cães e gatos acompanhados no internamento e o número total de casos acompanhados durante o estágio. O número total de casos acompanhados difere da soma dos números de casos acompanhados em consultas e em internamento, uma vez que existiram animais que no seguimento das consultas também foram internados.

■ Felídeos ■ Canídeos ■ Exóticos



**Gráfico 1.** Frequência relativa de grupos de espécies dos diferentes animais acompanhados durante o estágio (n=440).

**Tabela 1.** Número de casos de canídeos e felídeos acompanhados em consulta, no internamento e número total de casos acompanhados durante o estágio curricular (n=425).

	Canídeos e felídeos	Canídeos	Felídeos
Nº de casos acompanhados em consulta	202	151	51
Nº de casos acompanhados no internamento	256	158	98
Nº total casos acompanhados	425	287	138

No decorrer das consultas assistidas foi realizada a receção do paciente e proprietário, acompanhamento da anamnese e exame físico, auxílio na contenção do paciente, colheita de amostras para realização de análises clínicas, acompanhamento e realização de exames complementares e sua interpretação em conjunto com o clínico responsável pelo caso. Sempre que possível, discutiram-se diagnósticos diferenciais, o diagnóstico definitivo e as abordagens terapêuticas possíveis.

No internamento, realizaram-se e acompanharam-se atividades como passagem de casos entre turnos, estudo da história clínica dos pacientes, realização de exames físicos e exames complementares, discussão de resultados de exames clínicos e complementares, interpretação e discussão de diferentes opções terapêuticas, acompanhamento de visitas, colocação de cateteres endovenosos, colheita de amostras para exames complementares, administração medicamentosa, alimentação, contenção de animais, passeio de cães, higienização de jaulas, mudança de pensos e antissepsia de feridas.

Na tabela 2 encontra-se discriminada a distribuição, em frequência absoluta (Fi) e frequência relativa (fr), a última referida em percentagem, dos casos de canídeos, felídeos e total de casos acompanhados, por três grupos de áreas clínicas (medicina preventiva, clínica médica e clínica cirúrgica). A área de maior destaque foi a clínica médica, com 74,4% do total de casos.

Tanto no decorrer das consultas como no internamento, frequentemente foram realizados exames complementares, muitas vezes essenciais para um diagnóstico definitivo, instauração da terapêutica mais adequada e para uma boa monitorização da resposta ao tratamento. Nas tabelas 3 e 4 discriminam-se as frequências absolutas (Fi) dos diferentes exames complementares imagiológicos e não imagiológicos, respetivamente, realizados em canídeos e felídeos.

**Tabela 2.** Fi e fr (%) de casos de canídeos e felídeos acompanhados durante o estágio, relativamente às áreas de medicina preventiva, clínica médica e clínica cirúrgica (n=425).

Área Clínica	Canídeos		Felídeos		Total	
	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)
Medicina preventiva	32	11,1	11	8,0	43	10,1
Clínica médica	214	74,6	102	73,9	316	74,4
Clínica cirúrgica	41	14,3	25	18,1	66	15,5
Total	287	100,0	138	100	425	100,0

**Tabela 3.** Fi de exames complementares imagiológicos realizados em canídeos e felídeos durante o estágio curricular (n=430).

Exames imagiológicos		Canídeos	Felídeos
Raio X simples	Tóraco	37	16
	Abdominal	54	29
	Pélvico	72	12
	Cervical	3	1
	Coluna vertebral	24	6
	Crânio	2	3
	Membro torácico	43	7
	Membro pélvico	25	3
Raio X contrastado	Corpo inteiro	3	7
	Urografia excretora	1	0
Ecografia abdominal	Torácico	1	1
		34	18
Ecocardiografia		13	6
Endoscopia	Artroscopia	3	0
	Traqueobroncoscopia	2	0
	Otoscopia	1	0
	Laringoscopia	0	1
	Gastroscopia	1	0
	Colonoscopia	1	0

**Tabela 4.** Fi de exames complementares, não imagiológicos, acompanhados, por espécie em que foram realizados (n=653).

Exames complementares		Canídeos	Felídeos
Eletrocardiograma		7	1
Medição de pressão arterial		47	25
Colheita e análise de efusão pleural		2	3
Colheita e análise de efusão pericárdica		2	0
Colheita e análise de conteúdo de vesícula biliar		1	0
Bioquímicas séricas		65	42
Ionograma		7	3
Provas de coagulação		4	0
Hemograma		73	54
Microhematócrito		42	32
Citologia de amostras colhidas por PAAF		27	10
Citologia vaginal		1	1
Citologia auricular		7	3
Colheita e citologia de líquido sinovial		1	1
Esfregaços sanguíneos		10	11
Provas de coagulação		6	0
Biópsia cutânea por “punch”		2	0
Citologia cutânea por raspagem		5	1
Testes oftalmológicos	Tesde de fluoresceína	10	0
	Medição da pressão ocular	5	0
	Teste de <i>Shirmer</i>	2	0
Testes rápidos de diagnóstico	Parvovirus SNAP teste	3	0
	FIV + FeLV	0	9
	<i>Leishmania</i> SNAP test	10	0
	4Dx SNAP test (Erliquiose, Dirofilariose, doença de Lyme e Anaplasmose)	5	0
Urianálise	Com tira de urina	14	13
	Densidade urinária	14	13
	Análise de sedimento	14	13
	Rácio UPC	8	7
Teste de estimulação por ACTH		2	0
Teste de estimulação com doses baixas de dexametasona		2	0
Doseamento de T4 total		5	7
Doseamento de TSH		1	0

### 1.1. Medicina preventiva

Na área da medicina preventiva assistiu-se à elaboração de planos de vacinação e desparasitação de canídeos e felídeos e colocação de dispositivos de identificação eletrónica (*microchip*) em canídeos.

Ao abrigo do artigo 6º do Decreto-lei nº 313/2003, de 17 de dezembro, a identificação e registo electrónico de cães é obrigatória para todos os cães, entre os três e os seis meses de idade, nascidos após um de julho de 2008, e desde 2004 para cães perigosos ou potencialmente perigosos, cães utilizados em acto venatório ou cães de exposição<sup>(1)</sup>.

Relativamente à primovacinação de cachorros o VetOeiras segue o seguinte esquema vacinal: i) vacinação contra esgana e parvovirose canina com a vacina Novibac® Puppy DP, em cachorros entre as quatro e as oito semanas; ii) vacinação contra esgana, hepatite canina infecciosa (por Adenovirus tipo 1), parvovirose canina, parainfluenza e contra leptospirose (por *Leptospira interrogans*, serogrupo *canicola* e *icterohaemorrhagiae*) através da vacina Novibac®

DHPPi + Lepto 2, em cachorros a partir das oito semanas, com um ou dois reforços, intervalados por três a quatro semanas, de modo a que o último reforço ocorra entre as 14 e as 16 semanas de idade; iii) vacinação contra a raiva, com recurso à vacina Novibac® Rabies, que apenas necessita de reforço a cada três anos e que é geralmente administrada entre os quatro e os seis meses, de modo a que na mesma consulta se proceda à aplicação do *microchip* e se vigie a evolução da denteição, que decorre nesse período. Após a primovacinação, no segundo ano recomenda-se o reforço com a vacina Novibac® DHPPi + Lepto 2 e no terceiro e quarto anos com a vacina Novibac® Pi + Lepto 2 (contra parainfluenza vírus e *Leptospira interrogans*), uma vez que a vacina Novibac® DHPPi confere proteção contra parvovirose canina, esgada e hepatite canina infecciosa durante três anos e contra parainfluenza durante apenas um ano. Assim, utilizando estas vacinas, anualmente os animais devem ser vacinados contra parainfluenza e leptospirose e a cada três anos contra parvovirose, esgada, hepatite canina infecciosa e raiva.

Em cães predispostos ao desenvolvimento de doença infecciosa respiratória, vulgarmente conhecida por “tosse do canil”, nomeadamente aqueles que vão realizar estadia temporária em canil, procede-se à vacinação com Novibac® KC, uma suspensão de administração nasal, que confere imunização ativa contra *Bordetella bronchiseptica* e vírus da paraínfluenza canina. A administração deve ser realizada três semanas antes do período previsível de risco para que se obtenha proteção para ambos os agentes.

Quanto ao esquema vacinal proposto para felinos, na primovacinação recomenda-se a administração da vacina Purevax® RCP (contra o vírus da rinotraqueíte felina, calicivírus e vírus da panleucopénia felina) em gatos com cerca de oito semanas de idade, devendo um reforço ser realizado três a quatro semanas após a primeira administração. Em animais que têm contacto direto com o exterior recomenda-se a vacinação contra o vírus da leucemia felina, através da vacina Purevax® FeLV, quatro semanas após a segunda administração da Purevax® RCP, com reforço três a quatro semanas após a primeira administração. Após a primovacinação, por norma, recomendam a realização de reforços anuais com ambas as vacinas, embora a Purevax® RCP, após o primeiro reforço anual, tenha uma duração de imunidade de três anos para os componentes rinotraqueíte, calicivírus e panleucopénia.

Relativamente aos planos de desparasitação interna de canídeos, a medida que mais frequentemente foi recomendada foi a administração oral de Milbemax®, a cada três meses. Este trata-se de um produto constituído por comprimidos palatáveis de milbemicina oxima e praziquantel, e é indicado para cães com mais de cinco quilogramas, sendo eficaz no tratamento de infeções mistas por cestodes adultos e nemátodes. Em cachorros com menos de cinco quilogramas recomendou-se, frequentemente, a administração de Panacur®, uma solução oral de fenbendazol a 10%, na dose um mL/kg/dia, correspondente a 50 mg/kg/dia, durante cinco dias consecutivos.

Para desparasitação externa de cães, nas consultas de medicina preventiva, frequentemente recomendou-se a colocação de coleira Scalibor® (coleira impregnada com deltametrina), que pode ser utilizada a partir das sete semanas de idade, com substituição a cada

seis meses, para prevenção de picada por flebótomos e mosquitos, e de infestações por carraças e pulgas. Em cães que, por algum motivo, não podiam fazer prevenção com esta coleira, recomendou-se a administração mensal de solução para unção punctiforme, de Activyl® Tick Plus, que tem como princípios ativos indoxacarb e permetrina, podendo esta ser aplicada em cães a partir das oito semanas de idade e com peso superior a mil e duzentos grama. Para reforço da prevenção de infestações por pulgas e carraças recomendou-se, com frequência, a administração de Bravecto® (comprimidos mastigáveis) contendo fluralaner como princípio ativo, uma substância acaricida e inseticida eficaz contra carraças e pulgas, a qual deve ser administrada a cada três meses, em cães com mais de oito semanas e mais de dois quilograma.

Para prevenção contra a leishmaniose canina, para além do recurso a repelentes do vetor é ainda recomendada a prevenção através da imunização ativa, quer específica contra *Leishmania infantum*, recorrendo à vacina CaniLeish®, quer inespecífica, por estimulação da imunidade celular, com xarope de domperidona - Leisguard®. A vacinação com CaniLeish® pode ser iniciada a partir dos seis meses de idade e todos os animais devem ser serologicamente testados para a deteção de infeção por *L. infantum* antes da vacinação, não devendo ser vacinados se se obtiver um resultado positivo. No primeiro ano a primovacinação deve ser constituída por uma primeira administração a partir dos seis meses de idade, uma segunda administração três semanas após a primeira e uma terceira, três semanas após a segunda. Posteriormente, devem ser feitos reforços anuais, com início um ano após a terceira administração da primovacinação. O Leisguard® constitui uma alternativa à vacina, cuja administração pode inclusive ser iniciada antes dos seis meses de idade, e que geralmente se adequa a animais de pequeno a médio porte, por ser de fácil administração e ser menos dispendioso que a vacina. Recomenda-se a sua administração nos meses de fevereiro, junho e outubro, na dose 0,5 mg/kg, diariamente, durante trinta dias consecutivos. Animais em que se pretende iniciar a vacinação com CaniLeish®, mas em que é necessário adiar a sua administração, por indisponibilidade monetária ou por ainda não terem seis meses de idade, podem realizar prevenção com Leisguard® e mais tarde, então, proceder à vacinação.

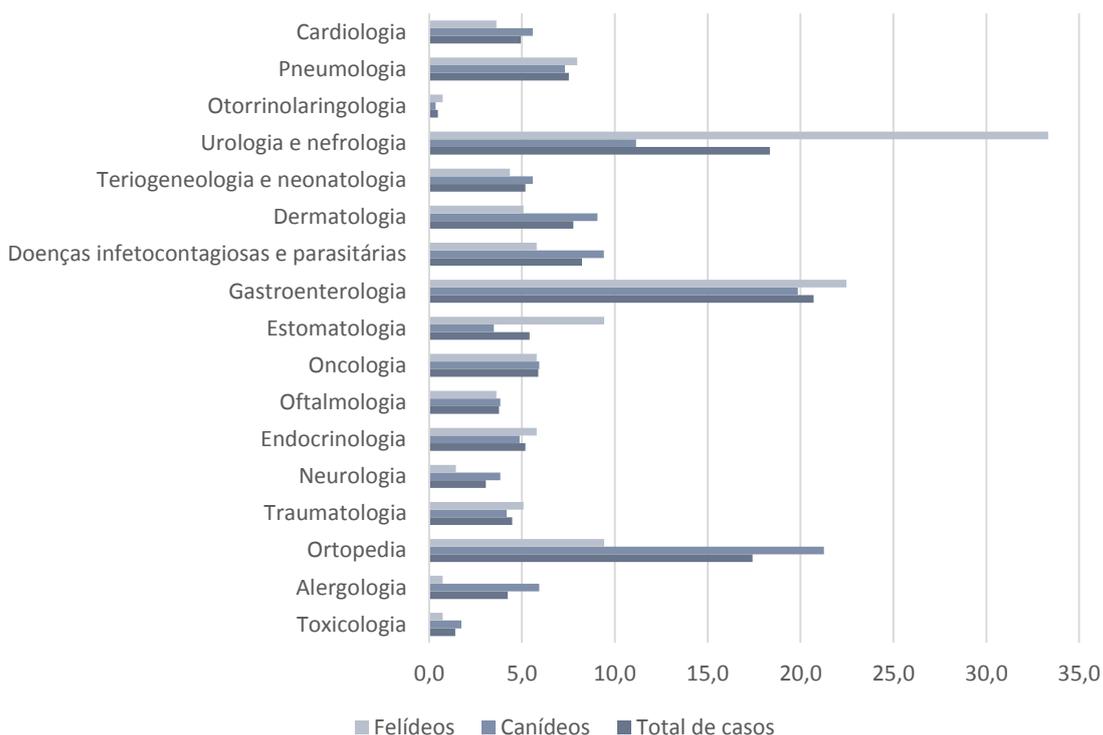
Relativamente às medidas profiláticas recomendadas para felídeos, para desparasitação interna e externa, frequentemente, recomendou-se a administração mensal de Broadline® solução para unção punctiforme em gatos, que pode ser utilizada com segurança em gatos com mais de sete semanas e seiscentos grama de peso, e que contém os seguintes princípios ativos: firponil, s-metopreno, eprinomectina e praziquantel. Esta solução, para além de ser eficaz contra cestodes e nemátodes também o é para ectoparasitas.

Em situações de infestações graves por pulgas recomendou-se, frequentemente, o tratamento com Capstar® e Program®, cujos princípios ativos são nitenpiram e lufenuron, repetidamente. O Capstar® apresenta-se em comprimidos, podendo ser administrado em cães e gatos com mais de quatro semanas e um kg de peso, e provoca a morte das pulgas adultas no espaço de 30 minutos após a administração. O Program® previne a multiplicação de pulgas através da inibição da eclosão dos respetivos ovos, estando disponível em solução injetável para

gatos, com duração de ação de seis meses, ou em comprimidos para cães ou suspensão oral para gatos, com duração de ação de 30 dias.

## 1.2. Clínica médica

No que diz respeito aos casos da área clínica médica acompanhados, a distribuição das áreas clínicas abordadas por casos de canídeos, felídeos e total de casos encontra-se esquematizada no gráfico 2. Dos 287 casos de canídeos destacam-se as áreas da gastroenterologia, ortopedia e urologia e nefrologia. No acompanhamento de consultas e internamento de felídeos a área que mais se destacou foi a urologia e nefrologia.



**Gráfico 2.** Distribuição da fr (%) das diferentes áreas clínicas abordadas no estágio curricular durante o acompanhamento de casos de canídeos e felídeos em consultas e/ou no internamento ( $n_{total}=425$ ;  $n_{felídeos}=138$ ;  $n_{canídeos}=287$ ).

### 1.2.1. Cardiologia

Na área da cardiologia acompanharam-se as consultas de diagnóstico e seguimento de afeções cardíacas, realizadas pela Dra. Sílvia Pinheiro, nas quais se procedeu à realização de anamnese e exame físico completos, com especial atenção para a presença de manifestações clinicamente compatíveis com doença cardiovascular (sopros cardíacos, arritmias, pulso jugular, síncope, letargia, intolerância ao exercício, tosse ou outras alterações respiratórias, distensão abdominal, cianose, entre outras). Uma vez completo o exame físico realizaram-se exames complementares como radiologia torácica, ecocardiografia, eletrocardiograma e medição da pressão arterial através de HDO (*High-Definition Oscilometry*) ou *Doppler*.

Na tabela 5 encontram-se referidas as afeções cardíacas observadas durante o estágio, sendo a doença degenerativa valvular a que mais vezes foi encontrada em cães com patologia

cardíaca (43,8% dos casos). Em gatos, apenas se observaram cinco casos com patologia cardíaca, dois dos quais com insuficiência valvular mitral, um com um bloqueio atrioventricular de 3º grau, um com cardiomiopatia não classificada (com dilatação atrial bilateral e constante formação de efusão pleural) e um caso de cardiomiopatia hipertrófica.

**Tabela 5.** Distribuição da casuística acompanhada, por espécie e no total de animais, relativamente às diferentes afeções cardíacas diagnosticadas (n=21).

Afeções	Canídeos		Felídeos		Total	
	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)
Bloqueio atrioventricular de 3º grau	0	0,0	1	20	1	4,8
Taquiarritmia ventricular	1	6,3	0	0	1	4,8
Doença degenerativa valvular	7	43,8	2	40	9	42,9
Cardiomiopatia dilatada	3	18,8	0	0	3	14,3
Cardiomiopatia hipertrófica	0	0,0	1	20	1	4,8
Cardiomiopatia não classificada	0	0,0	1	20	1	4,8
Insuficiência cardíaca congestiva	3	18,8	0	0	3	14,3
Efusão pericardica idiopática	1	6,3	0	0	1	4,8
Efusão pericardica neoplásica (por mesotelioma)	1	6,3	0	0	1	4,8
Total	16	100,0	5	100	21	100,0

A doença degenerativa valvular é a afeção crónica mais frequentemente na origem de insuficiências cardíacas em cães. A válvula atrioventricular mitral é aquela que mais frequentemente, e em maior grau, é afetada, embora, em muitos cães, também se observe envolvimento da válvula tricúspide. Espessamentos das válvulas aórtica e pulmonar são também por vezes observados em animais geriátricos, embora raramente causem insuficiências graves<sup>(2)</sup>.

Na sequência de patologia valvular mitral observaram-se casos com insuficiência cardíaca congestiva, hipertensão venosa pulmonar e edema pulmonar. Em tais casos procedeu-se ao tratamento com furosemida (Lasix<sup>®</sup>), pimobendan (Vetmedin<sup>®</sup>), espironolactona e benazepril (Cardalis<sup>®</sup>). A fusosemina trata-se de um diurético de ansa, que promove o aumento da excreção renal de sódio, potássio, cloro e água, sendo indicada no tratamento de insuficiência cardíaca congestiva, quando presentes evidências radiológicas de edema pulmonar. O pimobendan é um fármaco inodilatador, isto é, que aumenta a contratilidade cardíaca (inotropo positivo) e promove vasodilatação pulmonar e sistémica (vasodilatador). Relativamente à espironolactona é um antagonista competitivo da aldosterona, que promove o aumento da excreção de sódio e água e retenção de potássio e inibe os efeitos da aldosterona, de remodelação miocárdica e vascular, e a disfunção endotelial. O benazepril é um inibidor da enzima conversora da angiotensina (IECA) que bloqueia os efeitos mediados pela angiotensina II, nomeadamente de vasoconstricção arterial e venosa e de retenção de sódio e água pelo rim<sup>(3)</sup>.

### 1.2.2. Pneumologia

Na abordagem aos pacientes com possível afeção pneumológica, em muitos dos casos, para além da auscultação de ruídos respiratórios, foi imprescindível a realização de estudo radiológico torácico. Em alguns casos, recorreu-se a traqueobroncoscopia, para inspeção das vias respiratórias e colheita de material para cultura e antibiograma. Nesta área as diferentes

afeções diagnosticadas em cães e gatos encontram-se sumariadas na tabela 6. No total de casos acompanhados as alterações patológicas que mais vezes foram identificadas foram a efusão pleural e o edema pulmonar, em 25% e em 21,9% dos casos, respetivamente.

**Tabela 6.** Distribuição da casuística acompanhada, por espécie e no total de animais, relativamente às diferentes afeções diagnosticadas na área da pneumologia (n=32).

Afeções	Canídeos		Felídeos		Total	
	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)
Broncopneumonia	3	14,3	1	9,1	4	12,5
Efusão pleural	4	19,0	4	36,4	8	25,0
Edema pulmonar	5	23,8	2	18,2	7	21,9
Colapso de traqueia	4	19,0	0	0,0	4	12,5
Pneumotórax	4	19,0	0	0,0	4	12,5
Rotura de traqueia	1	4,8	0	0,0	1	3,1
Asma felina	0	0,0	4	36,4	4	12,5
Bronquite crónica	2	9,5	0	0,0	2	6,3
Hemorragia pulmonar aguda	1	4,8	0	0,0	1	3,1
Total	21	100,0	11	100,0	32	100,0

A efusão pleural é caracterizada por uma acumulação anormal de líquido entre a pleura visceral e pleura parietal da cavidade torácica, podendo ocorrer devido a aumento da pressão hidrostática ou da permeabilidade capilar, diminuição da pressão oncótica intravascular ou por alterações de drenagem linfática. Na presença de efusão pleural, frequentemente observa-se o fenómeno de respiração restritiva com taquipneia compensatória. Ao raio x torácico, na presença de efusão pleural, os lobos pulmonares afastam-se da parede torácica e os seus bordos tornam-se arredondados, alteração particularmente visível no ângulo caudodorsal dos lóbulos pulmonares caudais, e os contornos do diafragma e silhueta cardíaca podem tornar-se pouco definidos. De um modo geral, cães e gatos com efusão pleural apresentam, à auscultação torácica, sons pulmonares diminuídos, particularmente na região ventral do tórax. A realização de toracocentese é indicada, não só para o alívio rápido da compressão pulmonar como também para o diagnóstico etiológico, devendo-se para isso proceder à análise dos fluidos colhidos e sua classificação em transudado puro, transudado modificado, exsudado séptico ou não séptico, efusão hemorrágica (hemotórax), efusão neoplásica ou efusão quilosa (quilotórax)<sup>(4)</sup>.

O edema pulmonar define-se como a acumulação de líquido no espaço intersticial e alveolar pulmonar e como principais mecanismos etiológicos estão incluídos a diminuição da pressão oncótica plasmática, a sobrecarga vascular, a obstrução linfática e o aumento da permeabilidade vascular. Animais com edema pulmonar apresentam-se frequentemente com tosse, taquipneia e dificuldades respiratórias. À auscultação torácica podem ser ouvidos sons de crepitação. Alterações radiográficas típicas caracterizam-se por um padrão intersticial que pode evoluir para padrão alveolar<sup>(5)</sup>.

Animais em que, ao raio x torácico, se observaram padrões compatíveis com edema pulmonar ou efusão pleural, após a sua estabilização, investigou-se a presença de anomalias cardíacas primárias, através da realização de ecocardiografia, e de outras alterações sistémicas, através da realização de hemograma e perfis bioquímicos séricos. No caso de efusão pleural,

realizou-se toracocentese para alívio da compressão pulmonar e análise citológica do material colhido.

### 1.2.3. Otorrinolaringologia

Quanto à área da otorrinolaringologia, apenas dois casos foram acompanhados, um caso de otite interna num Labrador retriever e outro de hemiplegia laríngea diagnosticada num gato (tabela 7). Em ambos os casos recorreu-se ao exame endoscópico para diagnóstico definitivo.

**Tabela 7.** Distribuição da casuística acompanhada, por espécie e no total de animais, relativamente às diferentes afeções diagnosticadas na área da otorrinolaringologia (n=2).

Afeções	Canídeos		Felídeos		Total	
	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)
Otite interna	1	100,0	0	0,0	1	50,0
Hemiplegia laríngea	0	0,0	1	100,0	1	50,0
Total	1	100,0	1	100,0	2	100,0

### 1.2.4. Urologia e nefrologia

Na área da urologia e nefrologia a entidade patológica que mais vezes foi abordada foi a doença renal crónica, tanto em felídeos como em canídeos, correspondendo a 43,6% do total de casos em que foram diagnosticadas afeções nestas áreas, como pode ser observado na tabela 8. Tanto em cães como em gatos com diagnóstico de doença renal crónica procurou-se proceder ao seu estadiamento clínico e tratamento de acordo com as diretrizes da IRIS (*International Renal Interest Society*).

**Tabela 8.** Distribuição da casuística acompanhada, por espécie e no total de animais, relativamente às diferentes afeções diagnosticadas pertencentes às áreas da urologia e nefrologia (n=78).

Afeções	Canídeos		Felídeos		Total	
	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)
Infeção urinária	10	31,3	16	34,8	26	33,3
Insuficiência renal aguda	3	9,4	0	0,0	3	3,8
Insuficiência renal crónica	13	40,6	21	45,7	34	43,6
Cistite idiopática	0	0,0	8	17,4	8	10,3
Urolitíase	0	0,0	1	2,2	1	1,3
Hidronefrose e hidroureter	1	3,1	0	0,0	1	1,3
Displasia renal congénita	2	6,3	0	0,0	2	2,6
Abcesso renal	1	3,1	0	0,0	1	1,3
Incontinência urinária	2	6,3	0	0,0	2	2,6
Total	32	100,0	46	100,0	78	100,0

### 1.2.5. Teriogenologia e neonatologia

Na área da teriogenologia e neonatologia a afeção que mais vezes foi diagnosticada foi a piómetra, em 25% do total de casos com afeções afins (tabela 9). Apenas um caso foi acompanhado na área da neonatologia, correspondente a um cachorro recém-nascido, da raça Weimaraner, com fenda palatina congénita.

A piómetra é uma afeção reprodutiva comum na cadela, ocorrendo, geralmente, em fêmeas com mais de seis anos de idade, na fase lútea do ciclo éstrico, com surgimento de sinais clínicos entre os cinco e os 80 dias após o final do estro<sup>(6)</sup>. Encontra-se fortemente associada ao

desenvolvimento de hiperplasia quística endometrial, por influência da contínua estimulação do tecido glandular uterino pela progesterona, que predispõe a multiplicação uterina de bactérias comensais, pertencentes à porção distal do trato genitourinário, no final do éstro, e conduz a alterações degenerativas que diminuem a capacidade de contração miometrial<sup>(7,8)</sup>. Adicionalmente, a progesterona inibe a resposta imunitária local uterina, estimula a secreção glandular endometrial, promovendo um ambiente uterino favorável à multiplicação bacteriana, diminui a contratibilidade miometrial e promove o fechamento da cérvix, impedindo a drenagem de exsudados uterinos<sup>(7,8)</sup>. Assim, a piómetra é caracterizada por uma inflamação séptica uterina, sendo a *Esherichia coli* o microrganismo mais frequentemente isolado em cadelas e gatas com esta afeção<sup>(8)</sup>.

A ocorrência de corrimento vulvar purulento pode ou não ser observado, dependendo de se a cérvix se encontra aberta ou fechada. Situações de piómetra com cérvix fechada são mais graves, sendo maior o risco de peritonite séptica por rotura uterina ou fuga de material purulento pela via oviductal. Para além da observação de corrimento purulento vulvar, em piómetras abertas, as manifestações clínicas que frequentemente são observadas em fêmeas com piómetra são anorexia, letargia, perda de peso, poliúria e polidipsia. As análises clínicas geralmente revelam leucocitose neutrofílica e hiperglobulinémia. A presença de azotémia e densidade urinária baixa pode refletir diabetes insipidus nefrogénica, secundária à circulação de endotoxinas produzidas por *E. coli*<sup>(7)</sup>. Nos casos acompanhados, após estabilização com fluidoterapia e antibioterapia, realizou-se ovariectomia, o tratamento de eleição recomendado para estes casos.

**Tabela 9.** Distribuição da casuística acompanhada, por espécie e no total de animais, relativamente às diferentes afeções diagnosticadas na área da teriogenologia e neonatologia (n=20).

Afeções	Canídeos		Felídeos		Total	
	Fi	Fr (%)	Fi	Fr (%)	Fi	Fr (%)
Piómetra	3	21,4	2	33,3	5	25,0
Hematómetra	1	7,1	0	0,0	1	5,0
Hiperplasia endometrial benigna	0	0,0	1	16,7	1	5,0
Prolapso vaginal	1	7,1	0	0,0	1	5,0
Hiperplasia prostática benigna	4	28,6	0	0,0	4	20,0
Prostatite	1	7,1	0	0,0	1	5,0
Diagnóstico de gestação	2	14,3	0	0,0	2	10,0
Monitorização pós-parto	0	0,0	2	33,3	2	10,0
Criptorquidismo	1	7,1	0	0,0	1	5,0
Persistencia de estro pós OVH	0	0,0	1	16,7	1	5,0
Fenda palatina congénita	1	7,1	0	0,0	1	5,0
Total	14	100,0	6	100,0	20	100,0

#### 1.2.6. Dermatologia

Na tabela 10 encontram-se referidas as diferentes afeções observadas em cães, gatos e no total de animais, na área da dermatologia. As afeções dermatológicas que mais vezes foram observadas foram a otite externa e a piodermatite.

Na abordagem ao paciente com alterações dermatológicas a elaboração de uma boa anamnese é essencial para um correto diagnóstico, com colheita de informações como raça, idade em que apareceram as primeiras alterações e qual a sua localização e aspeto, caracterização do ambiente em que vive, medidas de controlo de pulgas efetuadas, outros problemas diagnosticados anteriormente, tratamentos realizados e sua eficácia, existência de outros animais coabitantes com alterações semelhantes, tipo de alimentação e ocorrência de mudanças ambientais. Em caso de prurido importa ainda caracterizar se este ocorre sazonalmente, durante alturas específicas do dia, em determinados locais ou durante determinadas atividades<sup>(9,10)</sup>.

Após a anamnese deve ser realizado um exame físico geral completo, uma vez que existem doenças sistémicas que podem apresentar manifestações dermatológicas (hipotiroidismo, hiperadrenocorticismismo, leishmaniose, neoplasias gonadais, infeção por vírus da leucemia felina, infeção por vírus da imunodeficiência felina, entre outras) e, por outro lado, doenças concomitantes podem estar presentes e podem condicionar a escolha da terapêutica<sup>(9)</sup>.

Posteriormente deve ser então realizado um exame dermatológico detalhado, com examinação de mucosas, pele e pelagem de forma sistemática. Deve procurar-se diferenciar e caracterizar as lesões primárias (máculas, pápulas, pústulas, nódulos, tumores e vesículas) e secundárias (crostas, cicatrizes, úlceras, escoriações, liquenificação, hiperpigmentação, hiperqueratose e comedões) e a sua distribuição deve ser registada para que possam ser feitas comparações em visitas futuras<sup>(9,10)</sup>.

Adicionalmente, podem ser realizados exames complementares tais como tricograma, citologias por aposição, pela técnica da fita-cola, de zaragatoas auriculares ou de exsudados e de raspagens de pele, bem como de punções aspirativas por agulha fina (PAAF), culturas bacterianas e fúngicas, provas de sensibilidade a etiotropos, biopsias de pele, testes alérgicos, hemograma e análises bioquímicas, incluindo doseamento hormonal<sup>(11)</sup>.

**Tabela 10.** Distribuição da casuística acompanhada relativamente às diferentes afeções diagnosticadas na área da dermatologia (n=33).

Afeções	Canídeos		Felídeos		Total	
	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)
Piodermatite	5	19,2	0	0,0	5	15,2
Dermatite por corpo estranho	3	11,5	0	0,0	3	9,1
Dermatite aguda húmida ( <i>Hot spot</i> )	3	11,5	0	0,0	3	9,1
Dermatite por contacto	1	3,8	0	0,0	1	3,0
Dermatofitose	1	3,8	0	0,0	1	3,0
Abcesso de sacos perianais	3	11,5	1	14,3	4	12,1
Laceração cutânea	0	0,0	2	28,6	2	6,1
Mordedura	2	7,7	0	0,0	2	6,1
Dermatite psicogénica	0	0,0	1	14,3	1	3,0
Queimadura	0	0,0	1	14,3	1	3,0
Otite externa	5	19,2	2	28,6	7	21,2
Otohematoma	1	3,8	0	0,0	1	3,0
Sarna demodécia	1	3,8	0	0,0	1	3,0
Celulite juvenil	1	3,8	0	0,0	1	3,0
Total	26	100,0	7	100,0	33	100,0

### 1.2.7. Doenças infetocontagiosas e parasitárias

Na tabela 11 encontram-se discriminadas as doenças infetocontagiosas e parasitárias diagnosticadas em canídeos e felídeos, e no total de animais acompanhados durante o estágio curricular. Das doenças infetocontagiosas diagnosticadas em canídeos e felídeos, aquelas que mais vezes foram diagnosticadas foram a parvovirose canina e a micoplasmose. Relativamente às doenças parasitárias, a leishmaniose canina foi aquela que mais vezes foi abordada, o que suscitou interesse para o desenvolvimento da monografia, que constitui a segunda parte deste relatório de estágio.

**Tabela 11.** Distribuição das diferentes doenças infetocontagiosas e parasitárias diagnosticadas em canídeos, felídeos e no total de animais acompanhados durante o estágio curricular (n=35).

Doenças infetocontagiosas/ parasitárias	Canídeos		Felídeos		Total	
	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)
Parvovirose canina	7	25,9	0	0,0	7	20,0
Rinotraqueíte infecciosa felina	0	0,0	1	12,5	1	2,9
Panleucopênia felina	0	0,0	1	12,5	1	2,9
Imunodeficiência felina	0	0,0	2	25,0	2	5,7
Micoplasmose	0	0,0	3	37,5	3	8,6
Leucemia felina	0	0,0	1	12,5	1	2,9
Erliquiose	1	3,7	0	0,0	1	2,9
Tosse do canil	1	3,7	0	0,0	1	2,9
Leptospirose	3	11,1	0	0,0	3	8,6
Leishmaniose	11	40,7	0	0,0	11	31,4
Ascaridiose	2	7,4	0	0,0	2	5,7
Neosporose	1	3,7	0	0,0	1	2,9
Giardiose	1	3,7	0	0,0	1	2,9
Total	27	100,0	8	100,0	35	100,0

A parvovirose canina é causada por um parvovírus que invade e destrói preferencialmente células de multiplicação rápida, como células precursoras da medula óssea e células epiteliais das criptas intestinais. A gravidade dos sinais clínicos está dependente de fatores como a virulência do vírus, a capacidade de defesa do hospedeiro, a idade do animal e presença de outros agentes patogênicos entéricos (como, por exemplo, parasitas)<sup>(12)</sup>. A transmissão de parvovirose canina ocorre pela via oronasal, por contacto com fezes contaminadas, e pode causar enterite aguda em cães de qualquer raça, idade ou sexo. Contudo, cachorros com idade entre as seis semanas e os seis meses, e pertencentes a raças como Rottweiler, Doberman pinscher, Labrador retriever e Pastor alemão, parecem ser afetados com maior frequência. A infecção apresenta geralmente um período de incubação de sete a catorze dias e, da intensa destruição das células das criptas intestinais, decorrem manifestações clínicas inespecíficas, de doença gastrointestinal, como vômito, diarreia, anorexia, depressão e desidratação. Em casos severos, neutropenia e linfopenia são achados frequentes, por destruição de células precursoras medulares e, secundariamente, com a depressão do sistema imunitário e destruição da barreira intestinal, desenvolvem-se complicações como bacteriemia (por bactérias gram-negativas anaeróbias pertencentes à microflora intestinal), endotoxemia e coagulação intravascular disseminada, que podem levar à morte do animal em poucos dias<sup>(13)</sup>.

O diagnóstico pode ser apenas clínico, com base na idade do animal, estado vacinal e nos sinais clínicos apresentados. Adicionalmente pode recorrer-se a um teste de *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) qualitativo (como o IDEXX SNAP® Parvo Test), que deteta a presença de antígenos de parvovirus nas fezes. Contudo, podem ocorrer falsos positivos em animais vacinados contra a doença nos cinco a quinze dias precedentes e falsos negativos, quando realizados numa fase precoce da infeção, em que a excreção viral nas fezes ainda não ocorre<sup>(12)</sup>.

Nos animais acompanhados o tratamento preconizado para enterite parvoviral canina incluiu fluidoterapia agressiva para correção de desequilíbrios hídricos e eletrolíticos, com suplementação com dextrose em casos de hipoglicémia e transfusão de plasma em situações de hipoalbuminémia severa. Nos animais com febre e/ou com neutropenia iniciou-se antibioterapia de largo espectro, utilizando-se uma cefalosporina de 3ª geração (ceftriaxona) em combinação com metronidazol. Como antieméticos utilizaram-se, com frequência, fármacos como o maropitant (Cerenia®) e a metoclopramida.

#### 1.2.8. Gastroenterologia

Nesta área para além de estarem incluídas desordens do trato gastrointestinal, incluem-se também as afeções das glândulas anexas como o fígado e o pâncreas. A ocorrência de alterações gastrointestinais é um dos motivos mais frequentes de consulta em medicina veterinária. A casuística acompanhada durante o estágio curricular realizado no VetOeiras não fugiu à regra, tendo esta sido a área que, no total de casos acompanhados, mais vezes foi abordada. Na tabela 12 encontram-se discriminadas as alterações patológicas diagnosticadas nos casos acompanhados.

A maioria dos sinais clínicos de doença gastrointestinal é inespecífica, designadamente anorexia, vômito, diarreia, melena, hematoquezia, dor abdominal e perda de peso, e pode resultar tanto de uma doença primária do trato gastrointestinal, como de uma afeção de outros órgãos ou mesmo sistémica. Contudo, a maioria dos cães com alterações gastrointestinais apresentam afeções autolimitantes, relacionadas com indiscrições alimentares, que, muitas vezes, se resolvem com tratamento sintomático. Apenas alguns cães, e a maioria dos gatos, requerem procedimentos de diagnóstico adicionais por ausência de melhoria clínica após tratamento sintomático ou quando se apresentam gravemente doentes na primeira abordagem<sup>(14)</sup>.

Mais uma vez, a elaboração de uma história clínica detalhada é importante, nomeadamente para caracterizar a evolução dos sinais clínicos e distinguir se se trata de um processo agudo ou crónico, e investigar a possibilidade de ingestão de agentes tóxicos ou corpos estranhos. Um exame físico detalhado deve também ser sempre realizado, de modo a identificar a presença de doença sistémica, e, em caso de suspeita, devem ser realizados exames complementares como hemograma e perfis bioquímicos séricos. O recurso a exame radiológico torácico e abdominal é especialmente indicado em pacientes com história de regurgitação ou vômito e diarreia aguda,

podendo permitir identificar presença de corpos estranhos, torções e dilatações gástricas e massas, que possam necessitar de intervenção cirúrgica de emergência. A realização de ecografia abdominal é um procedimento de elevado valor de diagnóstico em gastroenterologia, quando realizado por ecografista experiente, que permite analisar a arquitetura dos tecidos que constituem o trato gastrointestinal e glândulas anexas, a dimensão dos órgãos, a espessura e motilidade intestinal, diâmetro de linfonodos mesentéricos e colheita de amostras por PAAF para estudo citológico. O recurso a endoscopia também pode ser útil para um diagnóstico definitivo, permitindo observar a integridade da mucosa esofágica, gástrica, duodenal, jejunal e do cólon, realizar biópsia destas regiões e identificar a presença de corpos estranhos<sup>(14)</sup>.

A maioria dos casos acompanhados de gastroenterite idiopática ou de gastroenterite por indiscrição alimentar responderam rapidamente ao tratamento sintomático, com dieta dita gastrointestinal, administração de um antiemético de ação central no caso de vômito, como o maropitant (Cerenia®), de um antiácido antagonista dos recetores H<sub>2</sub>, como a famotidina (Lasa®), e de um protetor da mucosa gastroesofágica, como o sucralfato. Nos casos mais graves, com desidratação, anorexia e depressão severas, foi necessário internamento para fluidoterapia endovenosa adequada ao restabelecimento do balanço hídrico e eletrolítico, com eventual suplementação com dextrose, no caso de hipoglicemia.

**Tabela 12.** Distribuição das diferentes afeções na área da gastroenterologia diagnosticadas em canídeos, felídeos e no total de animais acompanhados durante o estágio curricular (n=88).

Patologias	Canídeos		Felídeos		Total	
	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)
Corpo estranho	7	12,3	0	0,0	7	8,0
Gastroenterite por indiscrição alimentar	4	7,0	2	6,5	6	6,8
Gastroenterite inespecífica	12	21,1	6	19,4	18	20,5
Gastrite	4	7,0	3	9,7	7	8,0
Úlcera gástrica perfurante	0	0,0	1	3,2	1	1,1
Colite	5	8,8	3	9,7	8	9,1
Impactação gastrointestinal	1	1,8	0	0,0	1	1,1
Doença inflamatória intestinal	5	8,8	0	0,0	5	5,7
Pancreatite	5	8,8	3	9,7	8	9,1
Insuficiência hepática	2	3,5	0	0,0	2	2,3
Hepatopatia inespecífica	7	12,3	2	6,5	9	10,2
Hepatopatia por esteroides	1	1,8	0	0,0	1	1,1
Triadite	0	0,0	2	6,5	2	2,3
Obstrução do ducto coledoco	0	0,0	1	3,2	1	1,1
Colangiohepatite	1	1,8	0	0,0	1	1,1
Lipidose hepática	0	0,0	7	22,6	7	8,0
Dilatação gástrica	1	1,8	0	0,0	1	1,1
Dilatação e torção gástrica	2	3,5	0	0,0	2	2,3
Prolapso rectal	0	0,0	1	3,2	1	1,1
Atraso de esvaziamento gástrico	2	3,5	0	0,0	2	2,3
<b>Total</b>	<b>57</b>	<b>100,0</b>	<b>31</b>	<b>100,0</b>	<b>88</b>	<b>100,0</b>

### 1.2.9. Estomatologia

Como apresentado na tabela 13, na área da estomatologia foram acompanhados sete casos com doença periodontal e três com persistência de dentição decídua em cães. Em gatos, a afeção estomatológica mais frequentemente diagnosticada foi a gengivoestomatite felina.

**Tabela 13.** Distribuição das diferentes afeções na área da estomatologia acompanhadas durante o estágio curricular (n=23; CE-corpo estranho).

Afeções	Canídeos		Felídeos		Total	
	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)
Doença periodontal	7	70,0	4	30,8	11	47,8
Gengivoestomatite felina	0	0,0	5	38,5	5	21,7
Fenda palatina traumática	0	0,0	1	7,7	1	4,3
Persistência de dentição decídua	3	30,0	0	0,0	3	13,0
Fratura de sínfise mandibular	0	0,0	1	7,7	1	4,3
Anquilose da articulação temporomandibular	0	0,0	1	7,7	1	4,3
Traumatismo por ingestão de CE	0	0,0	1	7,7	1	4,3
Total	10	100,0	13	100,0	23	100,0

As doenças da cavidade oral são um problema relativamente comum em cães e gatos de qualquer idade, algumas das quais apenas são identificadas quando o veterinário realiza o exame da cavidade oral. Os sinais clínicos de doença da cavidade oral podem ser variáveis, devendo sempre ser investigada a sua presença quando animais manifestam dor oral, disfagia, salivação excessiva, edema facial, presença de fístulas de drenagem de abscessos, halitose e hemorragias da cavidade oral<sup>(15)</sup>.

No VetOeiras, os casos de dentisteria são acompanhados pela Dra. Carina Ferreira. Em situações de doença periodontal recomenda-se a realização de limpeza e destartarização dentária de forma a remover fatores que estimulam de forma contínua a inflamação dos tecidos periodontais. Na presença de mobilidade dentária e reabsorção de raízes dentárias (detetada por realização de raio x da cavidade oral através de equipamentos específicos para o efeito) é recomendada a extração de dentes. Como medidas de prevenção de doença periodontal, recomenda-se uma higiene oral regular, através da escovagem de dentes, procedimento aceite por alguns proprietários, e fornecimento de biscoitos e brinquedos com efeitos de limpeza da cavidade oral.

A gengivoestomatite felina é uma afeção crónica multifatorial, relativamente comum em gatos, caracterizada por inflamação crónica e proliferação da mucosa gengival e oral, com presença de ulceração nos casos mais severos<sup>(15)</sup>. Em pacientes com esta patologia recomendou-se a realização de testes de diagnóstico de infeção por FIV, pois esta pode ser um fator predisponente do desenvolvimento desta afeção. Com frequência, em pacientes estáveis, recomendou-se a extração cirúrgica de pré-molares e molares. Quando os proprietários se mostraram relutantes à extração múltipla de dentes procedeu-se ao tratamento médico, com antibioterapia com amoxicilina e ácido clavulânico (Clavubactin®) e anti-inflamatório não esteroide como o meloxicam (Meloxivet®) ou robenacoxib (Onsior®).

#### 1.2.10. Oncologia

Na tabela 14 encontram-se discriminadas as frequências absolutas e relativas das diferentes afeções neoplásicas diagnosticadas nos casos de canídeos e felídeos acompanhados durante o estágio curricular.

Durante o estágio realizado acompanhou-se o processo de diagnóstico de processos neoplásicos de diferentes sistemas orgânicos. A suspeita de neoplasia ocorreu em diferentes

tipos de casos: i) animais aparentemente saudáveis, nos quais no exame físico de rotina se identificou o desenvolvimento de uma massa; ii) animais aparentemente saudáveis, nos quais o proprietário detetou a existência de uma massa, sendo esse o motivo da consulta e iii) animais com sintomatologia inespecífica, que ao exame físico ou após realização de exames complementares (radiológicos, ecográficos ou hematológicos) se suspeitou de processo neoplásico. De um modo geral, após deteção de massas suspeitas foi realizada PAAF e com a amostra obteve-se um esfregaço para avaliação citológica, que, na maioria dos casos permitiu identificar a natureza da massa puncionada (neoplasia benigna, maligna, de natureza inflamatória ou hiperplásica). Para um diagnóstico definitivo, sempre que possível, procedeu-se à extração cirúrgica da massa, ou parte desta, com envio de biopsia para análise histopatológica, sendo que em alguns casos a extração cirúrgica fez também parte do tratamento.

No caso de suspeita ou diagnóstico definitivo de neoplasia maligna com potencialidade de metastização pulmonar, recomendou-se a realização de raio x torácico.

Em alguns dos casos acompanhados assistiu-se à conversa, com os proprietários, de introdução à quimioterapia e foram acompanhadas várias sessões de quimioterapia com carboplatina, realizadas numa cadela à qual foi extraído um osteossarcoma da parede costal em setembro de 2014.

**Tabela 14.** Distribuição das diferentes neoplasias diagnosticadas nos casos de canídeos, felídeos e no total de casos acompanhados durante o estágio curricular (n=26).

Neoplasias	Canídeos		Felídeos		Total	
	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)
Mastocitoma cutâneo	1	5,5	0	0,0	1	3,8
Carcinoma de células escamosas	1	5,5	0	0,0	1	3,8
Adenocarcinoma intestinal	1	5,5	1	12,5	2	7,7
Linfoma intestinal	2	11,1	0	0,0	2	7,7
Linfoma mediastínico	0	0,0	2	25,0	2	7,7
Adenocarcinoma adrenal	1	5,5	0	0,0	1	3,8
Leucemia aguda	1	5,5	0	0,0	1	3,8
Hemangiossarcoma	2	11,1	0	0,0	2	7,7
Mesotelioma pericárdico	1	5,5	0	0,0	1	3,8
Melanoma	1	5,5	0	0,0	1	3,8
Tumores mamários	4	22,2	3	37,5	7	26,9
Tumor das glândulas hepatóides	1	5,5	0	0,0	1	3,8
Metastização cerebral	1	5,5	0	0,0	1	3,8
Metastização pulmonar	1	5,5	2	25,0	3	11,5
Total	18	100,0	8	100,0	26	100,0

#### 1.2.11. Oftalmologia

Na área da oftalmologia foram acompanhadas consultas realizadas pela Dra. Cristina Seruca, médica veterinária diplomada em oftalmologia pelo colégio europeu da especialidade. Nesta área assistiu-se à realização de exames oftalmológicos, incluindo realização de exames como o teste de *Schirmer*, teste da fluoresceína, ecografia ocular e medição da pressão intraocular. Na tabela 15 encontram-se discriminadas as afeções oftalmológicas que foram acompanhadas durante o estágio.

**Tabela 15.** Distribuição das diferentes afeções oftalmológicas diagnosticadas nos casos de canídeos, felídeos e no total de casos acompanhados durante o estágio curricular (n=16).

Afeções	Canídeos		Felídeos		Total	
	Fi	Fr (%)	Fi	Fr (%)	Fi	Fr (%)
Quemose	0	0,0	1	20,0	1	6,3
Conjuntivite	1	9,1	2	40,0	3	18,8
Úlcera de córnea	1	9,1	1	20,0	2	12,5
Melting de córnea	0	0,0	1	20,0	1	6,3
Cataratas	4	36,4	0	0,0	4	25,0
Massa palpebral	1	9,1	0	0,0	1	6,3
Queratoconjuntivite seca	3	27,3	0	0,0	3	18,8
Cílio ectópico	1	9,1	0	0,0	1	6,3
Total	11	100,0	5	100,0	16	100,0

#### 1.2.12. Endocrinologia

Na tabela 16 encontram-se apresentadas as afeções diagnosticadas em cães, gatos e no total de animais, na área da endocrinologia. Em ambas as espécies a patologia endocrinológica que mais vezes foi abordada foi a diabetes mellitus.

**Tabela 16.** Distribuição das diferentes afeções endócrinas diagnosticadas nos casos de canídeos, felídeos e no total de casos acompanhados durante o estágio curricular (n=22).

Afeções	Canídeos		Felídeos		Total	
	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)
Diabetes mellitus	7	50,0	5	62,5	12	54,5
Hipotiroidismo	2	14,3	0	0,0	2	9,1
Hipertiroidismo	0	0,0	3	37,5	3	13,6
Hiperadrenocorticismo iatrogénico	1	7,1	0	0,0	1	4,5
Hiperadrenocorticismo	3	21,4	0	0,0	3	13,6
Hipoadrenocorticismo	1	7,1	0	0,0	1	4,5
Total	14	100,0	8	100,0	22	100,0

Em cães, dois dos casos de diabetes mellitus acompanhados apresentaram-se à consulta em estado de cetoacidose diabética, com os seguintes sinais clínicos: poliúria, polidípsia, perda de peso, letargia, vômito, anorexia, desidratação e respiração lenta e profunda. Recorrendo a exames complementares foi determinada hiperglicemia, glicosúria e cetonúria. Procedeu-se ao seu internamento com administração de fluidoterapia (NaCl 0,9%, suplementado com KCl 40 mEq/L no caso de hipocalémia) para reposição de fluidos e eletrólitos em défice e manutenção de balanço hidroeletrólítico, e iniciou-se insulino-terapia, utilizando, numa primeira fase uma insulina de rápido início e curta duração de ação (Actrapid®), de acordo com o seguinte protocolo:

- ✓ 1º - Administração de 0,2 U/kg, via intramuscular;
- ✓ 2º - Administração 0,1 U/kg, via intramuscular, a cada hora, até que a glicémia se aproxime de 250 mg/dL, nessa altura passar para administração subcutânea de insulina cada oito horas (0,1 a 0,3 U/kg);
- ✓ Medição de glicémia a cada hora;
- ✓ Se glicémia inferior a 250 mg/dL, suplementação de fluidoterapia com dextrose 5%;
- ✓ Quando o animal estiver estável, a comer, sem sinais de cetoacidose e a ser capaz de manter equilíbrio hidroeletrólítico, sem necessitar de fluidoterapia endovenosa, passar para insulina de longa ação - Caninsulin®, de administração cada 12 horas.

O objetivo da insulino terapia passa pela obtenção de valores de glicémia nunca superiores a 300 mg/dL, um nadir (valor mais baixo de glicémia obtido na curva de glicémia diária, correspondente ao pico de ação da insulina administrada) entre 80 e 130 mg/dL e uma média de valores de glicémia diários inferior a 250 mg/dL.

Em gatos, os casos acompanhados corresponderam a animais em que já tinha sido feito o diagnóstico prévio de diabetes mellitus e foram internados por outros motivos ou passaram o dia no hospital para elaboração de curva de glicémia. Nestes, a insulina geralmente utilizada foi a insulina glargina (Lantus®), uma insulina de longa ação, com administração a cada 12 horas.

### 1.2.13. Neurologia

Na tabela 17 encontram-se enumeradas as diferentes afeções neurológicas diagnosticadas nos casos acompanhados durante o estágio curricular. Dos 11 casos acompanhados em cães, seis corresponderam a animais com patologia de disco intervertebral, nomeadamente hérnias disciais de extrusão (Hansen tipo I), hérnias disciais de protrusão (Hansen tipo II) e um caso de hérnia de extrusão traumática.

**Tabela 17.** Distribuição das diferentes afeções diagnosticadas nos casos de canídeos, felídeos e no total de casos acompanhados durante o estágio curricular, na área da neurologia (n=13).

Afeções	Canídeos		Felídeos		Total		
	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)	
Epilepsia idiopática	2	18,2	0	0,0	2	15,4	
Afeção de disco intervertebral	cervical	1	9,1	0	0,0	1	7,7
	toraco-lombar	3	27,3	0	0,0	3	23,1
	lombar	2	18,2	0	0,0	2	15,4
Polirradiculoneurite	1	9,1	0	0,0	1	7,7	
Doença vestibular central (neoplásica)	1	9,1	0	0,0	1	7,7	
Doença vestibular periférica (por otite média-interna)	1	9,1	0	0,0	1	7,7	
Síndrome vestibular idiopático felino	0	0,0	1	50,0	1	7,7	
Hemiparesia de posteriores	0	0,0	1	50,0	1	7,7	
Total	11	100,0	2	100,0	13	100,0	

Na área da neurologia assistiu-se à realização de exames neurológicos em animais com suspeita de patologia neurológica, com o intuito de localização da lesão responsável pelos sinais clínicos observados. Um exame neurológico detalhado deve ser constituído pela avaliação dos seguintes componentes: estado mental, postura em repouso e em andamento, reações posturais, tónus e desenvolvimento muscular, reflexos espinais, nociceção e função dos nervos cranianos. A realização de radiografias de coluna vertebral permitiu a identificação de malformações congénitas, fraturas, luxações e afeções de disco intervertebral, capazes de justificar as alterações neurológicas observadas em alguns pacientes. Em tais casos recomendou-se a realização de tomografia axial computadorizada (TAC) para localização e caracterização mais precisa da patologia, de modo a estabelecer um prognóstico e determinar quais as opções de tratamento mais indicadas.

#### 1.2.14. Traumatologia

Na área da traumatologia diferentes casos foram acompanhados, encontrando-se discriminada na tabela 18 a distribuição das diferentes causas de trauma, nas diferentes espécies e no total de animais.

**Tabela 18.** Distribuição das diferentes causas de trauma nos casos de canídeos, felídeos e no total de casos acompanhados durante o estágio curricular (n=19).

Causas de trauma	Canídeos		Felídeos		Total	
	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)
Atropelamentos	5	41,7	4	57,1	9	47,4
Mordeduras	5	41,7	0	0,0	5	26,3
Quedas	2	16,7	3	42,9	5	26,3
Total	12	100,0	7	100,0	19	100,0

Numa primeira abordagem ao paciente que sofreu trauma realizou-se um exame físico completo, com especial atenção para a presença lesões multiorgânicas que pudessem comprometer a vida do animal num curto espaço de tempo. Como tal, na maioria dos casos procedeu-se à realização de radiografias torácicas e abdominias, eletrocardiograma, ecografia abdominal e microhematócrito, com o intuito de identificar a presença de hemorragias ativas, roturas de órgãos, pneumotórax e contusões pulmonares. Após estabilização dos parâmetros vitais passou-se então à avaliação das possíveis feridas e fraturas.

As lesões observadas, decorrentes de trauma, encontram-se referidas nas diferentes áreas clínicas a que correspondem.

#### 1.2.15. Ortopedia

Na área da ortopedia diversos casos foram acompanhados em consultas do Dr. Luís Chambel, que tem como área de interesse preferencial a ortopedia. Entre as afeções abordadas destacaram-se a displasia de anca, a displasia de cotovelo e a rotura de ligamento cruzado cranial (tabela 19).

A displasia de anca é uma doença biomecânica de desenvolvimento, ou seja, um animal com displasia de anca nasce sem qualquer alteração. No entanto, durante os primeiros meses de vida desenvolvem-se alterações na articulação coxofemoral, por ausência de coaptação perfeita entre a superfície redonda da cabeça do fémur e a superfície côncava do acetábulo. A incongruência articular leva ao desenvolvimento precoce de subluxação articular e posteriormente lesões de artrose, em muitos casos responsável por dor e, conseqüentemente, claudicação. Esta é uma patologia hereditária poligénica, embora alguns fatores ambientais (excesso de peso, curva de crescimento acentuada, excesso de exercício, pavimento escorregadio e liso, entre outros) possam contribuir para uma maior expressão da doença em animais portadores de genes para displasia de anca. Embora esta possa ocorrer em qualquer raça, é mais frequente em raças de cães médias e grandes, como, por exemplo, São Bernardo, Terra nova, Golden retriever; Labrador retriever, Pastor alemão, Serra da estrela, Rafeiro do Alentejo, entre outras<sup>(16)</sup>. Neste âmbito, foram acompanhados casos de animais com displasia de anca e com sintomatologia associada, casos de animais assintomáticos, mas que por

pertencerem a raças predisponentes foi recomendada a realização de despiste precoce de displasia, e casos de animais de criadores responsáveis que participam no programa de despiste e controlo de displasia de anca desenvolvido pela associação portuguesa de médicos veterinários especialistas em animais de companhia (APMVEAC).

No caso de animais pertencentes a raças predispostas é indicada a realização de estudo radiológico coxofemoral a partir dos quatro meses de idade, sendo que, nestes casos, recomendou-se a avaliação de quatro projeções radiológicas (coxofemoral convencional, coxofemoral sobre compressão, coxofemoral sobre distração e *Dorsal Acetabular Rim view* (DAR view)). Em cães com mais de um ano de idade pode proceder-se, com segurança, à classificação do grau de displasia, de A a E, de acordo com as características estabelecidas pela APMVEAC, apenas com recurso a raio x coxofemoral convencional.

Relativamente ao tratamento, em animais com menos de um ano de idade e que já apresentavam sinais de displasia, recomendou-se a realização de osteotomia tripla, que, apesar de ser um tratamento agressivo, pode ajudar na melhoria de qualidade de vida futura, do animal. Animais em que o diagnóstico de displasia é feito tardiamente, recomendou-se cirurgia de colocação de prótese de anca, um procedimento muito dispendioso e que não seria realizado em Portugal, não estando ao alcance dos proprietários dos animais acompanhados. Como alternativa, recomendou-se a realização de fisioterapia para fortalecimento muscular e analgesia, administração de condroprotetores, realização de exercício moderado regular, perda de peso no caso de animais com excesso de peso, e recurso a anti-inflamatórios como carprofeno (Canidryl®).

**Tabela 19.** Distribuição das diferentes afeções abordadas na área da ortopedia, nos casos de canídeos, felídeos e no total de casos acompanhados durante o estágio curricular (n=74).

Afeções	Canídeos		Felídeos		Total		
	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)	
Displasia de anca	24	39,3	0	0,0	24	32,4	
Displasia de cotovelo	7	11,5	0	0,0	7	9,5	
Rotura de ligamento cruzado cranial	9	14,8	0	0,0	9	12,2	
Fratura	Sínfise mandibular	0	0,0	1	7,7	1	1,4
	Costelas	1	1,6	0	0,0	1	1,4
	Tíbia	2	3,3	0	0,0	2	2,7
	Fíbula	1	1,6	0	0,0	1	1,4
	Fémur	1	1,6	1	7,7	2	2,7
	Rádio	1	1,6	0	0,0	1	1,4
	Metatarsos	3	4,9	1	7,7	4	5,4
	Pélvica	3	4,9	4	30,8	7	9,5
Luxação sacroilíaca	3	4,9	4	30,8	7	9,5	
Luxação de patela	1	1,6	0	0,0	1	1,4	
Luxação tibiotársica	1	1,6	0	0,0	1	1,4	
Anquilose temporomandibular	0	0,0	1	7,7	1	1,4	
Luxação temporomandibular	0	0,0	1	7,7	1	1,4	
Claudicação de causa indeterminada	4	6,6	0	0,0	4	5,4	
Total	61	100,0	13	100,0	74	100,0	

### 1.2.16. Alergologia

Na tabela 20 encontram-se discriminados os diferentes processos alérgicos abordados durante o estágio curricular realizado no VetOeiras.

**Tabela 20.** Distribuição dos diferentes processos alérgicos abordados nos casos de canídeos, felídeos e no total de casos acompanhados durante o estágio curricular (n=18; DAPP – Dermatite alérgica à picada da pulga).

Processos alérgicos	Canídeos		Felídeos		Total	
	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)
Reação pós-vacinal aguda	3	17,6	0	0,0	3	16,7
Reação pós-vacinal retardada	0	0,0	1	100,0	1	5,6
Reação do tipo alérgico após contacto com <i>Thaumetopoea pityocampa</i>	9	52,9	0	0,0	9	50,0
Alergia ambiental não identificada	2	11,8	0	0,0	2	11,1
DAPP	2	11,8	0	0,0	2	11,1
Atopia	2	11,8	0	0,0	2	11,1
Alergia alimentar	2	11,8	0	0,0	2	11,1
Total	17	100,0	1	100,0	18	100,0

A reação do tipo alérgico que mais vezes foi detetada foi a reação ao contacto com lagartas dos pinheiros, também denominadas de processionárias (*Thaumetopoea pityocampa*), tendo ocorrido um surto de reações no mês de janeiro. Estas lagartas apresentam pêlos que retêm no seu interior uma haloproteína, designada de taumatopoina, e que é capaz de desencadear a libertação, na pele e mucosas, de histamina, acetilcolina ou proteínas<sup>(17)</sup>. Alguns autores consideram que este se trata de um processo de intoxicação e não alérgico, no entanto, o tipo de reação desencadeada e a rapidez com que ocorre conduziu à sua inclusão neste grupo de afeções.

Diversos animais, apresentaram-se no hospital com edema da língua e lábios e sinais de conjuntivite, sintomatologia semelhante à descrita em alguns dos casos referidos por Oliveira *et al.* (2003)<sup>(17)</sup>, e através da anamnese concluiu-se que tinham estado em contacto com *Thaumetopoea pityocampa*, vulgarmente conhecida como lagarta dos pinheiros, ou processionária. Procedeu-se à administração endovenosa de succinato de sódio de metilprednisolona e, após sedação ligeira, procedeu-se à lavagem da boca e língua, bem como das conjuntivas, com soro fisiológico, para remoção de possíveis componentes das lagartas, que ainda pudessem estar presentes. A gravidade desta afeção e a precocidade com que o tratamento inicial é instaurado têm grande influência na resposta ao tratamento desta reação do tipo alérgica, sendo o prognóstico considerado reservado, embora a maioria dos casos apresente uma evolução favorável<sup>(17)</sup>. Felizmente, praticamente todos os animais acompanhados foram tratados atempadamente. Apenas um necessitou de internamento, por se ter apresentado mais tardiamente e desenvolvido uma úlcera na língua, que necessitou maior atenção.

### 1.2.17. Toxicologia

Na área da toxicologia foram acompanhados seis casos por possível ingestão de substâncias tóxicas, discriminados na tabela 21.

Nos casos de canídeos que ingeriram chocolate e embalagem de comprimidos Cerebrum®, a sua ingestão tinha ocorrido há menos de uma hora, pelo que, ao provocar a emese (por administração oral de um a dois mililitros de peróxido de hidrogénio a três por cento, por kg de peso) promoveu-se a evacuação gástrica de tais substâncias potencialmente tóxicas, não chegando a ser observados sinais clínicos de intoxicação.

**Tabela 21.** Frequências absolutas e relativas das diferentes toxicoses abordadas no seguimento dos casos de canídeos, felídeos e no total de casos acompanhados durante o estágio curricular (n=6).

Toxicoses	Canídeos		Felídeos		Total	
	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)
Intoxicação por dicumarínicos	2	40,0	0	0,0	2	33,3
Intoxicação por deltametrina	1	20,0	0	0,0	1	16,7
Ingestão de chocolate	1	20,0	0	0,0	1	16,7
Ingestão de comprimidos Cerebrum®	1	20,0	0	0,0	1	16,7
Intoxicação por acepromazina	0	0,0	1	100,0	1	16,7
Total	5	100,0	1	100,0	6	100,0

A ingestão de chocolate pode levar à intoxicação por metilxantinas, como a teobromina e a cafeína, presentes na sua constituição. Tais substâncias causam efeitos adversos cardiovasculares (como vasoconstrição, aumento da força de contração do músculo cardíaco, taquiarritmias, hipertensão e contrações ventriculares prematuras), gastrointestinais (vómito, diarreia), metabólicos (hipocalémia e hipertermia), neurológicos (convulsões tónico-clónicas, hiper-reatividade e tremores), renais (poliúria e polidipsia) e respiratórios (taquipneia, hipoxia, cianose e falência respiratória)<sup>(18)</sup>.

Relativamente à ingestão de comprimidos Cerebrum® (constituídos por lecitina, ortofosfato de cálcio, L-glutamina, L-arginina, fosfatidilserina e vitaminas B6, B1, B2 e ácido fólico) os possíveis efeitos adversos em animais são desconhecidos. No caso acompanhado a emese foi eficaz na eliminação dos comprimidos ingeridos, não se chegando a observar efeitos adversos.

Em dois cães suspeitou-se de ingestão de substâncias raticidas, designadamente dicumarínicos. Tais substâncias apresentam uma ação anticoagulante, ao inibirem competitivamente a enzima responsável pela ativação da vitamina K, que, por sua vez, tem um importante papel na ativação de fatores de coagulação<sup>(19)</sup>. Assim, um a três dias após a ingestão de doses tóxicas de dicumarínicos dá-se o esgotamento das reservas dos fatores implicados, o que leva ao desenvolvimento de coagulopatias<sup>(19)</sup>. Num dos casos acompanhados ocorreu suspeita de ingestão de substâncias raticidas poucas horas antes da consulta, pelo que, neste caso específico, foi realizada administração oral de carvão ativado e de comprimidos de vitamina K, não se chegando a observar coagulopatias. Já num segundo caso o cenário foi diferente, o animal apresentou-se à consulta com sinais graves de coagulopatia (hemotórax, hematomas subcutâneos, epistaxe e melena). Neste caso foi administrada vitamina K, parentericamente, e foi realizada transfusão com concentrado de eritrócitos, conseguindo-se reverter o efeito da intoxicação.

Noutro caso foi ingerida uma coleira Scalibor® por uma cadela, que se apresentou à consulta com ataxia e tremores musculares. Foi administrado diazepam para tratamento sintomático e os sinais clínicos desapareceram em 24 horas.

Em relação aos felídeos, apenas um caso de intoxicação foi acompanhado, relativo a um gato ao qual foi administrado acidentalmente, pelo proprietário, um comprimido de 20 mg de acepromazina. Este apresentava-se atáxico, com protusão da terceira pálpebra e com estado mental deprimido. Permaneceu sobre observação, realizando-se apenas fluidoterapia de manutenção e em 12 horas os sinais clínicos desapareceram.

### **1.3. Clínica cirúrgica**

Na área cirúrgica realizou-se o acompanhamento de consultas pré-cirúrgicas (acompanhamento por exame físico, realização de exames complementares, explicação de procedimentos e esclarecimento de dúvidas aos proprietários). No dia da cirurgia participou-se na preparação do paciente antes da entrada na sala de cirurgia (colocação de cateter endovenoso e sistema de fluidoterapia, cálculo e administração de pré-medicação anestésica e tricotomia, lavagem e desinfecção da região corporal correspondente ao campo operatório). Já na sala de cirurgia, mediante requisição pelo cirurgião responsável pela cirurgia, participou-se na indução anestésica e intubação endotraqueal, monitorização anestésica (monitorização de frequência cardíaca, frequência respiratória, pressão arterial, capnografia, temperatura esofágica, assim como do reflexo palpebral e convergência ocular), preparação de material cirúrgico e realizou-se a tarefa de ajudante de cirurgia e de circulante. No período pós-cirúrgico, realizou-se a monitorização de pacientes, vigiando o seu acordar, monitorizando as suas constantes vitais, temperatura retal, estado mental e, nos casos mais graves, pressão arterial e nível de dor.

Sempre que possível, realizou-se o acompanhamento das altas dos pacientes internados, com especial atenção a informações como medicação prescrita, recomendações indicadas e data de reavaliação, transmitidas ao proprietário.

Na tabela 22 encontram-se evidenciados os diferentes procedimentos cirúrgicos acompanhados durante o estágio curricular, discriminados por área cirúrgica e espécie em que foram realizados. No total foram acompanhados 90 procedimentos, 58 dos quais corresponderam a procedimentos de cirurgia de tecidos moles. Nesta tabela apenas se incluem os casos em que o procedimento cirúrgico propriamente dito foi acompanhado, não estando incluídos aqueles em que apenas o processo de diagnóstico, planeamento de cirurgia e/ou seguimento pós-cirúrgico foi acompanhado.

**Tabela 22.** Descrição do número de procedimentos cirúrgicos acompanhados em cada área cirúrgica (n=90; TPLO - Osteotomia de nivelamento do *plateau* tibial; RLCC – Rotura de ligamento cruzado cranial; ATM – Anquilose temporomandibular).

Área cirúrgica	Procedimento cirúrgico	Fi (total)	Fi (canídeos)	Fi (felídeos)
<b>CIRURGIA DE TECIDOS MOLES</b>		<b>58</b>	<b>36</b>	<b>22</b>
Dermatologia	Nodulesctomia	3	2	1
	Mastectomia	6	2	4
	Sutura de fístula perianal	1	0	1
	Reconstrução de lacerações cutâneas	3	1	2
Estomatologia	Exerese de massa sublingual	1	1	0
	Sutura de fenda palatina traumática	1	0	1
Gastroenterologia	Enterectomia	5	4	1
	Gastrotomia	1	0	1
	Enterotomia	2	2	0
	Biopsia hepática	1	1	0
Laparotomia exploratória	Laparotomia exploratória	3	2	1
	Plastia de palato mole e divertículos laríngeos	1	1	0
Teriogenologia	Ovariohisterectomia	10	7	3
	Ovariectomia	2	2	0
	Orquiectomia	11	4	7
	Omentalização de coto uterino	1	1	0
Sistema muscular	Reconstrução de parede torácica	1	1	0
Oftalmologia	Correção de cataratas por facoemulsificação	2	2	0
	Exerese de cílio ectópico	1	1	0
	Exerese de massa palpebral	1	1	0
	Queratotomia em rede	1	1	0
<b>CIRURGIA ORTODÔNTICA</b> (Destartarizações e extrações dentárias)		<b>17</b>	<b>9</b>	<b>8</b>
<b>CIRURGIA ORTOPÉDICA</b>		<b>15</b>	<b>10</b>	<b>5</b>
Artrologia	Artroscopia de cotovelo	2	2	0
	Caudectomia	1	1	0
	TPLO	2	2	0
	Técnica extracapsular de estabilização de joelho com RLCC	2	2	0
	Artroplastia de ATM	1	0	1
Osteologia	Biopsia de osso mandibular	1	0	1
	Estabilização de fratura de fêmur	2	0	2
	Estabilização de fratura de rádio e ulna	3	3	0
	Estabilização de fratura de metatarsianos	1	0	1
<b>TOTAL</b>		<b>90</b>	<b>55</b>	<b>35</b>

### III. Monografia: Leishmaniose canina

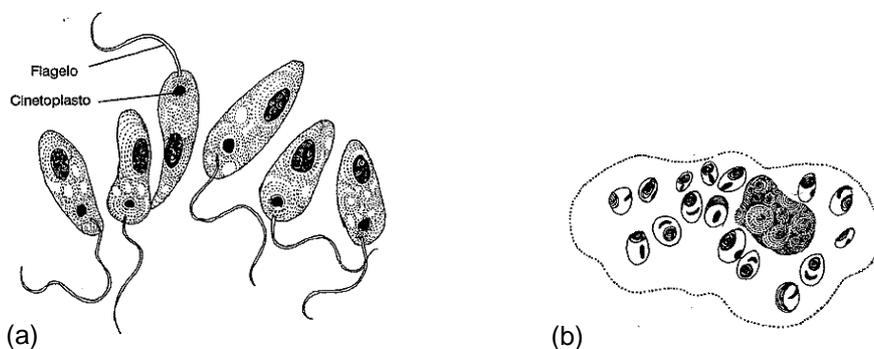
#### 1. Revisão bibliográfica

##### 1.1. Epidemiologia

A leishmaniose trata-se de uma zoonose potencialmente fatal para a espécie humana e canina e que se encontra amplamente distribuída pelos continentes Europeu, Africano, Asiático e Americano<sup>(20,21)</sup>. Tem como agente etiológico um protozoário pertencente à classe Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae* e género *Leishmania*. O género *Leishmania* está ainda dividido em dois subgéneros, *Leishmania* e *Viannia*, em função do local de replicação e desenvolvimento do protozoário no hospedeiro invertebrado. Assim, as espécies que pertencem ao subgénero *Leishmania*, como *Leishmania infantum*, replicam-se no intestino médio do hospedeiro invertebrado, enquanto as pertencentes ao subgénero *Viannia* se replicam no intestino distal<sup>(21)</sup>.

Atualmente estão identificadas várias espécies de *Leishmania* capazes de infetar canídeos de diferentes países do velho mundo (continentes Africano, Asiático e Europeu) e do novo mundo (continente Americano). Contudo, considera-se hoje que a espécie *Leishmania infantum* é o agente causal da leishmaniose visceral zoonótica, nos países do velho mundo, e a *Leishmania chagasi* o agente nos países do novo mundo. Muitos autores acreditam ainda que *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* são a mesma espécie e devem ser referidas como sinónimos<sup>(20,22)</sup>.

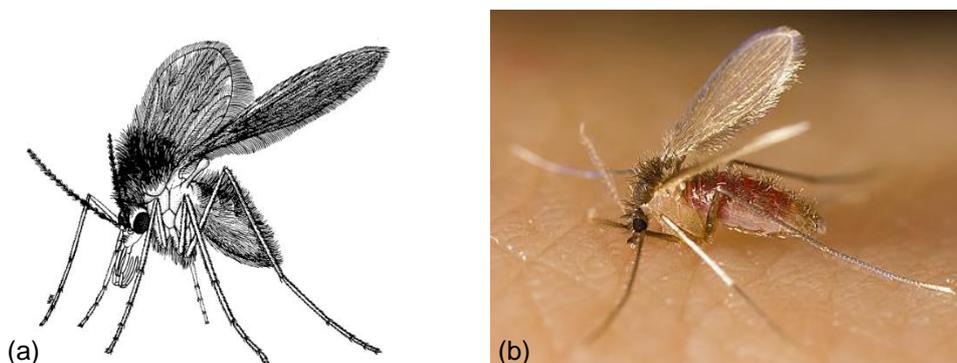
No ciclo de vida natural de *Leishmania sp* existem duas formas morfológicas do protozoário, bem distintas, a forma amastigota e a forma promastigota (figura 1). A amastigota caracteriza-se por uma forma redonda ou ovalada, com um diâmetro de dois a seis  $\mu\text{m}$ , e é capaz de parasitar as células do sistema fagocitário mononuclear (neutrófilos e macrófagos) dos hospedeiros vertebrados (HV). Estas apresentam no seu interior um núcleo basofílico e um cinetoplasto em forma de bastão, de cor mais escura, quando em preparações coradas com a técnica de Giemsa. Quanto à forma promastigota, encontra-se no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados (HI), tratando-se de uma forma extracelular alongada, com um flagelo livre, de 15-30  $\mu\text{m}$  de comprimento e dois a três  $\mu\text{m}$  de largura<sup>(21)</sup>.



**Figura 1.** Esquema ilustrativo das formas promastigota (a) e amastigota (b) de *Leishmania*. (adaptado de Taylor et al., 2010<sup>(23)</sup>).

Relativamente aos hospedeiros envolvidos no ciclo de vida deste protozoário, encontram-se i) um HI, pertencente à ordem *Diptera*, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, género *Phlebotomus*, nos países do velho mundo, ou género *Lutzomyia*, nos países do novo mundo, ambos comumente denominados por flebótomos, e ii) um HV, cuja espécie infetada pode variar consoante a área geográfica, podendo estar envolvidas espécies quer de animais domésticos e silvestres, quer a espécie humana<sup>(20)</sup>.

Relativamente ao HI, apenas as fêmeas são hematófagas, necessitando de sangue para a maturação dos ovos, e caracterizam-se pela sua pequena dimensão (dois a cinco mm), aspeto piloso, olhos grandes e negros, pernas longas e asas lanceoladas cobertas de pelos e mantidas eretas, em forma de V, quando em repouso (figura 2). Encontram-se em extensas áreas de todo o mundo, em habitats distintos, desde lugares abaixo do nível do mar até lugares a mais de três mil metros de altitude<sup>(21)</sup>. A sua atividade está dependente das condições de humidade e temperatura do ambiente, estando as condições ótimas relacionadas com temperaturas compreendidas entre os 15 e os 28 °C e humidade relativa elevada, não suportando condições meteorológicas extremas, como chuva e vento fortes<sup>(24,25)</sup>. O ambiente rural e periurbano, com presença de casas com pátios e jardins, favorece a presença de flebótomos, nomeadamente junto a locais de acumulação de matéria orgânica em decomposição<sup>(24)</sup>. Nos trópicos e subtropicais, o seu ciclo de vida é contínuo, contudo, na região mediterrânea as populações de vetores tendem a desenvolver-se segundo um padrão estacional mais definido, tipicamente entre a primavera e o outono<sup>(21)</sup>. Em Portugal, pensa-se que os flebótomos estão ativos entre maio e outubro, com picos de atividade em julho e agosto<sup>(26)</sup>. Com as alterações climáticas a distribuição e abundância de flebótomos pode ser afetada<sup>(27)</sup>.



**Figura 2.** (a) Esquema ilustrativo de um inseto fêmea do género *Phlebotomus* (adaptado de Killick-Kendrick, 1999<sup>(24)</sup>). (b) Fotografia de uma fêmea de *Phlebotomus perniciosus* a exercer hematofagia (Fonte: referência 28).

As fêmeas dos flebótomos são principalmente ativas ao entardecer, durante a noite e ao amanhecer, embora possam exercer hematofagia durante o dia, se perturbadas<sup>(21)</sup>. Quanto às áreas do corpo dos cães onde se alimentam, os flebótomos tendem a fazê-lo principalmente em áreas de pouco pelo, como a cabeça, especialmente no pavilhão auricular, e áreas inguinais e perianais<sup>(29)</sup>. Em condições favoráveis e em regiões endémicas, um cão pode receber até 700 picadas numa só noite<sup>(30 referido por 21)</sup>. Comparativamente aos mosquitos, os flebótomos

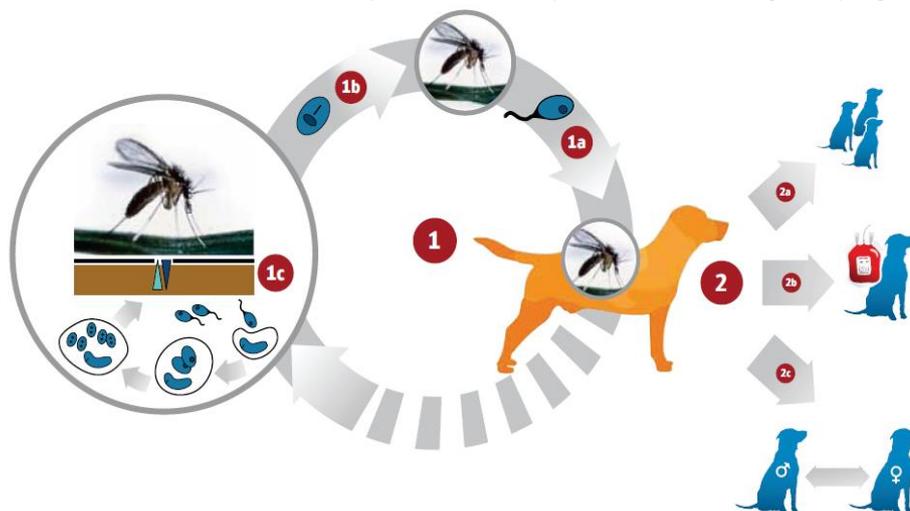
apresentam um voo silencioso e a sua velocidade de voo é consideravelmente mais baixa (inferior a um m/s)<sup>(24,31)</sup>. Adicionalmente, o seu voo é tipicamente mais curto (aproximadamente 300 m), estando a atividade dos adultos geralmente restringida aos arredores dos locais de reprodução<sup>(31)</sup>. Contudo, em estudos de campo realizados no sul de França, foi demonstrado que uma espécie de flebotomo (*P. ariasi*) é capaz de se deslocar por mais de dois km, pelo que este vetor pode ter uma capacidade de dispersão da infeção por *Leishmania* superior à anteriormente esperada<sup>(24)</sup>.

Muitas espécies de flebotomos estão descritas, mas apenas algumas como vetor de transmissão de *Leishmania*<sup>(20)</sup>. Na Europa, nove espécies do género *Phlebotomus* estão estritamente relacionadas com a transmissão de *L. infantum* em cães, e podem considerar-se como vetores demonstrados ou prováveis de leishmaniose canina (LC): *P. ariasi*, *P. Kyelakii*, *P. langeroni*, *P. longicuspis*, *P. neglectus*, *P. perfilliewi*, *P. perniciosus*, *P. syriacus* e *P. tobbi*<sup>(23)</sup>. Em Portugal estão identificadas as espécies *P. ariasi* e *P. perniciosus*<sup>(31)</sup>.

Os flebotomíneos são os únicos artrópodes adaptados para a transmissão biológica de *Leishmania*, no entanto taxas relativamente baixas de flebotomíneos portadores de *L. infantum* (0,5 – 3%) são suficientes para a manutenção desta infeção em áreas endémicas<sup>(32)</sup>. Na natureza, *P. ariasi* sobrevive aproximadamente 29 dias e *P. perniciosus* 31 dias, durante os quais as fêmeas ingerem sangue por várias ocasiões, pelo que um único flebotomo pode ser responsável pela infeção de vários animais<sup>(33 referido por 21)</sup>.

O ciclo de vida de *L. infantum* encontra-se esquematizado na figura 3. As fêmeas de flebotomos, ao se alimentarem de sangue de um HV infetado ingerem formas amastigotas, que se encontram no interior de células do sistema fagocítico mononuclear. Por sua vez, no intestino do inseto, tais formas são libertadas das células hospedeiras e transformam-se na forma extracelular flagelada, promastigota procíclica, que inicia a replicação. Posteriormente, após sucessivas replicações e com o decorrer de alterações moleculares da superfície celular, e destacamento do epitélio intestinal do HI, dá-se a migração anterior das formas promastigotas, nesta fase denominadas por metacíclicas infetantes, até ao aparelho bucal do inseto. Quando o flebotomo fêmea infetado se alimenta novamente, juntamente com a saliva inocula formas promastigotas metacíclicas, infetando o HV<sup>(20,23)</sup>. Tais formas são, então, fagocitadas por macrófagos ou neutrófilos e transformam-se em amastigotas. Ocorre, então, a formação de um vacúolo parasitóforo, inicia-se a multiplicação por divisão binária e posteriormente dá-se a rotura das células hospedeiras. São, então, libertadas novas formas amastigotas, que, por sua vez, serão fagocitadas por novas células. A repetição deste processo leva à disseminação das formas amastigotas, conduzindo à sua presença em diversos tecidos<sup>(21)</sup>. Outras formas de transmissão da doença foram descritas e comprovadas, tais como através da transfusão de sangue de dadores infetados<sup>(34,35)</sup>, transmissão vertical *in utero*<sup>(36,37,38)</sup> e transmissão venérea entre machos infetados e cadelas sãs<sup>(39)</sup> (figura 3), contudo o seu papel na epidemiologia da LC permanece incerto. Outras formas de transmissão possíveis, mas que ainda não foram comprovadas, incluem a transmissão direta de cão para cão através de mordeduras e feridas, o que poderia

explicar a presença de casos clínicos autóctones de LC em áreas não endémicas, na ausência aparente de vetores, e a transmissão por outros artrópodes como carrças e pulgas<sup>(32)</sup>.



**Figura 3.** Esquema ilustrativo do ciclo de vida de *L. infantum* com referência a outras possíveis vias de transmissão que não por flebótomos. 1- Ciclo de vida clássico: 1a – Promastigota; 1b – Amastigota; 1c – Multiplicação do parasita no interior de macrófagos. 2- Outras vias de transmissão menos usuais: 2a – Vertical; 2b – Transfusão sanguínea; 2c – Transmissão venérea (adaptado de Solano-Gallego *et al.*, 2011<sup>(32)</sup>).

Para que uma espécie seja considerada reservatório de *Leishmania*, esta deve ser abundante, estar infetada em grande proporção, ter capacidade de infetar flebótomos e manter a infeção ao longo de todo o ano<sup>(40 referido por 21)</sup>. Devido à sua densidade elevada, os cães parecem ser a única espécie doméstica capaz de manter *L. infantum* naturalmente<sup>(41)</sup>, embora também esteja documentada infeção noutras espécies de mamíferos domésticos e selvagens, tanto no velho como no novo mundo<sup>(20,42 referido por 21)</sup>. De facto, o cão é considerado o principal hospedeiro reservatório de *L. infantum* nas regiões geográficas onde a leishmaniose visceral zoonótica é endémica, estando comprovado o seu papel na manutenção da transmissão deste agente. Quanto ao seu papel na manutenção da transmissão de outras espécies de *Leishmania*, existe alguma controvérsia, sendo este provavelmente pouco relevante<sup>(40 referido por 21, 41)</sup>.

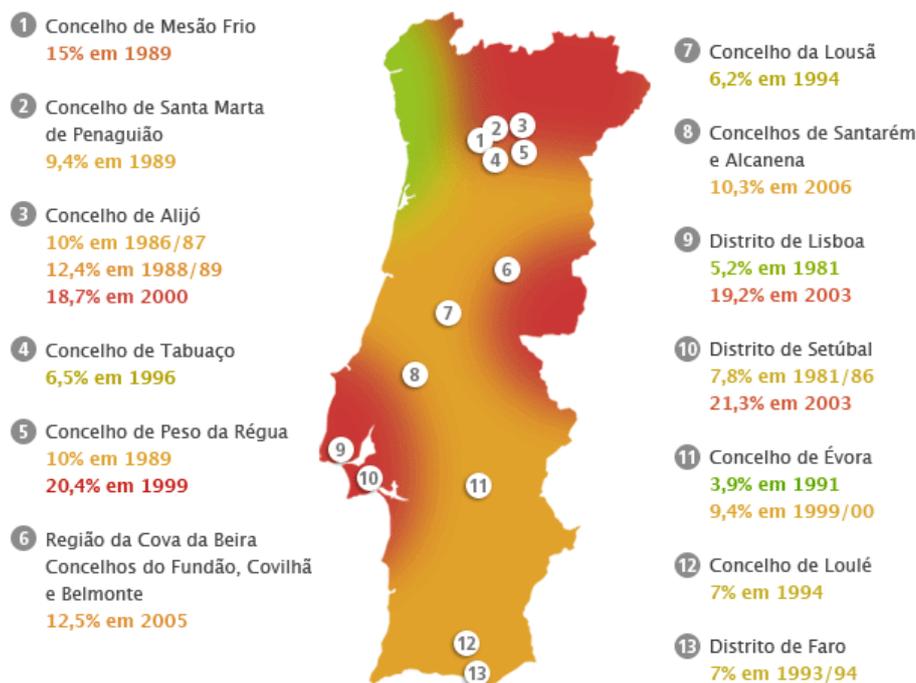
Entre as outras espécies, cuja capacidade de infeção e transmissão a flebótomos está descrita, encontram-se o gato doméstico (*Felis catus*), a lebre (*Lepus granatensis*), o guaxinim (*Cerdocyon thous*), o opossum (*Didelphis spp.*), o rato-preto (*Rattus rattus*) e a espécie humana. Contudo, para que seja confirmado o papel destas como hospedeiros reservatórios são necessários mais estudos de xenodiagnóstico realizados a nível populacional<sup>(42 referido por 21,43)</sup>. Pensa-se que os canídeos silvestres possam ser uma fonte adicional para a manutenção da infeção humana e canina no ambiente<sup>(44)</sup>, ainda que a existência de um ciclo silvático independente dos cães domésticos seja ainda questionável<sup>(41)</sup>.

A LC é uma doença zoonótica endémica em mais de 70 países de todo o mundo<sup>(45 referido por 21)</sup>. No velho mundo, infeções por *L. infantum* em cães são endémicas em muitas regiões da Europa, norte de África e Ásia, onde os cães são o reservatório principal deste protozoário<sup>(20)</sup>. A maioria dos estudos epidemiológicos de infeção por *Leishmania* em populações caninas baseia-

se na deteção de anticorpos específicos em estudos transversais (onde a colheita de amostras por indivíduo é feita num único momento, não existindo seguimento por períodos de tempo), estimando-se que no sul da Europa a seroprevalência varie de seis até mais de 20% (tabela 23). Tendo em conta dados serológicos de Itália, França, Espanha e Portugal, estima-se que, pelo menos, dois milhões e meio (em 15 milhões) de cães estão infetados nestes países<sup>(47)</sup>. Contudo, a prevalência da infeção pode ser significativamente mais alta que a seroprevalência, pois estão descritos casos de cães seronegativos, testados por técnicas de *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), nos quais foi detetado ADN de *Leishmania*, através da técnica de *polymerase chain reaction* (PCR), e onde foi detetada imunidade celular específica<sup>(47,48)</sup>.

**Tabela 23.** Seroprevalência de infeção por *L. infantum* em cães, em alguns dos países europeus onde a LC é endémica. (Adaptado de Solano-Gallego *et al.*, 2013<sup>(21)</sup>)

Países (região)	Cães (n)	Seroprevalência (variação)	Referência
Espanha	1.100	15.7% (0.0-46.6)	Miró <i>et al.</i> , 2013 <sup>(49)</sup>
França (sul)	3.922	12.4% (3.0-28)	Marty <i>et al.</i> , 2007 <sup>(50)</sup>
Grécia (Atenas)	2.620	19.5% (2.1-30.1)	Athanasίου <i>et al.</i> , 2012 <sup>(51)</sup>
Itália (norte)	4.456	26.4% (14.0-60.5)	Zaffaroni <i>et al.</i> , 1999 <sup>(52)</sup>
Portugal	3.974	6.3% (0.9-17.4)	Cortes <i>et al.</i> , 2012 <sup>(53)</sup>



**Figura 4.** Mapa mostrando os resultados de vários estudos seroepidemiológicos relativamente às taxas de seroprevalência de leishmaniose visceral canina em diferentes regiões de Portugal. (Adaptado de ONLEISH, 2015<sup>(26)</sup>)

Em Portugal Continental, as regiões de Trás-os-Montes e Alto Douro, Cova da Beira, o concelho da Lousã, a região de Lisboa e Setúbal, o concelho de Évora e o Algarve, podem ser consideradas regiões endémicas. Na figura 4 encontra-se esquematizada a prevalência de LC nas diferentes regiões de Portugal Continental, tendo por base diferentes estudos de seroprevalência realizados<sup>(26)</sup>.

Estudos populacionais realizados em áreas endêmicas, demonstraram que só uma percentagem baixa de cães desenvolve doença grave, contudo, muitos cães desenvolvem infeções subclínicas persistentes<sup>(45)</sup>. Num estudo realizado por Solano-Gallego *et al.* (2001)<sup>(47)</sup> em Espanha, na ilha de Maiorca, em 100 cães avaliados 13 estavam infetados e apresentavam sinais clínicos de doença, 26 eram seropositivos e 63 eram positivos para a presença de ADN de *Leishmania*, quando testados por técnicas de PCR. De facto, em áreas endêmicas, a LC é apenas a “ponta do iceberg”, onde a maioria da população está exposta e se infeta, sem apresentar sinais clínicos da doença ou até mesmo desenvolver imunidade humoral contra *Leishmania*<sup>(48)</sup>.

Relativamente aos fatores de risco de infeção, na Europa, cães que habitam em ambientes rurais ou periurbanos parecem estar mais expostos, contudo a infeção é cada vez mais frequente em áreas urbanas<sup>(40 referido por 21,46,52)</sup>. Animais que vivem ou dormem ao ar livre durante a noite também apresentam maior risco de infeção por *L. infantum*, o que torna os cães de guarda com níveis de infeção mais altos comparativamente com os cães de companhia que vivem predominantemente no interior das habitações<sup>(54)</sup>. Num estudo realizado no Brasil, os fatores associados de forma mais significativa com a infeção por *L. chagasi* em cães foram o pelo curto, raça pura, restrição a ambiente peridoméstico, comparativamente com restrição doméstica, e a presença de áreas verdes adjacentes à habitação<sup>(55)</sup>.

De acordo com dados de distintos estudos realizados na Europa, o nível de exposição entre géneros e grupos de idade pode variar de acordo com a região. Relativamente ao sexo, a maioria dos estudos não revela diferenças significativas nos níveis de infeção entre machos e fêmeas<sup>(21)</sup>, contudo, numa população de animais com leishmaniose canina clínica, a proporção de machos foi consideravelmente superior à de fêmeas<sup>(56)</sup>. Quanto à idade, os animais podem infetar-se em qualquer idade, contudo a seroprevalência mostra um padrão bimodal, com níveis de infeção mais altos em animais de menos de três e mais de oito anos<sup>(55 referido por 21)</sup>. A distribuição da idade e da doença tem também dois picos de expressão, com a prevalência de LC mais alta entre os dois e os quatro anos e em cães com sete ou mais anos<sup>(56)</sup>.

Quanto à predisposição racial, em áreas endêmicas, animais de qualquer raça podem tornar-se infetados, contudo as raças Boxer, Cocker spaniel, Pastor alemão e Rottweiler parecem ser as mais suscetíveis ao desenvolvimento da doença. Contrariamente, o Caniche e o Yorkshire terrier apresentam taxas de infeção significativamente mais baixas<sup>(56, 58)</sup>. Contudo, tais diferenças nas prevalências de infeção por *Leishmania* descritas entre raças podem estar relacionadas com o ambiente em que vivem, condicionando a exposição aos flebótomos, e não propriamente à capacidade das raças para combater a infeção<sup>(54)</sup>. Ainda assim, acredita-se que algumas raças autóctones, como o Podengo de Ibiza, e animais de raça indeterminada em áreas endêmicas, tenham maior probabilidade de desenvolvimento de imunidade celular protetora, apresentando raramente sinais clínicos de leishmaniose<sup>(59)</sup>.

Estudos de xenodiagnóstico demonstraram que a percentagem de transmissão de infeção a flebótomos aumenta com a presença e severidade dos seus sinais clínicos e elevados níveis

de anticorpos anti-*leishmania*, diminuindo com o aumento das contagens de células T CD4+ (60,61,62,63). Tais factos corroboram a ideia de que a doença clínica e a presença de altos títulos de anticorpos anti-*leishmania* estão positivamente correlacionados com altas cargas parasitárias(64,65) e que o risco de transmissão de infeção, de um cão para um flebótomo que dele se alimente, reduz-se com a diminuição da carga parasitária após tratamento(66,67).

A LC pode ser definida como não endémica em países ou regiões onde os flebótomos estão ausentes e onde os casos clínicos esporádicos correspondem a infeções adquiridas, sobretudo, fora de tais regiões(68). A maioria dos animais infetados que habitam nessas regiões é proveniente ou viajou por áreas endémicas, embora em alguns casos a transmissão também possa ser autóctone(40 referido por 21). Nos últimos anos, juntamente com o aumento significativo do número de cães infetados em áreas endémicas(69,70,71), tem-se demonstrado a emergência de casos autóctones de leishmaniose canina e humana em novas regiões(72, 73 referido por 21). Em algumas regiões da Europa, a propagação da LC tem sido relacionada não só com o aumento da densidade e distribuição dos vetores, mas também com o aumento dos deslocamentos de cães infetados de regiões mediterrâneas para áreas da Europa central e setentrional(70 referido por 21,44). Entre as regiões que sugerem expansão da transmissão de *L. infantum* na Europa, destacavam-se os Alpes (norte de Itália), Pirinéus franceses e Galiza(70 referido por 21,71,75,76,77).

## 1.2. Patogénese

De um modo geral, nas doenças que afetam o cão e que são transmitidas por vetores, como a leishmaniose, babesiose, hepatozoonose, riquetsiose e erliquiose, entre outras, as lesões observadas devem-se, na sua maioria, a uma resposta exagerada do sistema imunitário do hospedeiro à presença do parasita, e não à atividade propriamente dita do agente patogénico sobre as células e tecidos do hospedeiro(78).

Nem todos os cães naturalmente ou experimentalmente infetados com *Leishmania* desenvolvem a doença(79,80 referido por 20). Apesar de não se conhecerem ao certo quais os mecanismos que levam a que um cão seja resistente ou suscetível à infeção, muitos fatores podem ser apontados como possíveis determinantes. O sistema imunitário e a base genética do animal são provavelmente os fatores mais determinantes, embora outros fatores como a idade, sexo, estado nutricional, virulência da estirpe de *Leishmania* e carga parasitária, assim como a presença de doenças concomitantes e imunossupressão, infeção prévia e método de transmissão também possam influenciar o desenvolvimento da doença(29).

Num estado inicial de infeção não existem sinais clínicos aparentes, mas rapidamente o quadro pode alterar-se, a não ser que o sistema imunitário consiga interromper a multiplicação das formas amastigotas. Uma infeção subclínica não é necessariamente permanente e fatores como condições de imunossupressão e de doença concomitante podem quebrar o equilíbrio e desencadear a progressão para doença clínica em cães infetados, fenómeno que foi também observado em humanos com síndrome de imunodeficiência adquirida e coinfeção por *Leishmania*(20,29,81).

Quando um HV é infetado mecanismos de resposta imunitária inata entram em ação, ocorrendo migração de múltiplas células do sistema imunitário, principalmente macrófagos, para o foco de inflamação, fagocitando os parasitas inoculados<sup>(20,82)</sup>. No interior dos macrófagos formam-se vacúolos parasitóforos, com a finalidade de eliminar o parasita através da síntese e libertação de diversas moléculas, como óxido nítrico (NO), que têm papel leishmanicida<sup>(83 referido por 21,84)</sup>. Outras células com capacidade fagocítica, como os neutrófilos, chegam também ao foco de inflamação, e parecem ter um papel protetor no controlo da multiplicação de parasitas e desenvolvimento lesional, em estados iniciais de infeção, encontrando-se a sua ação deprimida em estados de doença mais avançados<sup>(85,86)</sup>.

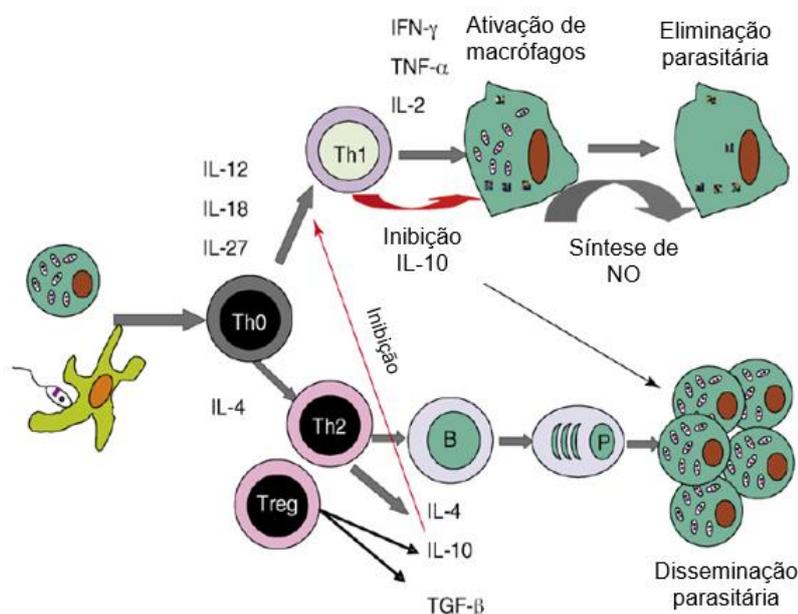
Através de vários mecanismos possíveis, as formas amastigotas apresentam capacidade de sobreviver e replicar no interior dos fagolisossomas dos macrófagos, entre os quais através da produção de lipofosfoglicanos, que inibem a maturação do fagossoma<sup>(87)</sup>. Assim, quando a atividade leishmanicida intramacrofágica não é efetiva, dá-se a multiplicação de parasitas no interior dos macrófagos, por fissão binária, que culmina com a sua lise e libertação das formas amastigotas<sup>(29)</sup>. Estas, por sua vez, podem então ser fagocitadas por novas células, ocorrendo disseminação de parasitas por diversos órgãos do sistema linfohematopoiético, como linfonodos, baço, fígado e medula óssea, entre outros<sup>(21)</sup>.

Mecanismos de resposta imunitária adquirida ou específica são os principais responsáveis pelo grau de suscetibilidade à infeção. O balanço entre a resposta imunitária celular mediada por linfócitos *T-helper* do tipo 1 (Th1) e por linfócitos *T-helper* do tipo 2 (Th2) parece ter um papel determinante no controlo da disseminação da infeção e progressão da doença (figura 5). Uma resposta maioritariamente mediada por linfócitos Th1 está associada a uma maior produção de citocinas como interleucina 2 (IL-2), interferão  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e fator  $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), que induzem uma maior atividade anti-*Leishmania* nos macrófagos, nomeadamente pela via do NO. Já a resposta mediada por linfócitos Th2 tem sido associada à produção de citocinas como a interleucina 4 (IL-4) e a interleucina 10 (IL-10), esta última com ação inibitória sobre células Th1, e ao aumento da atividade de linfócitos B, plasmócitos e, conseqüentemente, da produção de anticorpos. Assim, uma maior ação dos linfócitos Th2 pode estar associada a uma maior disseminação do agente etiológico, bem como ao surgimento de doença clínica, associada a uma resposta humoral exagerada, não protetora<sup>(20,48)</sup>.

Contudo, a compreensão dos perfis de citocinas expressos na LC é complexa, dado o limitado número de estudos realizados neste âmbito, o amplo espectro de estados clínicos de doença, a variedade de tecidos afetados e analisados nos diferentes estudos, os variados métodos utilizados na avaliação de citocinas e as diferenças entre animais experimentalmente e naturalmente infetados. Tudo isto torna difícil a comparação e interpretação de resultados entre diferentes estudos, não estando ainda claro o papel das células Th1 e Th2, bem como das diferentes citocinas por elas sintetizadas, no desenvolvimento da doença clínica no cão. Ainda assim, pensa-se que no cão, ao contrário do que foi demonstrado experimentalmente em murinos (onde em infeções assintomáticas predomina uma resposta mediada por linfócitos Th1 e em

sintomáticos uma resposta mediada por linfócitos Th2), em casos de infecção sintomática está presente uma resposta mista Th1/Th2<sup>(20,48)</sup>.

Os linfócitos T reguladores (Treg) têm como principal função evitar o desenvolvimento de fenômenos autoimunes, isto é, evitar que o sistema imunitário identifique como antigênicas as suas próprias estruturas moleculares. Assim, estes linfócitos migram para os focos de inflamação e suprimem a atividade de outros linfócitos, especialmente linfócitos Th, com a finalidade de inibir a ocorrência de fenômenos imunológicos aberrantes ou respostas imunitárias excessivas. Em cães infetados por *L. infantum*, alguns estudos revelaram aumento da atividade de linfócitos Treg, com aumento da síntese de IL-10 e de *transforming and growth factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), citocinas com ação inibitória da atividade macrófagica, favorecendo a multiplicação de *Leishmania*<sup>(21)</sup>.



**Figura 5.** Esquema representativo da complexa interação entre as respostas mediadas pelas células Th1 e Th2 face à infecção por *Leishmania*. Em resposta à infecção, as células Th1 produzem citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ , que induzem a ativação de macrófagos e a morte intracelular dos parasitas pela via do NO. Em contraste, a síntese de citocinas como IL-10, TGF- $\beta$  e IL-4, por estimulação de células B, plasmócitos e hiperglobulinemia (Adaptado de Baneth et al., 2008<sup>(48)</sup>).

Adicionalmente, a lise de macrófagos infetados com *L. infantum*, com destruição dos parasitas, está também dependente da capacidade de apresentação de antígenos à sua superfície, através de moléculas da classe II do complexo major de histocompatibilidade (CMH), às quais se ligam linfócitos Th CD4<sup>+</sup>, ou através de moléculas da classe I do CMH, às quais se ligam linfócitos T CD8<sup>+</sup>, citotóxicos<sup>(20,21,88)</sup>. Em cães com doença clínica, ocorre diminuição ou supressão deste processo através da interferência no processamento antigênico dentro dos macrófagos infetados, modulação negativa da expressão dos CMH ou através da degradação dos mesmos<sup>(21)</sup>.

Uma forte resposta positiva em testes intradérmicos de hipersensibilidade retardada a antígenos de *Leishmania*, indicativa de forte resposta imunitária celular face a infecção por

*Leishmania*, foi demonstrada em cães resistentes expostos ao parasita, assim como ausência de resposta foi encontrada em cães severamente doentes<sup>(59,80)</sup>. Por citometria de fluxo de células mononucleares de sangue periférico e esplenócitos, demonstrou-se que doença severa e elevado parasitismo estão frequentemente acompanhados por uma diminuição do número de linfócitos T CD5<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, linfócitos B CD21<sup>+</sup> e monócitos, e que, por contraste, em casos de infecção subclínica e parasitismo baixo observa-se, mais frequentemente, aumento do número de linfócitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>)<sup>(20,89,90,91)</sup>. Tais factos corroboram a ideia de que animais com infecção assintomática apresentem uma maior resposta imunitária celular, competente no controlo da multiplicação parasitária, enquanto animais com sintomatologia clínica severa apresentam menor resposta imunitária celular e maior resposta imunitária humoral. No entanto, os mecanismos pelos quais a resposta celular mediada por células T se encontra deprimida em casos de LC não estão completamente compreendidos<sup>(20)</sup>.

Uma base genética parece também estar em jogo na suscetibilidade e resistência à LC. Estudos realizados acerca de polimorfismos e mutações da região promotora do gene canino *Solute carrier family 11 member a1 (Slc11a1)*, que codifica uma proteína de transporte iónico envolvida no controlo da replicação parasitária intrafagossomal e ativação macrofágica, podem estar envolvidos no grau de suscetibilidade canina à infecção por *Leishmania*. Nesse sentido, foi identificado um haplotipo (TAG-8-141) que pode ter um papel determinante na predisposição da raça Boxer para o desenvolvimento da doença, assim como outros três de 24 polimorfismos do mesmo gene identificados foram associados a um risco acrescido de desenvolvimento de LC clínica<sup>(92,93)</sup>.

A LC é considerada uma doença crónica, e os sinais clínicos da doença podem desenvolver-se três meses a sete anos após a infecção. Com a progressão da doença, nos órgãos linfoides observa-se uma depleção celular nas regiões de linfócitos T e proliferação nas regiões de linfócitos B, produtores de anticorpos. A proliferação de linfócitos B, plasmócitos, histiócitos e macrófagos promove linfadenomegalia generalizada, esplenomegalia e hiperglobulinemia<sup>(20)</sup>. A linfadenomegalia deve-se ao aumento do número e tamanho de folículos linfoides, juntamente com a marcada hipertrofia e hiperplasia de macrófagos medulares<sup>(48)</sup>. O aumento considerável do baço em cães clinicamente doentes ocorre devido ao aumento da sua celularidade, principalmente pelo aumento do número de monócitos e macrófagos, juntamente com o aumento das fibras reticulares e alterações na estrutura microvascular<sup>(48)</sup>.

De um modo geral, os níveis de anticorpos anti-*Leishmania* detetados em cães com leishmaniose clínica são superiores aos níveis detetados em cães infetados mas assintomáticos, existindo uma correlação positiva entre os níveis de anticorpos anti-*Leishmania* circulantes, principalmente imunoglobulina G (IgG), e o estado clínico do animal infetado<sup>(29)</sup>. Como consequência de uma resposta humoral exagerada e não protetora, na patogenia da infecção por *L. infantum*, encontram-se descritos dois tipos de reações de hipersensibilidade, do tipo II e do tipo III, que estão na origem de muitas das lesões tecidulares que ocorrem em cães com leishmaniose<sup>(20)</sup>. A hipersensibilidade do tipo II caracteriza-se pela interação entre anticorpos

(principalmente imunoglobulinas G e M) e antígenos presentes na superfície de células e outros componentes tecidulares, que resulta na lise e fagocitose mediada por células dependentes de anticorpos, como células *natural killer* (NK), macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, ou por ativação da cascata do complemento<sup>(21)</sup>. Um exemplo de lesão desencadeada por este tipo de reação é o fenômeno de trombocitopenia imunomediada.

No caso das reações de hipersensibilidade do tipo III, formam-se imunocomplexos de antígeno-anticorpo circulantes, que se depositam em diferentes tecidos, e, ao ativarem células polimorfonucleares, ocorre a libertação, por exocitose, de substâncias lisossomais tóxicas, as quais provocam lesões nos tecidos adjacentes<sup>(21)</sup>. As principais lesões consequentes de reações de hipersensibilidade do tipo III localizam-se na úvea, glomérulo renal e sinóvia, podendo também ocorrer processos inflamatórios em vasos sanguíneos que levam ao desenvolvimento de vasculites<sup>(21)</sup>. No caso da deposição de complexos imunes a nível renal, desenvolvem-se, com frequência, glomerulonefrites que podem conduzir a insuficiência renal crónica (IRC), uma das principais causas de morte em cães com LC. As vasculites podem resultar em isquemias locais e causar necrose de tecidos cutâneos e viscerais. Embora seja pouco frequente, pode ocorrer também envolvimento do sistema nervoso central. Adicionalmente, os imunocomplexos podem incluir crioglobulinas, as quais são proteínas que, quando expostas a temperaturas baixas, precipitam no interior de vasos sanguíneos das extremidades e podem causar necrose isquémica<sup>(20)</sup>.

Contudo, nem todas as lesões produzidas no curso da doença estão relacionadas com reações de hipersensibilidade devido a uma resposta humoral exagerada, como é o caso das reações de inflamação piogranulomatosa ou linfoplasmocelular que podem ser detetadas em órgãos onde o parasita está presente<sup>(21)</sup>.

Quase sempre a LC clínica é acompanhada por várias lesões de pele, que, mais frequentemente, se manifestam de forma generalizada do que localizada, pois o agente etiológico encontra-se disseminado por todo o corpo, podendo mesmo encontrar-se lesões microscópicas e presença de parasitas em regiões de pele aparentemente sãs<sup>(20,94,95)</sup>.

Lesões oculares são também relativamente comuns em cães sintomáticos, podendo ser observadas lesões como uveíte anterior, conjuntivite, queratoconjuntivite seca (QCS), blefarite, entre outras, que podem surgir isolada ou concomitantemente. A QCS está associada à localização de infiltrados inflamatórios granulomatosos ou piogranulomatosos, bem como à presença de formas amastigotas, em torno do ducto lacrimal, causando retenção secretora e diminuição da produção de lágrima<sup>(96,97,98)</sup>.

A atrofia muscular observada em animais com LC está associada a fenómenos como miosite mononuclear, vasculite neutrofílica e deposição de imunocomplexos nos tecidos musculares em conjunto com presença de anticorpos antimiofibrilares séricos, que podem originar inclusivamente necrose e fibrose muscular<sup>(99 e 100 referidos por 20)</sup>.

Desordens hemostáticas, como epistaxe, hematúria e diarreia hemorrágica, estão também descritas. Na sua origem podem estar envolvidos distúrbios de hemostase primária e secundária,

causados por múltiplos fatores patogénicos como trombocitopenia, trombocitopatia e alterações na síntese e metabolismo de fatores de coagulação. Adicionalmente, a epistaxe pode estar associada a outros fenómenos como hiperviscosidade sérica induzida por hiperglobulinemia, rinite linfoplasmocítica, granulomatosa ou neutrofílica, com ou sem ulceração na mucosa nasal<sup>(101,102)</sup>.

Ocorre frequentemente anemia como sequela de doença ou inflamação crónica, com ou sem doença renal crónica associada, como resultado de défices na eritropoiese, podendo ser agravada por perdas de sangue adicionais<sup>(20)</sup>.

### 1.3. Manifestações clínicas

A LC é uma doença sistémica que potencialmente pode comprometer qualquer órgão, tecido ou fluido biológico, manifestando-se por sinais clínicos não específicos que podem ser muito variáveis, tornando a lista de diagnósticos diferenciais, em cães com sinais compatíveis com leishmaniose, geralmente bastante alargada<sup>(29)</sup>. Os achados clínicos mais frequentemente encontrados na história clínica e exame físico de casos clássicos de LC incluem lesões cutâneas, linfadenomegalia generalizada, perda de peso progressiva, atrofia muscular, intolerância ao exercício, diminuição de apetite, letargia, esplenomegalia, poliúria e polidipsia, lesões oculares, epistaxe, onicogribose, claudicação, vômito e diarreia (tabela 24)<sup>(20)</sup>.

**Tabela 24.** Alterações encontradas na história clínica e exame físico de animais sintomáticos com LC. (Adaptado de Baneth & Solano-Gallego, 2012<sup>(20)</sup>; Baneth *et al.*, 2008<sup>(48)</sup>)

Alterações encontradas na história clínica	fr (%)	Alterações encontradas no exame físico	fr (%)
Intolerância ao exercício	67,5	Linfadenomegalia	62-90
Perda de peso	64	Lesões cutâneas	81-89
Sonolência	60	Caquexia	10-48
Polidipsia	40	Palidez das mucosas	58
Anorexia	32,5	Claudicação	37,5
Diarreia	30	Hipertermia	4-36
Vômito	26	Lesões oculares	16-81
Polifagia	15	Esplenomegalia	10-53
Epistaxe	6-15	Onicogribose	20-31
Melena	12,5	Rinite	10
Espirros	10	Pneumonia	2,5
Tosse	6	Icterícia	2,5
Síncope	6		

A linfadenomegalia de múltiplos linfonodos superficiais, com aumento de volume da ordem de duas a seis vezes o tamanho normal, é relativamente frequente e ocasionalmente pode mimetizar os achados clínicos de linfoma. A esplenomegalia é também um achado frequente, mesmo à palpação abdominal<sup>(20)</sup>.

Unhas anormalmente longas, baças e quebradiças, que caracterizam a condição de onicogribose e onicorrexia, um achado muito pouco específico, surgem numa pequena proporção de animais com LC. Já a perda de peso e atrofia muscular, particularmente da região facial,

afetando os músculos mastigadores (masséteres e temporais), mas que pode também ser generalizada em animais caquéticos, são sinais frequentemente encontrados quando existe envolvimento visceral<sup>(20)</sup>.

Com frequência, deteriorações rápidas da condição clínica estão associadas ao desenvolvimento de doença renal crônica. Por esta razão, em cães afetados é essencial avaliar a sua função renal, nomeadamente através recomendações da IRIS para estadiamento de IRC<sup>(29)</sup>. A doença renal crônica progressiva pode ser acompanhada por anorexia, prostração, poliúria, polidipsia e vômito, e pode ser a única alteração aparente em cães com LC, pelo que, em áreas endêmicas, todos os cães com estes sinais clínicos e/ou doença renal diagnosticada devem ser testados quanto a infeção por *Leishmania*. Esta pode progredir de estados com proteinúria ligeira até estados de insuficiência renal grave, uma consequência severa da progressão da doença que é apontada como a principal causa de morte em cães com LC<sup>(29)</sup>. No entanto, apesar da elevada prevalência de patologia renal, a azotemia típica de IRC é um achado laboratorial pouco frequente, sendo evidente apenas quando a maioria dos nefrônios se torna disfuncional, já em fases avançadas da progressão da doença<sup>(29)</sup>. A presença de lesões histopatológicas, nomeadamente lesões de glomerulonefrite e nefrite túbulo-intersticial, parece ser mais frequente<sup>(103)</sup>.

Distúrbios na locomoção podem ser causados por neuralgia, poliartrites erosivas ou não erosivas, polimiosites, defeitos nas almofadas plantares, úlceras interdigitais, lesões osteoarticulares e osteolíticas ou periosteites proliferativas, estando também descrito um caso de paraparésia resultante da formação de um granuloma no canal vertebral<sup>(20)</sup>. Frequentemente observam-se poliartrites de caráter imunomediado, caracterizadas por claudicações que não respondem a tratamentos anti-inflamatórios convencionais, de caráter intermitente e que podem ser generalizadas ou afetar apenas um dos membros<sup>(21)</sup>.

Distúrbios gastrointestinais são pouco frequentes, ocorrendo, sobretudo, sob a forma de diarreias de intestino grosso, com ou sem presença de sangue, e que podem resultar de colite ulcerativa granulomatosa devido a multiplicação de parasitas na mucosa intestinal<sup>(21)</sup>.

A ocorrência de vômitos e ascite, excetuando os casos em que o vômito está associado a azotemia por IRC ou a intolerância a algum tratamento, podem ser consequência de alterações hepáticas, embora estas sejam pouco frequentes<sup>(21)</sup>.

Adicionalmente, o quadro clínico pode ser ainda complicado por condições como demodecose, piodermatite, doença gastrointestinal, pneumonia ou infeção concomitante com outros agentes patogénicos como *Ehrlichia*, *Babesia*, *Hepatozoon*, *Trypanosoma*, *Bartonella* ou *Dirofilaria*, em países em que estes são também endémicos<sup>(20)</sup>.

Em cães com leishmaniose clínica, as lesões cutâneas, quando presentes, podem ser o único achado clínico ou surgir em conjunto com outras alterações clinicopatológicas. Contudo, encontram-se no grupo das manifestações mais frequentes de LC em pacientes que iniciam tratamento da doença, estimando-se que ocorrem em 56 a 90% dos casos<sup>(20,29)</sup>. Qualquer animal com manifestações cutâneas de LC, mesmo que não aparente outros sinais clínicos óbvios de

doença, está predisposto ao desenvolvimento de afeções viscerais, uma vez que no cão o agente etiológico se dissemina por todo o corpo antes de desenvolver lesões de pele generalizadas<sup>(20)</sup>. A maioria das lesões cutâneas derivada da infecção por *L. infantum* pode ser classificada em: i) dermatite exfoliativa não pruriginosa, com ou sem alopecia, generalizada ou localizada na face, pavilhões auriculares ou membros; ii) dermatite ulcerativa em proeminências ósseas, junções mucocutâneas, extremidades dos membros ou pavilhão auricular; iii) dermatite nodular focal ou multifocal; iv) dermatite proliferativa mucocutânea e v) dermatite papular. Entre as manifestações atípicas, relativamente pouco frequentes, podemos encontrar alterações como despigmentação, paniculite, hiperqueratose digital e nasal, erupções pustulares, lesões do tipo da alopecia areata ou tipo pênfigo foliáceo e eritemas multiformes<sup>(29)</sup>. Uma complicação frequente das lesões cutâneas é a ocorrência de piodermatites, superficiais e profundas, por *Staphylococcus* spp. Os achados histopatológicos cutâneos mais frequentes estão associados a dermatites piogramulomatosas ou granulomatosas, nodulares ou difusas, hiperqueratose ortoqueratótica ou paraqueratótica, acantose e ulceração, estando também descritas alterações de dermatite pustular subcorneal, dermatite liquenoide, vasculite e paniculite<sup>(29)</sup>.

Entre as manifestações oculares e perioculares mais comuns em cães com LC encontram-se: i) conjuntivite; ii) blefarite (esfoliativa, ulcerativa ou nodular); iii) uveíte anterior e iv) QCS<sup>(98,104 referido por 29)</sup>.

Outras manifestações menos comuns podem incluir efusão pericárdica, miosite dos músculos mastigatórios, pancreatite, meningite, colite crónica, trombose e coagulação intravascular disseminada<sup>(20)</sup>.

Apesar de pouco frequentes, estão descritos alguns casos de LC com afeção cardíaca, nos quais foi determinada, por histopatologia e imunohistoquímica, a presença de parasitas no tecido cardíaco, em especial com afeção do miocárdio. Nestes casos, os sinais clínicos incluem compromisso cardiorrespiratório com prostração, dispneia e anorexia. Um caso de trombose da veia cava caudal foi descrito num cão com síndrome nefrótico induzido por *L. infantum*, e que apresentava sinais de edema numa das extremidades posteriores<sup>(21)</sup>.

#### 1.4. Diagnóstico

O recurso a métodos de diagnóstico de infecção por *L. infantum* pode ser indicado em diferentes situações na vida de um animal, nomeadamente para confirmação de doença suspeita, por exemplo: i) em cães com sinais clínicos e/ou alterações clinicopatológicas compatíveis com a doença; ii) análise de cães clinicamente saudáveis, mas que vivem ou viajaram em áreas endémicas; iii) para evitar a importação de cães infetados para países não endémicos; iv) para o preenchimento de pré-requisitos para que um cão seja dador de sangue ou v) para monitorização da resposta ao tratamento<sup>(20,32)</sup>.

Para um diagnóstico preciso de leishmaniose clínica é geralmente necessário recorrer a uma abordagem dinâmica que englobe testes de diagnóstico específicos e análises

clinicopatológicas inespecíficas, não esquecendo a realização de uma história clínica e exame físico detalhados<sup>(32)</sup>.

Entre os testes de diagnóstico específicos encontram-se: i) análises parasitológicas; ii) análises sorológicas, quantitativas ou qualitativas; iii) provas de avaliação da imunidade celular e iv) análises moleculares<sup>(32)</sup>.

Em relação às análises clinicopatológicas inespecíficas, devem ser avaliados parâmetros como hemograma completo, perfil bioquímico e eletroforese sérica, urianálise e, adicionalmente, estudo imagiológico abdominal, por radiologia e ecografia<sup>(20,29,32,45)</sup>.

O diagnóstico de LC é complexo, dado o alargado espectro, não específico, de sinais clínicos e alterações clinicopatológicas que podem ser identificados. Além disso, o paciente pode apresentar, concomitantemente, outras doenças, de caráter infeccioso ou não infeccioso, podendo o leque de diagnósticos diferenciais ser muito amplo. Nesse sentido, para cada paciente, com base numa lista de problemas clinicopatológicos, devem ser pensados todos os diagnósticos diferenciais possíveis e de seguida recorrer então a testes de diagnóstico específicos<sup>(32)</sup>.

#### 1.4.1. Análises laboratoriais inespecíficas

##### 1.4.1.1. Hematologia

Entre as alterações hemtológicas mais frequentemente identificadas em cães com LC encontram-se a anemia ligeira, normocítica, normocrômica, não regenerativa, e a presença de leucograma de *stress*, com linfopenia e neutrofilia, podendo ou não estar presente monocitose<sup>(21)</sup>. Raramente se observam alterações hematológicas mais graves, como leucopenia e pancitopenia, acompanhadas por febre e hepato e esplenomegalia, frequentemente observadas em casos de leishmaniose visceral humana causada por *L. infantum*<sup>(21)</sup>.

Alterações de hemostase, primárias e secundárias, podem também ocorrer e estar na origem de estados de diátese hemorrágica, apesar de estes poderem também ser causados por ulceração de tecidos. Os mecanismos de hemostase podem estar comprometidos devido a trombocitopenia, trombocitopatia, hiperviscosidade sérica devido a hiperglobulinemia ou alterações de fibrinólise<sup>(21)</sup>.

##### 1.4.1.2. Análise de perfil bioquímico sérico

Alterações como ligeiro a moderado aumento da atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e gama-glutamil transferase (GGT) e aumentos ligeiros da bilirrubina total e ácidos biliares pós-prandiais podem ocorrer e são sugestivos de lesão hepática, enquanto aumentos da atividade da creatinina quinase (CK) e da lactato desidrogenase (LDH) são sugestivos de miosite<sup>(105)</sup>. Aumentos da concentração de ureia e creatinina séricas ocorrem com alguma frequência e podem refletir deterioração da função renal<sup>(21)</sup>.

### 1.4.1.3. Análise de proteínas séricas

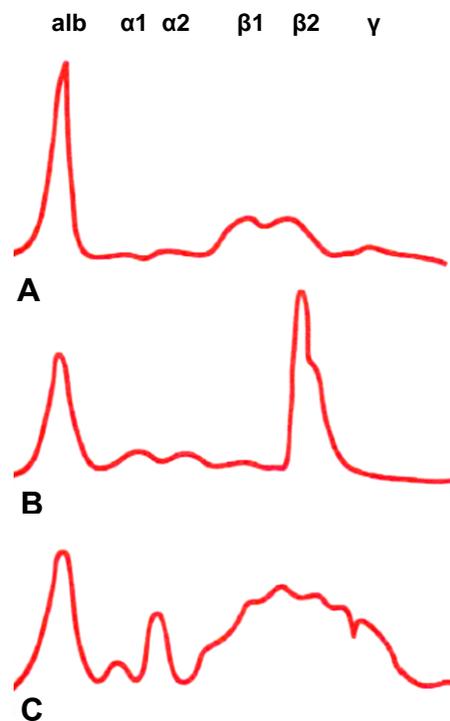
Outras das alterações mais comuns em cães com LC são hiperproteinemia com hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, obtendo-se diminuição do coeficiente albumina/globulina<sup>(20,32)</sup>. Quando se realiza o proteínograma por electroforese sérica, observa-se frequentemente um padrão típico de doença inflamatória/infeciosa, ao qual é atribuída a denominação de gamopatia policlonal, e que é constituído por uma concentração de albumina normal ou ligeiramente diminuída e por hiperglobulinemia como resultado do aumento da concentração de globulinas  $\alpha_2$  (proteínas de fase aguda) e globulinas  $\beta$  e  $\gamma$  (imunoglobulinas) (figura 6, C)<sup>(106)</sup>. Na presença de hiperglobulinemia com este padrão de proteínograma, em cães que vivem ou viajaram por regiões endémicas, mesmo que estes não aparentem sinais clínicos de doença, deve-se sempre investigar a existência de infeção por *Leishmania*<sup>(20,32)</sup>. Contudo, este achado não é específico de infeção por *Leishmania*, podendo estar presente em muitas outras doenças de caráter inflamatório ou infeccioso<sup>(106)</sup>.

As gamopatias monoclonais ocorrem quando um clone de células do sistema imunitário produz o mesmo tipo e subtipo de imunoglobulinas, originando um pico de concentração tipicamente localizado na região  $\beta$  ou  $\gamma$  do proteínograma (figura 6, B)<sup>(106)</sup>. Tal é observado principalmente em cães com mielomas, leucemias ou linfomas, mas, ocasionalmente, pode também ser um achado em cães com erliquiose ou leishmaniose<sup>(106)</sup>.

As proteínas positivas de fase aguda, como a proteína C reativa e a ceruloplasmina, surgem muitas vezes elevadas em cães com leishmaniose clínica, diminuindo com o início de tratamento específico<sup>(21)</sup>

### 1.4.1.4. Urianálise

Relativamente a alterações detetadas por urianálise, a proteinúria renal é o achado mais importante em pacientes com LC. Ao se detetar aumento das proteínas urinárias, deve-se avaliar o coeficiente proteína/creatinina urinário (UPC), assim como a concentração de ureia e creatinina séricas, e proceder ao estadiamento de doença renal de acordo com as recomendações da IRIS<sup>(20)</sup>. Outra alteração que pode ser encontrada é a presença de cristais de xantina em cães sujeitos a tratamento prolongado com alopurinol<sup>(20)</sup>.

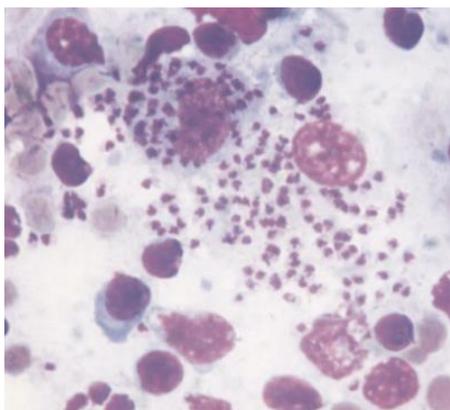


**Figura 6.** Esquemas representativos de proteínogramas séricos. A – Proteínograma sérico normal. B – Proteínograma sérico típico de gamopatia monoclonal com aumento da concentração na região  $\beta_2$ - $\gamma$  e ligeira diminuição da concentração de albumina (alb). C – Proteínograma sérico característico de gamopatia policlonal com aumento da região  $\alpha_2$  e aumento de distribuição ampla das regiões  $\beta$ - $\gamma$ . (Adaptado de Nelson & Couto, 2014f<sup>(105)</sup>)

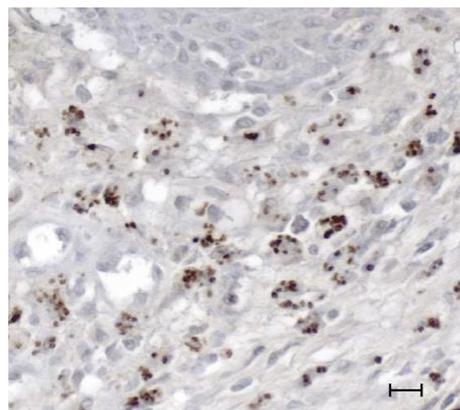
## 1.4.2. Análises laboratoriais específicas

### 1.4.2.1. Testes de diagnóstico parasitológicos

Em cães com sintomatologia clínica e/ou alterações clinicopatológicas compatíveis com LC, entre os métodos de diagnóstico específicos indicados encontra-se a identificação citológica ou histopatológica de formas amastigotas de *Leishmania*, no interior de macrófagos ou livres, a partir de amostras colhidas de lesões cutâneas, linfonodos, medula óssea, baço, entre outros tecidos e fluidos corporais. A observação de parasitas é possível em preparações coradas pelo método de Giemsa e observadas ao microscópio, em ampliações de 600 a 1000x (figura 7).



**Figura 7.** Esfregaço, corado pelo método de Giemsa, de amostra de medula óssea de um cão naturalmente infetado por *L. infantum*, evidenciando várias formas amastigotas do protozoário (Adaptado de Dantas-Torres, 2008<sup>(109)</sup>).



**Figura 8.** Imagem de corte histológico de tecido subepitelial de conjuntiva canina, corado por imunohistoquímica, evidenciando a presença de formas amastigotas de *L. infantum*. Escala indicada = 10  $\mu$ m (Adaptado de Miró *et al.*, 2008<sup>(108)</sup>).

A especificidade deste método é virtualmente de 100%, estando, contudo, dependente da experiência do observador, e apresenta uma sensibilidade máxima de aproximadamente 80% em cães com sinais clínicos compatíveis. Contudo, a sensibilidade é significativamente menor (<30%) em cães com infecção assintomática<sup>(20,107,108)</sup>.

Na prática clínica, recomenda-se o estudo citológico de esfregaços obtidos de amostras colhidas por PAAF de linfonodos, em todos os cães suspeitos de infecção por *Leishmania*. Trata-se de um procedimento minimamente invasivo, relativamente fácil de executar, dada a elevada prevalência de linfadenomegalia periférica em cães com LC, e que pode permitir o diagnóstico definitivo de infecção. Citologias cutâneas devem também ser realizadas quando as lesões de pele favorecem a sua colheita, como, por exemplo, quando estão presentes erosões de pele, úlceras, nódulos e pápulas<sup>(105)</sup>. Em contrapartida, a avaliação microscópica destas pode ser dificultada pelo elevado número de artefactos presentes, não sendo um bom método de diagnóstico para microscopistas menos experientes<sup>(110)</sup>. Em esfregaços de sangue periférico é raro conseguir observar formas amastigotas de *Leishmania*<sup>(21)</sup>.

As citologias de medula óssea, baço e líquido sinovial são considerados procedimentos mais invasivos, sendo apenas recomendadas quando não seja possível encontrar formas amastigotas em amostras de linfonodos ou em raspagens cutâneas<sup>(105)</sup>.

Em termos práticos, a principal vantagem da histopatologia comparativamente à citologia, é o facto de permitir a identificação de lesões microscópicas indicativas da doença nos tecidos afetados. Contudo, tais lesões dificilmente são específicas e não permitem um diagnóstico definitivo, a não ser que se observem formas amastigotas, o que nem sempre é possível, dado o seu reduzido tamanho, particularmente após fixação com formol, e dadas as propriedades pouco adequadas da coloração de hematoxilina-eosina. Através de técnicas de imunohistoquímica, como pela imunoperoxidase ou pela imunofluorescência direta, a identificação histopatológica de amastigotas em tecidos infetados pode ser facilitada, aumentando a sensibilidade do teste (figura 8)<sup>(20,105)</sup>.

O diagnóstico parasitológico pode ainda ser feito recorrendo à cultura e isolamento de parasitas, a partir de tecidos, em meios de cultura como *Novy-MacNeal-Nicolle* (NNN) e *Schneider's Drosophila*<sup>(20)</sup>. Contudo, tais métodos são demorados, necessitando de, pelo menos, 30 dias, e, por isso, não estão indicados para um rápido diagnóstico. Além disso, apresentam uma menor sensibilidade comparativamente com as técnicas de PCR e serológicas, destinando-se, mais frequentemente, a fins investigacionais<sup>(20,108)</sup>.

O xenodiagnóstico consiste num processo, no qual flebótomos criados laboratorialmente são expostos a um cão com suspeita de infeção, o qual é sedado e colocado em ambiente isolado. Após um período de exposição, durante o qual os flebótomos se alimentaram de sangue do cão suspeito, os vetores são analisados quanto à presença de formas promastigotas no interior do seu intestino. Este processo permite saber o grau de infectividade dos cães sujeitos ao teste, contudo, devido à complexidade da sua execução é pouco realizado na prática corrente, sendo apenas desenvolvido para fins de investigação<sup>(21,110)</sup>.

#### 1.4.2.2. Testes de diagnóstico serológicos

A deteção de anticorpos séricos anti-*Leishmania* pode ser levada a cabo através de várias metodologias, entre as quais se destacam técnicas quantitativas, como a IFI, ELISA e teste de aglutinação direta (DAT), e técnicas qualitativas como *Western blotting* (WB), imunocromatografia, teste rápido de ELISA qualitativo, imunodifusão em gel de agarose (IDA) e contraímunoeletroforese (CIE)<sup>(21,108)</sup>.

O diagnóstico serológico com recurso a provas quantitativas permite determinar os níveis de IgG presentes no soro do animal suspeito, possibilitando relacionar estes com o grau de parasitismo e sinais clínicos presentes. Nesse sentido, um elevado nível de anticorpos associado a alterações clinicopatológicas ou a sinais clínicos compatíveis permite a obtenção de um diagnóstico definitivo de leishmaniose clínica. Contudo, a presença de um baixo nível de anticorpos não é necessariamente indicativa de doença, pelo que, na presença de sinais clínicos ou de alterações clinicopatológicas, devem ser sempre realizados exames complementares adicionais, que permitam confirmar ou excluir a existência de leishmaniose clínica e/ou de outras afeções que possam estar na sua origem<sup>(21)</sup>.

#### 1.4.2.2.1 *Imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio de imunoadsorção ligada a enzima (ELISA)*

A IFI é considerada por alguns autores como a técnica de referência para o diagnóstico laboratorial de LC. Porém, algumas limitações podem ser apontadas. A interpretação dos resultados pode ser considerada subjetiva, pois a sua leitura é feita ao microscópio óptico com fonte de fluorescência e está, portanto, dependente da formação e experiência do operador. Outra das limitações é o facto de nesta técnica serem apenas utilizados como antígenos formas promastigotas inteiras. De acordo com Mettler *et al.* (2005) a técnica de IFI, comparativamente com a de ELISA, apresenta uma sensibilidade ligeiramente menor em cães sintomáticos (90%), mas o mesmo não se observa em animais assintomáticos, nos quais a sensibilidade decresce para aproximadamente 24%<sup>(111,112)</sup>.

A técnica de ELISA permite a utilização de diferentes tipos de antígenos, podendo estes ser classificados em quatro grupos, de acordo com a sua natureza: i) formas inteiras ou extratos solúveis de promastigotas; ii) formas inteiras ou extratos solúveis de amastigotas; iii) proteínas recombinantes e iv) proteínas purificadas. A sensibilidade e especificidade na técnica de ELISA variam, dependendo do tipo de antígenos utilizados. Num estudo, realizado por Solano-Gallego *et al.* (2014), obtiveram-se valores de sensibilidade deste teste entre 92,5 e 95,3%, e valores de especificidade entre 89,6 e 100%, enquanto o teste de IFI revelou valores de sensibilidade e especificidade inferiores (86,9% e 91,7%, respetivamente). A utilização de antígenos de amastigotas parece proporcionar maior sensibilidade que a utilização de antígenos de promastigotas, na deteção de anticorpos em animais sintomáticos e assintomáticos, o que pode explicar os valores menores de sensibilidade dos testes de IFI<sup>(112)</sup>.

Relativamente à especificidade destes testes, estão descritas reações cruzadas com outros agentes patogénicos, originando falsos positivos, nomeadamente na presença de *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis*, *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* ou *Hepatozoon canis*. Para aumentar a especificidade dos testes de ELISA podem ser utilizados polipéptidos recombinantes contendo epitopos específicos, como o recombinante K39 (rK39), em vez de antígenos constituídos por formas inteiras, amastigotas ou promastigotas, de *Leishmania*, ou extratos solúveis das mesmas. Contudo, em cães assintomáticos a sensibilidade destes testes torna-se reduzida (29-65%)<sup>(111,113)</sup>.

Assim, consoante o motivo da requisição do teste de diagnóstico, diferentes tipos de testes serológicos podem estar mais indicados. Para confirmar uma infeção suspeita em animais com sintomatologia compatível, devem ser adotados testes com maior especificidade, enquanto os de maior sensibilidade devem ser utilizados para testar animais assintomáticos, possíveis portadores de *Leishmania*, nomeadamente em programas de vigilância ou para testar animais importados de áreas endémicas<sup>(111)</sup>.

Os laboratórios de análises clínicas dispõem atualmente de um kit para determinação semiquantitativa de anticorpos anti-*Leishmania*, comercializado pela ESTEVE Veterinária, denominado LEISCAN®. Os resultados obtidos através deste modelo vêm expressos em valores

Rz (Razão da amostra), determinados de acordo com uma fórmula que relaciona a absorvância da amostra com a absorvância do controlo positivo. O valor da Rz apresenta equivalência a um determinado título de anticorpos, determinado por IFI, tal como indicado na tabela 25 <sup>(114)</sup>.

**Tabela 25.** Equivalência entre a Razão da amostra (Rz) obtida através do Kit LEISCAN® e o título determinado por IFI (Adaptado de ESTEVE Veterinária, 2015<sup>(113)</sup>).

Razão da amostra (Rz)	Resultado	Correspondência por IFI
Rz<0,5	Negativo	Negativo
0,5<Rz<0,7	Negativo	1/20 a 1/40
0,7<Rz<0,9	Negativo	1/40 a 1/80
0,9<Rz<1,1	Duvidoso	1/80
1,1<Rz<1,5	Positivo baixo	1/80 a 1/160
1,5<Rz<2	Positivo alto	1/160 a 1/320
2<Rz<3	Positivo alto	1/320 a 1/640
3<Rz<4	Positivo muito alto	1/640 a 1/1280
Rz>4	Positivo muito alto	>1/1280

Num estudo que avaliou a performance de diferentes kits comerciais de diagnóstico serológico na deteção de infeção por *L. infantum* em cães experimentalmente infetados, entre os três testes comerciais ELISA quantitativos avaliados (LEISCAN®, INGEZIM® LEISHMANIA e INGEZIM® LEISHMANIA VET) o LEISCAN® foi aquele que demonstrou maior sensibilidade e especificidade (98 e 100%, respetivamente), utilizando como referência a técnica de PCR quantitativa e titulação de anticorpos IgG2 específicos para *L. infantum*, por ELISA<sup>(115)</sup>.

#### 1.4.2.2.2 Teste de aglutinação direta (DAT)

O teste de aglutinação direta (DAT) trata-se de uma técnica serológica quantitativa que tem por base, como o seu nome indica, um fenómeno de aglutinação, onde os anticorpos presentes no soro do animal suspeito, o qual é sujeito a várias diluições, reagem de forma específica com antigénios de *Leishmania* (formas promastigotas coradas). Para este teste determinou-se uma sensibilidade de 100% e especificidade de 98%<sup>(116)</sup>.

Uma modificação a este método consiste no *Easy DAT*, que apresenta a vantagem de reduzir custos e tempo na preparação do antigénio, e apresenta sensibilidade e especificidade semelhantes ao método original<sup>(117)</sup>.

Convencionalmente, a técnica de DAT para quantificação do título de anticorpos *Leishmania* específicos, em canídeos, utiliza como referência antigénios de *L. donovani* obtidos por tratamento com tripsina (REF-Ag). Recentemente, Semião-Santos *et al.* (2014) compararam a performance da técnica de DAT que utiliza este antigénio com a que utiliza antigénios de promastigotas de *L. infantum* obtidos por tratamento com  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME-Ag), na deteção de LC. Quando utilizado o  $\beta$ -ME-Ag obtiveram-se valores de sensibilidade e especificidade de 100%, em comparação com os obtidos utilizando o REF-Ag, 96,6 e 100%, respetivamente. Com base nestes resultados, e pelo facto do processamento do  $\beta$ -ME-Ag e leitura do teste de DAT serem processos de execução relativamente fácil, Semião-Santos *et al.* (2014) recomendam a incorporação deste antigénio no DAT para confirmação ou exclusão de LC em cães com doença suspeita<sup>(118)</sup>.

Barral-Veloso *et al.* (2013) estudaram a performance de testes de ELISA utilizando os mesmos antígenos testados em Semião-Santos *et al.* (2014),  $\beta$ -ME-ELISA e TRYP-ELISA, no diagnóstico de LC. Em comparação com o DAT de referência, para o qual foi determinada uma sensibilidade de 100%, o  $\beta$ -ME-ELISA e o TRYP-ELISA demonstraram ser menos sensíveis, obtendo-se valores de sensibilidade de 93,5 e 87,1%, respectivamente<sup>(119)</sup>.

#### 1.4.2.2.3 Contraimuno-electroforese (CIE)

Quanto à técnica de contraimuno-electroforese (CIE), trata-se de uma técnica qualitativa, que permite a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* com base na visualização de um precipitado azul (devido ao corante Azul de Coomassie utilizado) que se forma numa tira de acetato de celulose, como resultado da interação entre antígenos de *Leishmania* e anticorpos presentes na amostra de soro submetida a eletroforese<sup>(120)</sup>. Este método apresenta vantagens como: i) poder ser utilizado para análise serológica de diferentes espécies de hospedeiros, uma vez que não utiliza imunoglobulinas específicas; ii) permitir a obtenção rápida de resultados; iii) necessitar de poucos equipamentos para a sua execução e iv) ser pouco dispendioso. Estas características tornam a CIE um dos testes de escolha para estudos epidemiológicos<sup>(120)</sup>.

Relativamente aos valores de sensibilidade e especificidade, tal como para outros testes de diagnóstico serológico, variam consoante a situação clínica do animal testado, entre 72,2 e 96,1% e 90,5 e 100%, respetivamente<sup>(121 referido por 120)</sup>.

#### 1.4.2.2.4 Ensaio de imunodifusão (IDA)

O ensaio de imunodifusão (IDA) consiste num teste de imunodifusão dupla em gel de agarose a 1%, contendo 3% de polietilenoglicol, e que é realizado utilizando amostras de soro e antígenos solúveis de *Leishmania*. A formação de bandas é revelada pela coloração com Azul de Coomassie. Este método é de fácil execução, não requer equipamento sofisticado, a sua sensibilidade pode variar entre 69 e 100%, e apresenta uma especificidade de 98 a 100%<sup>(120)</sup>.

#### 1.4.2.2.5 Imunocromatografia

Os testes rápidos de imunocromatografia apresentam-se sobre a forma de kits que podem ser utilizados na prática clínica corrente. Podem ser bastante atrativos, dada a sua facilidade de execução e possibilidade de obtenção de resultados qualitativos num curto espaço de tempo, permitindo ao médico veterinário uma intervenção imediata<sup>(120)</sup>. Estão disponíveis comercialmente, testes de imunocromatografia que utilizam antígeno rK39. Estes, de um modo geral, apresentam uma boa sensibilidade e especificidade em animais sintomáticos, podendo ser úteis para confirmar a infeção em animais clinicamente suspeitos, contudo a sensibilidade pode ser reduzida em animais assintomáticos<sup>(111)</sup>.

#### 1.4.2.2.6 Western blotting (WB)

O WB enquadra-se nos métodos que podem ser utilizados como rotina para o diagnóstico de LC, ainda que seja utilizado maioritariamente em investigação, uma vez que requer equipamentos mais específicos, assim como operadores com formação técnica

especializada<sup>(120)</sup>. Este método permite identificar os antigénios fracionados que se relacionam com os anticorpos presentes em cães infetados, sintomáticos ou assintomáticos. Algumas investigações procuraram relacionar o padrão de bandas detetadas por WB e o prognóstico dos pacientes, contudo não foi possível estabelecer uma relação clara entre essas variáveis<sup>(21)</sup>.

#### 1.4.2.2.7 Citometria de fluxo (CF)

A citometria de fluxo (CF) consiste numa técnica de contagem, identificação e caracterização fenotípica de partículas microscópicas suspensas num determinado fluido. Este método permite a análise multiparamétrica simultânea de características físicas e/ou químicas de células simples detetadas pelo equipamento. Trata-se de uma metodologia de utilidade laboratorial, tanto para diagnóstico complementar, como para investigação, uma vez que se trata de um método de análise relativamente rápido, reprodutível e preciso. É capaz de analisar vários milhares de partículas, tais como células, por segundo, separando e coletando ativamente, se associado à função de *sorting*, partículas com características específicas, nomeadamente diferentes fenótipos celulares imunitários<sup>(120,122)</sup>.

Num estudo levado a cabo por Andrade *et al.* (2007), avaliou-se a “performance” da CF na deteção de anticorpos contra antigénios de formas promastigotas de *L. chagasi* em amostras de soro colhidas de animais infetados e de cães vacinados contra o agente. Concluiu-se que a CF é uma ferramenta útil na distinção entre animais infetados e animais não infetados mas vacinados, obtendo-se valores de especificidade de 100% e de sensibilidade de 93 a 97%<sup>(123)</sup>.

Andrade *et al.* (2009) compararam a capacidade de discriminação de serorreatividade das técnicas de IFI, ELISA e CF entre animais não infetados, animais com LC e animais vacinados, com Leishmune®. Todos os animais não infetados apresentaram resultados negativos pelas três técnicas. No grupo de animais infetados, a técnica de ELISA obteve uma sensibilidade de 90% e a CF de 93%. Relativamente aos animais vacinados, todos se revelaram seropositivos pela técnica de IFI, 19% obtiveram resultados positivos pela técnica de ELISA e nenhum se mostrou seropositivo por CF<sup>(124)</sup>.

#### 1.4.2.2.8 Teste rápido de ELISA qualitativo

Encontra-se, ainda, disponível para utilização na prática clínica corrente um outro método de diagnóstico serológico, de natureza qualitativa, bastante útil, que apresenta uma sensibilidade em cães assintomáticos superior à dos testes rápidos de imunocromatografia e que é tecnicamente mais acessível que a técnica de WB. Trata-se de um teste rápido de ELISA qualitativo - Snap® Canine *Leishmania Antibody Test Kit* (IDEXX, Westbrook, EUA).

Quando comparado com as técnicas de IFI e WB, num estudo que incluiu animais de áreas endémicas para *L. infantum*, com títulos de anticorpos positivos ou duvidosos, e animais com títulos negativos, provenientes de regiões onde a LC não é endémica, apresentou valores de sensibilidade e especificidade de 91,1 a 93,4% e 98,3 a 99,2%, respetivamente<sup>(125)</sup>. Quando utilizado para deteção de infeção por *L. infantum* em cães experimentalmente infetados,

utilizando como referência técnicas quantitativas de PCR e titulação de anticorpos por ELISA, determinou-se uma sensibilidade de 66% e uma especificidade de 100%<sup>(115)</sup>.

#### 1.4.2.3. Provas de avaliação de imunidade celular

Uma resposta imunitária celular específica pode ser detetada em cães com ou sem anticorpos específicos, sendo que uma resposta imunitária celular específica positiva está na base de uma resposta protetora contra o desenvolvimento da doença em animais infetados. Desta forma, um método prático e padronizado que permitisse avaliar a resposta imunitária celular específica seria de grande utilidade para monitorizar a evolução da doença em animais infetados, a resposta ao tratamento e para o estabelecimento de prognósticos<sup>(120)</sup>. Contudo, tais métodos encontram-se ainda pouco padronizados, quando comparados com as técnicas serológicas e, por esta razão, raramente são utilizados como ferramentas de diagnóstico, sendo que o seu uso restringe-se quase exclusivamente à investigação<sup>(120)</sup>.

##### 1.4.2.3.1 Teste de Montenegro ou *Leishmanin skin test* (LST)

O teste de Montenegro ou *Leishmanin skin test* (LST) consiste na inoculação intradérmica de uma suspensão de promastigotas inativados e avalia o tipo de hipersensibilidade retardada (tipo IV) desenvolvida em resposta aos antígenos de *Leishmania* inoculados. Considera-se uma resposta positiva quando ao fim de 48 a 72h se observa a formação de um eritema com pápula no local de inoculação, de diâmetro superior a cinco milímetros. De uma forma geral, durante a doença ativa este teste é negativo, sendo positivo em estados de infeção subclínica, em infeções precoces ou após tratamento eficaz<sup>(120)</sup>. Trata-se de um teste simples e pouco dispendioso, contudo o tempo decorrido entre a inoculação e a leitura do resultado (48-72h), a possibilidade de induzir resultados falsos positivos através do uso repetido desta prova, causando sensibilização iatrogénica, assim como a indução da produção de “anticorpos transitórios”, são alguns dos inconvenientes que podem ser apontados<sup>(21,120)</sup>.

##### 1.4.2.3.2 Ensaio de proliferação de linfócitos (LPA)

Nos ensaios de proliferação de linfócitos (LPA), após separação das células mononucleares presentes em amostras de sangue periférico, estas são estimuladas por antígenos solúveis de *Leishmania* (SLA) e por uma substância mitogénica, como a fitohemaglutinina ou concanavalina A. Como controlo negativo utilizam-se células do mesmo tipo mas sem adição de substâncias estimuladoras<sup>(21,120)</sup>. Nesta prova avalia-se a proliferação celular, expressa por um índice de estimulação (IS), que consiste no coeficiente entre as células estimuladas e as células não estimuladas. Dependendo do autor, considera-se um resultado positivo quando o IS é superior a dois, dois e meio, três ou cinco, revelando, ainda, a falta de padronização deste método<sup>(120)</sup>. Cães resistentes e assintomáticos apresentam uma forte resposta proliferativa, tanto na presença de SLA como do agente mitogénico, enquanto os suscetíveis apresentam uma resposta fraca. Contudo, a proliferação de células mononucleares parece ser restaurada em cães clinicamente curados, após tratamento com antimoniais, antimoniais e alopurinol, pentamidina ou anfotericina

B. Cães saudáveis não infetados mostram uma elevada proliferação de linfócitos na presença de agente mitogénico, mas sem resposta face à estimulação por SLA<sup>(21,120)</sup>.

#### 1.4.2.4. Testes de diagnóstico moleculares

##### 1.4.2.4.1. Reação em cadeia da polimerase convencional

A deteção de ADN de *Leishmania* em tecidos de animais infetados, com recurso ao método da reação em cadeia da polimerase (PCR – convencional), é um método de diagnóstico de elevada sensibilidade, que pode ser utilizado quando há suspeita de doença, em estudos de investigação e na avaliação de dadores de sangue, e que pode ser realizado a partir de vários tipos de amostras, incluindo amostras de linfonodos, medula óssea, baço e sangue<sup>(20, 108)</sup>.

Protocolos de PCR que se destinam à ampliação de diferentes regiões de ADN parasitário apresentam diferentes sensibilidades, sendo mais sensíveis aqueles que têm como alvo regiões que estão presentes num maior número de cópias no ADN de *Leishmania*<sup>(108)</sup>. Entre tais protocolos podemos identificar dois grupos: i) os que utilizam como alvo sequências de ADN cinetoplástico (kADN) e ii) os que utilizam sequências de ADN genómico nuclear, da região codificadora do ARN ribossómico (rARN)<sup>(20,108)</sup>.

Os protocolos que ampliam sequências de ADN genómico apresentam elevada sensibilidade na deteção de ADN de *L. infantum* em amostras colhidas por PAAF esplénica e de linfonodos de cães seropositivos ou, de forma não invasiva, por zaragatoa conjuntival. Contudo, quando a amostra utilizada é constituída por sangue total ou concentrado de leucócitos a sensibilidade do PCR, amplificando as mesmas sequências, diminui<sup>(126)</sup>.

As sequências de ADN genómico amplificadas por PCR estão presentes em 40 a 200 cópias no genoma de *Leishmania*, enquanto as de kADN estão presentes em aproximadamente 10000 cópias por parasita, o que faz com que os protocolos de PCR que amplificam kADN sejam mais sensíveis e permitam o diagnóstico em animais assintomáticos e até, por vezes, seronegativos. Comparativamente com outros meios de diagnóstico, apresentam, portanto, um maior valor preditivo negativo (maior probabilidade, de perante um resultado negativo, não existir mesmo infeção)<sup>(128)</sup>.

##### 1.4.2.4.2. Reação em cadeia da polimerase em tempo real

A PCR em tempo real é uma técnica quantitativa avançada, capaz de detetar níveis extremamente baixos de parasitas, sendo consideravelmente mais sensível que a técnica de PCR convencional. Utilizando como alvo sequências de kDNA, enquanto através de PCR convencional se conseguem resultados positivos em amostras de medula óssea contendo 30 ou mais parasitas por mililitro, com PCR em tempo real as mesmas amostras são determinadas positivas na presença de menos de um parasita por mililitro. Por outro lado, sendo quantitativa, permite avaliar o grau de infeção, a eficácia do tratamento e a evolução da doença ao longo do tempo, contudo, para que seja possível comparar resultados, estes devem ser obtidos do mesmo tipo de amostras, uma vez que a carga parasitária pode ser diferente, dependendo do tecido utilizado. Como amostra pode ser utilizado sangue, aspirados de medula óssea ou linfonodos,

material fresco ou embebido em parafina, colhido por biopsia de diferentes tecidos, urina ou material colhido por zaragatoa conjuntival<sup>(128)</sup>. Porém, trata-se de uma técnica muito dispendiosa, que requer técnicos qualificados para a sua execução e que é muito sensível à ocorrência de contaminações, o que a torna aplicável apenas em contexto laboratorial.

#### 1.4.3. Diagnóstico de infeção por *Leishmania infantum* em cães assintomáticos

As principais razões que levam um médico veterinário a rastrear a infeção por *L. infantum* em animais assintomáticos são: i) o preenchimento de pré-requisitos para que um cão seja dador de sangue; ii) o diagnóstico de cães que vão viajar ou viajaram de áreas endémicas para áreas não endémicas; iii) o diagnóstico antes de iniciar vacinação contra o agente e iv) a determinação de taxas de infeção em estudos epidemiológicos<sup>(105)</sup>.

A cultura, citologia e histopatologia, potenciada por técnicas de imunohistoquímica e imunofluorescência indireta, são técnicas em que é esperado obter uma elevada taxa de falsos negativos, dado que, geralmente, em cães infetados assintomáticos está presente uma forte imunidade celular efetiva, com uma baixa carga parasitária<sup>(105)</sup>.

As técnicas moleculares optimizadas, com elevada sensibilidade, em conjunto com os testes de leishmaniose cutâneos, capazes de detetar cães infetados com uma resposta imunitária predominantemente celular, são considerados os melhores métodos para diagnóstico de infeção neste grupo de cães<sup>(105)</sup>.

Os testes serológicos realizados em cães assintomáticos, frequentemente revelam resultados negativos ou positivos baixos, pelo que podem não ser a melhor escolha para o diagnóstico neste tipo de animais. Contudo, caso a densidade parasitária seja suficientemente elevada para que se obtenha uma citologia positiva e/ou uma serologia positiva, é possível que o animal venha a desenvolver a doença num futuro próximo e venha a precisar de intervenção terapêutica e monitorização. Por esta razão, em cães que vivem em áreas endémicas, por rotina é preferível realizar testes serológicos, devendo ser aplicados testes de elevada sensibilidade como o DAT, e citológicos em vez de técnicas moleculares, pois permitem antever o desenvolvimento da doença e não apenas identificar a presença de infeção<sup>(105)</sup>.

### 1.5. Estadiamento clínico

O estadiamento clínico da LC deve ser realizado como último passo no processo de diagnóstico e permite obter informações clínicas importantes para a tomada de decisões terapêuticas e estabelecimento de prognósticos e planos de monitorização<sup>(105)</sup>. Existem dois principais sistemas de estadiamento clínico de pacientes com LC, um proposto pelo grupo de trabalho LeishVet<sup>(29)</sup>, e outro pelo grupo *Canine Leishmaniasis Working Group (CLWG)*<sup>(129)</sup>.

O primeiro divide a doença em quatro estádios clínicos (I, II, III e IV) tendo por base o tipo e severidade dos sinais clínicos, a presença de alterações clinicopatológicas evidenciadas através de análises laboratoriais, o grau de lesão renal e o nível de anticorpos séricos anti-*Leishmania*, encontrando-se descrito em Solano-Gallego *et al.* (2009)<sup>(29)</sup>. O segundo sistema, para além dos parâmetros considerados pelo sistema proposto pelo grupo LeishVet, baseia-se ainda nos

resultados de exames parasitológicos (cultura, citologia, histopatologia e PCR), na resposta ao tratamento e na evolução após a descontinuação do mesmo, classificando a doença em cinco estádios (A, B, C, D e E) e encontra-se descrito em Roura *et al.* (2013)<sup>(129)</sup>.

O estadiamento de um animal com LC não é uma condição estática, podendo alterar-se a qualquer momento, com a progressão ou regressão da doença<sup>(20)</sup>.

### 1.6. Tratamento

O tratamento de animais com LC tem como objetivos controlar sinais clínicos e alterações clinicopatológicas, aumentar a imunidade protetora mediada por células, evitar recidivas e diminuir a carga parasitária e a competência na transmissão da infecção<sup>(105)</sup>.

As terapias anti-*Leishmania* conduzem frequentemente a uma redução da carga parasitária, embora tornar um animal infetado totalmente livre de *Leishmania* seja uma tarefa extremamente difícil. Por esta razão a maioria das terapias de curta duração são seguidas por recaídas no espaço de um ano, após o tratamento ter sido descontinuado. Assim, para que se previnam tais recorrências, muitas vezes, é recomendada a administração de fármacos leishmanicidas em combinação com leishmanióstáticos, podendo os últimos ser administrados durante longos períodos de tempo<sup>(105)</sup>.

Entre os fármacos leishmanicidas utilizados como primeira linha encontra-se o antimoniato de meglumina, um composto antimonial pentavalente que apresenta como mecanismo de ação a inibição seletiva de enzimas protozoárias necessárias para a oxidação de ácidos gordos e glucose. Este é o principal fármaco deste grupo utilizado no tratamento de LC, de acordo com o seguinte plano: 75-100 mg/kg, uma vez por dia (SID) ou 40-75 mg/kg, duas vezes por dia (BID), por via subcutânea, durante quatro a oito semanas<sup>(29)</sup>. Como efeitos secundários podem ocorrer celulite cutânea, formação de abscessos nos locais de administração e nefrotóxicidade. O surgimento de estirpes de *L. infantum* resistentes a este tratamento foi reportado em França, Espanha e Itália, sendo esta uma preocupação atual em matéria de saúde pública<sup>(19)</sup>.

Entre os fármacos leishmanióstáticos aquele que mais frequentemente é utilizado é o alopurinol, um composto de hipoxantina, que é metabolizado pelas leishmanias e causa falhas de translocação proteica, inibindo a sua multiplicação. É administrado oralmente, com poucos efeitos adversos, na dose de 10 mg/kg/BID, podendo ser utilizado em conjugação com fármacos leishmanicidas, e frequentemente resulta numa melhoria clínica do paciente no espaço de quatro semanas. Contudo, quando o tratamento é descontinuado recaídas ocorrem com grande frequência, pelo que deve ser descontinuado apenas quando todas as seguintes condições estão presentes: i) recuperação clínica completa; ii) normalização de parâmetros clinicopatológicos e iii) nível de anticorpos negativo. Ainda assim, raramente este estado clínico é atingido, e, com frequência, a administração de alopurinol é recomendada para o resto da vida, sendo que a deterioração da função renal pode continuar, apesar da melhoria das lesões dermatológicas e da condição clínica geral. Dos poucos efeitos adversos da administração de alopurinol destaca-se a formação de hiperxantínuria que, ocasionalmente, pode levar ao desenvolvimento de

urolitíase. Assim sendo, quando o controlo e diminuição da xantiúria não ocorre, recorrendo a dietas pobres em purina e a redução da dose de alopurinol, pode ser necessário descontinuar este fármaco<sup>(20,32,105)</sup>.

O tratamento combinado: antimoniato de meglumina (na dose 75-100 mg/kg/SID ou 40-75 mg/kg/BID, por via subcutânea, durante quatro a oito semanas) e alopurinol (na dose 10-15 mg/kg/BID, por via oral, durante pelo menos seis a doze meses) é considerado o protocolo de primeira linha no tratamento, estando indicado para a maioria dos casos<sup>(105)</sup>. Uma alternativa consiste na administração de miltefosina (na dose dois mg/kg/SID, por via oral, durante quatro semanas) em combinação com alopurinol (na dose 10-15 mg/kg/BID, por via oral, durante, pelo menos, seis a doze meses)<sup>(105)</sup>.

A miltefosina é um alquilfosfolípido com propriedades leishmanicidas por indução de apoptose. Apresenta ainda a propriedade de estimular a atividade de linfócitos T e macrófagos. Quando utilizada isoladamente é capaz de reduzir a carga parasitária, não permitindo, contudo, atingir a cura parasitológica, pelo que se recomenda igualmente a terapia conjugada com alopurinol. Devido à sua baixa nefrotoxicidade, comparativamente ao antimoniato de meglumina, a miltefosina tem sido recomendada no tratamento de LC em animais com IRC<sup>(105)</sup>.

A utilização de alopurinol em monoterapia tem sido utilizada em países em que os compostos antimoniais e a miltefosina não estão disponíveis ou em animais com estádios I ou IV de LC<sup>(105)</sup>. Contudo, devido à grande variedade de resultados obtidos em diferentes estudos clínicos analisados, Noli & Auxilia (2005) apoiam a falta de evidências suficientes para a recomendação da utilização de alopurinol como monoterapia em cães com LC<sup>(130)</sup>. Posteriormente, estudos revelaram a ineficácia deste fármaco na eliminação de formas amastigotas presentes na medula óssea, assim como foi confirmada a eficácia clínica superior da combinação de alopurinol e antimoniato de meglumina, comparativamente à administração de ambos os fármacos em monoterapia<sup>(131,132 referido por 105)</sup>.

A anfotericina B, um antibiótico da classe dos macrólidos que apresenta atividade contra alguns protozoários, para além de também apresentar propriedades antifúngicas, é eficaz no tratamento da leishmaniose humana e tem vindo a substituir, para esse fim, os compostos antimoniais em Itália e noutros países europeus. Contudo, apesar de também ser efetivo contra LC, a sua utilização é bastante limitada, dada a necessidade de administração endovenosa e o facto de ser muito nefrotóxico na espécie canina, causando vasoconstrição renal, redução da taxa de filtração glomerular e, possivelmente, lesão direta das células epiteliais renais<sup>(20)</sup>.

Outro antibiótico, da classe dos aminoglicosídeos, que tem sido estudado recentemente quanto à sua eficácia e segurança no tratamento de LC, é a aminosidina. Contudo, sabe-se que também é um fármaco com potencial nefrotóxico severo, com efeitos dose dependentes, associados a doses superiores a 20 mg/kg<sup>(105)</sup>. Num estudo piloto, 12 cães infetados, sem sinais de IRC, foram sujeitos a tratamento com este fármaco, na dose 15 mg/kg/dia durante 21 dias, tendo-se observado uma melhoria significativa nos parâmetros clínicos, serológicos e parasitológicos no final do tratamento, sem recorrências nos três meses seguintes, o que pode

indiciar este protocolo como possível alternativa no tratamento de casos de LC sem envolvimento da função renal<sup>(133)</sup>. Contudo, é ainda um fármaco pouco estudado, sendo necessária a realização de novos estudos, num maior número de animais, por períodos de tempo mais longos, em monoterapia ou em conjugação com outros fármacos, para comprovar a sua eficácia e segurança<sup>(105)</sup>.

Outros exemplos de fármacos de segunda linha para o tratamento de LC são a pentamidina, o cetoconazol e o metronidazol em associação com a espiamicina ou com a enrofloxacina. Porém, a sua eficácia terapêutica está ainda pouco estudada<sup>(108)</sup>.

A administração de domperidona, um antidopaminérgico, tem sido proposta como outra possível forma de controlo de infeções por *Leishmania*. O mecanismo de ação associado a este fármaco consiste na indução do aumento da concentração sérica de prolactina, hormona que, para além de estimular a produção de leite, é também classificada como uma citocina proinflamatória, derivada de linfócitos, capaz de gerar aumento da proliferação de células Th1 CD4+, libertação de IL-2, IL-12, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , responsáveis pela ativação de macrófagos e células NK, e diminuição da proliferação de células Th2 CD4+ e TNF- $\beta$ <sup>(134)</sup>. Num estudo realizado por Gómez-Ochoa *et al.* (2009), 98 cães naturalmente infetados por *L. infantum* foram tratados apenas com domperidona, administrada na dose um mg/kg/BID, por via oral, durante um mês. Durante um período de um ano os animais foram sujeitos a exames clínicos, serológicos, bioquímicos e imunológicos e a domperidona revelou-se eficaz no controlo e redução quer dos sinais clínicos, quer do título de anticorpos. Como principais vantagens deste fármaco encontra-se o facto de ser pouco dispendioso, de administração prática e com poucos efeitos secundários, podendo ser administrado, inclusive, em animais com IRC. Contudo, está ainda pouco estudado, pelo que seria benéfico avaliar o efeito de outras dosagens e a sua utilização em conjugação com outros fármacos<sup>(134)</sup>.

O levamisol, um fármaco imidazólico, utilizado em medicina humana em associações antineoplásicas, é ainda muito utilizado como anti-helmíntico, apresentando, igualmente, propriedades imunomoduladoras, motivo pelo qual é atualmente utilizado por alguns médicos veterinários com o intuito de fortalecer a imunidade protetora em cães com leishmaniose. Todavia, não existem evidências científicas suficientes que demonstrem a sua eficácia no tratamento de LC<sup>(21)</sup>.

A tomada de decisões terapêuticas deve ter por base uma avaliação precisa da condição clínica do animal e severidade da doença. Sugestões acerca do protocolo de tratamento mais adequado para cada estágio de doença foram publicadas por Solano-Gallego *et al.* (2009) e por Roura *et al.* (2013)<sup>(29,129)</sup>. Em cães seriamente doentes, especialmente aqueles com doença renal severa, é fundamental a restauração de fluídos, eletrólitos e do balanço ácido-base antes de se iniciar o tratamento anti-*Leishmania*<sup>(20)</sup>.

Embora exista pouca informação disponível acerca de utilização de corticosteroides em conjugação com a terapêutica clássica para a LC, alguns estudos apontam que a sua utilização pode conduzir a uma mais rápida melhoria da função plaquetária e dos sinais clínicos<sup>(135)</sup>.

Frequentemente, a predisona é utilizada em doses subimunossupressoras (um a dois mg/kg/dia) com o intuito de controlar distúrbios imunopatológicos, possivelmente associados a fenómenos de hipersensibilidade, tais como glomerulonefrites, queratites, uveítes ou poliartrites. Contudo, a sua utilização em doses imunossupressoras (2,2 mg/kg/BID) está contraindicada em pacientes com LC, pelo facto de induzir atividades catabólicas, hipoalbuminemicas e imunossupressoras<sup>(135)</sup>.

### **1.7. Monitorização do tratamento e prognóstico**

De um modo geral, a monitorização dos pacientes deve ser feita de acordo com as necessidades individuais, estando estas, naturalmente, relacionadas com o estado de saúde do animal antes e após o início do tratamento<sup>(136)</sup>.

Em geral, durante o tratamento, recomenda-se a avaliação do paciente, com recurso a exame físico completo, hemograma, perfil bioquímico sérico e urianálise, que deve incluir determinação do rácio UPC em cães proteinúricos<sup>(29)</sup>. Dependendo do paciente, a frequência de monitorização destes parâmetros poderá variar. Em cães que, quando iniciam tratamento, se encontram estadiados nas fases II ou III da doença, é recomendado monitorizar um mês após o início do tratamento, de modo a verificar se ocorreu uma melhoria das alterações clinicopatológicas e se os resultados dos testes laboratoriais se encontram dentro dos limites de referência. No caso de melhoria, a reavaliação deve ser feita a cada seis meses e deve incluir avaliação serológica do título de anticorpos contra *Leishmania*<sup>(136)</sup>. Cães em estado de doença avançada necessitam, geralmente, de uma monitorização mais apertada durante o curso do tratamento, nomeadamente aquando de doença renal associada, devendo dar-se especial ênfase à avaliação dos sistemas orgânicos mais afetados<sup>(136)</sup>.

A resposta ao tratamento em cães com leishmaniose clínica é bastante variável, dependendo do seu estado clinicopatológico no momento do diagnóstico. De um modo geral, em cães com IRC é esperada uma menor taxa de recuperação, em comparação com aqueles que não têm envolvimento da função renal. Naqueles que não atingiram estados de IRC, observa-se, frequentemente, uma melhoria do seu estado clínico após o primeiro mês de tratamento, ainda que o título de anticorpos e as alterações das proteínas séricas requeiram, por norma, períodos de tempo mais longos até normalizarem<sup>(20,29)</sup>.

O estabelecimento de um prognóstico em LC é difícil. Nos sistemas de estadiamento clínico propostos pelo grupo LeishVet e pelo CLWG, para cada estágio são atribuídos diferentes prognósticos<sup>(29,129)</sup>.

### **1.8. Prevenção**

A prevenção da LC não é uma tarefa simples nem fácil, dada a complexidade da epidemiologia da infeção, que implica a participação de um vetor biológico, cuja biologia e ecologia tornam o seu controlo praticamente impossível<sup>(21)</sup>. Para além disso, trata-se de uma doença subdiagnosticada em áreas endémicas e cães que permanecem assintomáticos podem

constituir potenciais transmissores da infecção a fêmeas de flebótomos que neles se alimentem<sup>(63)</sup>.

Diferentes estratégias podem ser adotadas para diminuir a probabilidade de um hospedeiro se infectar, não existindo, contudo, um método que seja 100% eficaz. Entre as várias estratégias encontram-se: i) o controlo de vetores, quer através de intervenção ambiental com redução dos seus locais de reprodução e aplicação de inseticidas, quer através da aplicação de repelentes nos animais; ii) a administração de vacinas e outros imunostimulantes e iii) o diagnóstico e tratamento de animais infetados.

#### 1.8.1. Controlo de vetores

Uma das formas de inibir a dissiminação de LC é através do controlo de vetores, podendo este ser realizado a nível ambiental e/ou a nível dos HV.

O controlo de vetores no meio ambiente pode ser efetuado através da aplicação de produtos inseticidas nas paredes e tetos das habitações e abrigos para animais ou através da destruição de microambientes favoráveis ao desenvolvimento dos flebótomos existentes nas vizinhanças das casas ou locais frequentados pelos cães (por exemplo raízes de árvores, tocas de animais, buracos em árvores, fissuras em muros de pedra). Contudo, tais medidas são pouco viáveis, particularmente em ambiente rural, onde tais microambientes são numerosos e de controlo praticamente impossível<sup>(32,137)</sup>. Adicionalmente, pode ainda evitar-se o passeio por locais com estas características ou manter os animais no interior das habitações durante os períodos de maior atividade dos vetores, isto é, entre o anoitecer e o amanhecer<sup>(32)</sup>.

A aplicação de inseticidas, através de pulverizações residuais para interiores (*Indoor residual spraying* - IRS), quando realizadas nas paredes das habitações e abrigos para animais em ambiente urbano, mostrou-se eficaz na redução das populações de vetores<sup>(138)</sup>. Porém, a sua eficácia está dependente do grau de adaptação da espécie de flebótomos ao ambiente, assim como da área total tratada, tratando-se de um método bastante mais eficaz em ambiente urbano, onde existe a possibilidade de tratar grande parte dos locais propícios ao desenvolvimento dos vetores, comparativamente com o rural, onde as casas e abrigos tratados são poucos e dispersos, afetando uma pequena proporção da população total de vetores<sup>(129)</sup>.

Os inseticidas mais frequentemente utilizados em IRS, para o controlo dos vetores da LC pertencem à classe dos organofosforados (clorpirifos-metilo), carbamatos (propoxur) e piretroides sintéticos ( $\alpha$ -cipermetrina, cipermetrina, deltametrina e  $\lambda$ -cialotrina), que, quando comparados com produtos antigamente utilizados (diclorodifeniltricloroetano - DDT), se caracterizam por um efeito residual mínimo. Ainda assim, a utilização das duas primeiras classes vem sendo cada vez menor devido aos seus perigos e consequências ambientais e de saúde pública, visto apresentarem uma maior toxicidade para animais e humanos<sup>(21,139)</sup>.

Quanto ao controlo de vetores ao nível dos hospedeiros, a utilização de substâncias repelentes em canídeos tem-se revelado uma ferramenta eficaz na prevenção da LC<sup>(137)</sup>. Vários compostos químicos demonstraram ter efeito repelente e/ou inseticida sobre flebótomos, podendo

o seu grau de eficácia ser variável, dependendo de fatores como: i) modo de ação; ii) grau de suscetibilidade das diferentes espécies de flebótomos e iv) capacidade de dispersão e manutenção de eficácia ao longo do tempo na pele do animal. Os piretroides sintéticos são os produtos atualmente mais utilizados devido à sua efetividade contra os vetores e baixa toxicidade para os hospedeiros caninos<sup>(108)</sup>.

Um forte efeito repelente confere uma maior proteção a nível individual comparativamente com o efeito inseticida. Tal acontece pois um produto essencialmente inseticida apenas mata os flebótomos após estes se alimentarem do animal com o produto, e, uma vez que os vetores são numerosos e podem alimentar-se de um amplo número de animais, não é um efeito que tenha um impacto significativo na população de flebótomos, e não impede a transmissão de *Leishmania* ao animal cujo produto foi aplicado<sup>(140)</sup>. Já os produtos com forte poder repelente inibem a picada de hospedeiros por flebótomos, quebrando o ciclo de transmissão de *Leishmania* e prevenindo assim propagação da doença<sup>(110)</sup>.

As coleiras impregnadas com deltametrina têm-se demonstrado eficazes, principalmente pelo seu efeito repelente de flebótomos, com uma duração de ação superior a seis meses. Num estudo realizado por Killick-Kendrick *et al.* (1997) a eficácia de repelência de *P. perniciosus* por este tipo de produto foi avaliada ao longo de 34 semanas (oito meses e meio) após a colocação das coleiras, tendo-se estimado uma eficácia média de proteção de 96%, sendo menor durante a primeira semana (90%)<sup>(140)</sup>. Estudos mais recentes, realizados em Itália e Brasil, apontam, no entanto, para eficácias de proteção inferiores, entre 50 e 86%<sup>(141,142,143)</sup>. A influência do mesmo produto no desenvolvimento clínico de LC foi avaliada por Foglia Manzillo *et al.* (2006), com base na observação clínica de animais serologicamente positivos para *Leishmania*, concluindo-se que as coleiras com deltametrina poderão influenciar parcialmente o curso clínico da infeção por *Leishmania*, uma vez que a observação de sinais clínicos foi significativamente superior no grupo de animais sem coleira (90% nos animais sem coleira e 36% naqueles com coleira)<sup>(141)</sup>. Possivelmente, o forte efeito repelente das coleiras resulta num menor número de picadas por flebótomos infetados, reduzindo-se, assim, os estímulos antigénicos sucessivos, que podem ser responsáveis pela evolução da doença através de uma resposta imunitária não protetora<sup>(141)</sup>.

A aplicação tópica de formulações, em *spot-on* e em *spray*, de outros piretroides tem sido também demonstrada como efetiva contra flebótomos, embora com duração de eficácia inferior, comparativamente às coleiras com deltametrina. Molina *et al.* (2001) estudaram o efeito repelente e inseticida da aplicação tópica em *spot-on* de permetrina a 65% em cães, contra *P. perniciosus*, tendo sido demonstrado um efeito repelente pouco significativo, mas uma eficácia inseticida superior a 90%, entre os sete e os 28 dias após a aplicação, pelo que este será um produto com pouca eficácia de proteção a nível individual<sup>(144)</sup>. Molina *et al.* (2006) analisaram o efeito de uma solução de permetrina e piriproxifeno, sob a forma de *spray*, e observaram uma eficácia imediata, próxima de 100%, em termos de repelência de *P. perniciosus*, na primeira semana, decrescendo para 71,4% ao fim de 21 dias<sup>(145)</sup>.

Outro estudo, levado a cabo por Otranto *et al.* (2007), avaliou a solução *spot-on* de imidaclopride a 10% e permetrina a 50% (Advantix®) e demonstrou uma elevada eficácia na prevenção da transmissão de LC em condições naturais, em virtude da sua atividade repelente. Foi estudada a eficácia do produto em dois grupos de cães<sup>(146)</sup>. Num grupo a solução foi administrada mensalmente e no outro a cada duas semanas, sendo que, para ambos, o efeito repelente foi significativo, com taxas de proteção entre 88,9 e 90,36%, no primeiro grupo, e entre 90,73 e 100%, no segundo. Adicionalmente, registaram-se incidências de infeção significativamente inferiores nos grupos sujeitos a tratamento profilático comparativamente com os grupos controlo<sup>(146)</sup>. Miró *et al.* (2007) estudaram o efeito repelente e inseticida contra *P. perniciosus* do mesmo produto, mas em ambiente experimental, demonstrando-se uma eficácia de repelência de 97,72% um dia após a aplicação, decrescendo para 73,99% ao fim de 28 dias<sup>(147)</sup>.

Mais recentemente foi criada uma nova formulação *spot-on* para controlo de infestações por pulgas e carraças em cães, constituída por permetrina e indoxacarbe (Activyl® Tick Plus). Embora nas características fornecidas pelo fabricante não seja indicado o seu uso como repelente de flebótomos, estima-se que tenha eficácias de repelência de *P. perniciosus* de 99 a 88%, entre 2 e 21 dias após aplicação, decrescendo para 84% ao 29.º dia, resultados superiores aos obtidos em Miró *et al.* (2007) relativamente ao Advantix®<sup>(148)</sup>.

De uma forma geral as formulações *spot-on* apresentam um menor período de ação repelente mas um mais rápido início de ação, quando comparadas com as coleiras com deltametrina. As formulações *spot-on* de permetrina/imidaclopride apresentam uma elevada atividade repelente contra flebotómidos durante três semanas, devendo, por isso, ser administradas repetidamente, durante as épocas de exposição, a cada 21 dias. Em cães que vão viajar para áreas endémicas a solução deve ser aplicada pelo menos dois dias antes da viagem. Relativamente às coleiras com deltametrina, estas permitem uma inibição de picadas por flebótomos durante cinco a seis meses e devem ser aplicadas pelo menos uma a duas semanas antes dos períodos de exposição<sup>(32)</sup>.

Nos últimos anos, uma nova coleira de ação prolongada, constituída por uma matriz polimérica contendo imidaclopride a 10% e flumetrina a 4,5% foi desenvolvida para cães e gatos (Seresto®), encontrando-se licenciada como um produto de atividade repelente e inseticida contra pulgas e carraças. Apesar de não estar licenciado como produto repelente contra flebótomos, alguns estudos têm sido desenvolvidos para avaliar a sua eficácia na prevenção de LC e que indicam que este pode vir a ser mais uma ferramenta importante no controlo desta doença. Recentemente, a eficácia destas coleiras na prevenção de LC foi avaliada em dois estudos realizados em regiões endémicas de Itália<sup>(149,150)</sup>. Em ambos, registaram-se eficácias de proteção elevadas, 100 e 93,4%, com incidências de infeção de 45,1 e 60,7% nos grupos controlo, o que valida tais estudos quanto à atividade de vetores nos locais onde foram realizados. As eficácias de proteção contra LC determinadas por estes dois estudos, são superiores às obtidas nos estudos realizados com coleiras impregnadas com deltametrina<sup>(150)</sup>.

Tal pode dever-se ao efeito residual maior das coleiras de imidaclopride/flumetrina, que permite uma duração de ação de até oito meses, ser superior aos das coleiras com deltametrina<sup>(150)</sup>.

### 1.8.2. Vacinação e administração de imunostimulantes

Uma vacina eficaz contra a LC deverá ser capaz de induzir uma forte e prolongada imunidade celular predominantemente mediada por células Th1, por forma a prevenir o estabelecimento de um estado de infeção inicial e controlar a progressão da infeção até estados de doença severa. Além disso, esta deverá também promover a redução da transmissão do agente etiológico, que se sabe estar positivamente correlacionada com a progressão da doença em cães<sup>(151)</sup>.

Até aos dias de hoje são várias as classes de vacinas contra *Leishmania* desenvolvidas e cuja eficácia contra o desenvolvimento da LC tem sido estudada: i) vacinas mortas compostas por formas promastigotas inativadas (primeira geração); ii) vacinas constituídas por frações purificadas de *Leishmania* (segunda geração); iii) vacinas compostas por antigénios recombinantes de *Leishmania* (terceira geração) e iv) vacinas de ADN (quarta geração). Para além dos diferentes antigénios, diferentes adjuvantes têm também sido estudados, podendo também influenciar a segurança e eficácia das diferentes vacinas<sup>(108)</sup>.

Os estudos de vacinas contra a LC, realizados ao longo dos últimos anos, podem ser divididos em duas categorias, os das fases I e II, que avaliam a segurança, imunogenicidade e proteção contra infeção artificial, e os de fase III, que avaliam a eficácia de proteção em cães vacinados expostos por longos períodos, em áreas endémicas<sup>(151)</sup>. Nestes estudos, duas medidas de eficácia podem ser calculadas: i) a percentagem de proteção, que consiste na percentagem de animais vacinados que não desenvolveram a doença e ii) a eficácia de vacinação, que é dada pela fórmula  $[(\% \text{ animais infetados no grupo controlo} - \% \text{ animais infetados vacinados}) / \% \text{ animais infetados no grupo controlo}] * 100$ . Várias combinações de antigénio/adjuvante têm sido testadas em cães, em estudos das fases I e II, contudo duas grandes limitações podem ser apontadas a este tipo de estudos: i) a falta de segurança na administração de alguns adjuvantes em vacinas potencialmente eficazes no controlo da doença, relacionada com, por exemplo, a presença do bacilo de *Calmette-Guerin* (BCG) que pode desencadear a formação de abscessos de grande dimensão, semanas após a sua administração subcutânea<sup>(152)</sup> e ii) o desenho experimental utilizado para a obtenção de resultados num curto período de tempo, em que se recorre à infeção experimental pela injeção endovenosa de culturas de promastigotas em doses muito elevadas (em média  $5 \times 10^7$  promastigotas), consiste numa simulação bastante distinta da via de infeção natural, onde através de picadas frequentes por flebotomos infetados se inoculam na derme relativamente poucos parasitas por picada (10-500 promastigotas), em conjunto com produtos salivares e intestinais<sup>(151)</sup>.

Na Europa, a única vacina licenciada para prevenção de LC é a CaniLeish<sup>®</sup>, uma vacina de segunda geração que contém como antigénios produtos de excreção/secreção purificados a partir de culturas de promastigotas de *L. infantum* (LIESAp) e como adjuvante a saponina *Quilaja*

*saponaria* - QA-21. Trata-se da primeira vacina licenciada na Europa e nos últimos anos vários estudos têm sido desenvolvidos a seu respeito, tendo-se demonstrado ser: i) altamente imunogénica, sendo capaz de desenvolver uma resposta humoral caracterizada predominantemente por IgG2 e uma resposta imunitária celular prolongada<sup>(153)</sup>; ii) eficaz na proteção de 57% dos animais vacinados sujeitos a um estudo das fases I e II<sup>(154 referido por 151)</sup> e iii) em animais infetados reduz o risco de progressão da doença para estados de infeção ativa<sup>(153)</sup>, assim como a probabilidade de transmissão da infeção a flebótomos<sup>(156)</sup>.

A CaniLeish® está disponível comercialmente em Portugal e, de acordo com as recomendações disponibilizadas pelo fabricante (Virbac), destina-se à imunização ativa de cães a partir dos seis meses de idade, negativos quanto a infeção por *Leishmania*, e permite reduzir o risco de infeção ativa e doença clínica, após contato com *L. infantum*. A vacinação primária deverá ser composta por uma primeira dose a partir dos seis meses de idade, seguida de reforços três e seis semanas após a primeira administração. O estabelecimento de imunidade ativa ocorre quatro semanas após a última inoculação da vacinação primária e tem a duração de um ano. Por esta razão, após a vacinação primária, a revacinação é anual para que o seu efeito se mantenha, sendo constituída por apenas uma administração por ano. Após a administração desta vacina alguns cães desenvolvem reações moderadas e temporárias no local da administração, como edema, formação de um nódulo, dor à palpação ou eritema. Tais reações desaparecem espontaneamente no espaço de dois dias a duas semanas. Outros sinais temporários, que frequentemente ocorrem após a vacinação incluem hipertermia, apatia e distúrbios gastrointestinais, com duração de um a seis dias. Reações de hipersensibilidade do tipo I, como angioedema e mesmo anafilaxia, são pouco frequentes e, caso ocorram, tais animais devem receber tratamento sintomático apropriado. Após a vacinação, transitoriamente, podem ser detetados anticorpos anti-*Leishmania* por IFI, contudo, estes não deverão refletir estado de infeção ativa<sup>(157)</sup>.

Em cães clinicamente saudáveis e seronegativos encontra-se demonstrado que a administração de domperidona induz um aumento significativo da percentagem de células polimorfonucleares fagocitárias ativadas, envolvidas na resposta imunitária inata<sup>(158 referido por 159)</sup>. Tais células constituem a primeira linha de defesa que a *Leishmania* enfrenta ao entrar num HV suscetível e uma apropriada ativação das mesmas pode hipoteticamente conduzir à rápida eliminação dos parasitas fagocitados e prevenir a progressão da doença. De facto, num estudo realizado por Sabaté *et al.* (2014) o risco de desenvolvimento de doença sintomática, calculado para um grupo de animais tratados com este fármaco, foi sete vezes inferior ao calculado para o grupo controlo, sendo este um resultado semelhante ou até mesmo superior aos descritos em estudos de eficácia de vacinas desenvolvidas contra a mesma doença. No mesmo estudo, determinou-se uma percentagem de falha na prevenção do desenvolvimento de doença, ao fim de 12 meses, (através da observação de sinais clínicos, confirmação de infeção por observação citológica de parasitas, de linfónodos e medula óssea, e seroconversão), de sete por cento nos animais tratados com domperidona e de 35% nos animais sem tratamento<sup>(159)</sup>. Contudo, estes

valores são baseados num curto período de tempo e sabe-se que a LC é uma doença que pode levar vários anos a manifestar-se, pelo que, apesar deste fármaco poder ser considerado útil na redução do risco de desenvolvimento de leishmaniose clínica, a prevenção da infeção através da eliminação precoce total dos parasitas após a sua inoculação não está ainda comprovada. Desta forma, para uma melhor prevenção contra a LC, em conjunto com a domperidona devem ser sempre aplicados produtos repelentes de flebótomos.

No mercado de produtos veterinários encontra-se disponível uma formulação de domperidona em suspensão oral para cães (Leisguard<sup>®</sup>, Esteve), com a posologia recomendada de 0,5 mg/kg/SID, durante quatro semanas consecutivas. O esquema posológico recomendado pode variar um pouco, consoante a situação clínica do animal e a região em que vive. Para a redução do risco de desenvolvimento de uma infeção ativa ou doença clínica, após contacto com o agente etiológico, em áreas de elevada prevalência ou climas com estação infetante longa, como na região mediterrânica, será aconselhável tratar os animais a cada quatro meses (em junho, outubro e fevereiro). Em áreas com baixa prevalência pode ser suficiente um tratamento no início da estação infetante e outro pouco depois do final<sup>(160)</sup>.

### 1.8.3. Diagnóstico e tratamento de animais infetados

O diagnóstico e tratamento adequado e precoce de animais infetados, não só possibilita o aumento da sua esperança média de vida e qualidade de vida, podendo inclusivamente conduzir à sua cura clínica, como também permite reduzir a sua carga parasitária e, dessa forma, diminuir também o seu grau de infetividade<sup>(137)</sup>.

Contudo, uma grande limitação prende-se com a elevada percentagem de animais infetados que permanecem assintomáticos, residentes em áreas endémicas, e que potencialmente podem transmitir a infeção aos flebótomos. Uma vez que em animais assintomáticos os métodos de diagnóstico serológico e parasitológico apresentam menor sensibilidade, frequentemente obtêm-se resultados falsos negativos e o recurso a técnicas moleculares mais sensíveis e específicas apresenta muitas vezes um custo impeditivo, o que conduz ao subdiagnóstico de infeção por *Leishmania* em áreas endémicas, dificultando o seu controlo<sup>(137)</sup>.

No Brasil, para efeitos de controlo de LC, as autoridades de saúde pública recomendam o abate de todos os cães seropositivos, ainda que não existam evidências científicas de que esta estratégia seja eficaz na redução da incidência de leishmaniose visceral zoonótica.

## **2. Estudo clínico retrospectivo de dados de pacientes caninos do VetOeiras que realizaram testes de diagnóstico de infecção por *Leishmania infantum* entre maio de 2011 e fevereiro de 2015.**

### **2.1. Objetivos**

Nos primeiros meses de estágio, o contacto com diferentes casos de LC acompanhados no VetOeiras suscitaram o interesse em desenvolver um estudo longitudinal retrospectivo sobre a doença. A maioria dos estudos sobre esta doença são transversais ou avaliam um grupo de animais durante um curto período de tempo, pelo que surgiu a motivação para analisar diferentes casos durante um maior período de tempo.

Como objetivos, no presente trabalho procurou-se avaliar: i) a relação entre possíveis fatores predisponentes (raça, sexo, porte, comprimento do pelo, ambiente em que vivem durante o dia e em que pernoitam e pertença a proprietários que já tiveram outros animais com LC) e a presença de infecção por *Leishmania infantum*; ii) quais os métodos profiláticos que mais estão a ser utilizados e qual o seu papel na prevenção da doença; iii) por que motivos são os animais testados e quais os métodos de diagnóstico utilizados; iv) quais as alterações mais frequentemente identificadas ao exame clínico de animais infetados; v) a eficácia de diferentes tratamentos leishmaniostáticos e/ou leishmanicidas no controlo sintomático da doença e vi) qual a esperança média de vida de um animal após o diagnóstico de LC.

### **2.2. Material e métodos**

Definiu-se o limite temporal de maio de 2011 a fevereiro de 2015, justificando-se por maio de 2011 ter sido o mês em que se iniciou o registo informático de dados dos pacientes do VetOeiras através do sistema informático utilizado atualmente (QVET – Pontual, soluções informáticas, Lda.), pelo que dados anteriores a esta data não se encontravam disponíveis, e fevereiro de 2015 por ter sido o último mês do estágio curricular realizado.

No estudo, incluíram-se todos os animais que realizaram testes de diagnóstico de infecção por *L. infantum* durante o período acima referido. Para a recolha e análise de dados foi construído um formulário através do programa Epi Info 7® (figuras 9 a 15, em anexo), de forma a obter uma base de dados com o histórico dos pacientes. Para o preenchimento do formulário, para cada paciente, procurou-se no seu histórico do QVET o máximo de informações possível e contactaram-se os proprietários para informações adicionais (ambiente em que o animal vive/vivia predominantemente durante o dia e durante a noite, metodologia profilática contra LC adotada antes e depois da realização de testes de diagnóstico, entre outras informações). Relativamente aos resultados de hemogramas e análises bioquímicas séricas os dados foram colhidos através da IDEXX VetLab® *Station* e exportados para Excel®. O tratamento de dados foi realizado através dos programas Epi Info 7® e Excel®.

### 2.3. Resultados obtidos

No total, realizou-se a análise do historial de 188 cães sujeitos a testes de diagnóstico de LC, dos quais 56 corresponderam a animais com diagnóstico positivo de infecção por *L. infantum* (prevalência de infecção no total de animais testados de 29,79%). Tendo em conta que à data do termo do estudo se encontrava registado o óbito de 20 animais com diagnóstico positivo e 17 animais com diagnóstico negativo, a prevalência de infecção na amostra, no final do estudo, é de 23,8%.

No processo de recolha de informação acerca dos pacientes, para além da recolha de dados existentes no sistema informático do VetOeiras, foi possível completar o histórico de 129 pacientes (68,6% do total dos animais, 75% dos animais infetados, 66% dos animais sem infecção diagnosticada) contactando os respetivos proprietários, via telefone.

#### 2.3.1. Caracterização dos pacientes quanto a possíveis fatores predisponentes

Nas tabelas 37 e 38, em anexo, encontram-se discriminadas as frequências absolutas (Fi) e relativas (fr) das raças a que pertencem os animais que constituem a amostra deste estudo, bem como a percentagem de infecção por *L. infantum* por raça. Entre os animais analisados, 32,98% corresponderam a indivíduos de raça indeterminada, dos quais em 24,19% foi diagnosticada infecção, correspondendo a 26,79% do total de infetados. Analisando a associação entre a raça, indeterminada ou pura, e o diagnóstico de infecção, observou-se que os animais de raça indeterminada apresentam menor probabilidade de infecção – OR (*odds ratio*) de 0,66, com limites inferior e superior de 0,33 e 1,32, respetivamente, para um intervalo de confiança (CI) de 95%. No entanto, aplicando o teste estatístico de  $X^2$ , tal associação não é estatisticamente significativa ( $p = 0,23$ ), não sendo possível rejeitar a hipótese nula de independência entre variáveis. Dentro das raças puras, aquelas que revelaram maior número de animais infetados foram as seguintes: Labrador retriever, Boxer, Dogue alemão, Pastor alemão e Podengo português.

Relativamente a características como sexo, porte, comprimento do pelo, ambiente em que vivem predominantemente durante o dia, ambiente em que pernoitam e pertença a proprietários que já tiveram ou têm outros animais com LC diagnosticada, as Fi e fr no total de animais e nos grupos de animais com diagnóstico positivo e negativo de infecção por *L. infantum* encontram-se discriminadas na tabela 39, em anexo.

Quanto à associação entre o sexo e a presença de infecção, obteve-se uma probabilidade de infecção superior em cães do sexo masculino (OR de 1,87, com limites inferior e superior de 0,96 e 3,61, respetivamente, para um CI de 95%), no entanto, tal associação não é estatisticamente significativa ( $p = 0,06$ ).

Animais com pelagem curta exibiram uma maior probabilidade de infecção por *L. infantum* comparativamente aos de pelagem média ou longa (OR de 1,12, com limites inferior e superior de 0,57 e 2,22, respetivamente, para um CI de 95%), contudo, mais uma vez, tal associação não é estatisticamente significativa ( $p = 0,74$ ).

Entre os animais infetados as categorias mais representadas, relativamente ao porte, foram o grande (peso entre 25 e 45 kg), em 46,43%, e o pequeno (peso entre seis e 15 kg), em 25%. Avaliando a associação entre o porte e o diagnóstico de infeção por *L. infantum*, pelo teste de  $X^2$ , não existem evidências estatísticas significativas de dependência entre variáveis ( $p = 0,39$ ).

Relativamente ao ambiente em que vivem, a sua caracterização não foi possível para 59 indivíduos do total de animais (31,4%), 14 dos quais com infeção diagnosticada (25% dos infetados) e 45 sem infeção diagnosticada (34% dos não infetados). Entre os animais infetados, 51,79% caracterizaram-se por viver predominantemente em ambiente exterior, durante o dia, e 41,07% por pernoitarem em ambiente exterior. Da avaliação da relação entre o ambiente em que vivem durante o dia e a noite e a presença de infeção, através do teste de  $X^2$ , obtiveram-se valores de  $p < 0,05$ , rejeitando-se a hipótese de independência entre tais variáveis. Na análise da relação entre o ambiente em que passam a noite e a presença de infeção obteve-se um valor  $p$  de 0.0000183, existindo uma maior probabilidade de infeção nos animais que pernoitam em ambiente exterior (OR de 5,81, com limites inferior e superior de 2,55 e 13,24, respetivamente, para um CI de 95%). Quanto à relação entre o ambiente em que vivem predominantemente durante o dia e a presença de infeção, também os animais que vivem em ambiente exterior revelaram uma maior probabilidade de infeção (OR de 5,52, com limites inferior e superior de 2,11 e 14,49, respetivamente, para um CI de 95%), tendo-se obtido um valor  $p$  de 0.000272. Contudo, dos 29 animais infetados que durante o dia vivem em ambiente exterior, 22 (75.9%) passam também a noite no exterior, pelo que as variáveis ambiente em que passam o dia e ambiente em que pernoitam não são independentes.

Em relação aos animais de proprietários que já têm ou já tiveram outros animais com LC obteve-se uma maior probabilidade de estes desenvolverem infeção (OR de 2,00, com limites inferior e superior de, respetivamente, 0,94 e 4,24, para um CI de 95%), no entanto, mais uma vez, tal associação não é estatisticamente significativa ( $p = 0,069$ ).

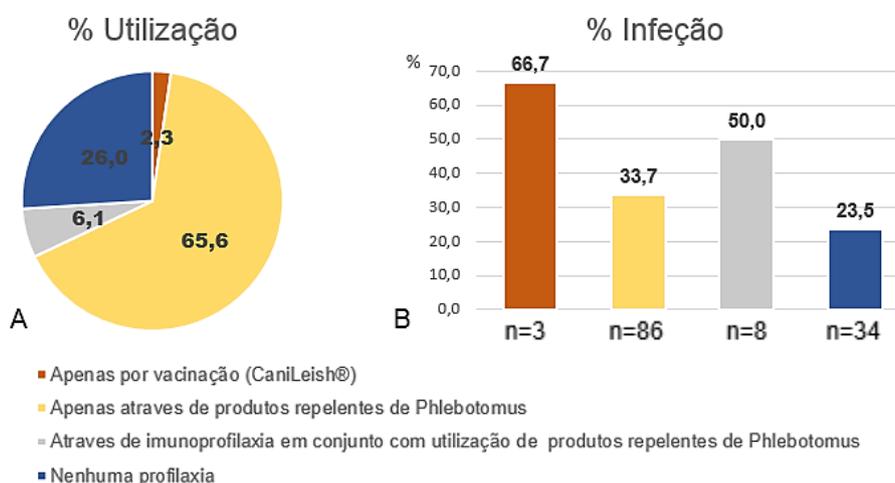
### 2.3.2. Métodos profiláticos utilizados antes e após o diagnóstico

Na tabela 40 do anexo encontram-se descritas as frequências absolutas e relativas de utilização de diferentes combinações profiláticas, adotadas previamente à realização de testes de diagnóstico de infeção por *L. infantum*, assim como a percentagem de infeção dentro de cada grupo de animais que receberam o mesmo tipo de metodologia profilática.

Em 56 animais, 13 com infeção (30,2%) e 43 sem infeção (48,3%), não foi possível obter informação acerca das profilaxias utilizadas.

Agrupando as metodologias profiláticas utilizadas antes da realização de testes de diagnóstico em: i) realização de vacina (CaniLeish®), apenas; ii) aplicação de produtos repelentes de *Phlebotomus* (coleira de deltametrina - Scalibor® e/ou pipetas *spot-on* de permetrina - Advantix® ou Activyl® Tick Plus); iii) administração de vacina mais aplicação de produtos repelentes de *Phlebotomus* ou em iv) ausência de qualquer metodologia profilática contra LC, verificou-se que a mais adotada foi a segunda, de utilização de produtos repelentes contra o

vetor, em 65,6% dos casos (Gráfico 3, A). Em todos os grupos registaram-se percentagens de infeção relativamente elevadas, como pode ser observado no gráfico 3, B (66,7% nos animais que receberam apenas vacinação, 50% no grupo que realizava vacinação e aplicação de repelentes, e 33,7% nos que realizaram profilaxia apenas com produtos repelentes).



**Gráfico 3.** A - Percentagem de utilização de diferentes metodologias profiláticas antes da realização de testes de diagnóstico de LC (n=131). B- Percentagens de infeção correspondentes aos grupos de animais que utilizavam metodologias profiláticas do mesmo tipo.

Relativamente aos produtos repelentes de flebotomos foi colhida informação acerca de quais as formulações utilizadas e a sua periodicidade de aplicação. No que diz respeito aos animais infetados, na tabela 26 encontram-se sintetizadas as metodologias que eram seguidas nestes, antes do diagnóstico. Num universo de 29 animais, em 17,2% dos casos não foi possível aferir qual a periodicidade de aplicação dos produtos repelentes, em 48,3% eram aplicadas coleiras Scalibor® pelo menos a cada 6 meses e em 7% a substituição de coleira era feita apenas anualmente. Em 62% era aplicada solução de Advantix®, mensalmente durante todo o ano em 20,7% e mensalmente mas apenas sazonalmente, durante os meses mais quentes, em 24,1%.

Relativamente aos animais que utilizavam como única metodologia profilática a coleira Scalibor® ou a solução *spot-on* de Advantix®, determinou-se uma taxa de infeção de 30% entre aqueles que utilizavam coleira com substituição pelo menos a cada 6 meses e de 23,8% quando a Advantix® foi aplicada mensalmente, durante todo o ano. Quando a Advantix® foi aplicada mensalmente, mas apenas sazonalmente, a taxa de infeção subiu para 42,9% (Tabela 27). Quando avaliada a taxa de infeção nos mesmos grupos de animais, mas considerando apenas aqueles que pernoitam no interior das habitações, observa-se uma redução das taxas de infeção (tabela 27).

Três animais realizavam profilaxia através de repelência de vetor com coleira Scalibor® (com substituição pelo menos a cada seis meses) e vacinação com CaniLeish® e em todos foi detetada infeção por *L. infantum*. Em três casos que realizavam profilaxia através da aplicação Advantix® (mensalmente, durante todo o ano) e vacinação com CaniLeish®, tal metodologia revelou-se ineficaz num dos casos.

Três animais realizavam profilaxia, apenas através de vacinação, dos quais dois desenvolveram infecção. Aquele que não desenvolveu infecção correspondia a um animal que passava a noite em ambiente interior.

**Tabela 26.** Periodicidade de aplicação dos diferentes produtos repelentes de *Phlebotomus*, utilizados antes da realização de testes de diagnóstico de LC, em animais que se revelaram infectados por *L. infantum*.

Produto repelente utilizado	Periodicidade de aplicação
<b>Coleira impregnada com deltametrina (Scalibor®) (11 casos)</b>	-Periodicidade de substituição desconhecida (1 caso); -Substituição a cada 12 meses (1 caso); -Substituição a cada 6 meses (5 casos); -Substituição a cada 4 meses (2 casos); -Substituição a cada 3 meses (2 casos).
<b>Solução spot-on de permetrina e imidacloprid (Advantix®) (10 casos)</b>	-Periodicidade desconhecida (2 casos); -Aplicação mensal durante todo o ano (5 casos); -Aplicação mensal mas apenas sazonalmente (3 casos).
<b>Coleira impregnada com deltametrina (Scalibor®) mais Solução spot-on de permetrina e imidacloprid (Advantix®) (8 casos)</b>	-Coleira substituída a cada 4 meses e aplicação mensal de Advantix® durante todo o ano (1 caso); -Coleira substituída a cada 12 meses e aplicação de Advantix® apenas sazonalmente e a cada 3 meses (1 caso); -Coleira substituída a cada 6 meses e aplicação de Advantix® apenas sazonalmente e a cada 40 dias (1 caso); -Coleira substituída a cada 4 meses e aplicação de Advantix® apenas sazonalmente e a cada 30 dias (3 casos); - Periodicidade de substituição de coleira e aplicação de Advantix® desconhecida (2 casos).

**Tabela 27.** Taxa de infecção calculada em diferentes subgrupos de animais que realizavam profilaxia com diferentes produtos repelentes de *Phlebotomus*, em diferentes periodicidades de administração, no total de animais e nos subgrupos de animais que pernoitavam no exterior ou interior das habitações (n – número total de animais).

Metodologia profilática	Taxa de infecção (%)		
	Total de animais	Pernoita no exterior	Pernoita no interior
<b>Coleira Scalibor® (Substituição pelo menos a cada 6 meses)</b>	30,0 (n=30)	57,1 (n=7)	21,7 (n=23)
<b>Advantix® (administração mensal durante todo o ano)</b>	23,8 (n=21)	40 (n=5)	18,8 (n=16)
<b>Advantix® (administração mensal, sazonalmente)</b>	42,9 (n=7)	100 (n=1)	33,3 (n=6)
<b>Nenhuma profilaxia</b>	23,5 (n=34)	50 (n=6)	17,9 (n=28)

Após o diagnóstico de LC, como pode ser verificado na tabela 41, em anexo, 42,8% dos proprietários afirmaram realizar prevenção de transmissão de infecção nos seus animais com recurso a Scalibor® ou a Advantix®, 12,5% por conjugação de ambos e em 3,6% através Activyl® Tick Plus. Sete animais com diagnóstico positivo de infecção (12,5%) não iniciaram qualquer tipo de tratamento profilático após o diagnóstico.

Em relação às medidas profiláticas adotadas após realização de testes de diagnóstico, nos animais sem infecção diagnosticada, as suas frequências absolutas e relativas encontram-se discriminadas na tabela 41, em anexo.

Entre os animais vacinados com CaniLeish® (n=54), registaram-se reações adversas em seis indivíduos (11%) e, em quatro deles, foram desaconselhadas novas administrações. Quanto

ao momento das reações, 50% ocorreu na primovacinação e 50% no reforço anual. Os tipos de reações adversas observados encontram-se discriminados da tabela 28.

**Tabela 28.** Tipos de reações adversas registadas após vacinação com CaniLeish® (n=6).

TIPO DE REAÇÃO	Fi	fr (%)
<b>Reação sistémica</b>	6	100
Angioedema	3	50
Apatia	2	33
Distúrbios gastrointestinais	1	17
Pápulas e eritema generalizados	1	17
<b>Reação local</b>	1	17
Edema	1	17

### 2.3.1. Diagnóstico

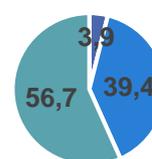
Em oito dos 56 casos de infeção (14,3%) não foi possível obter informação acerca do diagnóstico, por se tratarem de animais cujo diagnóstico foi feito noutra CAMV ou pelo diagnóstico ter sido prévio a maio de 2011, não havendo registo do mesmo no sistema informático atualmente utilizado pelo VetOeiras, ou por não ter sido possível obter informação adicional junto dos proprietários.

Relativamente ao motivo que levou à realização de testes de diagnóstico, como pode ser observado no gráfico 4, entre os 180 animais testados, 56,7% realizaram testes por suspeita de doença, 39,4% por pretenderem iniciar profilaxia vacinal ou via domperidona e 3,9% por outros motivos, como, por exemplo, o proprietário ter outros animais com LC diagnosticada.

Entre os animais com diagnóstico positivo, no momento do diagnóstico a grande maioria (87,5%) apresentava sintomatologia compatível com a infeção, dos quais 47,9% eram oligossintomáticos (com até três sinais clínicos compatíveis) e 39,6% eram polissintomáticos (com mais de três sinais clínicos de doença). Apenas 12,5% permaneciam assintomáticos

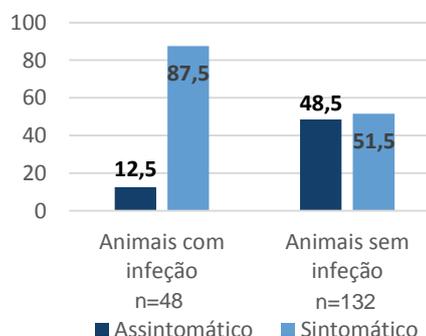
(Gráfico 5), tendo sido testados, pois os proprietários pretendiam iniciar imunoprofilaxia. No grupo de animais sem infeção diagnosticada, aquando da realização de testes de diagnóstico, 51,5% apresentavam sinais clínicos de doença e 48,5% não aparentavam qualquer sintomatologia (Gráfico 5).

### Motivo de testagem



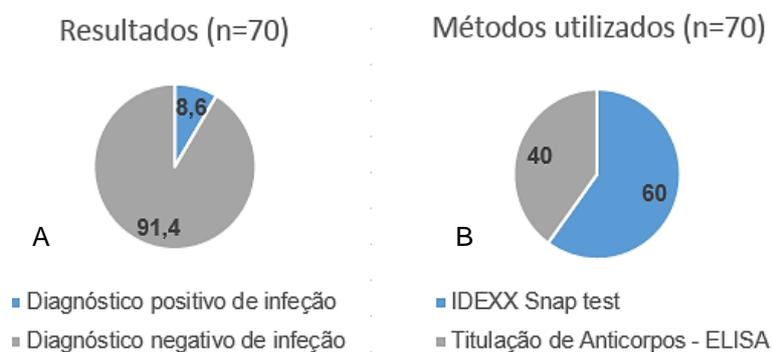
- Outro
- Pré-profilaxia
- Suspeita de infeção

**Gráfico 4.** Esquema representativo da fr (%) do motivo de realização de testes de diagnóstico de infeção por *L. infantum* (n=180).



**Gráfico 5.** Percentagens de animais sintomáticos e assintomáticos no grupo de animais com infeção e no grupo de animais sem infeção, no momento do diagnóstico.

Relativamente aos métodos de diagnóstico utilizados, nos animais assintomáticos, em 60% recorreu-se ao teste rápido de ELISA qualitativo - IDEXX *Leishmania*® Snap test e em 40% a testes de ELISA quantitativos (Leishcan® em 93% dos testes), registando-se uma prevalência de infeção de 8,6% (seis em 70) (Gráfico 6). Dos seis animais assintomáticos com diagnóstico definitivo positivo, este foi obtido através de um teste rápido de ELISA qualitativo (IDEXX *Leishmania*® Snap test) em três dos casos e por titulação de anticorpos pela técnica de ELISA, nos outros três (Leishcan® em dois dos casos e ELISA de quatro titulações, no outro).



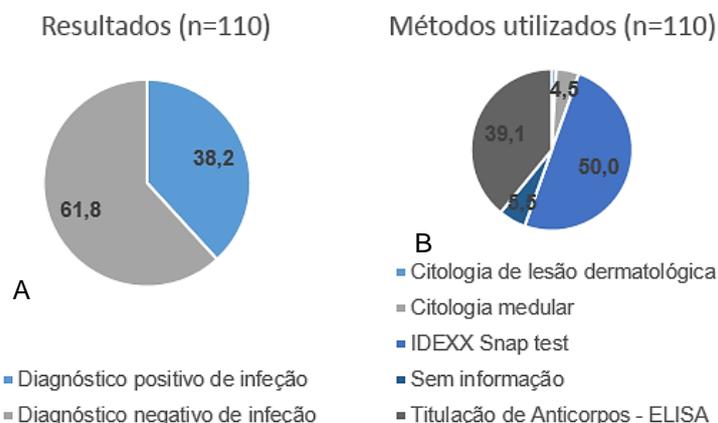
**Gráfico 6.** A- Percentagens de diagnóstico positivo e negativo de infeção por *Leishmania* no subgrupo de animais assintomáticos. B - Frequência relativa (%) de métodos de diagnóstico utilizados. (n – número de animais testados).

Entre os animais sintomáticos, 50% realizaram testes rápidos serológicos da IDEXX, 39,1% realizaram titulação de anticorpos por ELISA (Leishcan® em 96% dos casos, ELISA de quatro titulações em 2% e ELISA de duas titulações em 2%), 4,5% realizaram diagnóstico por citologia medular e em 0,9% (apenas um caso) o diagnóstico foi obtido por citologia de lesão dermatológica. Entre estes indivíduos sintomáticos, foi determinada uma prevalência de infeção de 38,2% (42 em 110) (Gráfico 7, A). Em 47,6% destes (20 de 42), o diagnóstico definitivo foi obtido através do teste rápido de ELISA qualitativo da IDEXX, em 23,8% através de testes de ELISA quantitativos, em 11,9% por citologia medular e em apenas um caso através de citologia de lesão dermatológica. Seis dos animais com diagnóstico positivo de infeção por *Leishmania*, antes do diagnóstico realizavam profilaxia através da vacina CaniLeish®. Nestes, o diagnóstico definitivo de infeção foi obtido em dois dos casos por de citologia medular, em três casos por titulação de anticorpos, revelando título elevado, pela técnica Leishcan® e em um dos casos pela realização do teste rápido de ELISA qualitativo da IDEXX.

Entre os animais com diagnóstico definitivo positivo, determinado por citologia medular ou de lesão dermatológica (seis indivíduos), em três foram também realizados testes serológicos. Dois animais realizaram testes rápidos de ELISA qualitativos da IDEXX, obtendo-se num deles um resultado serológico negativo e noutro um resultado duvidoso. No terceiro caso foi realizada titulação de anticorpos por ELISA, que se revelou negativa ( $Rz < 0.5$ ).

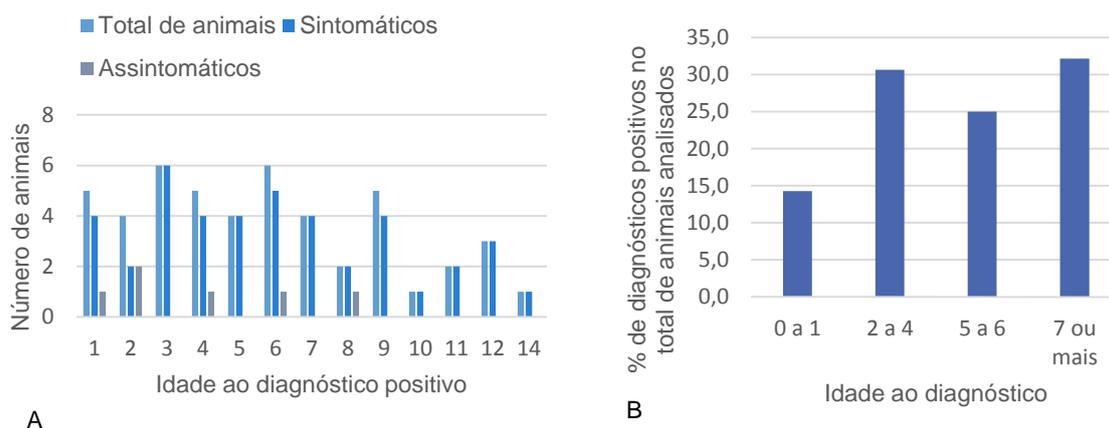
No gráfico 8, A, encontra-se esquematizada a distribuição de idades, aquando da realização de testes de diagnóstico no grupo de animais com diagnóstico positivo de infeção por *L. infantum*. O diagnóstico positivo de infeção ocorreu numa ampla gama de idades (entre um e 14 anos).

Agrupando os animais infetados sintomáticos, de acordo com a sua idade, em cachorros (até um ano), jovens adultos (dois a quatro anos), adultos (cinco a seis anos) e idosos (sete ou mais anos) obteve-se a distribuição que pode ser observada no gráfico 8, B.



**Gráfico 7.** A - Percentagens de diagnóstico positivo e negativo de infeção por *Leishmania* no subgrupo de animais sintomáticos. B - Frequência relativa (%) de métodos de diagnóstico utilizados (n – número de animais testados).

#### Idade ao diagnóstico positivo de infeção por *Leishmania infantum*



**Gráfico 8.** A- Distribuição da idade no momento do diagnóstico positivo de infeção por *L. infantum*, no total de animais com diagnóstico positivo e nos subgrupos de animais infetados sintomáticos e assintomáticos. B- Distribuição da idade ao diagnóstico positivo em animais sintomáticos, agrupando-os em cachorros (0-1 ano), jovens adultos (2-4 anos), adultos (5-6 anos) e idosos ( $\geq 7$  anos).

#### 2.3.2. Sinais clínicos e alterações clinicopatológicas

Na tabela 29 encontram-se descritas as Fi e fr das diferentes manifestações clínicas identificadas nos animais com diagnóstico positivo de infeção por *L. infantum* e que foram registadas no seu historial clínico. Entre as alterações, aquelas que mais se destacaram e que, em muitos dos casos, foram motivo de suspeita da doença foram: i) alterações dermatológicas (50%); ii) perda de peso ou condição corporal (43%); iii) letargia ou prostração (41%); iv) anorexia ou perda de apetite (38%) e v) claudicação ou dificuldades locomotoras (38%). Entre as alterações dermatológicas, destacaram-se dermatites ulcerativas nas extremidades corporais,

alopecia e dermatite descamativa não pruriginosa. Alterações oftalmológicas foram registadas em 21% dos casos, entre as quais a mais frequente foi a presença de QCS (13%).

**Tabela 29.** Fi e fr (%) das diferentes manifestações clínicas observadas no grupo de animais com diagnóstico positivo de infeção por *L. infantum*, no decorrer da doença (n=56).

Manifestações clínicas gerais	Fi	fr (%)	Manifestações clínicas	Fi	fr (%)
Perda de peso/ Condição corporal	24	43	Alterações dermatológicas	28	50
Letargia/ Prostração	23	41	Dermatites ulcerativas nas extremidades corporais	15	27
Anorexia/ Perda de apetite	21	38	Alopecia	9	16
Claudicação/ Dificuldades locomotoras	21	38	Dermatite descamativa não pruriginosa	6	11
Vômito	12	21	Onicorrexia	5	9
Mucosas pálidas	9	16	Onicogrifose	5	9
Atrofia dos músculos mastigadores	9	16	Dermatite ulcerativa de proeminências ósseas	5	9
Diarreia	8	14	Dermatite do plano nasal	2	4
Epistaxe	5	9	Dermatite ulcerativa mucocutânea	1	2
Febre	5	9	Dermatite pustular	1	2
Melena	4	7	Dermatite papular	1	2
Tosse	3	5	Pelagem baça	1	2
Esplenomagalia	3	5	Piodermatite profunda	1	2
Hematoquésia	2	4	Indeterminadas	2	4
Desordens vasculares	2	4	Alterações oftalmológicas	12	21
Linfadenomegalia regional	2	4	Queratoconjuntivite seca	7	13
Edemas nos membros e face	1	2	Conjuntivite	2	4
			Indeterminadas	2	4

**Tabela 30.** Fi e fr (%) das diferentes alterações laboratoriais registadas no grupo de animais com diagnóstico positivo de infeção por *L. infantum*, no decorrer da doença (n=56, Htc – Hematócrito, alb – albumina, glob - globulinas).

HEMOGRAMA	Fi	fr (%)	ANÁLISES BIOQUÍMICAS SÉRICAS	Fi	fr (%)
<b>Anemia não regenerativa</b>	24	43%	<b>Hiperglobulinemia</b>	29	52%
Ligeira (Htc = 30-37%)	14	58%	<b>Redução do rácio alb/glob</b>	21	38%
Moderada (Htc = 20-29%)	7	29%	<b>Hiperproteinemia</b>	16	29%
Severa (Htc = 13-19%)	2	8%	<b>Hipoalbuminemia</b>	12	21%
Muito severa (Htc <13%)	1	4%	<b>Hipoproteinemia</b>	1	2%
<b>Leucopenia</b>	11	20%	<b>Hiperuremia</b>	18	32%
<b>Neutrofilia</b>	9	16%	<b>Hipercreatinemia</b>	12	21%
<b>Monocitose</b>	8	14%	<b>Aumento de enzimas hepáticas</b>	13	23%
<b>Leucocitose</b>	7	13%	Aumento da FA	2	15%
<b>Trombocitopenia</b>	7	13%	Aumento FA e ALT	4	31%
<b>Trombocitose</b>	7	13%	Aumento ALT	1	8%
<b>Anemia regenerativa</b>	6	11%	Aumento FA, ALT e GGT	1	8%
Ligeira (Htc = 30-37%)	2	33%	Aumento FA, ALT e GGT	1	8%
Moderada (Htc = 20-29%)	3	50%	Aumento GGT	1	8%
Severa (Htc = 13-19%)	1	17%	<b>Hipocolesterolemia</b>	2	4%
<b>Neutropenia</b>	4	7%	<b>Hiperfosfatemia</b>	6	11%
<b>Eosinopenia</b>	4	7%	<b>Hipocalcemia</b>	1	2%
<b>Linfopenia</b>	3	5%	<b>Hipocloremia</b>	1	2%
<b>Monocitopenia</b>	2	4%	<b>Hipercalemia</b>	1	2%
<b>Linfocitose</b>	1	2%	<b>Não realizadas</b>	3	5%
<b>Basofilia</b>	1	2%			
<b>Não realizado</b>	3	5%			
<b>Ausência de alterações de hemograma e bioquímicas séricas</b>	9	16%			

Relativamente às alterações laboratoriais detetadas no grupo de animais infetados as Fi e fr das principais alterações registadas encontram-se expostas na tabela 30. Relativamente aos parâmetros hematológicos avaliados (determinados por *LaserCyte* – IDEXX), entre as alterações mais frequentemente registadas destacou-se a presença de anemia não regenerativa, em 43% do total de animais infetados. Esta foi classificada como ligeira em 58% das situações e normocítica e normocrómica em 70%. Em 20% dos casos foi identificada leucopenia, com eosinopenia (36%), com neutropenia (27%) e/ou com monocitopenia (9%). Em sete animais (13% do total de infetados) foi identificada leucocitose, sempre acompanhada por neutrofilia e em 86% por monocitose. Trombocitopenia e trombocitose foram registadas num igual número de indivíduos (cada condição em 13% do total de infetados).

Quanto às análises bioquímicas séricas, realizadas por *Catalyst Dx* - IDEXX, as alterações mais vezes registadas foram: i) hiperglobulinemia (52%); ii) redução do rácio albumina/globulinas (38%); iii) hiperproteinemia (29%); iv) hipoalbuminemia (21%); v) aumento da concentração de ureia (32%); vi) aumento da concentração de creatinina (21%) e vii) aumento da concentração de enzimas hepáticas (23%) (tabela 30).

Em 16% dos animais não se registaram quaisquer alterações nos parâmetros do hemograma ou bioquímicos séricos e em 5% estas determinações não se efetuaram.

Agrupando os animais avaliados em animais testados sem infeção diagnosticada (TSI) e testados com infeção diagnosticada (TI), e estes últimos em infetados assintomáticos (IA), infetados oligossintomáticos (IO) e infetados polissintomáticos (IP), realizou-se o estudo de diferenças entre médias de parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos, mensurados aquando o diagnóstico (tabela 31). De modo a avaliar estatisticamente as diferenças observadas aplicaram-se testes *t* de *Student*, considerando-se as diferenças estatisticamente significativas quando valor  $p \leq 0,05$ .

Comparando os grupos TSI e TI, registaram-se diferenças significativas relativamente aos seguintes parâmetros hematológicos: contagem de eritrócitos ( $p = 0,001$ ), hematócrito ( $p = 0,0007$ ) e hemoglobina ( $p = 0,002$ ), com valores inferiores no grupo de animais infetados, comparativamente aos não infetados, e, em média menores que o limite inferior dos valores de referência. As contagens de leucócitos e plaquetas foram significativamente inferiores no grupo TI,  $p = 0,035$  e  $p = 0,0005$ , respetivamente, embora os valores médios obtidos se encontrem dentro dos limites de referência. Relativamente aos parâmetros bioquímicos séricos avaliados, registaram-se diferenças significativas na concentração de ureia ( $p = 0,007$ ) (valor superior no grupo TI, com média acima do limite superior dos valores de referência), proteinemia ( $p = 0,003$ ) (valor superior no grupo TI, embora com média dentro dos valores de referência), albuminemia ( $p = 0,001$ ) (valor inferior no grupo TI, embora com média dentro dos valores de referência), globulinemia ( $p = 0,00001$ ) (valor superior no grupo TI, com média acima do limite superior dos valores de referência) e rácio albumina/globulinas séricas ( $p = 0,000003$ ) (valor inferior no grupo TI, com média menor que o limite inferior dos valores de referência).

**Tabela 31.** Valores médios e desvios padrão relativos aos resultados obtidos no momento do diagnóstico, em análises hematológicas e bioquímicas séricas, no total de animais sem infecção diagnosticada (TSI), no total de animais com infecção diagnosticada (TI) e nos subgrupos de animais infetados assintomáticos (IA), oligossintomáticos (IO) e polissintomáticos (IP) (n – número de animais avaliados; M –  $1 \times 10^6$ ; K –  $1 \times 10^3$ ; “a”, “b”, “c” e “d” indicam que existem diferenças estatísticas significativas entre TI e TSI, IP e IA, IP e IO e entre IA e IO, respetivamente, para um nível de significância de 5%; VCM – volume corpuscular médio; HCM – hemoglobina corpuscular média; MCHC – concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW – *red cell distribution width*, índice de anisocitose). Os valores de referência considerados são os indicados pela IDEXX para os aparelhos de análises utilizados (LaserCyte e Catalyst Dx).

Parâmetros analíticos	Valores de referência	TSI (n=43)	TI (n=34)	IA (n=3)	IO (n=15)	IP (n=16)
<b>PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS</b>						
Eritrócitos (M/ $\mu$ L)	5.50-8.50	6,18 $\pm$ 1,5	5,10 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	5,77 $\pm$ 0,7	5,44 $\pm$ 1,6	4,64 $\pm$ 1,3
Hematócrito (%)	37.0-55.0	43,8 $\pm$ 10,5	35,7 $\pm$ 10,2 <sup>a</sup>	43,7 $\pm$ 6,1	36,6 $\pm$ 11,5	33,3 $\pm$ 9,1
Hemoglobina (g/dL)	12.0-18.0	14,7 $\pm$ 3,1	12,5 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup>	16,9 $\pm$ 3,2 <sup>d</sup>	12,5 $\pm$ 3,3	11,6 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup>
VCM (fL)	60.0-77.0	71,0 $\pm$ 5,0	70,4 $\pm$ 6,9	75,5 $\pm$ 2,2 <sup>d</sup>	66,9 $\pm$ 6,4	72,5 $\pm$ 6,5 <sup>c</sup>
HCM (pg)	18.5-30.0	24,2 $\pm$ 2,5	25,6 $\pm$ 7,4	29,0 $\pm$ 2,5 <sup>d</sup>	23,3 $\pm$ 2,8	27,1 $\pm$ 9,6
MCHC (g/dL)	30.0-37.5	47,3 $\pm$ 60,7	33,5 $\pm$ 2,9	37,3 $\pm$ 1,2	33,9 $\pm$ 3,1	32,5 $\pm$ 2,3 <sup>b</sup>
RDW (%)	14.7-17.9	17,3 $\pm$ 12,0	16,6 $\pm$ 1,3	14,9 $\pm$ 0,6	16,5 $\pm$ 0,9	17,0 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>
Reticulócitos (%)	0-1.5	0,8 $\pm$ 0,6	1,1 $\pm$ 1,2	0,6 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 1,7	0,9 $\pm$ 0,7
Reticulócitos (K/ $\mu$ L)	10.0-110.0	43,8 $\pm$ 26,3	53,3 $\pm$ 62,0	34,3 $\pm$ 22,1	70,3 $\pm$ 83,5	41,3 $\pm$ 37,9
Leucócitos (K/ $\mu$ L)	5.50-16.90	11,34 $\pm$ 6,2	9,20 $\pm$ 3,9 <sup>a</sup>	6,51 $\pm$ 2,7	10,37 $\pm$ 3,8	8,66 $\pm$ 4,1
Neutrófilos (K/ $\mu$ L)	2.00-12.00	7,92 $\pm$ 5,1	6,30 $\pm$ 3,3	3,92 $\pm$ 2,0	7,10 $\pm$ 2,9	6,04 $\pm$ 3,7
Linfócitos (K/ $\mu$ L)	0.50-4.90	1,64 $\pm$ 1,1	1,43 $\pm$ 1,0	1,56 $\pm$ 0,6	1,57 $\pm$ 0,8	1,27 $\pm$ 1,2
Monócitos (K/ $\mu$ L)	0.30-2.00	1,35 $\pm$ 0,9	1,14 $\pm$ 0,7	0,63 $\pm$ 0,2	1,32 $\pm$ 0,9	1,07 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>
Eosinófilos (K/ $\mu$ L)	0.10-1.49	0,40 $\pm$ 0,4	0,30 $\pm$ 0,2	0,39 $\pm$ 0,4	0,35 $\pm$ 0,3	0,24 $\pm$ 0,2
Basófilos (K/ $\mu$ L)	0.00-0.10	0,04 $\pm$ 0,0	0,04 $\pm$ 0,0	0,02 $\pm$ 0,0	0,04 $\pm$ 0,0	0,04 $\pm$ 0,0
Plaquetas (K/ $\mu$ L)	175-500	405 $\pm$ 199	270 $\pm$ 116 <sup>a</sup>	313 $\pm$ 104	312 $\pm$ 134	221 $\pm$ 85 <sup>c</sup>
<b>PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS</b>						
Ureia (mg/dL)	7-27	17 $\pm$ 13	41 $\pm$ 51 <sup>a</sup>	9 $\pm$ 4	26 $\pm$ 32	64 $\pm$ 62 <sup>b,c</sup>
Creatinina (mg/dL)	0.5-1.8	1,1 $\pm$ 0,7	1,5 $\pm$ 1,0	1,1 $\pm$ 0,1	1 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 2,0 <sup>b,c</sup>
Proteínas totais (g/dL)	5.2-8.2	7,1 $\pm$ 1,2	8,0 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	7,0 $\pm$ 0,5	8,0 $\pm$ 1,3	8,1 $\pm$ 1,7 <sup>b</sup>
Albumina (g/dL)	2.2-3.9	2,9 $\pm$ 0,4	2,6 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	2,9 $\pm$ 0,8	2,6 $\pm$ 0,4	0,4 $\pm$ 2,5
Globulinas (g/dL)	2.5-4.5	4,1 $\pm$ 1,1	5,5 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	4,1 $\pm$ 1,3	5,4 $\pm$ 1,3	5,1 $\pm$ 1,7
Rácio alb/ glob	0.89-2.68	0,8 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,8 $\pm$ 0,4 <sup>d</sup>	0,5 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,4
ALT (U/L)	10-100	47 $\pm$ 31	82 $\pm$ 166	18 $\pm$ 7	34 $\pm$ 34	240 $\pm$ 140
FA (U/L)	23-212	197 $\pm$ 240	168 $\pm$ 265	61 $\pm$ 4	183 $\pm$ 320	253 $\pm$ 178
GGT (U/L)	0-7	2 $\pm$ 3	30 $\pm$ 85	-	2 $\pm$ 4	114 $\pm$ 52
Colesterol (mg/dL)	110-320	226	148 $\pm$ 51	-	155 $\pm$ 59	47 $\pm$ 129

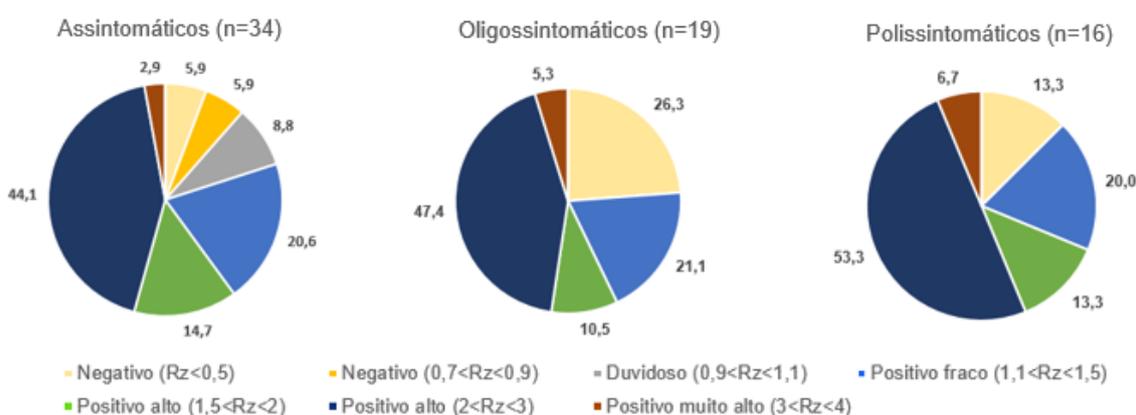
Analisando agora os resultados obtidos dentro dos vários subgrupos de animais infetados, observa-se uma redução dos valores médios de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina com o aumento do número de sinais clínicos. No entanto, tais diferenças, na sua maioria, não são estatisticamente significativas. No grupo de polissintomáticos (IP), os valores médios obtidos para estes três parâmetros foram inferiores aos valores de referência. Quanto aos valores de concentração de ureia e creatinina, registou-se um aumento entre animais sintomáticos, comparativamente aos assintomáticos, tendo os resultados mais elevados sido registados no grupo de polissintomáticos. As diferenças foram estatisticamente significativas quando

comparados os grupos IP com IA ( $p = 0,003$  e  $p = 0,01$ ) e IP com IO ( $p = 0,03$  e  $p = 0,006$ ). Relativamente à proteinemia, registou-se um valor médio superior nos animais IP comparativamente aos IA, sendo as diferenças entre grupos estatisticamente significativas ( $p = 0,04$ ). A concentração média de globulinas foi superior nos animais sintomáticos comparativamente aos assintomáticos, encontrando-se acima do limite superior de referência. O rácio albumina/globulinas sérico médio revelou-se abaixo do limite inferior de referência nos três subgrupos de animais infetados, registando-se uma redução deste com o aumento da sintomatologia, no entanto, as diferenças apenas foram estatisticamente significativas entre os grupos IA e IO ( $p = 0,038$ ).

Há que referir que os diferentes subgrupos de animais infetados não são constituídos por um igual número de animais. Apenas três animais assintomáticos realizaram hemogramas e análises bioquímicas séricas no momento do diagnóstico de infeção por *L. infantum*.

### 2.3.3. Relação entre sintomatologia e título de anticorpos anti-*Leishmania*

Avaliando a sintomatologia e o resultado de titulações de anticorpos anti-*leishmania*, determinados no momento do diagnóstico positivo de infeção e no decorrer de monitorizações da doença, verificou-se que, no caso de animais assintomáticos, estes apresentavam titulações positivas altas em 58,8% dos casos, titulações positivas fracas em 20,6%, titulações negativas em 11,8%, titulações duvidosas em 8,8%, e titulações positivas muito altas em 2,9% das situações (Gráfico 9). Em relação a animais sintomáticos, quando oligossintomáticos, 47,4% das titulações realizadas corresponderam a títulos positivos altos, 21,1% a títulos positivos fracos, 26,3% a titulações negativas e em 5,3% titulações positivas muito altas (Gráfico 9). Quando polissintomáticos, 66,3% das titulações realizadas corresponderam a títulos positivos altos, 20% a títulos positivos fracos, 13,3% a titulações negativas e em 6,7% a titulações positivas muito altas (Gráfico 9). Tais



**Gráfico 9.** Frequência relativa (%) dos resultados de titulações de anticorpos anti-*Leishmania* (realizadas aquando do diagnóstico e em monitorizações da doença) no grupo de animais com diagnóstico positivo de infeção, subdividido em animais assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos (n – número de titulações realizadas).

resultados respeitam a um total de 68 titulações de anticorpos anti-*Leishmania*, realizadas através de métodos de ELISA quantitativo (Leishcan® em 93% dos testes).

Num dos casos sintomáticos a que correspondeu uma titulação negativa, esta foi realizada no momento do diagnóstico, por suspeita de infeção, tendo a infeção sido posteriormente confirmada por observação de formas amastigotas por citologia medular. Os restantes casos de titulações negativas corresponderam a animais com diagnóstico prévio positivo, quer por titulações anteriores, quer por outros métodos de diagnóstico.

#### 2.3.4. Complicações e doenças concomitantes

Dos 56 animais com diagnóstico positivo de infeção por *L. infantum*, 12 (21,4%) desenvolveram insuficiência renal, determinada pelo aumento dos valores de ureia e creatinina séricos, e, em seis dos animais, desenvolvimento de hiperfosfatemia. Adicionalmente, em cinco animais, foi determinada proteinúria através da medição do rácio UPC. Nestes 12 indivíduos, os principais sinais clínicos identificados em consulta foram prostração (em 11), vômito (em todos), anorexia (em nove), emaciação (em todos), desidratação (em nove), melena (em dois), mucosas pálidas (em quatro) e ulceração labial (em um dos casos). Seis dos 12 animais (50%) apresentavam anemia não regenerativa. Relativamente ao estadiamento de IRC, seguindo as diretrizes da IRIS, no momento do diagnóstico, quatro foram classificados em estágio II, seis em estágio III e dois em estágio IV.

Em 16 dos animais diagnosticados com infeção por *L. infantum*, outras doenças concomitantes foram igualmente diagnosticadas (Tabela 32), podendo, em algumas situações, ser difícil distinguir qual a verdadeira origem das alterações detetadas ao exame físico e análises clinicopatológicas.

**Tabela 32.** Doenças concomitantes diagnosticadas no grupo de animais com diagnóstico positivo de infeção por *L. infantum*.

Doenças concomitantes	Fi	fr (%)
Displasia de cotovelo	2	4
Displasia de anca	1	2
Anaplasmosse	1	2
Infeção por babesia e riquetsia	1	2
Dermatofitose	1	2
Piodermatite profunda do Pastor alemão	1	2
Sarna demodécica	1	2
Gengivite hipertrófica	1	2
Doença de <i>Cushing</i>	1	2
Epilepsia idiopática	1	2
Diabetes mellitus	1	2
Hipotiroidismo	1	2
Infeção do trato urinário	1	2
Linfoma mucocutâneo	1	2
Hemangioma e hemangiossarcoma	1	2
Hérnia discal toracolombar	1	2
Doença degenerativa articular ou discospondilite intervertebral cervicotorácica	1	2

### 2.3.5. Tratamentos

No tratamento dos animais com diagnóstico positivo de infecção por *L. infantum*, diferentes fármacos ou conjuntos de fármacos foram prescritos. Na tentativa de avaliar a eficácia dos tratamentos prescritos avaliou-se a evolução do estado geral dos pacientes, através das informações existentes no histórico das consultas realizadas após início dos mesmos, classificando a evolução em: i) melhoria de estado geral; ii) agravamento de estado geral; iii) manutenção de estado geral ou iv) permanência em estado assintomático, encontrando-se os resultados sumariados na tabela 33. Em média, foram feitas monitorizações 12 meses após o início de tratamento, tendo-se obtido um desvio padrão de 18,5.

No total de tratamentos seguidos de monitorização, em 35,4% das vezes registou-se um agravamento de estado geral, em 34,2% melhoria de estado geral, tendo 25,3% correspondido a animais que permaneceram assintomáticos e 5,1% a animais sintomáticos, que mantiveram o seu estado geral. Assim, 59,5% dos tratamentos revelaram-se eficazes no controlo sintomático da infecção nas monitorizações posteriores à sua prescrição, traduzindo-se numa melhoria de estado geral ou na permanência em estado assintomático.

**Tabela 33.** Fi e fr (%) do tipo de evolução de estado geral em função do tipo de tratamento prescrito.

Tratamentos prescritos seguidos de monitorização	Agravamento		Manteve-se		Melhoria		Permaneceu assintomático		Total de tratamentos	
	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)
<b>Alopurinol</b>	3	21,4	0	0,0	5	35,7	6	42,9	14	17,7
<b>Alopurinol + Domperidona</b>	2	66,7	0	0,0	1	33,3	0	0,0	3	3,8
<b>Domperidona</b>	5	29,4	0	0,0	2	11,8	10	58,8	17	21,5
<b>A. de meglumina + Alopurinol</b>	7	35,0	2	10,0	11	55,0	0	0,0	20	25,3
<b>A. de meglumina</b>	4	44,4	1	11,1	3	33,3	1	11,1	9	11,4
<b>A. de meglumina + Alopurinol + Domperidona</b>	1	50,0	0	0,0	0	0,0	1	50,0	2	2,5
<b>A. de meglumina + Levamisol</b>	0	0,0	0	0,0	1	100,0	0	0,0	1	1,3
<b>Levamisol</b>	1	100,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,3
<b>Alopurinol + Levamisol</b>	1	100,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,3
<b>Miltefusina + Alopurinol</b>	1	33,3	0	0,0	2	66,7	0	0,0	3	3,8
<b>Miltefusina + Alopurinol + Levamisol</b>	1	50,0	0	0,0	1	50,0	0	0,0	2	2,5
<b>Nenhum</b>	2	33,3	1	16,7	1	16,7	2	33,3	6	7,6
<b>Total de tratamentos</b>	28	35,4	4	5,1	27	34,2	20	25,3	79	100,0

Contudo, ao analisar o histórico dos diferentes pacientes, verificou-se que os esquemas posológicos para cada fármaco ou conjunto de fármacos não foram homogêneos, o que desvaloriza a comparação de eficácias de tratamentos. Apenas quando foi prescrita domperidona (Leisguard®), em monoterapia, o esquema posológico foi sempre o mesmo (0,5 mg/kg/dia, via oral, durante quatro semanas, com repetição a cada quatro meses), o que

possibilita o estudo, com validade estatística, da eficácia deste fármaco no controlo sintomático da doença.

Na tabela 34 pode verificar-se que o tratamento com domperidona foi prescrito para animais em diferentes situações, quer a nível sintomático quer a nível de título sérico de anticorpos anti-*Leishmania*. Após o início do tratamento, diferentes animais foram monitorizados em diferentes momentos. Em cinco animais (45,5%) observou-se um agravamento de estado geral entre os 11 e os 25 meses após o início do tratamento com domperidona, enquanto nos restantes casos estes permaneceram assintomáticos ou passaram de oligossintomáticos a assintomáticos. Contudo, em três destes apenas se conhece o seu estado clínico até oito meses após o início do tratamento e todos os animais em que se observou agravamento de estado geral este ocorreu a partir dos 11 meses após início do tratamento com domperidona. Em relação ao título de anticorpos, em três dos animais não foram realizadas titulações após início do tratamento e nos restantes casos, à exceção de um cujo agravamento de estado geral coincidiu com o aumento do título de anticorpos (de fraco para muito alto), não se observou uma relação clara entre o título de anticorpos e o desenvolvimento de sinais clínicos compatíveis com LC.

**Tabela 34.** Classificação sintomática e resultado de titulação de anticorpos anti-*Leishmania* antes e depois do início de tratamento com domperidona, no grupo de 11 animais infetados que receberam tratamento com este fármaco e cuja doença foi monitorizada posteriormente (Ac – anticorpos, Rz – razão da amostra, \*1animal com displasia de cotovelo e sinais sugestivos de discopondilite cervico-torácica e hérnia discal lombo-sagrada identificados por TAC).

Classificação sintomática antes do início de tratamento	Título de Ac anti- <i>Leishmania</i> antes do início de tratamento	Sintomatologia após início de tratamento	Título de Ac anti- <i>Leishmania</i> após início de tratamento	Número de meses após início de tratamento
Oligossintomático	Negativo (Rz<0,5)	Assintomático	Negativo (Rz<0,5)	11
Oligossintomático	Negativo (0,7<Rz<0,9)	Assintomático	Não realizado	12
Assintomático	Positivo fraco (1,1<Rz<1,5)	Assintomático	Positivo fraco (1,1<Rz<1,5)	8
Assintomático	Positivo alto (1,5<Rz<2)	Assintomático	Negativo (Rz<0,5)	8
Assintomático	Positivo alto (2<Rz<3)	Assintomático	Positivo muito alto (3<Rz<4)	8
Assintomático	Positivo alto (2<Rz<3)	Assintomático	Positivo fraco (1,1<Rz<1,5)	22
Assintomático	Negativo (0,7<Rz<0,9)	Oligossintomático	Não realizado	12
Assintomático	Positivo fraco (1,1<Rz<1,5)	Oligossintomático	Positivo muito alto (3<Rz<4)	25
Oligossintomático	Positivo fraco (1,1<Rz<1,5)	Oligossintomático (agravamento)	Positivo fraco (1,1<Rz<1,5)	19
Assintomático	Positivo alto (2<Rz<3)	Polissintomático	Não realizado	11
Assintomático	Positivo alto (2<Rz<3)	Oligossintomático*1	Positivo alto (1,5<Rz<2)	31

Relativamente aos doze animais infetados, que desenvolveram IRC, nove foram internados para restauração do equilíbrio hidroeletrólítico e tratamento sintomático. Em três destes,

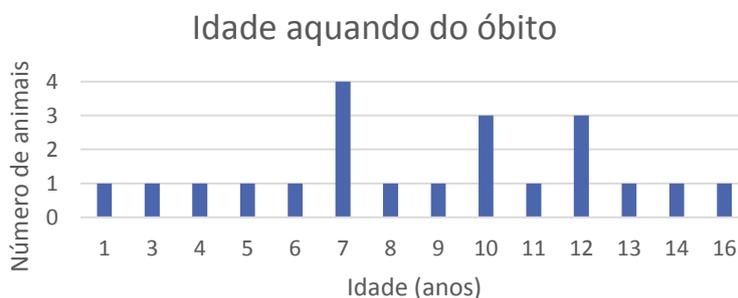
adicionalmente, foi prescrita, prednisolona (Lepicortinolo®), na dose um mg/kg/dia, via oral, durante cinco a sete dias. Quanto ao tratamento leishmanioestático e/ou leishmanicida em animais com IRC, dois receberam tratamento com antimoniato de meglumina (um na dose 100 mg/kg/BID e outro 100 mg/kg/SID), noutros três foi administrado antimoniato de meglumina em conjugação com alopurinol (sem doses registadas) e um animal recebeu tratamento com alopurinol (10 mg/kg/BID) e domperidoma (0,5 mg/kg/SID, durante quatro semanas). Apesar dos tratamentos acima descritos, as melhorias clínicas foram pouco significativas e todos os animais faleceram em menos de um mês após o diagnóstico de IRC, à exceção de um, que viveu por mais seis meses.

Para além dos três animais com IRC, aos quais foi prescrita corticoterapia, em 14 animais, com presença de alterações ao exame físico sugestivas de distúrbios imunomediados, para além do tratamento com fármacos leishmanioestáticos e/ou leishmanicidas, foi também prescrita prednisolona (Lepicortinolo®), na dose um mg/kg/dia, via oral, durante cinco a sete dias. É, no entanto, difícil avaliar o seu real efeito terapêutico.

#### 2.3.6. Número de meses ou anos vividos após o diagnóstico e idade aquando do óbito

Dos 56 animais com diagnóstico positivo de infeção registou-se o óbito de 21 indivíduos (37,5%), dos quais, em 12 (57,1%) foi realizada eutanásia. Entre os óbitos encontram-se 12 animais (57%) com IRC diagnosticada, tendo sido praticada eutanásia em 50% destes.

Relativamente à idade aquando do óbito, este registou-se em praticamente todas as idades, desde um até 16 anos, observando-se um maior número de óbitos entre os 7 e os 12 anos (gráfico 10). Em média tais animais viveram  $8,8 \pm 3,8$  anos. No grupo de animais sem infeção diagnosticada registou-se o óbito de 17 animais (12,9%), que viveram em média  $10,4 \pm 17,6$  anos. A média de idades aquando do óbito, determinada no grupo de animais infetados, é inferior à determinada no grupo de animais sem infeção diagnosticada, no entanto estatisticamente as diferenças não são significativas ( $p = 0,1$ ).



**Gráfico 10.** Gráfico ilustrativo da distribuição de idades aquando do óbito, relativas aos animais com diagnóstico positivo de LC e que faleceram no período compreendido neste estudo (n=21).

Entre os animais com LC que faleceram, e em que existe informação relativa à data do diagnóstico (19 animais), é possível determinar o seu tempo de sobrevivência após o diagnóstico da doença (tabela 35). Em média, tais animais viveram apenas durante pouco mais de um ano após o diagnóstico ( $12,6 \pm 23,5$  meses). Quinze animais (78,9%) viveram menos de um ano após

o diagnóstico de infeção por *L. infantum*, dos quais oito (53,3%) viveram apenas até um mês após o diagnóstico. Oitenta e oito por cento (sete em oito) dos animais que viveram até um mês após o diagnóstico corresponderam a animais com IRC. Dos restantes animais com insuficiência renal aquando do óbito, dois viveram entre três e seis meses e outros dois viveram por mais de quatro anos após o diagnóstico. No entanto, em tais animais o diagnóstico de insuficiência renal apenas foi efetuado já próximo do seu último mês de vida, ou seja, todos os animais, após o desenvolvimento de insuficiência renal, viveram durante um período de tempo muito curto (de aproximadamente um mês).

**Tabela 35.** Número de anos vividos após diagnóstico positivo de infeção por *L. infantum*, no grupo de animais cujo óbito foi registado durante o período compreendido no presente estudo (n=19).

Número de anos após diagnóstico	Fi	fr (%)
< 1 ano	15	78,9
1 a 2 anos	1	5,3
3 a 5 anos	1	5,3
> 5 anos	2	10,5
<b>Total</b>	19	100

Entre os animais ainda vivos, na tabela 36 apresenta-se a distribuição do número de anos que decorreram entre a data do diagnóstico e a data do último contacto, não estado incluídos pacientes que apenas realizaram uma consulta entre 2011 e 2013, na qual a doença foi diagnosticada e em que não foi possível contactar os proprietários para atualização da história clínica, desconhecendo-se o seu estado clínico atual, e pacientes em que não foi possível determinar a data aproximada em que foi feito o diagnóstico.

**Tabela 36.** Número de anos vividos após o diagnóstico de infeção por *L. infantum*, no grupo de animais sem registo de óbito (n=24).

Número de anos após diagnóstico	Fi	fr (%)
< 1 anos	7	29,2
1 a 2 anos	6	25
3 a 5 anos	7	29,2
>5 anos	4	16,7
<b>Total</b>	24	100

#### 2.4. Discussão de resultados

Os dados mais recentes encontrados relativamente a estimativas de prevalência de LC na região de Lisboa correspondem a dados de 2003, estimando-se uma prevalência, em áreas urbanas do distrito de Lisboa, de 19,2%<sup>(161)</sup>. Os resultados obtidos, relativos ao total de animais testados pelo VetOeiras para infeção por *L. infantum*, entre maio de 2011 e fevereiro de 2015, revelaram que 29,79% dos animais se encontravam infetados, estimando-se uma prevalência de infeção, à data do final deste estudo de 23,8%. No entanto, tal valor pode não refletir a prevalência de LC no distrito de Lisboa, uma vez que a escolha dos animais testados não foi aleatória, antes pelo contrário, 56,7% dos animais testados foram-no por suspeita de infeção.

Os resultados obtidos, relativos à associação entre fatores como raça (indeterminada ou pura), sexo e comprimento do pelo, foram semelhantes aos obtidos por Belo *et al.* (2013)<sup>(55)</sup>,

numa revisão sistemática dos fatores associados à infecção por *L. infantum* em cães, no Brasil. No presente estudo obteve-se uma aparente maior probabilidade de infecção em cães de raça pura, sexo masculino e pelo curto, tal como observado por Belo *et al.* (2013), embora estatisticamente os resultados não sejam significativos.

Em relação aos animais de raça pura, as raças que revelaram maior número de animais infetados foram: Labrador retriever; Boxer; Dogue alemão; Pastor alemão; Podengo português. Destas, o Boxer e o Pastor alemão estão entre as raças que parecem estar mais predispostas ao desenvolvimento de LC<sup>(56)</sup>. O Labrador retriever foi a raça pura mais representada entre os animais infetados, com 12,50%, todavia, foi também a raça a que pertencia um maior número de animais no total de indivíduos testados (11,17%). Relativamente à raça Podengo português, em três animais testados todos se encontravam infetados e com sintomatologia (dois com lesões dermatológicas e um com doença sistémica). Esta trata-se de uma raça do tipo primitivo e, possivelmente, próxima do Podengo de Ibiza, das raças com maior probabilidade de desenvolvimento de imunidade celular protetora, e cujos indivíduos raramente desenvolvem sinais clínicos de leishmaniose<sup>(59)</sup>.

Para os animais pertencentes ao sexo masculino obteve-se uma maior prevalência de infecção comparativamente com os do sexo feminino. Na associação entre o sexo e a infecção podem estar em jogo diferentes fatores de risco de exposição ou, por outro lado, poderão existir diferenças na resposta imunitária do hospedeiro, que possam determinar o grau de suscetibilidade à infecção<sup>(162)</sup>.

Segundo Belo *et al.* (2013), determinou-se que a probabilidade de cães de pelo curto serem infetados com *Leishmania* é significativamente superior à de cães de pelo longo<sup>(55)</sup>. No presente estudo, embora os resultados não tenham sido estatisticamente significativos, também os animais de pelo curto revelaram uma maior probabilidade de infecção. Presume-se que tal relação se deva à dificuldade encontrada pelos vetores em exercer hematofagia em cães com comprimento de pelo superior ou devido às diferenças na irradiação de CO<sub>2</sub> e calor pelos mesmos, relacionados com o poder de atração de flebótomos<sup>(163)</sup>.

Ao avaliar o ambiente em que os animais vivem durante o dia e durante a noite (exterior ou interior), observou-se que existe uma maior probabilidade de desenvolvimento de infecção nos animais que passam o dia e a noite no exterior, obtendo-se resultados estatisticamente significativos para a relação entre esse facto e o desenvolvimento de infecção. A maioria dos animais infetados que passavam o dia no exterior, também aí pernoitavam (75,9%), pelo que o ambiente em que viviam durante o dia e a noite não são fatores independentes. Tais resultados estão em consonância com o observado por Belo *et al.* (2013), que verificaram que animais que vivem em ambiente interior têm menor probabilidade de desenvolver a doença<sup>(55)</sup>. Será de esperar que animais que passam a noite no exterior, estejam mais expostos aos vetores, nomeadamente durante as horas de maior atividade destes. Por outro lado, tais animais, de um modo geral, vivem em moradias com quintal/jardim, com microambientes favoráveis ao

desenvolvimento e multiplicação dos flebótomos, o que é favorável à epidemiologia desta doença.

Entre as metodologias profiláticas utilizadas antes da realização de testes para diagnóstico de infecção por *L. infantum*, a mais adotada foi a utilização de produtos repelentes contra *Phlebotomus*, como única metodologia (65,6% do total de animais com informação disponível). A eficácia de tais produtos tem sido estudada sobre condições experimentais controladas, demonstrando, na sua maioria, resultados satisfatórios, no entanto, desconhece-se se os mesmos níveis de eficácia podem ser obtidos em cães individuais, em ambiente real, quando a aplicação dos inseticidas está a cargo dos proprietários<sup>(164)</sup>. No presente estudo a aplicação de repelentes demonstrou-se ineficaz na prevenção de infecção em 33,7% dos animais. Avaliando mais ao pormenor os animais que realizavam este tipo de profilaxia, como única metodologia, e que desenvolveram infecção, verifica-se que nem todos adotavam os esquemas recomendados quanto à periodicidade de aplicação de tais produtos. No entanto, apesar de terem ocorrido casos de infecção em que a ineficácia profilática se possa justificar por falhas na periodicidade de aplicação dos produtos, existiram também casos em que os proprietários, aparentemente, procediam de acordo com as recomendações do fabricante (em 48,3% com utilização de coleira Scalibor®, substituída pelo menos a cada seis meses).

No presente estudo, a diversidade de metodologias profiláticas utilizadas e o facto de diferentes animais poderem estar sujeitos a diferentes fatores de exposição, tornam difícil estimar objetivamente a eficácia de proteção de cada metodologia adotada. No entanto, registaram-se taxas de infecção relativamente elevadas, nomeadamente quando comparadas com a taxa de infecção obtida no grupo de animais que não realizava qualquer tipo de profilaxia (30% utilizando coleira Scalibor® com substituição, pelo menos, a cada seis meses; 23,8% aplicando Advantix®, mensalmente, durante todo o ano; 42,9% quando administrado Advantix®, mensalmente, mas apenas sazonalmente e 23,5% quando nenhuma profilaxia foi aplicada). O que sugere que as profilaxias que estão a ser utilizadas estão longe de ser 100% eficazes.

Uma percentagem considerável de proprietários (26%) afirmou que não realizava qualquer tipo de profilaxia no seu animal, antes da realização do teste de rastreio de infecção por *Leishmania*, revelando desconhecimento ou despreocupação em relação à doença, até à data da realização do teste. No entanto, dentro deste subgrupo de animais foi registada uma percentagem de infecção de 23,5%, inferior à dos outros subgrupos que receberam diferentes tipos de profilaxia. Tal pode ser explicado pelo facto de a maioria dos animais que não realizavam qualquer tipo de profilaxia antes do teste de diagnóstico serem animais que pernoitavam no interior das habitações (80%), ou seja, que estavam menos expostos aos vetores.

Relativamente aos animais que realizavam profilaxia através de produtos repelentes de flebótomos e imunoprofilaxia, em três casos, apesar do recurso simultâneo a repelente (coleira Scalibor® com substituição pelo menos a cada seis meses) e vacinação com CaniLeish®, detetou-se infecção por *L. infantum*. Outros três animais realizavam profilaxia através da aplicação

Advantix® (administração mensal, durante todo o ano) e vacinação, tendo o protocolo se revelado ineficaz para um dos indivíduos que passava a noite no exterior da habitação.

Três animais realizavam profilaxia apenas através de vacinação, dos quais dois desenvolveram infecção. Aquele que não desenvolveu infecção correspondia a um animal que passava a noite em ambiente interior.

Tais resultados sugerem que, mais do que a utilização de produtos repelentes e imunoprofilaxias, o pernoitar em ambiente interior parece ser determinante para a prevenção da infecção, registando-se uma taxa de infecção três vezes inferior quando animais pernoitam no interior das habitações, comparativamente aos que pernoitam no exterior. Ainda assim, 20,9% dos animais que pernoitavam no interior desenvolveram infecção.

Após o diagnóstico positivo de infecção, 12,5% dos proprietários de cães com leishmaniose (sete animais) afirmaram não realizar qualquer tipo de repelência contra o vetor de *Leishmania*, permitindo que tais animais constituam potenciais focos de disseminação da infecção, particularmente em dois dos casos que viviam durante o dia e a noite em ambiente exterior.

Entre os animais que obtiveram diagnóstico negativo de infecção, 28 (21,2%) iniciaram profilaxia com domperidona (Leisguard®) e 44 (33,3%) com CaniLeish®, entre 2011 e 2015, nenhum voltando a ser testado quanto a infecção por *L. infantum*. O facto de tais animais não terem voltado a ser testados poderá indicar que, mesmo que se tenham infetado posteriormente, tais profilaxias poderão estar a ser eficazes no controlo do desenvolvimento para LC clínica.

Em estudos de avaliação da segurança e eficácia da vacina CaniLeish®, a ocorrência de reações adversas raramente foi reportada, e quando o é apenas são descritas reações locais ligeiras, como edema e dor no local de inoculação, com resolução espontânea em dois a oito dias<sup>(152,153)</sup>. Em nenhum dos estudos é referida a ocorrência de reações sistémicas. No presente estudo, entre os 54 animais que realizaram vacinação, registou-se a ocorrência de reações adversas em seis indivíduos (11%), todos eles com algum tipo reacional sistémico (angioedema, apatia, alterações gastrointestinais, pápulas e eritema generalizados) e em apenas um foi relatada a ocorrência de edema no local da administração da vacina. Em quatro dos casos em que ocorreram reações (67%), estas foram mesmo impeditivas da realização de posteriores reforços com a mesma vacina. Tais resultados revelam que a vacina não é tão segura quanto o descrito nos estudos acima referidos.

Em regiões endémicas prevê-se que a prevalência de infecção por *L. infantum* seja bastante superior à proporção de animais que desenvolvem doença sintomática<sup>(48)</sup>. No presente estudo, entre os animais com diagnóstico positivo, a grande maioria (87,5%) encontrava-se já sintomática no momento do diagnóstico, embora haja que salientar que 56,7% do total de animais testados, foram-no por suspeita de infecção. Por outro lado, entre os animais assintomáticos, nos quais foi determinada uma reduzida prevalência de infecção (8,6%), em 60% dos casos o rastreio de infecção foi efetuado através de testes rápidos de ELISA qualitativos (IDEXX *Leishmania*® Snap test), menos sensíveis que os testes de ELISA quantitativos (Leishcan®)<sup>(115)</sup>, podendo, por isso, existir alguns falsos negativos neste grupo de indivíduos. A maioria dos animais

assintomáticos com diagnóstico negativo, após o teste, iniciou vacinação com CaniLeish® ou prevenção com domperidona. O recurso a este teste rápido, em vez da realização de testes mais sensíveis, para além de ser o recomendado pela *European Medicines Agency* (EMA) para despiste de infeção antes do início de primovacinação com CaniLeish®, ocorre muitas vezes por questões de comodidade para o proprietário, que obtém o resultado em poucos minutos e não necessita voltar ao hospital para saber o resultado e iniciar plano profilático. No entanto, a infeção poderá estar a ser subdiagnosticada, sendo que animais infetados podem estar a ser vacinados e, no futuro, poderão vir a desenvolver a doença, não por falha vacinal mas porque já se encontravam infetados quando iniciaram plano vacinal.

Miranda *et al.* (2008), num estudo de caracterização de uma população de 390 cães com LC, descreveram uma distribuição bimodal relativamente à idade de desenvolvimento clínico da doença, com ocorrência de dois picos, um primeiro entre os dois e os quatro anos de idade (jovens adultos) e outro em animais com idade igual ou superior a sete anos (idosos)<sup>(56)</sup>. No presente estudo, ao agrupar os animais com diagnóstico positivo e sintomáticos, nas mesmas classes etárias utilizadas por Miranda *et al.* (2008), obteve-se uma maior positividade diagnóstica nos mesmos grupos. Pensa-se que o desenvolvimento da doença em idades jovens ocorre em animais mais sensíveis à infeção, enquanto que quando esta se manifesta apenas em idades mais avançadas tal poderá corresponder a indivíduos mais resistentes, que, embora possam ter sido infetados em idades jovens, apenas desenvolvem doença quando o seu sistema imunitário se encontra deprimido e/ou quando estão presentes outras doenças concomitantes<sup>(56)</sup>.

Relativamente às alterações identificadas aquando da realização do exame clínico de animais infetados, seja na consulta do diagnóstico, seja em consultas de monitorização da evolução da doença, aquelas que mais vezes foram registadas foram: alterações dermatológicas (50%); perda de peso ou condição corporal (43%); letargia ou prostração (41%); anorexia ou perda de apetite (38%) e claudicação ou dificuldades locomotoras (38%). Alterações estas que estão entre as mais frequentemente encontradas na história clínica e exame físico de casos clássicos de LC<sup>(20)</sup>. As lesões dermatológicas são comuns na LC, sendo que a ocorrência de ulceração pode estar associada à ação direta do parasita, mas também pode ser atribuída ao desenvolvimento de vasculites necrotizantes derivadas da deposição de imunocomplexos<sup>(165)</sup>. A perda de peso e atrofia muscular, prostração, anorexia ou diminuição do apetite, são sinais clínicos frequentemente encontrados quando existe envolvimento visceral<sup>(20)</sup>, tal como foi observado nos pacientes com IRC.

Distúrbios na locomoção, em animais com LC, podem ser causados por neuralgia, poliartrites erosivas ou não erosivas, polimiosites, defeitos nas almofadas plantares, úlceras interdigitais, lesões osteoarticulares e osteolíticas ou periosteites proliferativas, estando também descrito um caso de paraparésia resultante da formação de um granuloma no canal vertebral<sup>(20)</sup>. Poliartrites, de natureza imunomediada, caracterizadas por claudicações que não respondem a tratamentos anti-inflamatórios convencionais, de carácter intermitente e que podem ser generalizadas ou afetar apenas um dos membros, são também frequentes<sup>(21)</sup>. No presente

estudo, entre os casos com alterações de locomoção identificadas, em 33% estas caracterizaram-se por claudicação consequente a dor numa determinada articulação, mas em 57,1% a origem exata da dificuldade locomotora não foi possível de determinar, surgindo casos de dificuldade de locomoção generalizada ou relutância em efetuar determinados exercícios (ex: subir ou descer escadas). Dois animais apresentavam défices proprioceptivos nos membros posteriores e em dois casos foram identificadas doenças concomitantes que poderiam estar na origem das alterações de locomoção, como displasia de cotovelo, hérnia discal toracolombar e doença degenerativa articular ou discospondilite intervertebral cervicotorácica.

Em 21% dos animais foram observadas alterações oftalmológicas, nos quais a presença de QCS foi a principal alteração registada. Pensa-se que o desenvolvimento de QCS em animais com LC, poderá resultar da presença de inflamação piogranulomatosa nos tecidos circundantes dos ductos lacrimais, derivada da presença de formas amastigotas, que conduz à retenção e acumulação de secreções das glândulas lacrimais, com dilatação ductal<sup>(98)</sup>.

Linfadenomegalia periférica tem sido também descrita como uma das alterações clínicas mais frequentes em cães infetados<sup>(105)</sup>. No presente estudo, apenas foi registada linfadenomegalia em dois animais (4% do total de casos de infeção). No entanto, sendo este um estudo retrospectivo, que teve por base a colheita de dados existentes nos processos clínicos dos pacientes, registados por diferentes clínicos, está sujeito a falhas como ausência de descrição do total de sinais clínicos e alterações clinicopatológicas identificados aquando da realização de exames clínicos. Por outro lado, alguns sinais clínicos são alvo de interpretação subjetiva, particularmente se a sua presença não for severa, como é o caso da linfadenomegalia e esplenomegalia.

Relativamente às alterações hematológicas registadas no grupo de animais infetados, a presença de anemia não regenerativa, a maioria das vezes classificada como ligeira e normocítica/normocrómica, foi a alteração mais vezes identificada. Na verdade, esta é considerada a alteração hematológica mais comum em cães com leishmaniose e desenvolve-se geralmente por diminuição da eritropoiese resultante de doença ou inflamação crónica, podendo também ser secundária a doença renal crónica<sup>(20)</sup>.

A segunda alteração hematológica mais registada foi a leucopenia, com ou sem neutropenia e eosinopenia. Neutropenia é um achado pouco frequente em cães, dadas as reservas de neutrófilos que existem na medula óssea, e que ocorre, por regra, devido ao excessivo consumo de neutrófilos em situações de inflamação severa e/ou devido a mielossupressão<sup>(166)</sup>. A presença de bicitopenias ou pancitopenias é sugestiva de mielossupressão, nomeadamente se anemia e trombocitopenia também estiverem presentes<sup>(166)</sup>. Na LC, a redução do número de leucócitos pode ter origem multifatorial, pensando-se que a diminuição da hematopoiese devida a disfunção medular, provocada por intenso parasitismo medular, e o recrutamento multiorgânico de leucócitos sejam os principais mecanismos responsáveis<sup>(57 referido por 91)</sup>.

Leucocitose neutrofílica foi determinada em 13% dos animais, muitas vezes acompanhada por monocitose. Este é frequentemente um achado secundário a processos inflamatórios<sup>(166)</sup>.

Monocitose é esperada na presença de inflamação granulomatosa ou piogranulomatosa, uma vez que os monócitos são células precursoras dos macrófagos presentes em tais processos<sup>(166)</sup>.

Trombocitopenia foi identificada em 13% do total de infetados (sete animais), no entanto, destes, apenas três manifestaram sinais clínicos compatíveis com distúrbios da hemostase (um apresentava petéquias na boca, abdômen e dorso, e os outros dois hematoquêsia e/ou melena). Os cinco animais, nos quais foi detetada epistaxe não apresentavam trombocitopenia, o que corrobora a ideia de que esta pode estar associada a outros fenômenos, como hiperviscosidade sérica induzida por hiperglobulinemia e rinite linfoplasmocítica<sup>(102)</sup>.

Entre as alterações de parâmetros bioquímicos séricos, as mais frequentemente registadas foram: hiperglobulinemia (52%); redução do rácio albumina/globulinas (38%); hiperproteinemia (29%); hipoalbuminemia (21%); hiperuremia (32%); hipercreatinemia (21%); aumento da concentração de enzimas hepáticas (23%). As disproteinemias estão entre as alterações mais frequentemente encontradas em cães com leishmaniose, ainda que não sejam achados específicos de infeção por *Leishmania*, podendo estar presentes em muitas outras afeções de carácter inflamatório ou infeccioso<sup>(20,21,106)</sup>. A hiperglobulinemia desenvolve-se principalmente por aumento da concentração de globulinas  $\beta$  e  $\gamma$  e a hipoalbuminemia pode ocorrer por diminuição da síntese de albumina pelo fígado, mas também pode resultar de inflamação crónica, distúrbios gastrointestinais com comprometimento da absorção de proteína pelo intestino e proteinúria excessiva<sup>(167)</sup>.

Para Slappendel (1988) o aumento da concentração sérica de enzimas hepáticas, como a ALT, a AST e a FA, foi identificado em 82% dos casos de LC analisados, sendo, de um modo geral, atribuído a envolvimento hepático<sup>(168)</sup>. Rallis *et al.* (2005) avaliaram histopatologicamente amostras de tecido hepático de 26 casos de LC, que, embora não mostrassem evidências clínicas de doença hepática, revelaram diferentes estados de progressão de possível hepatite crónica, caracterizada por três padrões: padrão I – infiltração macrófagica sinusoidal ligeira; padrão II – infiltração portal por macrófagos, linfócitos e plasmócitos; padrão III – hepatite portal linfoplasmocítica com áreas de necrose e fibrose<sup>(167)</sup>. No presente estudo, em 23% dos animais infetados foram identificados aumentos da concentração sérica de enzimas hepáticas, embora nenhum manifestasse ao exame físico sinais de insuficiência hepática, como ascite ou icterícia, o que está de acordo com o descrito por Slappendel (1988) e Koutinas *et al.* (1999), onde apenas 0-2,5% dos cães infetados manifestavam tais sinais<sup>(104,131,168)</sup>.

Ao comparar os resultados de parâmetros bioquímicos e hematológicos obtidos, aquando o diagnóstico, entre o grupo de animais com infeção e o grupo de animais sem infeção, registaram-se diferenças significativas relativamente a parâmetros como hematócrito, contagem de leucócitos, concentração de proteínas totais, albumina e globulinas séricas, e rácio albumina/globulinas, semelhantes às encontradas em Reis *et al.* (2006)<sup>(169)</sup>. Estas observações indicam que alterações como anemia (principalmente se não regenerativa, normocítica/normocrómica), leucopenia e/ou disproteinemias (com hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, hiperproteinemia e/ou redução do rácio albumina/globulinas), apesar de

inespecíficas, quando presentes, o diagnóstico diferencial deve incluir a possibilidade de infecção por *L. infantum*. Na comparação de resultados analíticos entre subgrupos de animais infetados (assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos), registou-se um aumento estatisticamente significativo da uremia e da creatinemia, com a evolução clínica da doença, pelo que são parâmetros que devem ser tidos em conta no diagnóstico, monitorização e prognóstico da doença.

O envolvimento renal é bastante comum na LC, estando na sua origem a deposição de imunocomplexos na membrana basal do parênquima renal, que leva ao desenvolvimento de glomerulonefrites crônicas<sup>(170)</sup>. A destruição de um glomérulo torna o restante nefrônio não funcional e a progressiva destruição glomerular leva à diminuição da taxa de filtração glomerular, azotémia e insuficiência renal<sup>(171)</sup>. Num estudo realizado por Costa *et al.* (2003) 100% de 55 animais infetados revelaram lesões de glomerulonefrite e 78,2% lesões de nefrite túbulo-intersticial, no entanto, alterações da função renal, com aumento da creatinemia, apenas foram registadas em 5% dos animais, possivelmente com doença renal em fase de progressão mais avançada. Sinais de doença renal podem surgir como únicas manifestações clínicas de leishmaniose em cães doentes, sendo o estado de IRC associado a um prognóstico mau a reservado, apontado como a principal causa de morte em animais infetados por *L. infantum*<sup>(29)</sup>. No presente estudo, o comprometimento da função renal foi identificado em 21,4% dos animais infetados. Nestes, foram identificadas alterações ao exame clínico, como prostração, vômito, anorexia, perda de peso, desidratação, melena, palidez de mucosas e ulceração labial. Apesar do tratamento preconizado nestes, todos eles faleceram no período compreendido pelo estudo (correspondentes a 57% do total de óbitos), sobrevivendo durante um período relativamente curto após o diagnóstico de insuficiência renal (seis animais viveram menos de um mês após o diagnóstico, cinco aproximadamente um mês e um aproximadamente seis meses), confirmando o prognóstico reservado a mau, em tais casos. Para além do tratamento sintomático e de suporte da função renal, cinco dos animais (dois em estágio II e três em estágio III de IRC) receberam tratamento leishmanicida, com antimoniato de meglumina. De acordo com as recomendações do grupo LeishVet, animais com estadiamento III de IRC devem receber tratamento apenas com alopurinol para além da terapia de suporte da função renal, devido ao risco acrescido de nefrotoxicidade quando a taxa de filtração glomerular se encontra diminuída. Assim, em três dos casos, a administração de antimoniato de meglumina poderá ter sido, em parte, responsável pelo agravamento do seu estado clínico.

O desenvolvimento de LC está associado a uma imunidade celular inefetiva, possibilitando uma multiplicação descontrolada de parasitas, que surgem em elevada concentração em diferentes tecidos levando à subsequente ativação de células B, com sobreprodução de imunoglobulinas<sup>(172)</sup>. Como tal, a concentração de IgG *Leishmania*-específicas está positivamente relacionada com a densidade de parasitas nos tecidos e possivelmente com a severidade dos sinais clínicos, sendo geralmente menor em cães infetados assintomáticos que nos sintomáticos. Por esta razão, quando concentrações elevadas são detetadas em animais

assintomáticos tal pode indicar que estes se encontram em período de incubação e na iminência do desenvolvimento dos primeiros sinais de LC<sup>(172)</sup>. No presente estudo, em 82,3% das vezes que animais assintomáticos foram avaliados quanto à concentração sérica de anticorpos anti-*leishmania* obtiveram-se resultados positivos, sendo especialmente elevados ( $2 < Rz < 3$ ) em 44,1% dos testes. Uma percentagem tão elevada de animais assintomáticos com títulos séricos altos de anticorpos anti-*leishmania* pode justificar-se pela ausência de registo completo de sinais clínicos no histórico das consultas, ou então corresponderem a animais que se encontram em período de incubação, sendo elevada a probabilidade de desenvolvimento de sinais clínicos num futuro próximo. De facto, entre estes, 41,6% vieram mais tarde a desenvolver sinais clínicos compatíveis com a doença: um manifestou sinais clínicos consequentes de insuficiência renal grave após 13 dias; os restantes desenvolveram sintomatologia, em média, 16 meses após monitorização, apesar de receberem tratamento com domperidona ou alopurinol.

A grande maioria dos cães sintomáticos são positivos quando testados serologicamente através de testes convencionais como IFI, ELISA ou DAT<sup>(172)</sup> e, assim sendo, quando animais sintomáticos obtêm resultados serológicos negativos, mesmo que a infeção tenha sido diagnosticada por outros métodos (PCR ou citologia), o papel da infeção no desenvolvimento dos sinais clínicos identificados deve ser encarado com ceticismo, devendo-se investigar outros diagnósticos diferenciais e, só depois, iniciar tratamento anti-*Leishmania*. Em tais casos, só a resposta ao tratamento é que permitirá o diagnóstico definitivo de LC como responsável pelos sinais clínicos observados<sup>(172)</sup>. No presente estudo, entre os animais sintomáticos, em 26,3% das titulações realizadas em indivíduos oligossintomáticos e em 13,3% das realizadas em polissintomáticos obtiveram-se titulações negativas, porém, em tais casos, alguns dos sinais clínicos poderão ser justificados por afeções concomitantes. Não obstante, entre os animais infetados analisados, ocorreu um caso atípico, polissintomático (com linfademegalia regional, perda de peso, atrofia muscular generalizada, anorexia, prostração, défice propriocetivo de posteriores e QCS), com múltiplas alterações de hemograma e parâmetros bioquímicos (hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, leucocitose, neutrofilia, trombocitopenia, aumento da concentração sérica de enzimas hepáticas – ALT, FA e GGT, e hiperfosfatemia) e que apresentava titulação de anticorpos, pelo método de ELISA - LeishCan®, negativa. Neste, a infeção foi determinada por citologia medular e ao iniciar tratamento com antimoniato de meglumina (60 mg/kg/BID) e alopurinol (10 mg/kg/BID) rapidamente se observaram melhorias clínicas, encontrando-se assintomático três meses após o início do tratamento e com parâmetros clínicos praticamente normalizados.

No total de tratamentos prescritos, seguidos de monitorização, em 59,5% dos casos observou-se um controlo sintomático eficaz, resultando numa melhoria de estado geral ou na permanência em estado assintomático, em 35,4% observou-se um agravamento do estado geral e em 5,1% mantiveram-se as alterações do estado geral. A comparação entre respostas a tratamentos com utilização de diferentes fármacos ou conjuntos de fármacos não foi possível, pois, ao analisar o histórico dos diferentes pacientes, constatou-se que nem sempre foram

utilizadas as mesmas posologias ou estas não se encontravam registadas, à exceção da domperidona que foi prescrita sempre no mesmo protocolo (0,5 mg/kg/dia, via oral, durante quatro semanas, com repetição a cada quatro meses).

De acordo com as diretrizes do programa Leispro apresentado pela ESTEVE, o recurso a domperidona (Leisguard®), como tratamento de animais infetados, está indicado quando estes apresentam titulações de anticorpos baixas e sinais clínicos ligeiros. Quando estes apresentam titulações de anticorpos positivas altas ( $Rz > 1,5$ ;  $IFI > 1/160$ ) então é recomendada a realização de tratamento leishmanicida ou leishmanioestático, 30 dias antes de iniciar tratamento com Leisguard®. Gómez-Ochoa *et al.* (2009) avaliaram o efeito do tratamento com domperidona em cães infetados, de acordo com a seguinte posologia: um mg/kg/BID, via oral, durante um mês. Os animais foram avaliados ao longo de 12 meses, tendo-se demonstrado um efeito positivo no controlo e redução de sinais clínicos e título de anticorpos em dois grupos de animais, um composto por animais com sinais clínicos ligeiros e títulos de anticorpos baixos, e outro por animais com sinais clínicos multissistémicos e titulações de anticorpos elevadas<sup>(134)</sup>. No presente estudo 11 animais infetados receberam tratamento com domperidona (0,5 mg/kg/SID, via oral, durante um mês, com repetição a cada quatro meses), dos quais, em cinco (45,5%) observou-se um agravamento do estado geral entre os 11 e os 25 meses após o início do tratamento. Os restantes casos permaneceram assintomáticos ou passaram de oligossintomáticos a assintomáticos e em apenas um se verificou um aumento do título de anticorpos. Contudo, em três dos animais em que não se verificou agravamento de estado geral, apenas se conhece o seu estado clínico até oito meses após o início da terapêutica, e em todos os animais em que se observou agravamento do estado geral, tal ocorreu, pelo menos, 11 meses após o início da terapêutica com domperidona. A posologia utilizada foi distinta da realizada no estudo acima referido, conduzido por Gómez-Ochoa *et al.* (2009), correspondendo no entanto à que é recomendada pelo programa Leispro. De facto, o tratamento com domperidona está ainda pouco estudado, pelo que mais estudos deveriam, então, ser realizados, com avaliação de animais infetados por períodos de tempo mais longos, em diferentes esquemas posológicos, em monoterapia e em combinação com outros fármacos.

Poucos estudos existem relativamente a taxas de mortalidade e tempos de sobrevivência em cães com leishmaniose<sup>(164)</sup>. No presente estudo a maioria dos animais que faleceram viveram durante menos de um ano após o diagnóstico (78,9%). Tais resultados são bastante distintos dos obtidos por Bourdeau *et al.* (2014), onde em quatro países europeus (França, Itália, Espanha e Portugal) apenas cinco a 20,5% dos animais sobreviveram menos de um ano, oito a 25,8% durante um a dois anos, 35,7 a 58% durante dois a cinco anos e 30,3 a 45,1% por mais de cinco anos<sup>(173)</sup>. Ou seja, a esperança média de vida após o diagnóstico foi claramente menor, em comparação com a determinada para os quatro países acima referidos. Em todo o caso, há que precisar que a maioria dos animais que viveu menos de um ano após o diagnóstico correspondeu a diagnóstico tardio de IRC, associada a um mau prognóstico. Tais animais constituíram 57% do total de óbitos, o que poderá justificar a elevada percentagem de animais com tempo de

sobrevivência menor que um ano. Analisando o grupo de animais ainda vivos verificou-se uma maior frequência de diagnósticos realizados há mais de um ano, o que pode significar que a abordagem destes casos tem vindo a observar melhoria, com o conseqüente aumento da esperança de vida.

#### **IV. Conclusões**

O presente relatório é parte integrante do estágio curricular realizado no Hospital Veterinário Central da Linha de Cascais – Vetoeiras, estágio este que permitiu a consolidação e aprofundamento de conhecimentos nas mais diversas áreas de clínica de animais de companhia e contribuiu para o enriquecimento, quer a nível pessoal, quer profissional, do percurso académico percorrido durante o Mestrado integrado em Medicina Veterinária.

A escolha do tema desenvolvido na segunda parte deste trabalho justificou-se pelo número e gravidade dos casos de leishmaniose canina acompanhados no início do estágio e por se tratar de uma doença de elevada importância em matéria de saúde pública, humana e veterinária, que é considerada endémica em várias regiões de Portugal e cuja prevenção não é simples, dada a complexidade da biologia e ecologia do vetor.

No presente estudo, procurou-se avaliar quais as metodologias profiláticas mais utilizadas e qual o seu efeito na prevenção da LC. De um modo geral, verificou-se que a maioria dos animais realizava profilaxia através de produtos repelentes de flebótomos, no entanto, os resultados obtidos sugerem que estes estão longe de ser 100% eficazes na prevenção de LC, mesmo quando aplicados de acordo com as recomendações do fabricante.

Tal como seria de esperar, determinou-se que animais que vivem em ambiente exterior apresentam uma probabilidade superior, estatisticamente significativa, de desenvolvimento de infeção por *L. infantum*. Tais resultados, em conjugação com os obtidos relativamente às falhas das metodologias profiláticas na prevenção da doença, sugerem que, mais do que a utilização de produtos repelentes e imunoprofilaxias, a pernoita em ambiente interior parece ser determinante para a prevenção da infeção.

A maioria dos animais assintomáticos sujeitos a testes de diagnóstico foram rastreados pois o proprietário pretendia iniciar profilaxia vacinal ou com domperidona. Na maioria destes casos foram realizados testes serológicos rápidos qualitativos, que, apesar de serem os recomendados para testagem prévia à primovacinação com CaniLeish®, sabe-se que são menos sensíveis que testes serológicos quantitativos ou testes moleculares, particularmente em animais assintomáticos. Desta forma, a infeção poderá estar a ser subdiagnosticada, sendo que animais infetados podem estar a ser vacinados e, no futuro, poderão vir a desenvolver a doença, não por falha vacinal mas porque já se encontravam infetados quando iniciaram plano vacinal.

Quanto à sintomatologia e às alterações clinicopatológicas registadas nos animais infetados, estas foram semelhantes às que se encontram já descritas em diferentes estudos. Entre animais com e sem infeção observaram-se diferenças significativas relativamente a parâmetros como hematócrito, contagem de leucócitos e concentração de proteínas séricas, o

que confirma que alterações como anemia (principalmente se não regenerativa, normocítica/normocrômica), leucopenia e/ou disproteinemias (com hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, hiperproteinemia e/ou redução do rácio albumina/globulinas), apesar de inespecíficas, quando presentes, como diagnóstico diferencial deve-se incluir a possibilidade de infeção por *L. infantum*. Com a evolução clínica da doença, registou-se um aumento, estatisticamente significativo, da uremia e da creatinemia, pelo que tais parâmetros devem também ser tidos em conta no diagnóstico, monitorização e prognóstico da doença, uma vez que estão fortemente relacionados com o comprometimento da função renal, que quando atinge estados de insuficiência o prognóstico é agravado. De facto, entre os animais infetados analisados, o período de sobrevivência após diagnóstico de IRC foi bastante reduzido.

Os animais que receberam tratamento com domperidona, em monoterapia, esta foi ineficaz no controlo sintomático de 45,5% dos casos, traduzindo-se num agravamento de estado geral 11 a 25 meses após início de tratamento. Este é um fármaco ainda pouco estudado, pelo que mais estudos deveriam ser realizados, com avaliação de animais infetados por períodos de tempo mais longos, sujeitos a tratamento com domperidona em diferentes dosagens, em monoterapia e em conjugação com outros fármacos.

O Epi Info 7<sup>®</sup> consiste num *software* gratuito, disponibilizado online pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*). O formulário desenvolvido neste programa mostrou ser útil na recolha e tratamento de dados. O desenvolvimento de um formulário universal, com possibilidade de divulgação a nível nacional e internacional, seria interessante para um estudo epidemiológico mais alargado sobre a doença, que poderia permitir a obtenção de respostas, nomeadamente em relação à problemática da eficácia das metodologias profiláticas atualmente disponíveis, quando aplicadas a nível individual.

## V. Bibliografia

1. Decreto-Lei nº 313/2003 de 17 de dezembro. Diário da República nº290 – I Série-A. Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.
2. Nelson RW & Couto CG (2014a) Acquired Valvular and Endocardial Disease. In *Small animal internal medicine*, 5<sup>th</sup> ed., Elsevier, Missouri, ISBN 978-0-323-08682-0, pp.1276-1278.
3. Nelson RW & Couto CG (2014b) Management of Heart Failure. In *Small animal internal medicine*, 5<sup>th</sup> ed., Elsevier, Missouri, ISBN 978-0-323-08682-0, pp.1276-1278.
4. Ettinger SJ & Feldman EC (2005) Pleural Effusion. In *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 6<sup>th</sup> edition, Ettinger SJ & Feldman EC, Elsevier/ Saunders, Missouri, ISBN 978-1-416-00110-2, pp. 204-207.
5. Nelson RW & Couto CG (2014c) Disorders of the Pulmonary Parenchyma and Vasculature. In *Small animal internal medicine*, 5<sup>th</sup> ed., Elsevier, Missouri, ISBN 978-0-323-08682-0, pp.316-336.
6. Noakes DE, Parkinson TJ & England GCW (2001) Infertility in the bitch and queen. In *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*, 8<sup>th</sup> ed., Noakes DE, Parkinson TJ & England GCW, W. B. Saunders, ISBN 978-0-702-02556-3, pp.639-666.
7. Nelson RW & Couto CG (2014d) Female and Male Infertility and Subfertility. In *Small animal internal medicine*, 5<sup>th</sup> ed., Elsevier, Missouri, ISBN 978-0-323-08682-0, pp.951-965.
8. Verstegen J, Dhaliwal G & Verstegen-Onclin K (2008) Mucometra, cystic endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch: Advances in treatment and assessment of future reproductive success. *Theriogenology*, **70**: 364-374.
9. Foil CS (2003) History, examination and initial evaluation. In *BSAVA Manual of Small Animal Dermatology*, 2<sup>nd</sup> ed., Foster AP & Foil CS, BSAVA, ISBN 978-0-905-21458-0, pp. 11-19.
10. Barnard N (2013) The diagnostic approach to pruritus in the dog. *Companion animal*, **2(18)**: 50-54.
11. Littlewood JD (2003) Investigative and laboratory techniques. In *BSAVA Manual of Small Animal Dermatology*, 2<sup>nd</sup> ed., Foster AP & Foil CS, BSAVA, ISBN 978-0-905-21458-0, pp. 11-19.
12. Nelson RW & Couto CG (2014e) Disorders of the Intestinal Tract. In *Small animal internal medicine*, 5<sup>th</sup> ed., Elsevier, Missouri, ISBN 978-0-323-08682-0, pp.455-491.
13. Greene CE & Decaro N (2012) Canine Viral Enteritis. In *Infectious diseases of the dog and cat*, 4<sup>th</sup> ed., Greene, C. E., Elsevier, USA, ISBN 978-1-455-75470-0, pp. 67-80.
14. Simpson JW (2005) Approach to the investigation of gastrointestinal diseases. In *BSAVA Manual of Canine and Feline Gastroenterology*, 2<sup>nd</sup> ed., Hall EJ, Simpson JW & Williams DA, BSAVA, ISBN 978-0-905-21473-0, pp. 1-12.
15. DeBowes LJ (2005) Disorders of the oral cavity. In *BSAVA Manual of Canine and Feline Gastroenterology*, 2<sup>nd</sup> ed., Hall EJ, Simpson JW & Williams DA, BSAVA, ISBN 978-0-905-21473-0, pp. 122-132.

16. APMVEAC – Associação Portuguesa de Médicos Veterinários Especialistas em Animais de Companhia. Programa de Controlo da Displasia da Anca. Acedido a 31 de maio de 2015. Disponível em: <http://www.apmveac.pt/site/upload/displasia.pdf>.
17. Oliveira P, Arnaldo PS, Araújo M, Ginja M, Sousa AP, Almeida O & Colaço A (2003) Cinco casos clínicos de intoxicação por contacto com a larva *Thaumetopoea pityocampa* em cães. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 98(547): 151-156.
18. Osweiler DG (2011) Chocolate Toxicosis. In *Blackwell's five-minute veterinary consult: Canine and Feline*, 5<sup>th</sup> ed., Tilley LP & Smith FWK, Wiley-Blackwell, ISBN 9780813807638, pp. 240-242.
19. Poppenga RH (2007) Toxicological emergencies. In *BSAVA Manual of Canine and Feline Emergency and Critical Care*, 2<sup>nd</sup> ed. King LG & Boag A, BSAVA, England. ISBN 978-0-905-21499-3, pp. 278-294.
20. Baneth G & Solano-Gallego L (2012) Leishmaniasis. In *Infectious diseases of the dog and cat*, 4<sup>th</sup> ed., Greene CE, Elsevier, USA, ISBN 978-1-455-75470-0, pp. 734-749.
21. Solano-Gallego L, Saz SV, Cardoso L, Esteve LO, Corrales, GM, Fondati A, Giménez MTP, Repiso ML, Freixa, CN, Dantas-Torres F, Otranto D & Pennisi MG (2013) Leishmaniosis – Una revisión actualizada. Servet, Zaragoza, Espanha. ISBN: 978-8-494-13891-1.
22. Maurício IL, Stothard JR & Miles MA (2000) The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today*, 16: 188-189.
23. Taylor MA, Coop RL & Wall RL (2010) Parasitologia Veterinária. 3<sup>a</sup> ed., Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, SBNIGRI, pp. 37-38 e 633-634.
24. Killick-Kendrick R (1999) The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, 17: 279-289.
25. Sharma U & Singh S (2008) Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *Journal of Vector Borne Diseases*, 45: 255-272.
26. ONLEISH – Observatório nacional das leishmanioses. Acedido a 31 de maio de 2015. Disponível em: <http://www.onleish.org/index.php?article=25&visual=3>.
27. Ready PD (2010) Leishmaniasis emergence in Europe. *Eurosurveillance*, 15: 19505.
28. Diptera Gallery, Photo Albums, Psychodidae, Phlebotomus perniciosus. Acedido a 22 de abril de 2015. Disponível em: [http://www.diptera.info/photogallery.php?photo\\_id=4790](http://www.diptera.info/photogallery.php?photo_id=4790).
29. Solano-Gallego L, Houtinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Ollia G & Baneth G (2009) Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary parasitology*, 165: 1-18.
30. Killick-Kendrick R & Rioux JA (2002) Mark-release-recapture of sand flies fed on leishmanial dogs: the natural life cycle of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus ariasi*. *Parassitologia*, 44: 67-71.
31. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN & Gradoni L (2013) Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27: 123-147.

32. Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Olivia G & Baneth G (2011) LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, **4**: 86.
33. Bryceson, ADM (1996) Leishmaniasis, In *Manson's tropical diseases*, Cook GC, WB Saunders, London, ISBN 978-0-702-01764-3, pp. 1213-1245.
34. Freitas E, Melo MN, Costa-Val AP & Michalick MSM (2006) Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology*, **137**: 159-167.
35. Ferreira MGPA, Fattori KR, Souza F & Lima VMF (2009) Potential role of dog in the cycle of *Leishmania* spp. *Veterinary Parasitology*, **165**: 150-154.
36. Diaz-Espineria MM & Slappendel RJ (1997) A case of autochthonous canine leishmaniasis in the Netherlands. *Veterinary Quarterly*, **19**: 69-71.
37. Pangrazio KK, Costa EA, Amarilla SP, Cino AG, Silva TMA, Paixão TA, Costa LF, Dengues EG, Diaz AAR & Santos RL (2009) Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. *Veterinary Parasitology*, **165**: 327-331.
38. Silva SM, Ribeiro VM, Ribeiro RR, Tafuri WL, Melo MN & Michalick MSM (2009b) First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. *Veterinary Parasitology*, **166**: 159-162
39. Silva FL, Oliveira RG, Silva TMA, Xavier MN, Nascimento EF & Santos RL (2009a) Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, **160**: 55-59.
40. Campino L & Maia C (2013) The role of reservoirs: canine leishmaniasis, In *Drug resistance in Leishmania parasites*. Ponte-Sucre A, Díaz E & Padrón-Nieves M, Springer-Verlag, Vienna, ISBN 978-3-7091-1125-3, pp. 45-64.
41. Ashford RW (2000) The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonosis. *International Journal of Parasitology*, **30**: 1269-1281.
42. Quinnell RJ & Courtenay O (2009) Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, **16**: 1-20.
43. Molina R, Jiménez MI, Cruz I, Iriso A, Marín-Martín I, Sevillano O, Melero S & Bernal J (2012) The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Veterinary Parasitology*, **190**: 268-271.
44. Sobrino R, Ferroglio E, Oleaga A, Romano A, Millan J, Revilla M, Arnal MC, Trisciuglio A & Gortázar C (2008) Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Veterinary Parasitology*, **155**: 198-203.
45. Solano-Gallego L & Baneth G (2008) Canine leishmaniasis – a challenging zoonosis. *European Journal of Companion Animal Practice*, **18**: 232-241.
46. Moreno J & Alvar J (2002) Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, **18**: 399-405.

47. Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J & Ferrer L (2001) Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**: 560-563.
48. Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P & Ferrer L (2008) Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. doi:10.1016/j.pt.2008.04.001.
49. Miró G, Montoya A, Roura X, Gálvez R & Sainz A (2013) Seropositivity rates for agents of canine vector-borne diseases in Spain: a multicenter study. *Parasites & Vectors*, **6**: 117.
50. Marty P, Izri A, Ozon C, Haas P & Rosenthal E (2007) A century of leishmaniasis in Alpes-Maritimes, France. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **101**: 563-574.
51. Athanasiou LV, Kontos VI, Saridomichelakis MN, Rallis TS & Diakou A (2012) A cross-sectorial sero-epidemiological study of canine leishmaniasis in Greek mainland. *Acta Tropica*, **122**: 291-295.
52. Zaffaroni E, Rubaudo L, Lanfranchi P & Mignone W (1999) Epidemiological patterns of canine leishmaniosis in western Liguria (Italy). *Veterinary Parasitology*, **81**:11-19.
53. Cortes S, Vaz Y, Neves R, Maia C, Cardoso L & Campino L (2012) Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Veterinary Parasitology*, **189**: 189-196.
54. Gálvez R, Miró G, Descalzo MA, Nieto J, Dado D, Matín O, Cubero E & Molina R (2010) Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). *Veterinary Parasitology*, **169**: 327-334.
55. Belo VS, Struchiner CJ, Werneck GL, Barbosa DS, Oliveira RB, Neto RGT & Silva ES (2013) A systematic review and meta-analysis of the factors associated with *Leishmania infantum* infection in Brazil. *Veterinary Parasitology*, **195**: 1-13.
56. Miranda S, Roura X, Picado A, Ferrer L & Ramis A (2008) Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dog. *Research in Veterinary Science*, **85**: 35-38.
57. Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J & Neto J (2004) Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, **57**: 1-88.
58. França-Silva JC, da Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GLL, Costa CA, Mayrink W, Vieira EP, Costa JS, Genaro O & Nascimento E (2003) Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, **111**: 161-173.
59. Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J & Ferrer L (2000) The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology*, **90**: 37-45.
60. Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Garcia MJ, Peribáñez MA, Alvar J & Castillo JA (2000) Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. *Research in Veterinary Science*, **69**: 249-253.

61. Courtenay O, Quinell RJ, Garcez LM, Shaw JJ & Dye C (2002) Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *Journal of Infectious Diseases*, **186**: 1314-1320.
62. Costa-Val AP, Cavalcanti RR, Gontijo NDF, Michalick MSM, Alexander B, Williams P & Melo MN (2007) Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *The Veterinary Journal*, **174**: 636-643.
63. Michalsky EM, Rocha MF, Lima ACVR, França-Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, Pacheco RS, Santos SL, Barata RA, Romanha ÁJ, Fortes-Dias CL & Dias ES (2007) Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Veterinary Parasitology*, **147**: 67-76.
64. Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Marques MJ, Giunchetti RC, Mayrink W, Guerra LL, Andrade RA, Corrêa-Oliveira R & Martins-Filho OA (2006a) Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **112**: 102-116.
65. Manna L, Reale S, Vitale F & Gravino AE (2009) Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Research in Veterinary Science*, **87**: 76-78.
66. Ikeda-Gracia FA, Lopes RS, Marques FJ, Lima VMF, Morinishi CK, Bonello FL, Zanette MF, Perri SHV & Feitosa MM (2007) Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Veterinary Parasitology*, **143**: 254-259.
67. Ribeiro RR, Moura EP, Pimentel VM, Sampaio WM, Silva SM, Schettini DA, Alves CF, Melo FA, Tafuri WL, Demicheli C, Melo MN, Frézard F & Michalick SM (2008) Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **52**: 2564-2572.
68. Mencke N (2011) The importance of canine leishmaniasis in non-endemic areas, with special emphasis on the situation in Germany. *Berliner and Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, **124**: 434-442.
69. Cardoso L, Rodrigues M, Santos H, Schoone GJ, Carreta P, Varejão E, Benthem B, Afonso MO, Alves-Pires C, Semião-Santos SJ, Rodrigues J & Schallig HDFH (2004) Seroepidemiological study of canine *Leishmania* spp. infection in the municipality of Alijó (Alto Douro, Portugal). *Veterinary Parasitology*, **121**: 21-32.
70. Dereure J, Vanwambeke SO, Malé P, Martínez S, Pratlong F, Balard Y & Dedet JP (2009) The potential effects of global warming on changes in canine leishmaniasis in a focus outside the classical area of the disease in southern France. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, **9**: 687-694

71. Miró G, Checa R, Montoya A, Hernández L, Dado D & Gálvez R (2012) Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain. *Parasites & Vectors*, **5**: 60.
72. Ballart C, Alcover MM, Portus M & Gallego M (2011) Is leishmaniasis widespread in Spain? First data on canine leishmaniasis in the province of Lleida, Catalonia, northeast Spain. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **106**: 134-136.
73. Cenderello G, Pasa A, Dusi A, Dentone C, Toscanini F, Bobbio N, Bondi E, Bono V, Izzo M, Riccio G, Anselmo M, Giacchino R, Marazzi MG, Pagano G, Cassola G, Viscoli C, Ferrea G & Maria A (2013) Varied spectrum of clinical presentation and mortality in a prospective registry of visceral leishmaniasis in a low endemicity area of Northern Italy. *BMC Infectious Diseases*, **13**: 248.
74. Dantas-Torres F, Solano-Gallego L, Baneth G, Ribeiro VM, Paiva-Cavalcanti M & Otranto D (2012) Canine leishmaniasis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends in Parasitology*, **28**: 531-538.
75. Amusatogui I, Sainz A, Aguirre E & Tesouro MA (2004) Seroprevalence of *Leishmania infantum* in northwestern Spain, an area traditionally considered free of leishmaniasis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1026**: 154-157.
76. Maroli M, Rossi L, Baldelli R, Capelli D, Ferroglio E, Genchi C, Gramiccia M, Mortarino M, Pietrobelli M & Gradoni L (2008) The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Tropical Medicine & International Health*, **13**: 256-264.
77. Biglino A, Bolla C, Concialdi E, Trisciuglio A, Romano A & Ferroglio E (2010) Asymptomatic *Leishmania infantum* infection in an area of northwestern Italy (Piemont region) where such infections are traditionally nonendemic. *Journal of Clinical Microbiology*, **48**: 131-136.
78. Day MJ (2011) The immunopathology of canine vector-borne diseases. *Parasites & Vectors*, **4**: 48.
79. Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Pinelli E, Del Real G, Molina R, Vitutia MM, Cañavate MC & Nieto J (1994) A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with *Leishmania infantum* promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies. *Parasite*, **1**: 311-318.
80. Pinelli E, Gonzalo RM, Boog CJP, Rutten VPM, Gebhard D, Del Real G & Ruitenberg EJ (1995) *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. *European Journal of Immunology*, **25**: 1594-1600.
81. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Boer MD, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Horst RT, López-Vélez R & Moreno J (2008) The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical Microbiology Reviews*, **21**: 334-359.
82. Liu D & Uzonna JE (2012) The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. doi: 10.3389/fcimb.2012.00083.

83. Holzmuller P, Bras-Gonçalves R & Lemesre JL (2006) Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. *Parasitology*, **132** Suppl: S19-32.
84. Zafra R, Jaber JR, Pérez-Ecija RA, Barragán A, Martínez-Moreno A & Pérez J (2008) High iNOS expression in macrophages in canine leishmaniasis is associated with low intracellular parasite burden. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **123**: 353-359.
85. Sousa LMA, Carneiro MBH, Resende ME, Martins LS, dos Santos LM, Vaz LG, Mello PS, Mosser DM, Oliveira MAP & Vieira LQ (2014) Neutrophils have a protective role during early stages of *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. *Parasite Immunology*, **36(1)**: 13-31.
86. Almeida BFM, Narciso LG, Bosco AM, Pereira PP, Braga ET, Avanço SV, Marcondes M & Ciarlina PC (2013) Neutrophil dysfunction varies with the stage of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, **196**: 6-12.
87. Sacks D & Sher A (2002) Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nature Immunology*, **3**: 1041-1047.
88. Tisard IR (2004) T helper cells and their response to antigen & T-cell function and the destruction of cell-associated invaders. In *Veterinary immunology: An Introduction*. 7<sup>th</sup> ed., Saunders, EUA. ISBN, pp. 105-116, 198-208.
89. Brandonisio O, Panunzio M, Faliero SM, Ceci L, Fasanella A & Puccini V (1996) Evaluation of polymorphonuclear cell and monocyte functions in *Leishmania infantum*-infected dogs. *Veterinary Immunology Immunopathology*, **53**: 95-103
90. Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, Tafuri WL & Corrêa-Oliveira R (2009) Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology Immunopathology*, **128**: 87-95.
91. Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Guerra LL, Carvalho MG, Mayrink W, Genaro O, Corrêa-Oliveira R & Martins-Filho OA (2006b) Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clinical and Experimental Immunology*, **146**: 303-311.
92. Altet L, Francino O, Solano-Gallego L, Renier C & Sánchez A (2002) Mapping and sequencing of the canine NRAMP1 gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. *Infection and Immunity*, **70**: 2763-2771.
93. Sanchez-Robert E, Altet L, Utzet-Sadurni M, Giger U, Sanchez A & Francino O (2008) *Slc11a1* (formerly *Nramp1*) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. doi: 10.1051/vetres:2008013.
94. Solano-Gallego L, Fernández-Bellón H, Morell P, Fondevila D, Alberola J, Ramis A & Ferrer L (2004) Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin in *Leishmania infantum*-infected dogs. *Journal of Comparative Pathology*, **130**: 7-12.

95. Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho AO, Marques MJ, Tafuri WL & Reis AB (2006) Relationship between Canine Visceral Leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *Journal of Comparative Pathology*, **135**: 100-107.
96. Peña MT, Naranjo C, Klauss G, Fondevila D, Leiva M, Roura X, Davidson MG & Dubielzig RR (2008) Histopathological features of ocular leishmaniosis in the dog. *Journal of Comparative Pathology*, **138**: 32-39.
97. Peña MT, Roura X & Davidson MG (2000) Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993–1998). *Veterinary Ophthalmology*, **3**: 35-41.
98. Naranjo C, Fondevila D, Leiva M, Roura X & Pena T (2005) Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, **133**: 37–47.
99. Paciello O, Oliva G, Gradoni L, Manna L, Foglia Manzillo V, Wojcik S, Trapani F & Papparella S (2009) Canine inflammatory myopathy associated with *Leishmania infantum* infection. *Neuromuscular Disorders*, **19**:124-130.
100. Vamvakidis CD, Koutinas AF, Kanakoudis G, Georgiadis G & Saridomichelakis M (2000) Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Veterinary Record*, **146**: 698-703.
101. Ciaramella P, Pelagalli A, Cortese L, Pero ME, Corona M, Lombardi P, Avallone L & Persechino (2005) Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *The Veterinary Journal*, **169**: 465-467.
102. Petanides TA, Koutinas AF, Mylonakis ME, Day MJ, Saridomichelakis MN, Leontides LS, Mischke R, Diniz P, Breitschwerdt EB, Kritsepi M, Garipidou VA, Koutinas CK & Lekkas S (2008) Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **22**: 866-872.
103. Costa FA, Goto H, Saldanha LC, Silva, SM, Sinhorini IL, Silva TC & Guerra JL (2003) Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Pathology*, **40**: 677–684.
104. Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A & Plevraki KG (1999) Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989–1996). *Journal of the American Animal Hospital Association*, **35**: 376–383.
105. Noli C & Saridomichelakis MN (2014) An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *The Veterinary Journal*, **202**: 425-435.
106. Nelson RW & Couto CG (2014f) Hyperproteinemia. In *Small animal internal medicine*, 5<sup>th</sup> ed., Elsevier, Missouri, pp.1276-1278.

107. Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides LS, Koutinas AF, Billinis C & Kontos VI (2005) Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **73**: 82-86.
108. Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G & Baneth G (2008) Canine leishmaniasis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology*, **8**: 371-377.
109. Dantas-Torres F (2008) Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasites & Vectors*, **1**:25.
110. Gramiccia M (2011) Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*, **181**: 23-30.
111. Mettler, M, Grimm F, Capelli G, Camp H & Deplazes P (2005) Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescence-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infection in dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, **43**: 5515–5519.
112. Solano-Gallego L, Villanueva-Saz S, Carbonell M, Trotta M, Furlanello T & Natale A (2014) Serological diagnosis of canine leishmaniasis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan, ID Screen and *Leishmania* 96), a rapid test (Speed Leish K) and an in-house IFAT. *Parasites & Vectors*, **7**: 111.
113. Ferreira EC, Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES, Schalling H & Gontijo CMF (2007) Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Veterinary Parasitology*, **146**: 235-241.
114. ESTEVE Veterinária – LEISCAN®, Acedido a 31 de maio de 2015. Disponível em: <http://www.esteve.es/EsteveArchivos/consultasonline/leispro/es/leiscan.pdf>
115. Rodríguez-Cortés A, Ojeda A, Todolí F & Alberola J (2012) Performance of commercially available serological diagnostic tests to detect *Leishmania infantum* infection on experimentally infected dogs. *Veterinary Parasitology*, **191**: 363-366.
116. El Harith A, Slappendel RJ, Reiter I, Van Knapen F, de Korte P, Huigen E & Kolk AHJ (1989) Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir. *Journal of Clinical Microbiology*, **27(10)**: 2251-2257.
117. Gómez-Ochoa P, Castillo JA, Lucientes J, Gascón M, Zarate JJ, Arbea JI, Larraga V & Rodriguez C (2003) Modified direct agglutination test for simplified serologic diagnosis of leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **10(5)**: 967-968.
118. Semião-Santos SJ, Veloso LB, de Andrade PP, de Melo MA, Martins LML, Marinho AAM, de Almeida JAA, Campino LMG & el Harith A (2014) Performance of an indigenous  $\beta$ -mercaptoethanol-modified antigen in comparison with a commercial reference in direct agglutination test for detection of canine visceral leishmaniasis. *Journal of Medical Microbiology*, **63**: 106-110.
119. Barral-Veloso L, Semião-Santos SJ, de Andrade PP, de Melo MA, Martins L, Marinho AA, de Almeida JAA, Cardoso L & el Harith A (2013) A  $\beta$ -mercaptoethanol-modified enzyme-linked

- immunosorbent assay for diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. doi: 10.1177/1040638712474818.
120. Maia C & Campino L (2008) Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, **158**: 274-287.
  121. Mancianti F & Meciani N (1988) Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counterimmunoelectrophoresis. *American Journal of Veterinary Research*, **49**: 1409-1411.
  122. Shapiro HM (2003) Using Flow Cytometers: Applications, Extensions, and Alternatives. In *Practical Flow Cytometry*, 4<sup>th</sup> ed. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, U.S.A. ISBN 978-0-471-41125-3, pp. 443-542.
  123. Andrade RA, Reis AB, Gontijo CMF, Braga LB, Rocha RDR, Araújo MSS, Vianna LR, Martins-Filho OA (2007) Clinical value of anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs. *Veterinary Immunology Immunopathology*, **116**: 85–97.
  124. Andrade RA, Araújo MSS, Reis AB, Gontijo CMF, Vianna LR, Mayrink W & Martins-Filho OA (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.
  125. Ferroglio E, Centaro E, Mignone W & Trisciuglio A (2007) Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot. *Veterinary Parasitology*, **144**: 162-166.
  126. Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L & Baneth G (2004) Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *The Journal of Infectious Diseases*, **189**: 1729-1733.
  127. Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP & Bastien P (2002) Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**: 210-215.
  128. Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, Ferrer L, Sánchez A & Roura X (2006) Advances of a real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, **137**: 214-221.
  129. Roura X, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Maroli M, Oliva G, Paltrinieri S, Zateli A & Zini E (2013) Prognosis and monitoring of leishmaniasis in dogs: A working group report. *The Veterinary Journal*, **198**: 43-47.
  130. Noli C & Auxilia ST (2005) Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: A systematic review. *Veterinary Dermatology*, **16**: 213–232.
  131. Papadogiannakis E, Andritsos G, Kontos V, Spanakos G, Koutis C & Velonakis E (2010) Determination of CD4+ and CD8+ T cells in the peripheral blood of dogs with leishmaniosis before and after prolonged allopurinol monotherapy. *The Veterinary Journal*, **186**: 262–263.

132. Miró G, Galvez R, Fraile C, Descalzo MA & Molina R (2011) Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitised with *Leishmania infantum* after different treatments. *Parasites & Vectors*, **4**: 52.
133. Athanasiou LV, Saridomichelakis MN, Kontos VI, Spanakos G & Rallis TS (2013) Treatment of canine leishmaniosis with aminosidine at an optimized dosage regimen: A pilot open clinical trial. *Veterinary Parasitology*, **192**: 91–97.
134. Gómez-Ochoa P, Castillo JA, Gascón M, Zarate JJ, Alvarez F & Couto CG (2009) Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: A clinical trial. *The Veterinary Journal*, **179**: 259-263.
135. Cortese L, Pelagalli A, Piantedosi D, Mastellone V, Di Loria A, Lombardi P, Ciaramella P & Avallone L (2008) The effects of prednisone on haemostasis in leishmaniotic dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *The Veterinary Journal*, **177**: 405-410.
136. Oliva G, Roura X, Crotti A, Maroli M, Castagnaro M, Gradoni L, Lubas G, Paltrinieri S, Zatelli A & Zini E (2010) Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **236**: 1192–1198.
137. Otranto D & Dantas-Torres F (2013) The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2013.05.003>.
138. Alexander B & Maroli M (2003) Control of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, **17**: 1-18.
139. Maroli M, Gradoni L, Oliva G, Castagnaro M, Crotti A, Lubas G, Paltrinieri S, Roura X, Zini E & Zatelli A (2010) Guidelines for prevention of leishmaniasis in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association*, **236**: 1200-1206.
140. Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Dereure J, Puech MP & Cadiergues MC (1997) Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology*, **11**: 105–111.
141. Foglia Manzillo V, Oliva G, Pagano A, Manna L, Maroli M & Gradoni L (2006) Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. *Veterinary Parasitology*, **142**: 142–145.
142. Maroli M, Mizzi V, Siragusa C, D'Orazi A & Gradoni L (2001) Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Medical and Veterinary Entomology*, **15**: 358–363.
143. Reithinger R, Coleman PG, Alexander B, Vieira EP, Assis G & Davies CR (2004) Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? *International Journal of Parasitology*, **34**: 55-62.
144. Molina R, Lohse J-M & Nieto J (2001) Evaluation of a topical solution containing 65% permethrin against the sandfly (*Phlebotomus perniciosus*) in dogs. *Veterinary Therapeutics*, **2**: 261–267.

145. Molina R, Miró G, Gálvez R, Nieto J & Descalzo MA (2006) Evaluation of a spray of permethrin and pyriproxyfen for the protection of dogs against *Phlebotomus perniciosus*. *Veterinary Record*, **159**: 206–209.
146. Otranto D, Paradies P, Lia RP, Lafrota MS, Testini G, Cantacessi C, Mencke N, Galli G, Capelli G & Stanneck D (2007) Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/ 50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennel dogs in an endemic area. *Veterinary Parasitology*, **144**: 270–278.
147. Miró G, Gálvez R, Mateo M, Montoya A, Descalzo MA & Molina R (2007) Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Veterinary Parasitology*, **143**: 375–379.
148. Fernais R, Flochlay-Sigognault A & Milon-Harnois G (2014) Anti-feeding efficacy of Activyl® Tick Plus topical treatment of dogs against *Phlebotomus perniciosus*. *Parasites & Vectors*, **7**: 217.
149. Otranto D, Dantas-Torres F, Caprarlis D, Di Paola G, Tarallo V, Latrofa MS, Lia RP, Annoscia G, Breltschwerdt EB, Cantacessi C, Capelli G & Stanneck D (2013) Prevention of canine leishmaniasis in a hyper-endemic area using a combination of 10% imidacloprid/ 4,5% flumethrin. doi: 10.1371/journal.pone.0056374.
150. Brianti E, Gaglio G, Napoli E, Falsone L, Prudente C, Basano FS, Latrofa MS, Tarallo VD, Dantas-Torres F, Capelli G, Stanneck D, Giannetto S & Otranto D (2014) Efficacy of a slow-release imidacloprid (10%)/ flumethrin (4,5%) collar for the prevention of canine leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, **7**: 327.
151. Gradoni L (2015) Canine *Leishmania* vaccines: Still a long way to go. *Veterinary Parasitology*, **208**: 94-100.
152. Poot J, Janssen LH, van Kasteren-Westerneng TJ, van der Heijden-Liefkens KH, Schijns VE & Heckerroth A (2009) Vaccination of dogs with six different candidate leishmaniasis vaccines composed of a chimerical recombinant protein containing ribosomal and histone protein epitopes in combination with different adjuvants. *Vaccine*, **27**: 4439-4446.
153. Moreno J, Vouldoukis I, Martin V, McGahie D, Cuisinier AM & Gueguen S (2011) Use of a LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **6**: e1683.
154. Martin V, Vouldoukis I, Moreno J, McGahie D, Gueguen S & Cuisinier AM (2014) The protective immune response produced in dogs after primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish®) remains effective against an experimental challenge one year later. *Veterinary Research*, **45**: 69.
155. Oliva G, Nieto J, Foglia Manzillo V, Cappiello S, Fiorentino E, Di Muccio T, Scalone A, Moreno J, Chicharro C, Carrillo E, Butaud T, Guegant L, Martin V, Cuisinier AM, McGahie D, Gueguen S, Cañavate C & Gradoni L (2014) A randomised, double-blind, controlled efficacy trial of the LiESP/QA-21 vaccine in naïve dogs exposed to two *Leishmania infantum* transmission seasons. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **8**: e3213.

156. Bongiorno G, Paparcone R, Foglia Manzillo V, Oliva G, Cuisinier AM & Gradoni L (2013) Vaccination with LiESP/QA-21 (CaniLeish®) reduces the intensity of infection in *Phlebotomus perniciosus* fed on *Leishmania infantum* infected dogs – a preliminary xenodiagnosis study. *Veterinary Parasitology*, **197**: 691-695.
157. EMA - European Medicines Agency (2011) EPAR summary for the public – CaniLeish. Acedido a um de maio de 2015. Disponível em: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/veterinary/002232/WC500104955.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/veterinary/002232/WC500104955.pdf)
158. Gómez-Ochoa P, Sabate D, Homedes J & Ferrer L (2012) Use of the nitroblue tetrazolium reduction test for the evaluation of domperidone effects on the neutrophilic function of healthy dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **146**: 97–99.
159. Sabaté D, Llinás J, Homedes J, Sust M & Ferrer L (2014) A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. *Preventive Veterinary Medicine*, **115**: 56-63.
160. DGAV - Direção Geral de Alimentação e Veterinária (2012) Resumo das características do medicamento – Leisguard 5 mg/ml, suspensão oral para cães. *Ministério da Agricultura, Mar, Ambiente e Ornamento do Território*.
161. Cortes S, Afonso MO, Alves-Pires C & Campino L (2007) Stray dogs and leishmaniasis in urban areas, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 13, No. 9, pp. 1431-1432.
162. Zivicnjak T, Martinković F, Marinculić A, Mrljak V, Kucer N, Matijatko V, Mihaljević Z & Barić-Rafaj R (2005) A seroepidemiologic survey of canine visceral leishmaniasis among apparently healthy dogs in Croatia. *Veterinary Parasitology*, **15**: 35-43.
163. Moreira-Junior ED, de Souza VM, Sreenivasan M, Lopes NL, Barreto RB, de Carvalho LP (2003) Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **69**: 393-397.
164. EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare) (2015) Scientific Opinion on canine leishmaniasis. *EFSA Journal* 2015, 13(4): 4075, 76pp. doi:10.2903/f.efs.2015.4075.
165. Ciaramella P, Oliva G, De Luna R, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A & Persechino A (1997) A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record*, **141**: 539–543.
166. Tvedten H & Raskin RE (2012) Leukocyte Disorders. In: *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*, 5<sup>th</sup> ed., Willard MD & Tvedten H, Elsevier, USA, pp. 63-91.
167. Rallis T, Day MJ, Saridomichelakis MN, Adamama-Moraitou KK, Papazoglou L, Fytianou A & Koutinas AF (2005) Chronic hepatitis associated with canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. *Journal of Comparative Pathology*, **132**: 145-152.

168. Slappendel RJ (1988) Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. *Veterinary Quarterly*, **10**: 1-16.
169. Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, França-Silva JC, Giunchetti RC, Genaro O & Corrêa-Oliveira R (2006) Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*, **81**: 68-75.
170. Gama ROG, Larangeira DF, Aguiar PHP & Barrouin-Melo SM (2009) Ultrasound evaluation of the kidneys of dogs with visceral leishmaniasis. *Proceedings of the 34<sup>th</sup> World Small Animal Veterinary Congress*, São Paulo, Brazil.
171. Nelson RW & Couto CG (2014) Glomerular Disease. In *Small animal internal medicine*, Fifth edition. Elsevier Inc., Missouri, pp. 653-662.
172. Saridomichelakis MN (2009) Advances in the pathogenesis of canine leishmaniasis: epidemiologic and diagnostic implications. *Veterinary Dermatology*, **20**: 417-489.
173. Bourdeau P, Saridomichelakis MN, Oliveira A, Oliva G, Kotnik T, Gálvez R, Manzillo VF, Koutinas AF, Pereira da Fonseca I & Miró G (2014) Management of canine leishmaniasis in endemic SW European regions: a questionnaire-based multinational survey. *Parasites & Vectors*, **7**: 110.

## VI. Anexos

### 1. Formulário Epi Info® para preenchimento de dados dos pacientes do VetOeiras que realizaram testes de diagnóstico de leishmaniose canina, entre maio de 2011 e fevereiro de 2015.

Data do último contacto com o paciente

#### Caracterização do animal

Nome do proprietário

Nome do animal  Data de nascimento  Idade aquando último contacto

Sexo  Raça  Porte  Comprimento do pelo

Ambiente em que vive predominantemente  Ambiente em que passa a noite

Proprietário tem ou já teve outros animais com leishmaniose diagnosticada

Com infeção por Leishmania diagnosticada      Número de anos com leishmaniose diagnosticada   
 Sem infeção por Leishmania diagnosticada

#### Profilaxia contra leishmaniose

*Profilaxia realizada antes da realização de testes de diagnóstico de infeção por Leishmania infantum*

Coleira de deltametrina (Scalibor)       Nenhuma  
 Coleira de imidaclopride + flumetrina (Seresto)       Sem informação acerca de profilaxia contra vetor  
 Repelente Spot-on de permetrina (Pulvex spot, Defendog)       Sem informação  
 Repelente Spot-on de permetrina + Piriproxifeno (Vectra 3D)       Outro  
 Repelente Spot-on de permetrina + imidaclopride (Advantix)      Qual?  
 Repelente Spot-on de permetrina + Firponil (Effitix)        
 Repelente Spot-on de permetrina + indoxacarb (Activyl tick plus)  
 Vacina (Canileish)  
 Domperidona (Leisguard)

No caso de utilização de coleira ou spot-on, qual a periodicidade de aplicação?

Periodicidade de substituição de coleira  meses      Periodicidade de aplicação de pipetas spot-on  dias  
 Periodicidade desconhecida       Periodicidade Desconhecida  
 Aplicação apenas sazonal       Aplicação apenas sazonal

#### Em caso de óbito

Morte natural       Óbito por eutanásia

Data de óbito

Idade aquando óbito

Nº de anos com Leishmaniose diagnosticada       Nº meses com Leishmaniose diagnosticada

**Figura 9.** Página 1 do formulário Epi Info® elaborado para preenchimento de dados dos pacientes do VetOeiras que realizaram testes de diagnóstico de LC, entre maio de 2011 e fevereiro de 2015.

## Vacinação

Animal recebeu vacinação com CaniLeish?

Se vacinado, ocorreu algum tipo de reação adversa após vacinação?

### Momentos em que ocorreram reações adversas:

- 1ª dose de Primovacinação
- 2ª dose de Primovacinação
- 3ª dose de Primovacinação
- Reforço anual

### Reações adversas observadas após vacinação:

Reação local

- Edema
- Nódulo
- Dor à palpação
- Eritema
- Outra  
Qual?

Reação sistêmica

- Hipertermia
- Apatia
- Distúrbios Gastrointestinais
- Angioedema
- Reação anafilática
- Outra  
Qual?

Reações adversas ocorreram em mais do que um período pós vacinal de CaniLeish?

Reações adversas foram impeditivas da continuação de realização deste tipo de profilaxia?

## Diagnóstico de Leishmaniose

Sem informação acerca do diagnóstico

Data do diagnóstico positivo

Data do diagnóstico negativo

Idade ao diagnóstico positivo

Idade ao diagnóstico negativo

Motivo de testagem

Resultado do teste de diagnóstico

Método de diagnóstico

Sintomatologia

### Manifestações clínicas no momento do diagnóstico

#### Gerais

- Linfadenomegália generalizada
- Linfadenomegália regional
- Perda de peso/ Condição Corporal
- Anorexia/ perda de apetite
- Letargia/ Prostração
- Polifagia
- Mucosas pálidas
- Polúria e Polidipsia
- Esplenomegália
- Febre
- Vômito
- Diarreia
- Melena
- Hematoquésia
- Tosse
- Epistaxis
- Claudicação/ Dificuldades locomotoras
- Atrofia dos músculos mastigadores
- Desordens vasculares
- Alterações neurológicas
- Outras  
Quais?

#### Dermatológicas

##### Lesões dermatológicas

- Dermate descamativa não pruriginosa
- Dermate ulcerativa de proeminências ósseas
- Dermate papular
- Onicogrifose
- Onicorrexia
- Dermate do plano nasal
- Dermate ulcerativa mucocutânea
- Dermite ulcerativas nas extremidades corporais
- Alopecia
- Dermate nodular cutânea e/ou mucocutânea
- Dermate pustular
- Dermate descamativa nasodigital
- Indeterminadas
- Outras  
Quais?

#### Oftalmológicas

##### Lesões oftalmológicas

- Blefarite (descamativa, ulcerativa ou nodular)
- Conjuntivite
- Queratoconjuntivite
- Uveíte anterior
- Endoftalmite
- Indeterminadas
- Outras  
Quais?

#### Alterações laboratoriais

- Aumento das PT
- Hiperglobulinemia
- Hipoalbuminemia
- Redução do coeficiente albumina/globulinas
- Anemia regenerativa
- Anemia não regenerativa
- Leucocitose
- Leucopénia
- Neutrofilia
- Neutropénia
- Linfocitose
- Linfopénia
- Trombocitopénia
- Proteinúria
- Aumento da Urea sérica
- Aumento da creatinina sérica
- Aumento de enzimas hepáticas
- Ausentes
- Resultados indisponíveis
- Hemograma não realizado
- Análises bioquímicas não realizadas
- Outras  
Quais?

Figura 10. Página 2 do formulário Epi Info® elaborado para preenchimento de dados dos pacientes do VetOeiras que realizaram testes de diagnóstico de LC, entre maio de 2011 e fevereiro de 2015.

Figura 11. Página 3 do formulário Epi Info® elaborado para preenchimento de dados dos pacientes do VetOeiras que realizaram testes de diagnóstico de LC, entre maio de 2011 e fevereiro de 2015.

**Diagnóstico de Leishmaniose (cont.)**

Titulação de Anticorpos Anti-Leishmania  Razão

Estadiamento Clínico  Tratamento iniciado  No caso de outro, qual?

Corticoterapia  
 Terapia sintomática

**Outros testes de diagnóstico realizados**

Teste de diagnóstico  Resultado

Teste de diagnóstico  Resultado

**Profilaxia após diagnóstico positivo**

Coleira de deltametrina (Scalibor)  Nenhuma  
 Coleira de imidaclopride + flumetrina (Seresto)  Sem informação  
 Repelente Spot-on de permetrina (Pulvex spot, Defendog)  Outro Qual?   
 Repelente Spot-on de permetrina + Piriproxifeno (Vectra 3D)  
 Repelente Spot-on de permetrina + imidaclopride (Advantix)  
 Repelente Spot-on de permetrina + Firponil (Effitix)  
 Repelente Spot-on de permetrina + indoxacarb (Activyl tick plus)

No caso de utilização de coleira ou spot-on, qual a periodicidade de aplicação?

Periodicidade de substituição de coleira  meses  Periodicidade de aplicação de pipetas spot-on  dias  
 Periodicidade desconhecida  Aplicação apenas sazonal  
 Aplicação apenas sazonal

**Profilaxia após diagnóstico negativo**

Coleira de deltametrina (Scalibor)  Nenhuma  
 Coleira de imidaclopride + flumetrina (Seresto)  Sem informação acerca de profilaxia contra vetor  
 Repelente Spot-on de permetrina (Pulvex spot, Defendog)  Sem informação  
 Repelente Spot-on de permetrina + Piriproxifeno (Vectra 3D)  Outro Qual?   
 Repelente Spot-on de permetrina + imidaclopride (Advantix)  
 Repelente Spot-on de permetrina + Firponil (Effitix)  
 Repelente Spot-on de permetrina + indoxacarb (Activyl tick plus)  
 Vacina (Canileish)  
 Domperidona (Leisguard)

No caso de utilização de coleira ou spot-on, qual a periodicidade de aplicação?

Periodicidade de substituição de coleira  meses  Periodicidade de aplicação de pipetas spot-on  dias  
 Periodicidade desconhecida  Aplicação apenas sazonal  
 Aplicação apenas sazonal

**Manifestações clínicas e alterações laboratoriais no decorrer da doença**

Sintomatologia

**Manifestações clínicas**

**Gerais**

Linfadenomegália generalizada  Esplenomegália  Claudicação/Dificuldades locomotoras  
 Linfadenomegália regional  Febre  Atrofia dos músculos mastigadores  
 Perda de peso/ Condição Corporal  Vômito  Desordens vasculares  
 Anorexia/ perda de apetite  Diarreia  Alterações neurológicas  
 Letargia/ Prostração  Melena  Outras  
 Polifagia  Hematoquêsia  Quais?  
 Mucosas pálidas  Tosse  
 Poliúria e Polidipsia  Epistaxis

**Dermatológicas**

Lesões dermatológicas

Dermatite descamativa não pruriginosa  Dermatites ulcerativas nas extremidades corporais  
 Dermatite ulcerativa de proeminências ósseas  Alopecia  
 Dermatite papular  Dermatite nodular cutânea e/ou mucocutânea  
 Onicogribose  Dermatite pustular  
 Onicorrexia  Dermatite descamativa nasodigital  
 Dermatite do plano nasal  Indeterminadas  
 Dermatite ulcerativa mucocutânea  Outras Quais?

**Oftalmológicas**

Lesões oftalmológicas

Blefarite (descamativa, ulcerativa ou nodular)  Uveíte anterior  
 Conjuntivite  Endoftalmite  
 Queratoconjuntivite  Indeterminadas  
 Outras Quais?

**Alterações laboratoriais**

Aumento das PT  Trombocitopénia  
 Hiperglobulinémia  Proteinúria  
 Hipoalbuminémia  Aumento da Ureia Sérica  
 Redução do coeficiente albumina/globulinas  Aumento da creatinina sérica  
 Anemia regenerativa  Aumento de enzimas hepáticas  
 Anemia não regenerativa  Ausentes  
 Leucocitose  Resultados indisponíveis  
 Leucopénia  Hemograma não realizado  
 Neutrofilia  Análises bioquímicas não realizadas  
 Neutropénia  Outras  
 Linfocitose  Quais?  
 Linfopénia

**Figura 12.** Página 4 do formulário Epi Info® elaborado para preenchimento de dados dos pacientes do VetOeiras que realizaram testes de diagnóstico de LC, entre maio de 2011 e fevereiro de 2015.

**Figura 13.** Página 5 do formulário Epi Info® elaborado para preenchimento de dados dos pacientes do VetOeiras que realizaram testes de diagnóstico de LC, entre maio de 2011 e fevereiro de 2015.

**Complicações**

Insuficiência Renal Crônica      Estadiamento IRIS

Hepatopatia

Dermatites extensas

Outras

Quais?

**Doenças concomitantes diagnosticadas**

Infecção por outros hemoparasitas

Diabetes mellitus

Epilepsia

Doença de Cushing

Doença de Addison

Displasia de anca

Displasia de cotovelo

Outras      Quais?

**Figura 14.** Página 6 do formulário Epi Info® elaborado para preenchimento de dados dos pacientes do VetOeiras que realizaram testes de diagnóstico de LC, entre maio de 2011 e fevereiro de 2015.

**Monitorização da doença**

**1ª Monitorização**

Data da monitorização       Mês após diagnóstico       Idade

Titulação de anticorpos anti-Leishmania       Razão       Evolução do título de anticorpos

Evolução de sinais clínicos       Estadiamento Clínico       Novo Ciclo de tratamento iniciado       No caso de outro, qual?

Sintomatologia

Corticoterapia     Terapia sintomática

**Manifestações clínicas**

**Gerais**

<input type="checkbox"/> Linfadenomegália generalizada	<input type="checkbox"/> Esplenomegália	<input type="checkbox"/> Claudicação/ Dificuldades locomotoras
<input type="checkbox"/> Linfadenomegália regional	<input type="checkbox"/> Febre	<input type="checkbox"/> Atrofia dos músculos mastigadores
<input type="checkbox"/> Perda de peso/Condição corporal	<input type="checkbox"/> Vômito	<input type="checkbox"/> Desordens vasculares
<input type="checkbox"/> Anorexia/ Perda de apetite	<input type="checkbox"/> Diarreia	<input type="checkbox"/> Alterações neurológicas
<input type="checkbox"/> Polifagia	<input type="checkbox"/> Melena	<input type="checkbox"/> Outras
<input type="checkbox"/> Letargia/ Prostração	<input type="checkbox"/> Hematoquêsia	Quais? <input type="text"/>
<input type="checkbox"/> Mucosas pálidas	<input type="checkbox"/> Tosse	
<input type="checkbox"/> Poliúria e Polidipsia	<input type="checkbox"/> Epistaxis	

**Dermatológicas**

Lesões dermatológicas

<input type="checkbox"/> Dermate descamativa não pruriginosa	<input type="checkbox"/> Dermate ulcerativas nas extremidades corporais
<input type="checkbox"/> Dermate ulcerativa de proeminências ósseas	<input type="checkbox"/> Alopecia
<input type="checkbox"/> Dermate papular	<input type="checkbox"/> Dermate nodular cutânea e/ou mucocutânea
<input type="checkbox"/> Onicogribose	<input type="checkbox"/> Dermate pustular
<input type="checkbox"/> Onicorrexia	<input type="checkbox"/> Dermate descamativa nasodigital
<input type="checkbox"/> Dermate do plano nasal	<input type="checkbox"/> Indeterminadas
<input type="checkbox"/> Dermate ulcerativa mucocutânea	<input type="checkbox"/> Outras
	Quais? <input type="text"/>

**Oftalmológicas**

Lesões oftalmológicas

<input type="checkbox"/> Blefarite (descamativa, ulcerativa ou nodular)	<input type="checkbox"/> Uveíte anterior
<input type="checkbox"/> Conjuntivite	<input type="checkbox"/> Endoftalmite
<input type="checkbox"/> Queratoconjuntivite	<input type="checkbox"/> Indeterminadas
	<input type="checkbox"/> Outras
	Quais? <input type="text"/>

**Alterações laboratoriais**

<input type="checkbox"/> Aumento das PT	<input type="checkbox"/> Linfopenia	<input type="checkbox"/> Outras
<input type="checkbox"/> Hiperglobulinemia	<input type="checkbox"/> Trombocitopenia	Quais? <input type="text"/>
<input type="checkbox"/> Hipoalbuminemia	<input type="checkbox"/> Proteinuria	
<input type="checkbox"/> Redução do coeficiente albumina/globulinas	<input type="checkbox"/> Aumento da Ureia Sérica	
<input type="checkbox"/> Anemia regenerativa	<input type="checkbox"/> Aumento da creatinina sérica	
<input type="checkbox"/> Anemia não regenerativa	<input type="checkbox"/> Aumento de enzimas hepáticas	
<input type="checkbox"/> Leucocitose	<input type="checkbox"/> Ausentes	
<input type="checkbox"/> Leucopenia	<input type="checkbox"/> Resultados indisponíveis	
<input type="checkbox"/> Neutrofilia	<input type="checkbox"/> Hemograma não realizado	
<input type="checkbox"/> Neutropenia	<input type="checkbox"/> Análises bioquímicas não realizadas	
<input type="checkbox"/> Linfocitose		

**Figura 15.** Página 7 do formulário Epi Info® elaborado para preenchimento de dados dos pacientes do VetOeiras que realizaram testes de diagnóstico de LC, entre maio de 2011 e fevereiro de 2015. Após esta página, seguiram-se páginas semelhantes para recolha de informação relativa às monitorizações seguintes.

**2. Resultados obtidos do estudo retrospectivo de dados de pacientes do VetOeiras que realizaram testes de diagnóstico de leishmaniose canina, entre maio de 2011 e fevereiro de 2015.**

**Tabela 37.** Fi e fr (%) de raças de animais avaliados, no total de animais e no grupo de animais com diagnóstico positivo de infecção por *Leishmania infantum*, e percentagem de animais infetados entre animais da mesma raça avaliados.

Raça	Total de animais analisados		Animais com diagnóstico de infecção por <i>Leishmania infantum</i>		% Infecção em animais da mesma raça
	Fi	fr (%)	Fi	fr (%) no total de animais infetados	
Indeterminada	62	32,98	15	26,79	24,19
Labrador retriever	21	11,17	7	12,50	33,33
Boxer	8	4,26	3	5,36	37,50
Dogue alemão	6	3,19	3	5,36	50,00
Pastor alemão	9	4,79	3	5,36	33,33
Podengo português	3	1,60	3	5,36	100,00
Caniche	3	1,60	2	3,57	66,67
Epagneul bretón	4	2,13	2	3,57	50,00
Golden retriever	8	4,26	2	3,57	25,00
Pit bull	3	1,60	2	3,57	66,67
Serra da estrela	3	1,60	2	3,57	66,67
Beagle	2	1,06	1	1,79	50,00
Cão de água português	2	1,06	1	1,79	50,00
Dogue de Bordéus	1	0,53	1	1,79	100,00
Drever	1	0,53	1	1,79	100,00
Leão da rodésia	3	1,60	1	1,79	33,33
Malamute do Alasca	1	0,53	1	1,79	100,00
Pastor holandês	1	0,53	1	1,79	100,00
Pug	1	0,53	1	1,79	100,00
Rafeiro do Alentejo	2	1,06	1	1,79	50,00
Rottweiler	2	1,06	1	1,79	50,00
Teckel miniatura	2	1,06	1	1,79	50,00
West Highland terrier	3	1,60	1	1,79	33,33
Basset hound	1	0,53	0	0	0,00
Bouvier Bernois	1	0,53	0	0	0,00
Bull terrier	1	0,53	0	0	0,00
Bulldog americano	1	0,53	0	0	0,00
Bulldog francês	2	1,06	0	0	0,00
Bulldog inglês	1	0,53	0	0	0,00
Cane corso	3	1,60	0	0	0,00
Chihuahua	1	0,53	0	0	0,00
Cocker spaniel	2	1,06	0	0	0,00
Collie	1	0,53	0	0	0,00
Dálmata	2	1,06	0	0	0,00
Husky siberiano	1	0,53	0	0	0,00
Jack russel	1	0,53	0	0	0,00
Pastor belga	1	0,53	0	0	0,00
Perdigueiro português	2	1,06	0	0	0,00
Pincher	2	1,06	0	0	0,00
Pointer	1	0,53	0	0	0,00
Schnauzer gigante	1	0,53	0	0	0,00
Schnauzer miniatura	1	0,53	0	0	0,00
Setter gordon	1	0,53	0	0	0,00
Shar Pei	1	0,53	0	0	0,00
Shih Tzu	1	0,53	0	0	0,00

**Tabela 38.** Continuação da tabela anterior.

Raça	Total de animais analisados		Animais com diagnóstico de infecção por <i>Leishmania infantum</i>		% Infecção em animais da mesma raça
	Fi	fr (%)	Fi	fr (%) no total de animais infetados	
Spitz anão	1	0,53	0	0	0,00
Teckel standard	2	1,06	0	0	0,00
Yorkshire terrier	5	2,66	0	0	0,00
<b>Total</b>	<b>188</b>	<b>100,00</b>	<b>56</b>	<b>100</b>	<b>29,79</b>

**Tabela 39.** Fi e fr (%) das variáveis sexo, porte, comprimento do pelo, ambiente em que vivem predominantemente durante o dia, ambiente em que pernoitam e pertença a proprietários que têm o já tiveram outros animais com leishmaniose, no total de animais analisados e nos grupos de animais com diagnóstico positivo e negativo de infecção por *L. infantum*.

Variáveis	Total de animias analisados		Animais com diagnóstico positivo de infecção por <i>Leishmania infantum</i>		Animais com diagnóstico negativo de infecção por <i>Leishmania infantum</i>	
	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)
<b>Sexo</b>						
Feminino	80	42,55	18	32,14	62	46,97
Masculino	108	57,45	38	67,86	70	53,03
<b>Total</b>	<b>188</b>	<b>100,00</b>	<b>56</b>	<b>100,00</b>	<b>132</b>	<b>100,00</b>
<b>Porte</b>						
Gigante (>45Kg)	12	6,38	5	8,93	7	5,30
Grande (25 a 45Kg)	78	41,49	26	46,43	52	39,39
Médio (15 a 25Kg)	39	20,74	9	16,07	30	22,73
Pequeno (6 a 15Kg)	42	22,34	14	25,00	28	21,21
Toy (<6Kg)	12	6,38	1	1,79	11	8,33
Indeterminado	5	2,66	1	1,79	4	3,03
<b>Total</b>	<b>188</b>	<b>100,00</b>	<b>56</b>	<b>100,00</b>	<b>132</b>	<b>100,00</b>
<b>Comprimento do pelo</b>						
Curto	101	53,72	34	60,71	67	50,76
Médio	49	26,06	16	28,57	33	25,00
Longo	12	6,38	3	5,36	9	6,82
Indeterminado	26	13,83	3	5,36	23	17,42
<b>Total</b>	<b>188</b>	<b>100,00</b>	<b>56</b>	<b>100,00</b>	<b>132</b>	<b>100,00</b>
<b>Ambiente em que vivem predominantemente durante o dia</b>						
Exterior	56	29,79	29	51,79	27	20,45
Exterior/ Interior	30	15,96	6	10,71	24	18,18
Interior	43	22,87	7	12,50	36	27,27
Sem informação	59	31,38	14	25,00	45	34,09
<b>Total</b>	<b>188</b>	<b>100,00</b>	<b>56</b>	<b>100,00</b>	<b>132</b>	<b>100,00</b>
<b>Ambiente em que pernoitam</b>						
Exterior	37	19,68	23	41,07	15	11,36
Exterior/ Interior	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Interior	91	48,40	19	33,93	72	54,55
Sem informação	59	31,38	14	25,00	45	34,09
<b>Total</b>	<b>188</b>	<b>100,00</b>	<b>56</b>	<b>100,00</b>	<b>132</b>	<b>100,00</b>
<b>Proprietários já tiveram ou têm outros animais com leishmaniose?</b>						
Não	79	42,02	21	37,5	58	43,94
Sim	50	26,60	21	37,5	29	21,97
Sem informação	59	31,38	14	25	45	34,09
<b>Total</b>	<b>188</b>	<b>100,00</b>	<b>56</b>	<b>100</b>	<b>132</b>	<b>100,00</b>

**Tabela 40.** Fi e fr (%) de utilização de diferentes combinações de medidas profiláticas, utilizadas antes da realização de testes de diagnóstico de LC e % de infecção nos grupos que utilizaram as mesmas metodologias profiláticas.

Combinações de profilaxias	Animais com infecção		Animais sem infecção		Total de animais		% Infecção
	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)	Fi	fr (%)	
Coleira Scalibor®	11	25,6	20	22,5	31	23,5	35,5
Coleira Scalibor® + Advantix®	8	18,6	14	15,7	22	16,7	36,4
Coleira Scalibor® + Activyl® Tick Plus	0	0,0	2	2,2	2	1,5	0,0
Coleira Scalibor® + Advantix® + Vacina CaniLeish®	0	0,0	1	1,1	1	0,8	0,0
Coleira Scalibor® + Activyl® Tick Plus + Vacina CaniLeish®	0	0,0	1	1,1	1	0,8	0,0
Coleira Scalibor® + Vacina CaniLeish®	3	7,0	0	0,0	3	2,3	100,0
Vacina CaniLeish®	2	4,7	1	1,1	3	2,3	66,7
Vacina CaniLeish® + sem informação contra vetor	0	0,0	1	1,1	1	0,8	0,0
Advantix® + vacina CaniLeish®	1	2,3	2	2,2	3	2,3	33,3
Advantix®	10	23,3	21	23,6	31	23,5	32,3
Nenhuma profilaxia	8	18,6	26	29,2	34	25,8	23,5
<b>Total</b>	<b>43</b>	<b>100,0</b>	<b>89</b>	<b>100,0</b>	<b>132</b>	<b>100,0</b>	<b>32,6</b>
<b>Ausência de informação</b>	<b>13</b>	<b>30,2</b>	<b>43</b>	<b>48,3</b>	<b>56</b>	<b>42,4</b>	<b>23,2</b>

**Tabela 41.** Fi e fr (%) das diferentes profilaxias utilizadas pelos animais com diagnóstico positivo e negativo de infecção por *L. infantum*, após realização de rastreio da doença.

Combinações profiláticas		Fi	fr (%)
Animais com diagnóstico positivo	Coleira Seresto®	1	1,8
	Coleira Scalibor®	12	21,4
	Coleira Scalibor® + Advantix®	7	12,5
	Advantix®	12	21,4
	Activyl® Tick Plus	2	3,6
	Nenhuma profilaxia	7	12,5
	Sem informação profilática	15	26,8
	<b>Total</b>	<b>56</b>	<b>100,0</b>
Animais com diagnóstico negativo	Leisguard®	6	4,5
	Leisguard® + Sem informação de profilaxia contra vetores	8	6,1
	Leisguard® + Scalibor® + Advantix®	2	1,5
	Leisguard® + Scalibor®	4	3,0
	Leisguard® + Advantix®	5	3,8
	Leisguard® + Activyl® Tick Plus	3	2,3
	Vacina CaniLeish®	4	3,0
	Vacina CaniLeish® + Sem informação contra vetores	13	9,8
	Vacina CaniLeish® + Coleira Scalibor® + Advantix®	4	3,0
	Vacina CaniLeish® + Coleira Scalibor® + Activyl® Tick Plus	1	0,8
	Vacina CaniLeish® + Coleira Scalibor®	7	5,3
	Vacina CaniLeish® + Advantix®	11	8,3
	Vacina CaniLeish® + Activyl® Tick Plus	2	1,5
	Vacina CaniLeish®/ Leisguard®	2	1,5
	Coleira Scalibor®	10	7,6
	Coleira Scalibor® + Activyl® Tick Plus	2	1,5
	Coleira Scalibor® + Advantix®	6	4,5
	Advantix®	12	9,1
	Nenhuma profilaxia	10	7,6
	Sem informação profilática	20	15,2
<b>Total</b>	<b>132</b>	<b>100,0</b>	