



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**Caracterização epidemiológica de canídeos
com diagnóstico de Leishmaniose. Hospital
Veterinário do Restelo, Lisboa (2014 – 2016)**

Joana Braga Gomes Tavares

Orientação: Professora Manuela Vilhena

Coorientação: Dr. Diogo Magno

Mestrado integrado em Medicina Veterinária

Dissertação científica

Évora, 2017



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**Caracterização epidemiológica de canídeos
com diagnóstico de Leishmaniose. Hospital
Veterinário do Restelo, Lisboa (2014 – 2016)**

Joana Braga Gomes Tavares

Orientação: Professora Manuela Vilhena

Coorientação: Dr. Diogo Magno

Mestrado integrado em Medicina Veterinária

Dissertação científica

Évora, 2017

Ama-se a vitória difícil, porque a derrota lhe preenchia quase todo o espaço possível. E foi com o que restava que se venceu em todo ele.

Vergílio Ferreira

*Não tenha medo de pensar diferente dos outros,
tenha medo de pensar igual e descobrir que todos estão errados.*

Eça de Queirós

AGRADECIMENTOS

A toda a minha família, obrigado por todo o carinho e pelos princípios que me foram transmitidos e que me tornaram na pessoa que sou hoje. Em especial à minha mãe, Ana Paula Beleza, que com a sua garra sempre me conseguiu dar todo o suporte necessário para conseguir prosseguir os meus estudos, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu namorado Jorge Oliveira, obrigado por toda a amizade e amor, tu completas parte da minha vida.

À minha avó emprestada, Maria de Lourdes Lopes Cardoso, pela amizade e por acreditar em mim e nos meus sonhos.

À Professora Manuela Vilhena, encontro-me bastante agradecida por ter aceitado orientar esta dissertação, esteve sempre disponível à distância de um telefonema para me esclarecer as dúvidas que surgiam. Obrigado por todas as palavras de incentivo e de compreensão, foram fundamentais para conseguir cumprir o meu objetivo.

Ao Dr. Diogo Magno, o meu orientador externo, um excelente profissional com quem tive a oportunidade de aprender bastante, graças à sua dedicação e tempo despendido com os estagiários. Também tenho a agradecer por toda a compreensão e apoio que me foi dado ao longo do estágio nos momentos de maior dificuldade.

A toda a equipa do Hospital Veterinário do Restelo, em especial aos médicos veterinários que tive oportunidade de acompanhar Dr. Martinho Capelão, Dra. Marta Cipriano, Dr. Hugo Lucas, Dr. Simão Nabais, Dra. Sofia Zamith, Dr. André Santos, Dra. Paula Santos, Dra. Joana Sousa, Dra. Maria João, e às Enfermeiras Veterinárias Joana Algarve e Sandrina Simões, pela vossa boa disposição contagiante.

Aos meus colegas estagiários, em especial à minha amiga Marta Olbrys.

Ao meu querido amigo João Lourenço pela amizade sincera.

A todos os amigos que marcaram o meu percurso universitário, em especial, Joana Rafael, Clara Dias, Andreia Farinha, Gonçalo Lamas, Tatiana Leite, Mónica Ribeiro, Carolina Carrujo, Ana Sofia Carvalho, Sara Alves, Carolina Rocha, Rita Teles, Rodwan Backar e Fahad Israr, bem como os meus amigos de infância Joana Oliveira, Diogo António e Rita Francisco. A amizade que nos une pode vencer todas as distâncias, e quando nos reencontramos é como se o tempo não tivesse passado.

A toda a equipa da Casa dos Animais de Lisboa que me ajudou a descontrair parte do dia enquanto escrevia esta dissertação, em especial à Dra. Marta Videira, Dra. Ana Machado, Dra. Fernanda Pimentel, Dra. Cândida Alves, Dra. Elisabete Andrade, Senhor João Lima, Senhor António Pinto, Senhor Valdemar Fernandes e Dona Jorgina Duarte.

RESUMO:

A Leishmaniose Canina (Lcan) caracteriza-se por ser uma doença multissistémica grave de evolução crónica, que afeta os canídeos. O agente responsável é o protozoário *Leishmania infantum*, o qual também é responsável pela Leishmaniose Visceral nos humanos. Esta zoonose é endémica na Bacia Mediterrânica e dadas as alterações climáticas registadas nos últimos anos, tem-se vindo a assinalar a sua re-emergência em determinadas áreas. O objetivo deste estudo retrospectivo foi avaliar os aspetos clínicos, epidemiológicos e profiláticos da Lcan na Área Metropolitana de Lisboa (AML). Para isso, no total foram estudados 364 cães domésticos atendidos no Hospital Veterinário do Restelo. Verificou-se uma ampla distribuição da Lcan na AML. Para controlar a expansão desta doença é essencial adotar mais do que uma medida profilática e efetuar um diagnóstico precoce, o qual é complexo dado a heterogeneidade do quadro clínico. A introdução da vacina dificulta o diagnóstico e observou-se a ocorrência de reações adversas em 18% dos animais vacinados.

Palavras-chave: Leishmaniose, canídeos, clínica, epidemiologia, prevenção.

ABSTRACT:

Epidemiological characterization of canids with diagnosis of Leishmaniasis. Hospital Veterinário do Restelo, Lisboa (2014 – 2016)

Canine Leishmaniasis (CanL) is a serious multisystemic disease of chronic evolution that affects canids. The etiologic agent is the protozoan *Leishmania infantum*, which is also responsible for the Visceral Leishmaniasis. This zoonosis is endemic in the Mediterranean Basin and due to climate changes in this last years was reported its re-emergence in some areas. The objective of this retrospective study is to evaluate the clinical, epidemiological and prophylactic aspects of CanL, in the Lisbon Metropolitan Area (LMA). In total, were studied 364 domestic dogs, observed in Hospital Veterinário do Restelo. We verified a wide distribution of CanL in LMA. To control the expansion of this disease is essential to combine more than one prophylactic measure and an early diagnosis, which is complex due to the heterogeneity of the clinical presentation. The introduction of the vaccine difficults the diagnosis and we have observed the occurrence of adverse reactions in 18% of the vaccinated animals.

Keywords: Leishmaniasis, canines, clinic, epidemiology, prevention.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
Índice de figuras	VI
Índice de tabelas	VII
Índice de gráficos	VIII
Lista de siglas e abreviaturas	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Etiologia.....	1
1.2. Vetor.....	4
1.3. Hospedeiros.....	7
1.4. Ciclo de Vida.....	7
1.5. Formas de transmissão.....	9
1.6. Epidemiologia.....	9
1.7. Patogenia.....	11
1.8. Sinais Clínicos.....	15
1.9. Alterações Laboratoriais.....	18
1.10. Diagnóstico.....	20
1.10.1. Diagnóstico Parasitológico.....	22
1.10.2. Diagnóstico Molecular.....	23
1.10.3. Diagnóstico Serológico.....	24
1.11. Tratamento.....	26
1.11.1. Alopurinol.....	27
1.11.2. Antimoniato de n-metilglucamina.....	28
1.11.3. Miltefosina.....	28
1.11.4. Imunoterapia.....	29
1.11.5. Monitorização do tratamento e prognóstico.....	29
1.12. Prevenção.....	30
1.13. Controlo.....	32
1.14. Impacto em Saúde Pública.....	33
2. OBJETIVOS	35
2.1. Objetivo geral.....	35
2.2. Objetivos específicos.....	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. Tipo de estudo.....	35
3.2. População em estudo.....	36
3.3. Amostra.....	36

3.4.	Fontes de informação.....	36
3.5.	Método de recolha de dados.....	36
3.6.	Método de tratamento de dados e análise estatística	37
3.7.	Variáveis.....	37
4.	RESULTADOS.....	39
4.1.	Frequência de positividade, independentemente do meio de diagnóstico	39
4.2.	Áreas geográficas de proveniência dos animais positivos	39
4.3.	Caracterização dos habitats das áreas geográficas identificadas	41
4.4.	Potenciais fatores de risco para a infeção por <i>L. infantum</i>	42
4.5.	Perfil clínico dos animais infetados por <i>L. infantum</i>	46
4.6.	Técnica de diagnóstico mais utilizada no Hospital Veterinário do Restelo.....	49
4.7.	Relacionar a resposta humoral dos animais infetados com a forma clínica (sintomática / assintomática)	51
4.8.	Relação entre o tipo de prevenção da Leishmaniose Canina com o número de casos de Leishmaniose na amostra.....	52
4.9.	Efeitos adversos verificados após vacinação	52
5.	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	54
6.	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação taxonómica de <i>L. infantum</i>	1
Figura 2 - Classificação do género, subgénero e complexo de espécies <i>Leishmania</i>	3
Figura 3 - Classificação taxonómica de <i>P. perniciosus</i> e <i>P. ariasi</i> , as espécies vetoras de Leishmaniose presentes em Portugal	4
Figura 4 - Distribuição geográfica das espécies vetoras <i>P. perniciosus</i> e <i>P. ariasi</i> na Europa, Outubro de 2016.....	5
Figura 5 - Flebótomo fêmea adulto (<i>Phlebotomus papatasi</i>) a alimentar-se no hospedeiro.....	5
Figura 6 - Esquema ilustrativo do ciclo de vida de <i>L. infantum</i>	8
Figura 7 - Distribuição da infeção canina por <i>L. infantum</i> na Europa.....	11
Figura 8 - Resposta imunitária mediada pelas diferentes linhagens de linfócitos, face o contacto com as formas promastigotas de <i>L. infantum</i>	12
Figura 9 - Diferentes possibilidades de evolução da infeção por <i>L. infantum</i>	12
Figura 10 - Exemplos de diferentes manifestações cutâneas exibidas por animais com Leishmaniose Canina	16
Figura 11 - Proteinogramas séricos de um animal saudável e animais com Leishmaniose Canina.....	19
Figura 12 - Abordagem diagnóstica recomendada para cães clinicamente saudáveis que habitam ou viajaram para uma zona endémica, ou, para cães que apresentam sinais clínicos consistentes com Leishmaniose.....	21
Figura 13 - Casos de Leishmaniose Visceral Humana reportados em Portugal, no período compreendido entre 1950 e 2015.....	34
Figura 14 - Mapa da AML com distribuição do total de animais testados e imagens satélites respetivas às áreas de maior concentração de animais positivos	41
Figura 14 - Imagens satélite 3D representativas das características urbanas, da Área A e B	42

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de <i>Leishmania</i> identificadas em canídeos, espécie vetora responsável pela sua transmissão e distribuição geográfica	1
Tabela 2 - Frequência das alterações laboratoriais mais frequentemente presentes em animais com Leishmaniose Canina	20
Tabela 3 - Frequências totais e relativas das variáveis independentes e variável dependente positiva	43
Tabela 4 - Verificar a associação os diferentes variáveis e a presença de infecção por <i>L. infantum</i> , recorrendo ao teste do qui-quadrado, baseado na tabela de contingência	44
Tabela 5 - Análise das diferentes variáveis relativas às características individuais do animal em relação à presença de infecção por <i>L. infantum</i> , recorrendo a uma regressão logística binária	45
Tabela 6 - Lista dos sinais clínicos registados nos animais considerados suspeitos e dos animais com diagnóstico positivo de infecção por <i>L. infantum</i>	46
Tabela 7 - Lista das alterações laboratoriais registadas nos animais classificados como suspeitos e nos animais com diagnóstico positivo de infecção por <i>L. infantum</i>	48
Tabela 8 - Relação entre o momento da administração da vacina Canileish® e os efeitos adversos observados.....	53

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Frequência dos animais testados por município de residência, na AML	40
Gráfico 2 - Frequência das diferentes lesões dermatológicas presentes nos animais positivos a <i>L. infantum</i>	47
Gráfico 3 - Frequência do tipo de gamopatia observada no proteinograma sérico dos animais infectados por <i>L. infantum</i>	49
Gráfico 4 - Frequência do motivo para a realização de testes de diagnóstico, específicos para <i>L. infantum</i>	50
Gráfico 5 - Frequência dos testes de diagnóstico adotados, dependendo do motivo da sua realização.....	50
Gráfico 6 - Proporção de animais sintomáticos e animais assintomáticos, segundo o título de anticorpos Anti-Leishmania obtido no teste LEISCAN®	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- Ac:** Anticorpos
- ALT:** Alanina amonittransferase
- AML:** Área Metropolitana de Lisboa
- BUN:** *Blood Urea Nitrogen*
- CAMV:** Centro de Atendimento Médico Veterinário
- CMH II:** Complexo de histocompatibilidade maior tipo II
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- ELISA:** *Enzyme-linked immunosorbent assay*
- FAS:** Fosfatase alcalina
- FNT- α :** Fator de necrose tumoral α
- GGT:** Gama-glutamil transferase
- HAART:** Terapia Anti-Retroviral Altamente Reativa
- HE:** Hematoxilina e Eosina
- HVR:** Hospital Veterinário do Restelo
- IC:** Intervalo de confiança
- Ig:** Imunoglobulinas
- IFAT:** *Indirect immunofluorescent antibody test*
- IFN- γ :** Interferon γ
- IL-2:** Interleucina 2
- IR:** Insuficiência renal
- IRC:** Insuficiência renal crónica
- IRIS:** *International Renal Interest Society*
- LC:** Leishmaniose Cutânea
- Lcan:** Leishmaniose Canina
- LV:** Leishmaniose Visceral
- ON:** Óxido nítrico
- ONLeish:** Observatório Nacional das Leishmanioses
- OR:** *Odds Ratio*
- PAAF:** Punção aspirativa por agulha fina
- PCR:** *Polymerase chain reaction*
- P-MAPA:** agregado proteico de magnésio-amoniofosfolinoleato-palmitoleato anihídrico
- RAG:** *Rácio albumina / globulina*
- RPC:** *Rácio proteína / creatinina na urina*
- Slc11c1:** *Solute carrier family 11 member a1*
- VIH:** Vírus da Imunodeficiência Humana

1. INTRODUÇÃO

1.1. ETIOLOGIA

As Leishmanioses são infeções causadas por parasitas protozoários intracelulares obrigatórios pertencentes ao género *Leishmania*, com apresentações clínicas e epidemiológicas diversas, envolvendo diferentes espécies que podem infetar o ser humano, entre outros mamíferos domésticos e selvagens (Dedet, 2002).

Já foram identificadas cerca de 30 espécies patogénicas, sendo que cerca de 20 são responsáveis por provocar doença clínica no Homem. A maioria apresenta um carácter zoonótico e poucas são estritamente antroponóticas, isto é, a transmissão ocorre de pessoa para pessoa por intermédio de um vetor (WHO, 2010).

Até ao presente foram identificadas cerca de 12 espécies diferentes de *Leishmania* capazes de infetar canídeos, as quais se encontram listadas na tabela 1. A *L. infantum* (sinónimo no Novo Mundo: *L. chagasi*) é a espécie que revela maior importância epidemiológica, uma vez que é o agente etiológico da Leishmaniose Visceral e Cutânea nos humanos em países da Europa, Médio e Extremo Oriente, África e América Central e do Sul (Dantas-Torres *et al.*, 2012).

<i>Leishmania</i> spp. ^a	Vetores ^b	Distribuição Geográfica
<i>L. amazonensis</i>	<i>L. flaviscutellata</i> , <i>L. nociva</i> , <i>L. whitmani</i>	Brasil
<i>L. arabica</i>	<i>P. papatasi</i>	Arábia Saudita
<i>L. braziliensis</i>	<i>L. intermedia</i> , <i>L. migonei</i> , <i>L. wellcomei</i> , <i>L. whitmani</i> , entre outros	América do Sul
<i>L. colombiensis</i>	<i>L. hartmanni</i>	Venezuela
<i>L. guyanensis</i>	<i>L. anduzei</i> , <i>L. umbratilis</i> , <i>L. whitmani</i>	Colômbia
<i>L. infantum</i>	<i>L. longipalpis</i> , <i>L. evansi</i> , <i>P. neglectus</i> , <i>P. perniciosus</i> , entre outros	África, América, Ásia, Europa
<i>L. major</i>	<i>P. papatasi</i>	Egipto, Arábia Saudita
<i>L. mexicana</i>	<i>L. ayacuchensis</i> , <i>L. olmeca</i>	Equador, Estados Unidos da América
<i>L. panamensis</i>	<i>L. hartmanni</i> , <i>L. gomezi</i> , <i>L. panamensis</i> , <i>L. trapidoi</i> , <i>L. sanguinaria</i>	Colômbia, Equador, Panamá
<i>L. peruviana</i>	<i>L. peruensis</i> , <i>L. verrucarum</i>	Peru
<i>L. pifanoi</i>	<i>L. flaviscutellata</i> , <i>L. youngi</i>	Equador
<i>L. tropica</i>	<i>P. sergenti</i>	Índia, Irão, Marrocos, Síria

Tabela 1 - Espécies de *Leishmania* identificadas em canídeos, espécie vetora responsável pela sua transmissão e distribuição geográfica. ^aCom a exceção da *L. arabica*, todas as outras espécies listadas são zoonóticas, não implicando o cão como hospedeiro reservatório. ^bApenas estão referidos os principais vetores confirmados ou suspeitos. *L.* – *Lutzomyia*, *P.* - *Phlebotomus* (Adaptado de Dantas-Torres *et al.*, 2012).

O género *Leishmania* foi identificado por Ross em 1903 e pertence ao Reino Protista. Na Figura 1 encontra-se esquematizada a classificação taxonómica da espécie *L. infantum*. Apesar de, atualmente, a sua taxonomia continuar a ser um assunto de considerável controvérsia (Akhoundi *et al.*, 2016). Toda a classificação feita do género para os níveis taxonómicos superiores baseia-se na classificação determinada inicialmente pela sistemática Lineana, isto é, com base nos critérios extrínsecos do parasita, a qual posteriormente foi apoiada com o desenvolvimento de novos métodos moleculares (Rioux *et al.*, 1990; Akhoundi *et al.*, 2016).



Figura 1 – Classificação taxonómica de *L. infantum* (Adaptado de Akhoundi *et al.*, 2016).

No início do século 70, Lainson e Shaw propuseram a divisão do género *Leishmania* em dois subgéneros, com base no local onde ocorre o desenvolvimento do parasita, no tubo digestivo do vetor. No subgénero *Leishmania* o desenvolvimento do parasita ocorre na zona suprapilórica, isto é, na porção cranial ao piloro, já no subgénero *Viannia* este ocorre na zona peripilórica, isto é, na porção caudal ao piloro (Lainson & Shaw, 1987, referido por Jean-Pierre, 2002). Enquanto o subgénero *Viannia* encontra-se apenas presente no continente americano, também designado por Novo Mundo, o subgénero *Leishmania* está presente quer no Novo Mundo, quer no Velho Mundo, sendo que este último compreende os países pertencentes à Europa, Ásia e África (Dedet, 2002). Na Figura 2 encontra-se esquematizada a taxonomia atualizada do género *Leishmania*.

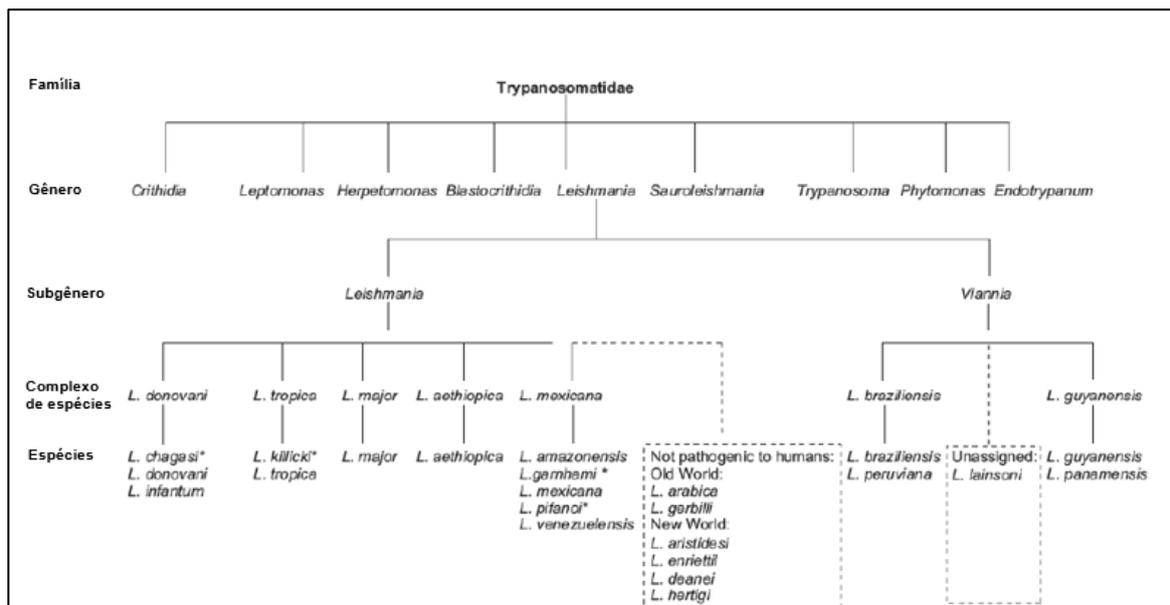


Figura 2 - Classificação do gênero, subgênero e complexo de espécies *Leishmania*. *Espécie submetida a reclassificação (Adaptado de WHO, 2010).

Inicialmente a classificação das espécies de *Leishmania* foi fundamentada nos critérios externos do parasita, no entanto, com desenvolvimento de técnicas bioquímicas que permitiram uma caracterização fenotípica, com base na mobilidade electroforética das isoenzimas, adotou-se por um sistema de classificação Adansoniana. Os grupos de isolados com o mesmo perfil isoenzimático designam-se por zimodemes, os quais se denominam com o acrónimo “MON” (Rioux *et al.*, 1990; Akhoundi *et al.*, 2016). Este sistema de classificação permite agrupar os parasitas segundo as suas relações evolutivas e consequentemente desenhar uma árvore filogenética. O método de eletroforese das isoenzimas continua a ser considerado o método de eleição para a identificação das diferentes espécies do parasita (WHO, 2010).

Até ao momento, foram identificados 25 zimodemes diferentes de *L. infantum* nos países pertencentes à bacia mediterrânica, sendo o MON-1 o mais frequentemente identificado quer em casos de Leishmaniose Canina (Lcan), quer em casos de Leishmaniose visceral (LV) (Alvar *et al.*, 2004).

Este parasita apresenta, fundamentalmente, duas formas morfológicas: a forma promastigota (extracelular) no vetor, e a forma amastigota (intracelular) no hospedeiro vertebrado (Bañuls *et al.*, 2007). As promastigotas são formas alongadas e móveis, graças à presença de um flagelo livre que tem origem no corpo basal do cinetoplasto. Encontram-se no meio extracelular do aparelho digestivo do inseto vetor. Estas formas medem cerca de 15-30 µm de comprimento e 2-3 µm de largura. Já as amastigotas são formas ovoides ou arredondadas, com 2-6 µm de diâmetro e sem flagelo, isto é, são imóveis. Estas localizam-se intracelularmente nas células fagocíticas mononucleares (neutrófilos e macrófagos) (Sykes *et al.*, 2013).

1.2. VETOR

Os flebótomos são considerados os únicos vetores de *Leishmania* spp., estes dípteros transmitem os protozoários através da picada por parte de uma fêmea previamente infetada (Adler e Theodor, 1957; Seblova *et al.*, 2014).

A classificação taxonómica dos flebótomos também é motivo de controvérsia. Apesar das diversas revisões propostas, não existe nenhum sistema universalmente aceite (Maroli *et al.*, 2013). O sistema de classificação mais utilizado encontra-se sumariado na Figura 3. Segundo Lewis e os seus colaboradores (1977), no Velho Mundo distinguem-se dois géneros de espécies (*Phlebotomus* spp. e *Sergentomyia* spp.) e no Novo Mundo três géneros de espécies (*Lutzomyia* spp., *Brumptomyia* spp. e *Warileya* spp.).

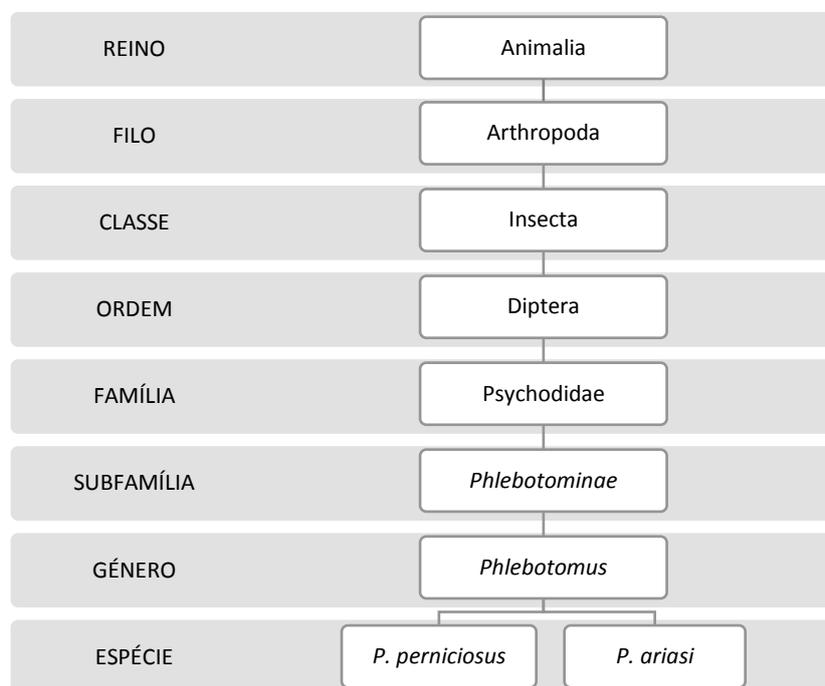


Figura 3 - Classificação taxonómica de *P. perniciosus* e *P. ariasi*, as espécies comprovadamente vetoras de *L. infantum* presentes em Portugal (Adaptado de Lewis *et al.*, 1977 e Alves-Pires *et al.*, 1991).

Têm vindo a ser identificadas cada vez mais espécies, estimando-se de momento que existam mais de 800 espécies flebotomínicas, em que apenas 98 destas são potencial ou comprovadamente vetoras de *Leishmania* spp., pertencentes aos géneros *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* (WHO, 2010). Até à presente data, as espécies reconhecidas como principais vetoras da *L. infantum* em Portugal são o *Phlebotomus (Larroussius) ariasi* (Tonnoir, 1921, referido por Alvar *et al.*, 2004) e o *Phlebotomus (Larroussius) perniciosus* (Newstead, 1911, referido por Alvar *et al.*, 2004).

Em Portugal, o *P. perniciosus* é a espécie mais abundante, e a sua distribuição estende-se por todo o país (Figura 4), já tendo sido capturada numa grande variedade de biótopos, geralmente em proximidade com a atividade humana (Pires, 1979; Alves-Pires *et al.*, 1991). O *P. ariasi* apenas supera a densidade do *P. perniciosus* nas regiões de elevada

humidade e de baixas temperaturas de Trás-os-Montes e Alto Douro (Alves-Pires *et al.*, 1991; Semião-Santos *et al.*, 1995), e, normalmente, é capturado em habitats peridomésticos rurais, em zonas de atividade humana e em áreas silváticas (Branco *et al.*, 2013).

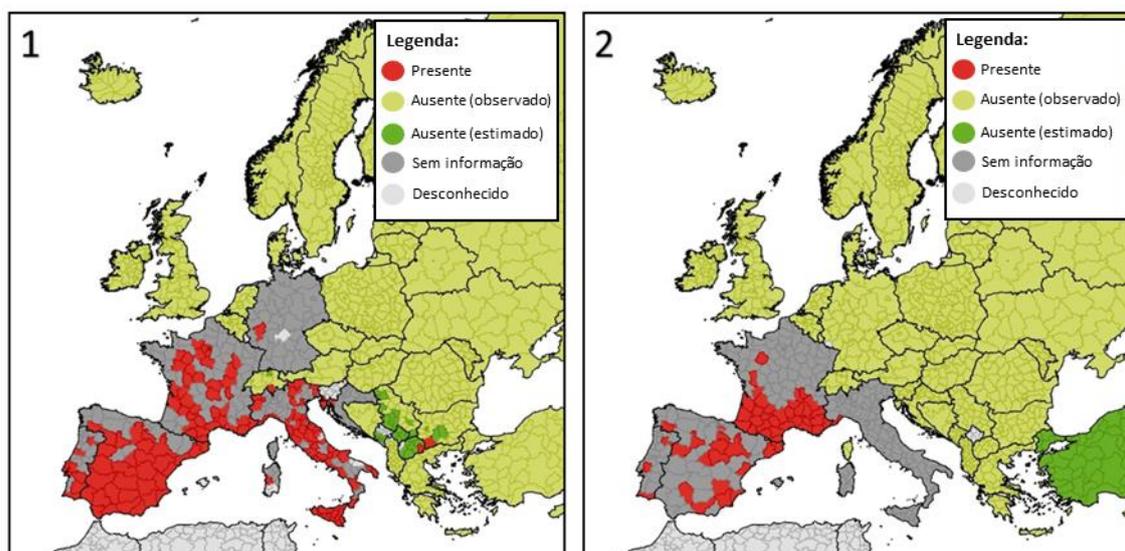


Figura 4 – Distribuição geográfica das espécies vetoras *P. perniciosus* (1) e *P. ariasi* (2) na Europa, Outubro de 2016 (Adaptado de <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vetors/vetormaps>, acedido a Janeiro de 2017).

Características morfológicas gerais da forma adulta

Os flebótomos (Figura 5) normalmente são confundidos erradamente com mosquitos (Família: Culicidae). Estes insetos apresentam pequenas dimensões e raramente ultrapassam os 3,5 mm de comprimento. O seu corpo alongado encontra-se densamente revestido por finas sedas, apresenta umas antenas longas e a sua coloração varia de castanha clara a negra (Killick-Kendrick, 2002). Quando o flebótomo se encontra em repouso as suas asas assumem uma posição característica em forma de “V”, num ângulo de 45° em relação ao corpo (Killick-Kendrick *et al.*, 1986).



Figura 5 - Flebótomo fêmea adulta (*Phlebotomus papatasi*) a alimentar-se no hospedeiro. (Adaptado de Maroli *et al.*, 2013).

Bioecologia geral

Os flebótomos são insetos holometabólicos, com quatro fases distintas de desenvolvimento: ovo, larva (com quatro estádios), pupa e imago ou adulto. As formas imaturas desenvolvem-se em meio terrestre, já o adulto vive em meio aéreo (Killick-Kendrick, 2002).

Quer os machos, quer as fêmeas, alimentam-se de sucos e açúcares vegetais (Lewis & Domoney, 1966). As fêmeas são simultaneamente hematófagas, necessitam de efetuar pelo menos uma refeição sanguínea num hospedeiro vertebrado para que seja possível a maturação ovárica (Killick-Kendrick, 2002), apesar de existirem referências de determinadas espécies capazes de produzir ovos viáveis sem esta necessidade (Brazil & Oliveira, 1999; Alves *et al.*, 2008). Completa a ovoposição, e não ocorrendo diapausa larvar, novos adultos voltarão a emergir passados aproximadamente 35 a 60 dias, sendo sua longevidade de 15 a 60 dias (Leger & Depaquit, 2001; Killick-Kendrick, 2002).

A maioria dos adultos apresenta actividade crepuscular e noturna, apesar de poderem exibir actividade diurna quando o seu habitat é perturbado. O seu período de actividade, tanto anual como diário, é muito variado e fortemente condicionado por fatores climáticos (Lane, 1993). Os flebótomos mostram-se ativos na ausência de chuva e ventos fortes, e quando a temperatura varia entre os 15 e os 28 °C (Killick-Kendrick, 2002). Nos trópicos observa-se actividade flebotómica ao longo de todo o ano, já na Europa a sua actividade encontra-se mais restrita a um padrão sazonal, normalmente, entre a primavera e outono (Dantas-Torres *et al.*, 2012).

Os locais de repouso dos flebótomos consistem em locais frescos, húmidos e micro-habitas escuros como casas, latrinas, caves, estábulos, grutas, fissuras nas paredes, rochas e solo, zonas de vegetação densa, tocas de roedores e outros mamíferos, ninhos de aves e termiteiras (Killick-Kendrick, 2002).

Estes fracos voadores apenas têm a capacidade de se afastar no máximo, cerca de um ou dois quilómetros dos seus criadouros, podendo estas distâncias ser variáveis conforme as espécies (Afonso & Alves-Pires, 2008). A velocidade de voo de um flebótomo é inferior a 1 metro por segundo (Killick-Kendrick *et al.*, 1986), ficando inibido de voar com velocidades de vento superiores, sendo este um dos principais fatores que limitam a sua dispersão. As fêmeas são predominantemente exofágicas (picando no exterior) e exofílicas (permanecem no exterior para a maturação ovárica) (WHO, 2010).

As espécies de flebótomos presentes em Portugal são zooantropofílicas, com uma maior preferência pelos cães do que pelos humanos, mas na ausência de um hospedeiro preferencial poderão apresentar um comportamento oportunista, alimentando-se do vertebrado disponível (Maroli *et al.*, 2008) Aproximam-se do hospedeiro em pequenos vôos silenciosos (Ready, 2013) e mostram preferência por se alimentarem de zonas glabras como, o focinho, o pavilhão auricular e a área inguinal e perianal (Campino, 2002). Numa noite, o cão pode ser picado centenas de vezes (Solano-Gallego *et al.*, 2009). No entanto, em zonas endémicas, verifica-se que apenas uma proporção moderada (0,5-3%) de flebótomos é que se encontra infetada com *L. infantum* (Martin-Sanchez *et al.*, 2006, referido por Solano-Gallego *et al.*,

2009). Ao picarem, penetram a epiderme e derme do hospedeiro e criam um microhematoma (“feeding pool”), de onde sugam o sangue, sem necessariamente lacerar um vaso sanguíneo (Saridomichelakis, 2009). Ao mesmo tempo é inoculada saliva com propriedades anticoagulantes e vasodilatadoras. Posteriormente, as fêmeas irão realizar a ovoposição em substratos húmidos e com abundante matéria orgânica, que servirá de alimento para as futuras larvas (Ready, 2013).

1.3. HOSPEDEIROS

O cão doméstico (*Canis familiaris*) é considerado o principal hospedeiro reservatório peridoméstico de *L. infantum* na Europa (Millán *et al.*, 2014). Tal facto deve-se ao elevado número de indivíduos presentes no nicho ecológico e à sua estreita relação com o vetor (Alvar *et al.*, 2004). Os cães coabitam com o Homem, ou então, mantêm-se presentes nas imediações das habitações humanas, o que favorece a manutenção do ciclo doméstico da transmissão da *L. infantum* (Dantas-Torres, 2007).

Na Europa foram identificados outros canídeos selvagens infetados com *L. infantum*, como a raposa (*Vulpes vulpes*), o lobo (*Canis lupus*), o chacal (*Canis aureus*), o saca-rabos (*Herpestes ichneumon*), o lince ibérico (*Lynx pardinus*), a marta (*Martes sp.*) a gineta (*Genetta genetta*) e a fuinha (*Martes foina*), os quais são hospedeiros reservatórios silvestres da *L. infantum* (Souza *et al.*, 2014). Estes, embora sejam responsáveis pela manutenção do ciclo silvático de *Leishmania*, não são considerados como a principal fonte de transmissão de Leishmaniose aos cães e humanos, devido ao seu número diminuto e distância da atividade humana (Alvar *et al.*, 2004).

Outros mamíferos selvagens têm sido identificados infetados com *L. infantum*, como lagomorfos (Molina *et al.* 2012) e roedores (Helhazar *et al.* 2013), especialmente, aqueles que são encontrados na proximidade do homem (Millán *et al.*, 2014).

Nas áreas endémicas, foram reportados casos de infeção em outros animais domésticos, como gatos, cavalos, porcos, ovelhas, cabras e ratos domésticos (Fisa *et al.*, 1999; Quinzel & Courtenay, 2009). Inclusive, têm vindo a ser documentados um crescente número de casos de infeções subclínicas de Leishmaniose Felina na literatura em todo o mundo, o que sugere o papel do gato (*Felis catus domesticus*) como um possível reservatório secundário e não apenas hospedeiro acidental, no entanto toda esta informação é ainda bastante limitada (Maia & Campino, 2008a; Pennisi *et al.*, 2015).

1.4. CICLO DE VIDA

O ciclo biológico da *L. infantum* é heteroxeno digénico, isto é, desenvolve-se em dois hospedeiros, um intermédio, que atua como vetor, e um hospedeiro definitivo vertebrado (Bañuls *et al.*, 2007), tal como podemos verificar na Figura 6. As fêmeas de flebótomos infetam-se ao ingerir as formas amastigotas do parasita, presentes no interior de células do sistema fagocítico mononuclear, quando efetuam uma refeição sanguínea num hospedeiro vertebrado infetado. No intestino do vetor decorrem uma série de alterações morfológicas dando origem

às formas promastigotas procíclicas, que são móveis. Estas formas parasitárias multiplicam-se intensivamente e, posteriormente, transformam-se nas formas promastigotas metacíclicas, que são a forma infetante para o hospedeiro vertebrado, e migram para a zona proximal do tubo digestivo, incluindo porções bucais. A transmissão ocorre quando a fêmea flebótomo, infetante, tenta efetuar uma nova refeição sanguínea, inoculando, simultaneamente, as formas promastigotas metacíclicas no hospedeiro vertebrado. Após a inoculação destas formas parasitárias na derme do hospedeiro vertebrado, estas são fagocitadas pelos macrófagos presentes, perdendo os seus flagelos e transformando-se na forma amastigota. A forma amastigota multiplica-se por fissão binária no interior dos fagolisossomas dos macrófagos, os quais eventualmente acabam por ruturar, libertando as formas amastigotas, que irão depois infetar novas células fagocitárias (Baneth & Solano-Gallego, 2012; Sykes *et al.*, 2013).

O ciclo reinicia-se quando uma outra fêmea flebotomínica efetua a sua refeição sanguínea no hospedeiro vertebrado infetado. Caso o hospedeiro infetado não consiga controlar a infeção localizada na pele, as formas amastigotas disseminam-se através do sistema linfático e sangue, afetando depois todo o sistema reticulo-endotelial (Sykes *et al.*, 2013).

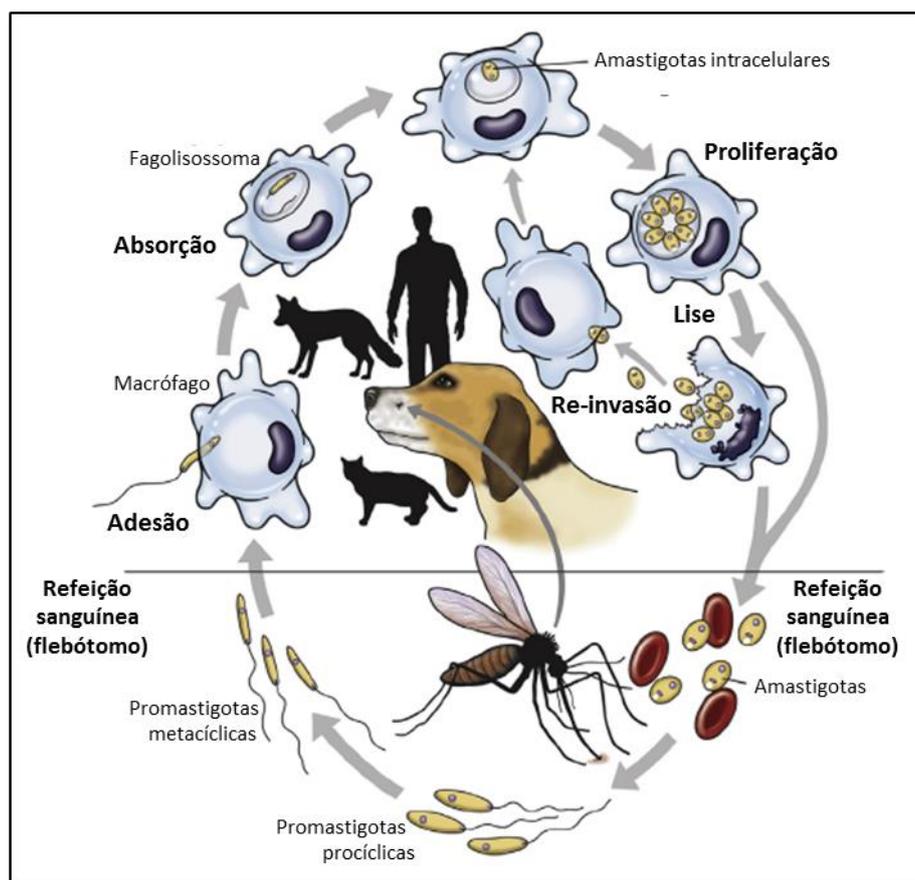


Figura 6 – Esquema ilustrativo do ciclo de vida de *L. infantum* (Adaptado de Sykes *et al.*, 2013).

1.5. FORMAS DE TRANSMISSÃO

Existem dois tipos de ciclos de transmissão de *Leishmania*: a antroponótica, na qual a infecção é transmitida homem a homem por intermédio de um vetor, e a zoonótica, que engloba reservatórios animais no ciclo de transmissão. O ciclo de transmissão zoonótico é o predominante em todo o mundo, já o ciclo de transmissão antroponótica limita-se apenas às espécies pertencentes ao complexo *L. tropica* e *L. donovani*, com a exceção da *L. infantum* (Ready, 2010).

A principal forma de transmissão, tanto de *L. infantum*, como de outras espécies de *Leishmania*, é através da picada de um flebótomo fêmea (Quinnell & Courtenay, 2009). Também tem sido sugerido a existência de outros vetores, como as carraças *Rhipicephalus sanguineus* (Coutinho, 2005; Paz *et al.*, 2010) e as pulgas *Ctenocephalides felis* (Coutinho, 2007; Ferreira *et al.*, 2009), mas até ao momento não existem resultados experimentais que o corroborem (Maia & Cardoso, 2015)

Raros são os relatos de formas de transmissão não vetorial (Maia & Cardoso, 2015). Verificaram-se casos de infecção de canídeos por transmissão venérea (Silva, 2009), transmissão congénita (Masucii, 2003; Rosypal, 2005) e transfusão sanguínea (Owens, 2001). Suspeita-se ainda na possibilidade de transmissão direta de cão-para-cão através de mordidas ou feridas, o que poderia explicar a presença de Lcan em zonas não endémicas onde o vetor aparentemente não está presente (Gaskin *et al.*, 2002).

1.6. EPIDEMIOLOGIA

A Leishmaniose é endémica em 98 países, sendo prevalente nas áreas dos trópicos, subtropicos e no Sul da Europa (WHO, 2010) A epidemiologia da Lcan é diversa, resultando das interações entre o vetor, o hospedeiro, o parasita e o ambiente (Gharbi, 2015).

O primeiro caso de LCan foi descrito na Tunísia (Nicolle & Comte, 1908, referido por Bettini & Gradoni, 1986). O cão foi o primeiro animal encontrado como naturalmente infetado, e nos anos consequentes foram descritos mais casos em diversos países pertencentes à bacia mediterrânica (Campino, 2002).

O número de animais infetados subclínicamente é muito superior ao número de animais doentes, estimando-se que cerca de metade dos cães parasitados com *Leishmania* não apresentem sinais clínicos (Baneth *et al.*, 2008; Campino & Maia, 2010). Assim, presume-se que existam animais aparentemente saudáveis que participam ativamente na transmissão, apesar de os cães sintomáticos serem considerados mais eficientes como hospedeiros reservatórios (Campino, 2002).

Segundo estudos de seroprevalência realizados em Espanha, França, Itália e Portugal calcula-se que cerca de 2,5 milhões dos cães se encontram infetados com *L. infantum* (Baneth *et al.*, 2008). Em alguns focos endémicos da infecção podem ser atingidos valores de seroprevalência de 60% a 80% em canídeos (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

A distribuição da Leishmaniose Canina nas zonas endémicas não é uniforme, mas sim focal, verificando-se variações na sua prevalência entre áreas contíguas. A sua distribuição normalmente acompanha a distribuição dos vetores, que também não é uniforme, devido a estar dependente da existência de nichos ecológicos específicos, que suprem as necessidades biológicas de cada espécie de flebótomo (Campino, 2002).

Em Portugal, foram identificados três focos zoonóticos principais, nas décadas de 80 / 90, nomeadamente a região de Trás-os-Montes e Alto Douro, Algarve e Área Metropolitana de Lisboa (AML) (Abranches *et al.*, 1984). Num estudo conduzido em 2003, verificou-se uma seroprevalência de 19,2% de infeção canina nas áreas urbanas / suburbanas da AML (Cortes *et al.*, 2007). No entanto, um estudo mais recente, efetuado por Cortes *et al.* 2012, revelou uma prevalência de infeção canina de apenas 5,85% no distrito de Lisboa. Neste mesmo estudo evidenciou-se uma maior prevalência da infeção canina na área rural (8,8%), em relação à área urbana / suburbana (3,8%), e a situação inversa na incidência da infeção humana (Cortes *et al.*, 2012). Este fenómeno designa-se por desvio trófico em meio rural, e calcula-se que esteja associado à urbanização ou domesticação de focos zoonóticos naturais, isto é, apesar de o vetor ser predominantemente zoofílico, a diminuição do número de animais disponíveis nas áreas urbanas pode levar a que a população humana fique mais vulnerável à infeção acidental (Abranches *et al.*, 1987, referido por Campino & Maia, 2010).

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento da incidência de casos de Leishmaniose em alguns países, tendo sido detetadas novas áreas endémicas em regiões onde, até então, não tinham sido assinalados casos autóctones (WHO, 2010). Esta expansão dos flebótomos e conseqüente ampliação da Lcan a nível global deve-se a uma multiplicidade de fatores, entre os quais se destacam o aumento da mobilidade humana e animal e o comércio internacional, bem como as alterações climáticas (Ready, 2010; Solano-Gallego *et al.*, 2011). Na figura 7 podemos analisar a atual distribuição da infeção por *L. infantum* em cães, na Europa.

O aumento da temperatura média global, causado pelas alterações climáticas, tem contribuído para a expansão geográfica dos vetores flebotomíneos para áreas onde estes não estavam presentes. A infeção está a progredir para o norte da Europa, alcançando os Alpes no norte da Itália (Maroli *et al.*, 2008), os Pirenéus na França (Chamaille *et al.*, 2010) e o norte da Espanha (Amusategui *et al.*, 2004). Nas áreas endémicas, é esperado que no futuro, com as alterações climáticas, os flebótomos aumentem não só o seu período de atividade, mas também o seu número de gerações anuais e a sua densidade (Ready, 2008).

Outros fatores que também têm contribuído para um crescente número de casos clínicos de Lcan registados em países não endémicos, como o Reino Unido (Shaw *et al.*, 2009) e a Alemanha (Menn *et al.*, 2010), tem sido a adoção de animais provenientes de zonas endémicas (Maia & Cardoso, 2015). Num estudo conduzido pela EFSA (2015) pretendeu-se avaliar o risco de introdução da *L. infantum* em zonas não endémicas através da importação de cães infetados e verificou-se que a probabilidade de introdução é apenas elevada caso estejam presentes os vetores competentes, mesmo que em baixas densidades.

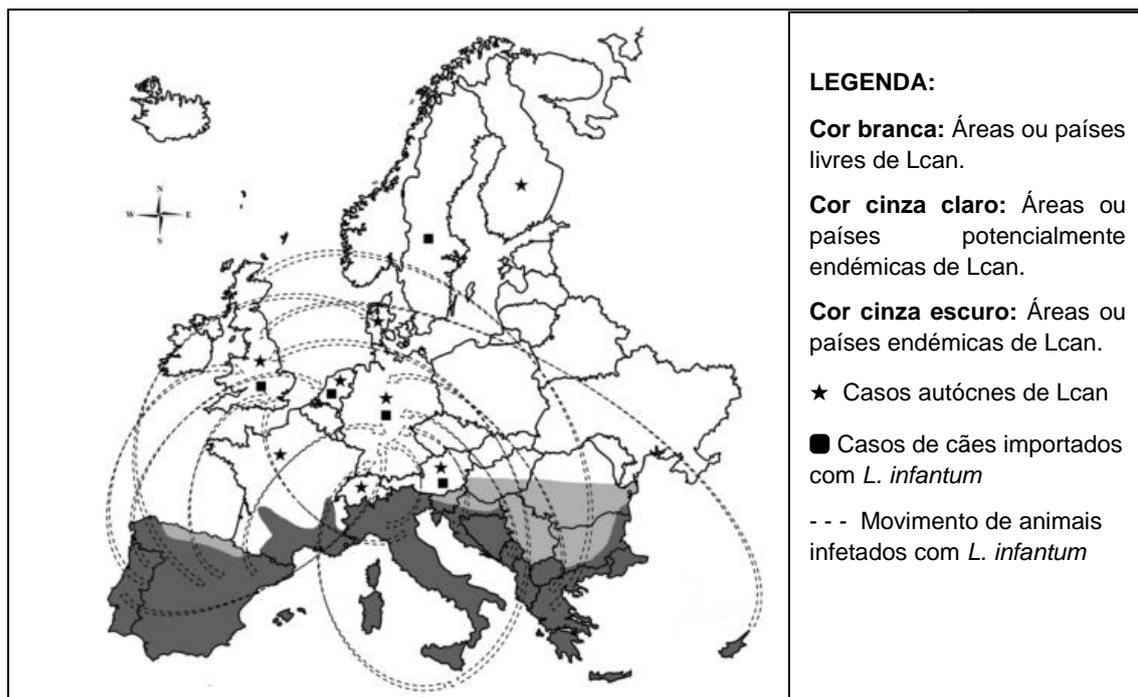


Figura 7 – Distribuição da infeção canina por *L. infantum* na Europa (Adaptado de Maia & Cardoso, 2015).

1.7. PATOGENIA

Os cães infetados podem ser classificados como resistentes ou suscetíveis ao desenvolvimento da Lcan. Esta característica é determinada pelo tipo de resposta celular desenvolvida pelo hospedeiro, que por sua vez está dependente dos linfócitos T, tal como esquematizado na Figura 8.

Animais resistentes desenvolvem uma resposta mediada por células Th1, que é protetora. Nesta resposta de carácter celular, as células T ativadas induzem a atividade leishmanicida dos macrófagos através da libertação de citocinas como o interferon- γ (IFN- γ), Interleucina-2 (IL-2) e o fator de necrose tumoral- α (FNT- α) (Baneth *et al.*, 2008). Os macrófagos produzem óxido nítrico (ON), que por sua vez irá induzir a morte intracelular das formas amastigotas por apoptose (Holzmuller *et al.*, 2006). Os macrófagos conseguem assim controlar a infeção e o hospedeiro permanece assintomático por um longo período de tempo, ou, até mesmo toda a sua vida (Saridomichelakis *et al.*, 2009).

Contrariamente, os animais suscetíveis desenvolvem uma resposta mediada por células Th2, a qual não é protetora. Nesta resposta humoral, as células B são ativadas e são produzidos elevados níveis de anticorpos (Ac), os quais não impedem a progressão da doença e estão associados a uma diminuição da resposta do tipo celular (Brandonisio, 1996). As imunoglobulinas G (Ig G) são as que predominam, mas estão presentes outras em menor concentração, as IgM, IgE e IgA (Reis *et al.*, 2006; Saridomichelakis *et al.*, 2009). Estes anticorpos irão formar imunocomplexos capazes de diminuir a capacidade fagocitária dos macrófagos, e que ativam a via do complemento, que por sua vez agrava a resposta inflamatória nos diferentes tecidos e órgãos (Brandonisio *et al.*, 1990). Consequente à afeção

dos múltiplos órgãos, a doença pode ser manifestada através de sinais clínicos e/ou alterações clínico-patológicas nos exames laboratoriais de rotina (Hemograma, Análises Bioquímicas e Urianálise) (Alvar *et al.*, 2004). A concentração de IgG é correlacionada positivamente com a densidade parasitária nos tecidos e com a severidade dos sinais clínicos (Reis *et al.*, 2006).

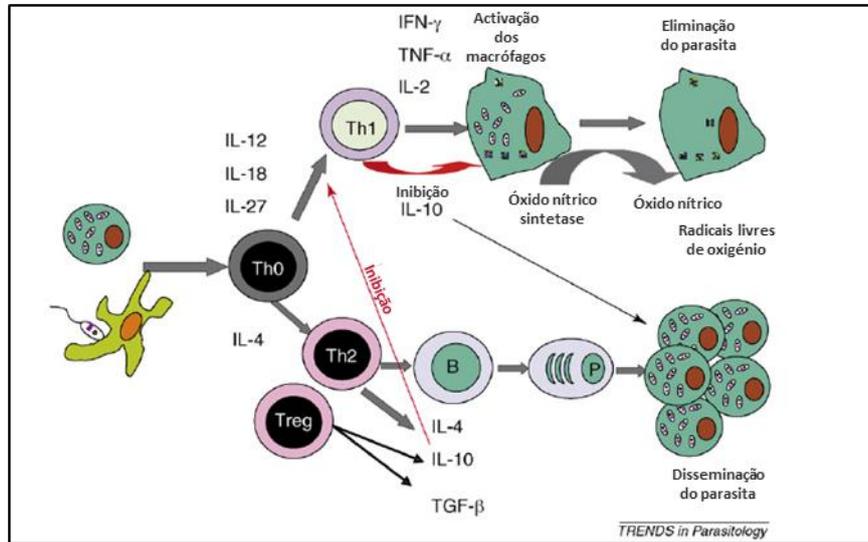


Figura 8 – Resposta imunitária mediada pelas diferentes linhagens de linfócitos, face o contacto com as formas promastigotas de *L. infantum* (Adaptado de Baneth *et al.*, 2008).

A evolução da infecção depende de vários fatores, os quais estão relacionados com o vetor, o parasita e o hospedeiro. Como podemos constatar na Figura 9, os parasitas podem ser eliminados no local (infecção autolimitada), podem ficar sequestrados na pele e linfonodos (infecção assintomática), ou então podem disseminar-se por todo o corpo (infecção assintomática/sintomática) (Saridomichelakis, 2009).

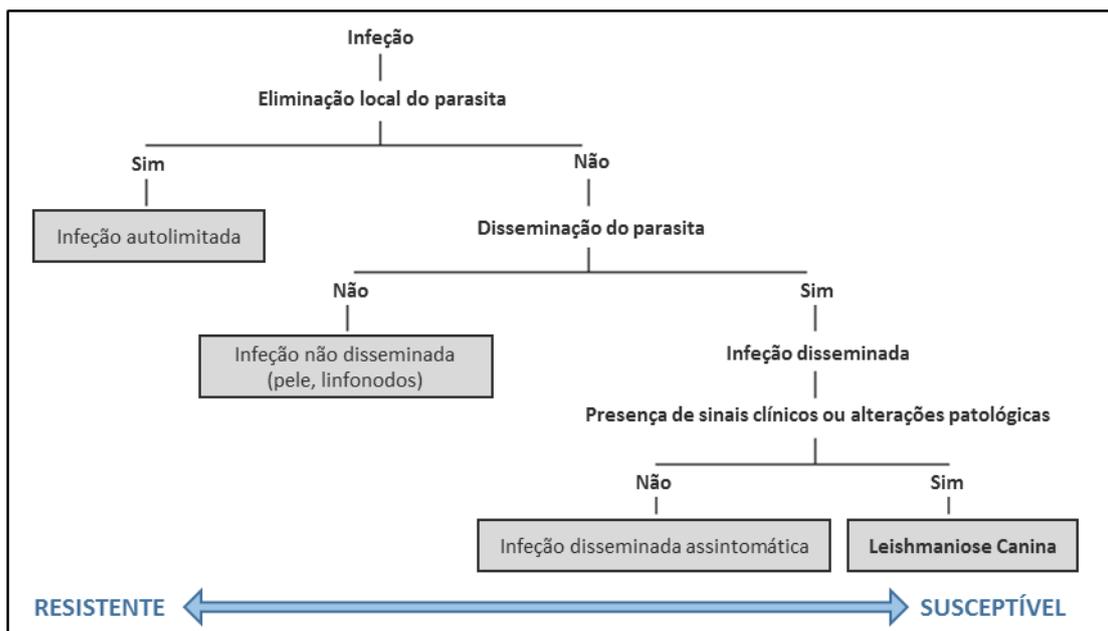


Figura 9 – Diferentes possibilidades de evolução da infecção por *L. infantum* (Adaptado de Saridomichelakis, 2009).

Fatores Predisponentes relacionados com o vetor

Nas zonas endêmicas, um cão ao longo da noite das mais de 100 picadas de flebótomos que pode receber por hora, apenas uma é infetante (Gradoni, 2002). O que significa que animais que passam a noite no exterior permanecem continuamente expostos ao parasita (Baneth & Solano-Gallego, 2012), contribuindo assim não só para o estabelecimento da infeção, mas também para o desenvolvimento da seropositividade e da Lcan (Molina *et al.*, 1994).

A saliva do flebótomo, que é injetada na derme do hospedeiro, apresenta na sua constituição componentes com propriedades vasodilatadoras, anticoagulantes, anestésicas e, também, imunomoduladoras (Ready, 2013). Em estudos realizados em animais de laboratório, a saliva facilita o estabelecimento da infeção, no entanto tal facto ainda não foi confirmado no cão (Molina *et al.*, 1994).

Fatores predisponentes relacionados com o parasita

A virulência do parasita varia consoante as espécies e estirpes de *Leishmania*, o que de certa forma explica o polimorfismo clínico da Leishmaniose nos humanos e nos animais (Baños *et al.*, 2007). Cães infetados com *L. braziliensis* manifestam clinicamente uma forma cutânea ou mucocutânea, enquanto os infetados por *L. infantum* manifestam a doença de forma generalizada, que se pode expressar sobre a forma de lesões cutâneas, oculares, mioesqueléticas e viscerais (Dantas-Torres, 2012). As estirpes apresentam diferentes determinantes patogénicos, mas ainda é necessário efetuar mais estudos sobre de que forma pode influenciar a epidemiologia e patogenia da infeção, ou as manifestações clínicas de Lcan (Saridomichelakis, 2009).

Fatores predisponentes relacionados com o hospedeiro

Numerosos estudos epidemiológicos descreveram diversos fatores associados ao hospedeiro que predispõem o desenvolvimento da Lcan em animais infetados, entre estes a idade, o sexo, a raça, a predisposição genética, estado nutricional, situações de imunossupressão, e o tipo de habitat do animal (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Os resultados obtidos são vários e, por vezes, até mesmo contraditórios. Tal facto pode dever-se a inúmeros motivos: 1) Autores considerarem a seroprevalência como sinónimo de doença, conduzindo a uma sobrestimação da prevalência da doença; 2) Maioria dos estudos avalia as diversas características determinantes de risco em termos percentuais dos animais que foram estudados, e não englobando toda população de cães que é suscetível de contrair doença; 3) Estudos serológicos serem limitados a zonas geográficas específicas (Amusatogui *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 2008).

A idade é um fator determinante, determinados estudos referem uma distribuição bimodal da prevalência da doença, afetando sobretudo animais com idade inferior a 3 anos e superior a 8 anos (Miranda *et al.*, 2008; Galvéz *et al.*, 2010; Miró *et al.*, 2012). No entanto,

outro estudo encontrou uma menor seroprevalência nos animais com menos de dois anos, contrariamente ao grupo dos animais com cinco a oito anos (Cortes *et al.*, 2012).

Existem autores que não consideram o sexo do animal um fator determinante (Alvar *et al.*, 2004; Cortes *et al.*, 2012). No entanto, alguns estudos revelaram uma maior frequência de infecção em machos (Ciaramella *et al.*, 1997; Fisa *et al.*, 1999; Dantas-Torres *et al.*, 2006; Miranda *et al.*, 2008).

Diversos estudos têm vindo a ser efetuados para identificar os genes que possivelmente podem estar implicados na suscetibilidade dos humanos e dos cães para o desenvolvimento da doença (Baneth *et al.*, 2008). Verificou-se que os fatores genéticos envolvidos na suscetibilidade do cão à Lcan estão associados a polimorfismos e mutações da zona promotora do gene *Solute carrier family 11 member a1* (Slc11c1), designado anteriormente por N-RAMPI, e à presença do haplótipo TAG-8-141 especificamente na raça Boxer (Sanchez-Robert *et al.*, 2008) Também se verificou um maior risco de infecção em animais que apresentam determinados alelos de genes do complexo de histocompatibilidade maior tipo II (CMH II), como por exemplo o alelo DLA-DRB1*01502 (Quinnell *et al.*, 2003).

Segundo Cortes *et al.* (2012), animais de raça cruzada são menos propensos à infecção que os de raça pura. Animais das raças Boxer, Cocker Spaniel, Rottweiler, Doberman e Pastor Alemão revelaram ser mais suscetíveis ao desenvolvimento da doença (França-Silva *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 2008). Já os cães pertencentes à raça Podengo Ibérico, ou animais cruzados, revelam ser mais resistentes. Estes, apresentam esta característica graças a uma resposta imunitária do tipo celular muito marcada e raramente manifestam sinais clínicos (Solano-Gallego, 2000). Num estudo efetuado por França-Silva *et al.* (2003) verificou-se que os cães de pelo curto são mais afetados do que os que apresentam um pelo longo, apesar dos flebotomos terem preferência pela face interna do pavilhão auricular (Campino, 2002).

Normalmente, a presença de co-morbilidades favorece a manifestação da Lcan, particularmente em animais mais velhos (Baneth *et al.*, 2008). Foram reportadas conjuntamente com a Lcan, infeções e parasitoses (erliquiose, babesiose, anaplasiose, bartonelose, hepatozonose, dirofilariose, espirocercose, demodecose, sarna sarcóptica), doenças imunomediadas (pemphigus foliaceus, lúpus eritematoso sistémico), endocrinopatias (hipotireoidismo), e várias neoplasias (hemangiosarcoma, linfoma, mieloma, histiocitoma, tumor venéreo transmissível) (Ferrer, 2004; Saridomichelakis, 2009). A supressão da resposta imunitária celular que caracteriza a Lcan irá aumentar a suscetibilidade dos animais para adquirir outras doenças. Também se verifica o oposto, um animal que tenha sido previamente infetado, mas que tenha desenvolvido resistência ao parasita, na presença de uma destas doenças o seu sistema imunitário irá ficar debilitado, permitindo a multiplicação do parasita e consequente desenvolvimento da Lcan (Ferrer, 2004; Miranda *et al.*, 2008; Saridomichelakis, 2009).

Existem outros fatores que provocam imunossupressão tornando os animais mais suscetíveis à evolução da Lcan, como por exemplo determinados medicamentos utilizados no

tratamento de doenças autoimunes (Miranda *et al.*, 2008), ou, subnutrição em cães vadios (Campino, 2002; Miranda *et al.*, 2008).

1.8. SINAIS CLÍNICOS

A Leishmaniose Canina é uma doença sistémica de carácter crónico nos cães, podendo manifestar-se através de uma grande variedade de sinais clínicos não específicos, como podemos observar na Figura 10 alguns exemplos (Baneth & Solano-Gallego, 2012). Tal como referido anteriormente, o número de animais assintomáticos é muito superior ao número de animais sintomáticos. A infeção por *L. infantum* nos cães é, normalmente, classificada como uma forma visceral, à semelhança dos humanos, no entanto, geralmente os cães apresentam não só envolvimento visceral, como cutâneo (Campino, 2002; Baneth & Solano-Gallego, 2012).

Os animais infetados eram apenas classificados consoante a presença de sinais clínicos em animais assintomáticos, oligossintomáticos e polisintomáticos. Dadas as suas limitações, foi proposto pelo grupo LeishVet um sistema de classificação que permite o estadiamento dos cães infetados em quatro diferentes graus, consoante os sinais clínicos, os resultados serológicos e alterações laboratoriais verificadas. Para cada estágio de classificação foi proposto um tratamento e estimado um prognóstico (Solano-Gallego *et al.*, 2009, 2011).

As manifestações cutâneas são as lesões descritas mais comuns, estando presentes em, aproximadamente, 80% a 90% dos casos clínicos (Campino, 2002; Baneth, 2008; Cortes *et al.*, 2012). A prevalência das diferentes formas de manifestação cutânea é muito semelhante entre os animais presentes em zonas endémicas e não endémicas, apesar de nos últimos, estes não serem expostos a repetidas picadas de flebótomos infetados e, conseqüentemente, não haver uma estimulação contínua do sistema imune da derme (Perego *et al.*, 2014). As alterações mais observadas são a dermatite exfoliativa, a dermatite ulcerativa, a dermatite papular e a onicogripose (Koutinas & Koutinas, 2014). Num estudo realizado em Itália verificou-se que em 100 cães com Leishmaniose cerca de 74% apresentavam dermatite exfoliativa, 18% dermatite ulcerativa e 11% dermatite nodular, sendo as lesões generalizadas em 49% dos casos, enquanto em 51% dos cães as lesões eram localizadas, sobretudo nas margens dos pavilhões auriculares, cabeça e zonas de pressão (Perego *et al.*, 2014).

A onicogripose é um sinal clínico tardio, de carácter crónico, que se encontra presente em 20-30% dos cães com Lcan (Baneth *et al.*, 2008; Cortes *et al.*, 2012). Clinicamente consiste numa hipertrofia e aumento da curvatura das unhas, devido ao sobrecrecimento excessivo do estrato córneo. Esta alteração normalmente está associada à dermatite exfoliativa (Koutinas & Koutinas, 2014).

Os cães com Lcan podem exibir outros sinais cutâneos menos frequentes como, a dermatite papular, despigmentação nasal, dermatite por lambadura (acral), doença tipo alopecia areata ou doença tipo pemphigus foliaceus e ainda o eritema multiforme (Koutinas & Koutinas, 2014).

As lesões cutâneas de Lcan podem passar despercebidas na presença de outros problemas cutâneos coexistentes (ex.: sarna sarcóptica, hipotiroidismo, dermatite atópica,

neoplasma nodular e/ou ulcerativo, micoses sistêmicas ou subcutâneas), ou, devido a complicações como, pioderma bacteriano, dermatofitose, dermatite por *Malassezia* e demodecose popular (Koutinas & Koutinas, 2014).



Figura 10 – Exemplos de diferentes manifestações cutâneas exibidas por animais com Leishmaniose Canina. 1 - Animal caquético com dermatite exfoliativa e presença de ulcerações nas proeminências ósseas; 2 - Dermatite exfoliativa localizada na zona da cabeça e face externa da orelha; 3 - Ulceração no pescoço; 4 - Onicogripose; 5 – Blefarite ulcerativa e nodular, conjuntivite purulenta e uveíte anterior com opacidade da córnea e neovascularização; 6 – Animal com miosite dos músculos mastigadores (Adaptado de Koutinas & Koutinas, 2014).

A linfadenomegália generalizada é um dos sinais clínicos mais característicos da Lcan, encontrando-se presente em 62-90% dos animais (Lima *et al.*, 2004; Baneth *et al.*, 2008; Cortes *et al.*, 2012). Os linfonodos apresentam duas a seis vezes mais o seu tamanho aumentado (Baneth & Solano-Gallego, 2012).

A hepatomegalia é considerada um sinal clássico de Lcan, no entanto, em diversos estudos realizados, esta alteração não é detetada aquando a realização do exame clínico, pelo que é considerado apenas um achado patológico (Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999; Rallis *et al.*, 2005). A esplenomegalia é um achado clínico muito comum nos cães com Leishmaniose, especialmente em animais com expressão clínica da doença (Koutinas & Koutinas, 2014).

A perda de peso é um sinal que foi reportado em cerca de 10-48% dos animais com Lcan. No entanto, apesar de ser um sinal frequente, a presença de anorexia é rara (Campino, 2002; Baneth *et al.*, 2008).

A presença de febre é ocasional e geralmente a temperatura é inferior a 39,5°C (Campino, 2002)

A sintomatologia gastrointestinal é pouco frequente ou mesmo rara e, normalmente, quando presente está associada a uma falência renal crônica ou hepática (Campino, 2002; Adamama-Moraitou *et al.*, 2007; Koutinas & Koutinas, 2014).

É comum os animais apresentarem as mucosas pálidas e, frequentemente, apresentam erosões nas mucosas oral e nasal (Campino, 2002; Baneth *et al.*, 2008)

Lesões ósseas e articulares são comuns em animais infetados. Num estudo em 58 animais infetados verificou-se que 45% destes apresentavam claudicação, a qual foi associada a processos de poliartrite (Agut *et al.*, 2003). As poliartrites não erosivas são as mais frequentes, podendo estar associadas a sinovites (Blavier *et al.*, 2001). No entanto, apesar de a claudicação estar normalmente relacionada com a presença de afeção articular, esta pode estar associada à presença de outras afeções como neuralgia, ulceração das almofadas plantares, poliomiosite e osteomielite (Koutinas & Koutinas, 2014). Lesões osteolíticas e/ou osteoproliferativas consequentes à infeção também condicionam gravemente a locomoção dos animais (Agut *et al.*, 2003; Koutinas & Koutinas, 2014).

A atrofia muscular é um sinal clínico pouco frequente, e deve-se a uma poliomiosite crônica (Blavier *et al.*, 2001; Koutinas & Koutinas, 2014). Normalmente os músculos faciais (músculos temporais e masséter) são os mais afetados, e apesar de se verificar uma atrofia muscular severa, o processo de mastigação não é acometido. A musculatura apendicular também pode estar afetada, neste caso o animal manifesta debilidade muscular progressiva, claudicação e intolerância ao exercício (Vamvakidis *et al.*, 2000; Koutinas & Koutinas, 2014).

Sinais clínicos como epistaxis, hematúria e diarreia hemorrágica devem-se à ulceração de tecidos e alterações na hemóstase primária e secundária (Ciaramella & Corona, 2003; Baneth *et al.*, 2008). As alterações hemostáticas descritas na Lcan incluem alterações na agregação plaquetária, que conduzem a uma disfunção plaquetária, trombocitopenia, redução da fibrinólise e fatores de coagulação (Ciaramella *et al.*, 2005). Cerca de 6 a 10% dos animais com Lcan apresentam episódios de epistaxis. A presença de epistaxis profusa pode ser o único sinal clínico apresentado pelo animal e pode ser fatal caso haja muita perda de sangue (Baneth *et al.*, 2008).

A prevalência de lesões oculares descrita em cães com Lcan oscila entre 16% e 81%, podendo ser a única manifestação clínica em 16% dos casos clínicos (Baneth *et al.*, 2008) A manifestação ocular mais frequente é a uveíte anterior, caracterizada por edema, miose, formação de fibrina na câmara anterior e múltiplos nódulos no estroma da íris. A uveíte posterior é diagnosticada com menor frequência e acompanha a uveíte anterior. O animal pode manifestar outros sinais como conjuntivite, blefarite, queratite, queratoconjuntivite seca, endoftalmite, corioretinite multifocal acompanhada de descolamento da retina e hemorragias retinianas (Peña *et al.*, 2000; Koutinas & Koutinas, 2014).

A doença renal pode ser a única manifestação clínica da doença e pode progredir de uma ligeira proteinúria assintomática a um síndrome nefrótico, ou mesmo, a falência renal

crónica, acompanhada de glomerulonefrite, nefrite tubulointersticial e amiloidose. As alterações laboratoriais indicativas de falência renal, nomeadamente, azotémia com elevação dos níveis de creatinina e de ureia séricas, apenas se evidenciam quando a maioria dos nefrónios estão disfuncionais, isto é, na fase tardia da doença. (Baneth *et al.*, 2008) A falência renal crónica é a maior causa de mortalidade nos cães com Lcan (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Consequente à insuficiência renal crónica, ou à diminuição da eritropoiese associada à evolução crónica da doença, os animais vão apresentar-se anémicos, condição a qual pode ser agravada pela perda de sangue, ou pela destruição imuno-mediada dos glóbulos vermelhos (Baneth *et al.*, 2008).

Não existe uma relação clara entre a Lcan e a afeção cardiorrespiratória (Koutinas & Koutinas, 2014). No entanto, num estudo desenvolvido por Cortadellas *et al.* (2006) verificou-se a presença de hipertensão sistémica secundária a glomerulonefrite, a qual pode estar presente nas fases iniciais de afeção renal. Cerca de 91,4% destes animais hipertensos apresentavam hipertrofia do ventrículo esquerdo.

Os sinais respiratórios são raros e não estão bem documentados. Foram reportados por Slappendel (1988) e Koutinas *et al.* (1999) casos de animais com rinite e pneumonia, provavelmente devido a inflamação da mucosa (Blavier *et al.*, 2001).

O quadro neurológico é raro. A meningoencefalomielite associada a Lcan pode ser responsável por vários sinais neurológicos, desde convulsões, dor e rigidez do pescoço e paraplegia (Vinuelas *et al.*, 2001; Koutinas & Koutinas, 2014).

1.9. ALTERAÇÕES LABORATORIAIS

As alterações hematológicas verificadas na Lcan não são específicas, no entanto estas são fundamentais, sobretudo em casos duvidosos. Em alguns casos podem ser a única indicação de Lcan em animais assintomáticos (Paltrinieri *et al.*, 2016).

A nível do hemograma verifica-se a presença de uma anemia normocítica, normocrómica não regenerativa, suave a moderada. A anemia está presente na maioria dos animais com Leishmaniose devido à insuficiência renal crónica (IRC) ou à redução da eritropoiese, podendo agravar-se com perdas de sangue ou destruição imunomediada dos eritrócitos (Ciaramella *et al.*, 1997; Paltrinieri *et al.*, 2016). Podem surgir outras alterações inconsistentes como, a leucocitose ou suave leucopénia, neutrofilia ou neutropénia, eosinofilia ou eosinopénia, linfocitose ou linfopénia, monocitose ou monocitopénia (Ciaramella *et al.*, 1997; Noli & Saridomichelakis, 2014). Também podem estar presentes alterações como trombocitopenia, trombocitopatia, prolongamento do tempo de trombina e do tempo de trombolastina parcial ativada e aumento dos produtos de degradação do fibrinogénio / fibrina, as quais são indicativas de distúrbios na hemostase primária, na coagulação e na fibrinólise. Estas alterações da hemostase são mais evidentes em animais sintomáticos com lesões hepáticas e/ou renais, uma vez que condicionam a síntese de fatores de coagulação e a função plaquetária, respetivamente (Moreno, 1999; Ciaramella *et al.*, 2005).

As alterações do proteinograma (Figura 11) são muito frequentes em cães com Leishmaniose Canina, dado as proteínas da fase aguda encontrarem-se elevadas no plasma sanguíneo. Verifica-se uma hiperproteinémia sérica com hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, originando uma diminuição do *rácio* albumina/globulina (RAG) (Baneth & Solano-Gallego, 2012). É frequente verificar-se hiperglobulinémia policlonal β e γ , enquanto a gamopatia monoclonal é menos comum (Ciaramella *et al.*, 1997; Noli & Saridomichelakis, 2014). Animais pertencentes a zonas endémicas de *L. infantum*, ou animais que tenham viajado para estas zonas, que apresentem hiperglobulinémia policlonal beta e gamma, sem causa aparente de doença, devem ser avaliados para uma possível infeção por *Leishmania* (Baneth & Solano-Gallego, 2012).

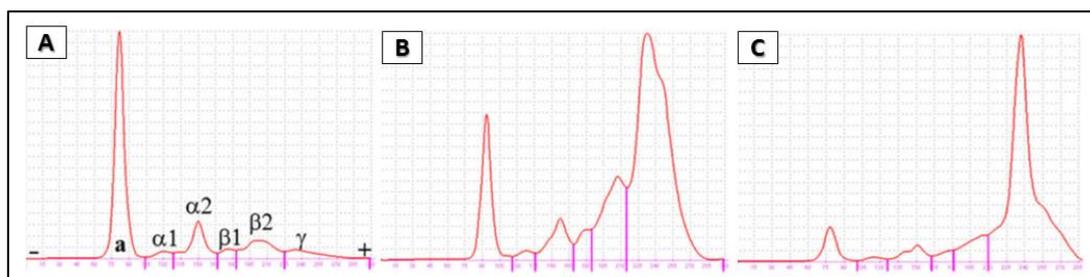


Figura 11 – Proteinogramas séricos de um animal saudável (A) e animais com Leishmaniose Canina (B-C). A - Proteinograma sérico normal (a=albumina; α 1, α 2, β 1, β 2, γ = frações de globulinas); B - Proteinograma sérico com hipoalbuminémia e característico de gamopatia policlonal; C - Proteinograma sérico com hipoalbuminémia e característico de gamopatia monoclonal (Adaptado de Paltrinieri *et al.*, 2016).

Ao avaliar o perfil bioquímico hepático em alguns animais verifica-se um aumento suave da atividade das enzimas hepáticas como a alanina amonitransferase (ALT), a fosfatase alcalina (FAS) e a gama-glutamil transferase (GGT), e ainda aumentos suaves da bilirrubina total e dos ácidos biliares pós-prandiais (Ciaramella *et al.*, 1997; Rallis *et al.*, 2005; Baneth & Solano-Gallego, 2012; Noli & Saridomichelakis, 2014). Apenas uma pequena minoria dos animais com Leishmaniose é que apresentam uma grande elevação da atividade das enzimas hepáticas (Baneth & Solano-Gallego, 2012).

A maioria dos animais apresenta proteinúria e alterações renais (Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999; Rallis *et al.*, 2005), e à medida que os imunocomplexos se depositam no rim desenvolve-se glomerulonefrite, que evolui para insuficiência renal (IR) (Baneth & Solano-Gallego, 2012). São poucos os animais com azotémia renal (Baneth & Solano-Gallego, 2012) e os sinais clínicos apenas surgem quando já existe uma lesão severa do rim (Ciaramella *et al.*, 1997). De forma a instituir a melhor terapêutica e conseguir estimar o prognóstico torna-se importante quantificar a proteína na urina, verificar a gravidade específica da urina e avaliar a função renal através da medição de “Blood Urea Nitrogen” (BUN), creatinina e fósforo inorgânico plasmáticos (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Pode-se avaliar inicialmente a presença de proteína na urina através de uma tira reativa, e caso o resultado seja positivo, é recomendado efetuar a classificação do grau de proteinúria através do *rácio*

proteína / creatinina na urina (RPC) (Paltrinieri *et al.*, 2016). A densidade urinária específica normalmente encontra-se diminuída (Koutinas *et al.*, 2001).

Também podem estar presentes outras alterações laboratoriais que são menos comuns e que, normalmente não são importantes para a decisão clínica (Paltrinieri *et al.*, 2016). O aumento da atividade de enzimas como a creatina quinase e a lactato desidrogenase são indicativos de miosite (Paltrinieri *et al.*, 2016). Testes de anticorpos antinucleares podem-se revelar positivos em animais com Lcan, especialmente em animais em que coexistem outro tipo de infeções (Baneth & Solano-Gallego, 2012).

Na tabela 2 encontram-se sumarizadas as principais alterações laboratoriais referidas, que podem ser detetadas em animais com Leishmaniose Canina.

PRINCIPAIS ALTERAÇÕES LABORATORIAIS	FREQUÊNCIA (%)
Hiperproteinémia	63,3-72,8
Hiperglobulinémia	76-100
Hipoalbuminémia	68-94
Diminuição do RAG^a	76
Azotémia	16-45
Aumento da actividade da FAS^b	16-51
Aumento da actividade da ALT^c	16-61
Proteinúria	71,5-85
Anémia	60-73,4
Leucocitose	24
Leucopénia	22
Trombocitopénia	29,3-50

Tabela 2 - Frequência das alterações laboratoriais mais frequentemente presentes em animais com Leishmaniose Canina (Adaptado de Solano-Gallego, 2011). ^aRácio albumina / globulina, ^bFosfatase alcalina, ^cAlanino Aminotransferase

1.10. DIAGNÓSTICO

O motivo que normalmente conduz à realização do diagnóstico da infeção por *L. infantum* é a necessidade de confirmar a presença da doença em animais clínicos e/ou laboratorialmente suspeitos de Lcan. No entanto, a deteção da infeção pode ser realizada por outros motivos, nomeadamente: 1) Fins científicos; 2) Avaliar o número de animais clinicamente saudáveis presentes nas zonas endémicas; 3) Prevenir a transmissão através de transfusões sanguíneas; 4) Evitar a importação de cães infetados para países não endémicos; 5) Monitorizar a resposta ao tratamento (Baneth & Solano-Gallego, 2012).

O diagnóstico da Lcan é bastante complexo e pode incluir diversos diagnósticos diferenciais, devido a uma série de fatores que já foram referidos em capítulos anteriores: 1) Cada animal infetado pode apresentar uma diferente resposta imunitária; 2) A doença pode manifestar-se numa grande variedade de sinais clínicos e alterações clínico-patológicas inespecíficas; 3) Os animais podem encontrar-se infetados com outras doenças infecciosas ou não concomitantes. (Baneth & Solano-Gallego, 2012). Assim sendo, para o diagnóstico é

necessário fazer uma abordagem que integre um conjunto de informações: dados epidemiológicos, anamnese, sinais clínicos compatíveis, alterações clínico-patológicas e exames específicos de diagnóstico (Noli & Saridomichelakis, 2014).

Os testes específicos podem ser classificados como: **diretos**, caso permitam a confirmação da presença do parasita ou dos seus componentes, ou, **indiretos**, caso detetem a resposta imunitária do animal face ao parasita. Testes indiretos como a serologia podem, ou não, indicar a presença de uma infeção, mas testes diretos como a citologia, histologia, imunohistoquímica, PCR, cultura e o xenodiagnóstico, permitem demonstrar que o animal se encontra infetado por *Leishmania* spp. (Paltrinieri *et al.*, 2016).

A condução de um diagnóstico para animais com Leishmaniose ainda é uma questão de alguma controvérsia e opiniões contraditórias levam ao sobre-uso, desuso e/ou mal interpretação de alguns resultados (Noli & Saridomichelakis, 2014). De momento, como não existe nenhum teste 100% específico e sensível, é essencial conhecer as limitações de cada teste de diagnóstico (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Dependendo do motivo do diagnóstico varia o teste de diagnóstico empregue, bem como a forma como o seu resultados é interpretado, tal como podemos verificar na Figura 12.

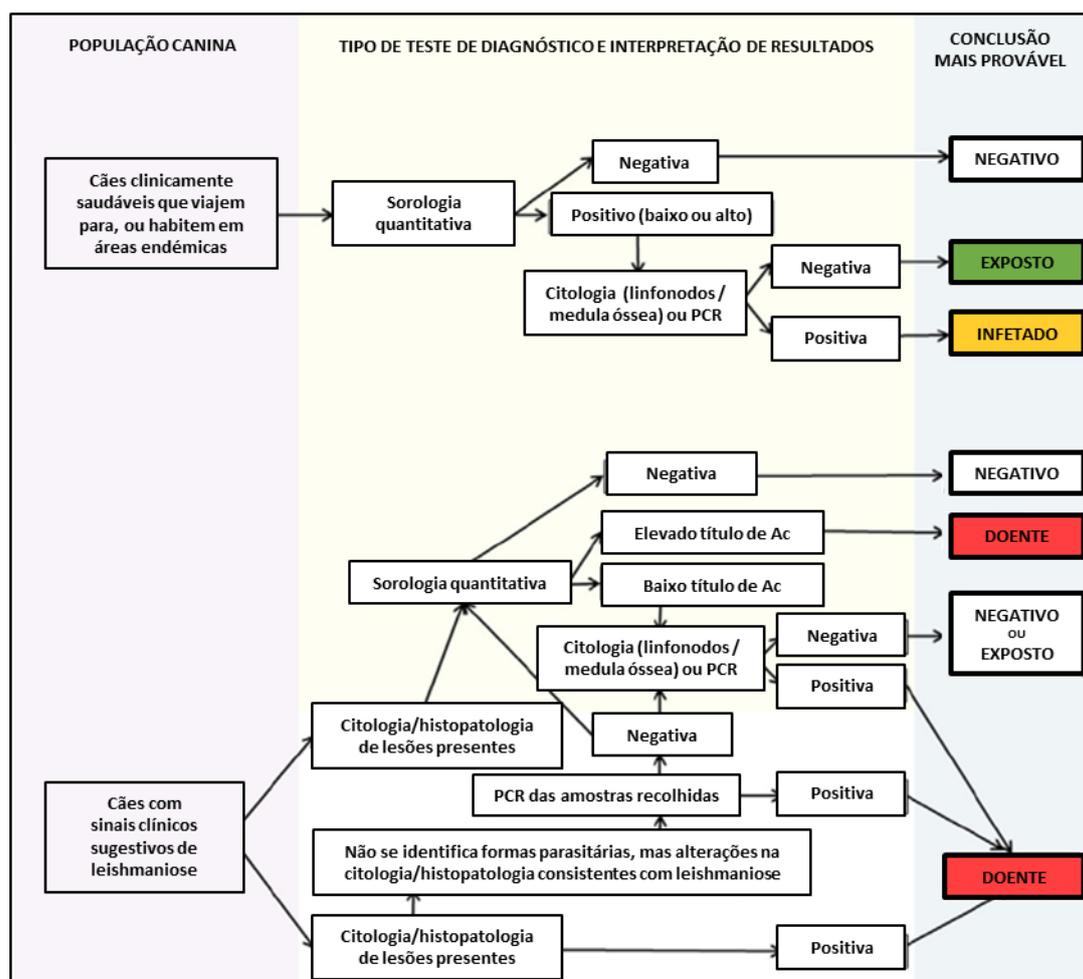


Figura 12 - Abordagem diagnóstica recomendada para cães clinicamente saudáveis que habitam ou viajaram para uma zona endémica, ou, para cães que apresentam sinais clínicos consistentes com Leishmaniose (Adaptado de Paltrinieri *et al.*, 2016).

1.10.1. Diagnóstico Parasitológico

Um diagnóstico positivo conclusivo só é possível através da demonstração do parasita. O diagnóstico parasitológico é feito ao identificar formas amastigotas de *Leishmania* em amostras de lesões cutâneas e/ou órgãos hematopoiéticos (linfonodos, medula óssea, fígado e baço), através da observação microscópica (Alvar *et al.*, 2004; Saridomichelakis *et al.*, 2005). O parasita raramente é detetado em esfregaços de sangue periférico (Baneth & Solano-Gallego, 2012). Os métodos de identificação morfológica apresentam a limitação de apenas permitir identificar o parasita até ao género, não possibilitando a distinção entre espécies/subespécies (OIE, 2014).

Avaliação citológica

A citologia é um método de diagnóstico simples e de baixo custo, que requer pouco material e permite obter um resultado rápido (Noli & Saridomichelakis, 2014).

Noli e Saridomichelakis (2014) recomendam na prática clínica a realização de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) dos linfonodos em todos os cães suspeitos de infeção, numa primeira abordagem. Tal motivo prende-se ao facto de ser um procedimento minimamente invasivo e de fácil execução, dada a elevada prevalência de linfadenomegália periférica, permitindo o diagnóstico da infeção na maioria dos casos. Em animais com lesões cutâneas também recomendam a realização de citologias, com material recolhido através de esfregaços de pele. Apenas quando não são identificadas formas amastigotas nestas amostras é que é aconselhável realizar a PAAF de outras amostras biológicas (Noli & Saridomichelakis, 2014). A citologia é um teste de elevada especificidade, especialmente em animais sintomáticos (Saridomichelakis *et al.*, 2005). A sensibilidade desta técnica não é muito elevada, estando referidas sensibilidades de 30 a 50% para amostras dos linfonodos, e de 60 a 75% para amostras de medula óssea (Alvar *et al.*, 2004; Ferrer, 1999). No entanto, outro estudo identificou formas amastigotas em 93% das amostras de medula óssea e linfonodos de cães naturalmente infetados com *L. infantum* (Rosypal *et al.*, 2005). A sensibilidade está dependente não só da densidade de parasitas presentes na amostra biológica (Saridomichelakis *et al.*, 2005), como, também, depende da qualidade da preparação da citologia, da experiência do examinador e do tempo dedicado à sua análise, bem como, o número de campos observados (Noli & Saridomichelakis, 2014). Normalmente, o resultado é negativo em animais infetados clinicamente saudáveis (Saridomichelakis *et al.*, 2005). Assim sendo, um resultado positivo não só demonstra a presença da infeção como também aumenta a probabilidade de aqueles sinais clínicos que o animal manifesta estarem relacionados com a Lcan (Noli & Saridomichelakis, 2014).

Avaliação histopatológica

A análise histopatológica dos órgãos infetados corados com hematoxilina e eosina (HE) é utilizada quando o resultado da citologia é negativo, mas apresenta características altamente consistentes com Leishmaniose (Paltrinieri *et al.*, 2016). Este método de diagnóstico, quando

comparado com a citologia e a técnica “Polymerase chain reaction” (PCR) apresenta três grandes desvantagens: é mais laborioso, despende mais tempo e a identificação das formas amastigotas é mais difícil comparativamente às amostras citológicas. No entanto, apresenta a vantagem de permitir informação adicional sobre a arquitetura tecidual das lesões (Noli & Saridomichelakis, 2014; Paltrinieri *et al.*, 2016). O diagnóstico histopatológico pode ser confirmado por outros métodos suplementares como, a imunohistoquímica, hibridização “in situ” ou PCR, em espécies fixadas com formalina, ou, embebidas em parafina (Paltrinieri *et al.*, 2016).

É uma técnica que apresenta uma sensibilidade inferior à da citologia (Maia & Campino, 2008b), especialmente devido ao tamanho reduzido do parasita (formas amastigotas reduzem o seu tamanho com a fixação da formalina) e às propriedades subótimas da HE (Noli & Saridomichelakis, 2014).

Cultura do Parasita e Xenodiagnóstico

Atualmente estes testes não são recomendados para a prática clínica, apenas são utilizados na investigação científica, dado não serem práticos e apenas poderem ser realizados em laboratórios especializados de referência (Paltrinieri *et al.*, 2016).

Os métodos de isolamento e cultura do parasita podem ser realizados “*in vitro*”, em meios de cultura não específicos de Leishmaniose, ou, “*in vivo*” em animais suscetíveis, como o hamster sírio (*Mesocricetus auratus*) (OIE, 2014). Estas culturas teciduais, não só confirmam a presença do parasita, mas, também, demonstram que os protozoários estão viáveis (Paltrinieri *et al.*, 2016).

O xenodiagnóstico é uma técnica que permite a deteção e isolamento do parasita utilizando uma colónia de flebótomos. Estes flebótomos irão alimentar-se do sangue dos cães infetados, sendo depois examinados para verificar a presença de promastigotas no intestino (Paltrinieri *et al.*, 2016).

1.10.2. Diagnóstico Molecular

Segundo Noli e Saridomichelakis (2014) só está indicada a realização de técnicas moleculares quando os casos são fortemente suspeitos de Lcan e já foram descartados outros possíveis diagnósticos diferenciais, mas cujos resultados das técnicas serológicas e/ou observação direta do parasita (ex.: citologia e/ou histopatologia) são inconclusivos.

Os métodos baseados no PCR aplicados à identificação de *Leishmania* não só são mais eficazes a determinar a presença e a identificar o protozoário em casos ativos de doença, como também permitem monitorizar a cura parasitológica após quimioterapia. Esta técnica permite amplificar quantidades muito reduzidas de sequências específicas de ácido desoxirribonucleico (DNA), de modo a posteriormente serem mais facilmente identificadas (Maia & Campino, 2008b).

O material biológico mais apropriado para a realização da técnica de PCR deve ser o aspirado de medula óssea, linfonodos, sangue e conjuntiva em animais com sinais sistémicos,

pele em animais com lesões cutâneas e conjuntiva de animais com sinais oculares (Martínez *et al.*, 2011). Estudos que avaliaram o desempenho da técnica de PCR em diferentes tecidos de animais infetados obtiveram resultados variáveis e por vezes até conflituosos (Baneth & Aroch, 2008). Esta variação na sensibilidade pode ser explicada com base na distribuição heterogênea dos parasitas em cada tecido, ou, em alternativa, à carga parasitária presente no órgão associada ao tropismo da espécie de *Leishmania*, ou à resposta imunitária local. Maia propõe que, numa primeira abordagem, o material deve ser recolhido nos linfonodos, mas caso os linfonodos poplíteos não sejam detetáveis deve-se optar por recolher uma amostra da medula óssea (Maia *et al.*, 2007).

Um único resultado negativo de PCR num animal clinicamente suspeito de Leishmaniose não é suficiente para descartar a presença da infeção.

Um resultado positivo apenas significa que o cão foi infetado e não que a infeção seja a causa dos sinais clínicos apresentados. É possível ocorrerem resultados falsos positivos, especialmente durante a época de transmissão devido à contaminação natural ou à infeção transitória do animal (Maia & Campino, 2008b).

A eficácia desta técnica está dependente de outros fatores, como, os “primers” usados, o número de cópias do alvo, o método de extração do DNA, o material biológico utilizado e o protocolo de PCR (Alvar *et al.*, 2004; Maia & Campino, 2008b).

O PCR em tempo real é uma variação da técnica convencional, que é mais atrativa por permitir quantificar a carga parasitária presente nos tecidos, informação útil não só para o diagnóstico, como também para a monitorização da resposta ao tratamento, permitindo antecipar possíveis recorrências da doença com base na carga parasitária residual após o tratamento. Adicionalmente apresenta alto desempenho e velocidade, baixo risco de contaminação e uma maior sensibilidade quando comparado com tecnologia de PCR convencional (Maia & Campino, 2008b).

1.10.3. Diagnóstico Serológico

A deteção de Ac IgG específicos de *Leishmania* através de testes serológicos é a abordagem inicial mais frequente no diagnóstico de Lcan (Bourdeau *et al.*, 2014) e, também, na realização de estudos científicos (Solano-Gallego *et al.*, 2014). Os testes serológicos mais frequentemente utilizados são o “indirect immunofluorescent antibody test” (IFAT), “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) e a imunocromatografia. No entanto, existem muitas outras técnicas serológicas que podem ser usadas, como “Western blotting”, teste de aglutinação de latex, deteção de anticorpos através de sensores imunes e citometria de fluxo (Paltrinieri *et al.* 2016).

A seroconversão pode ocorrer logo um mês após a exposição do animal a flebótomos infetados, mas o tempo médio estimado é de cinco meses na infeção natural (Moreno & Alvar, 2002). Assim sendo, cães que habitam nas zonas endémicas podem seroconverter-se durante o período ativo de transmissão da Leishmaniose (Oliva *et al.*, 2006).

Os métodos quantitativos (IFAT e ELISA) permitem a quantificação através das titulações de anticorpos ou densidade ótica observada, permitindo classificar o nível de Ac presentes. A sua *performance* de diagnóstico é superior aos métodos qualitativos (Solano-Gallego *et al.*, 2014).

Segundo Paltrinieri *et al.* (2016), em cães com sinais clínicos e alterações clinicopatológicas altamente compatíveis com Lcan, o teste de eleição deve ser uma serologia quantitativa. Sobretudo, quando não é possível a realização de uma PAAF, por ausência de lesões, ou, quando a citologia não revela padrão característico de Leishmaniose, independentemente de um teste de PCR positivo. Assim, sempre que se verifique a presença de título de Ac elevado, este resultado é consistente com a presença da infecção, mas caso o título de Ac for baixo, é indicativo de uma fase inicial da infecção, ou apenas da exposição do animal ao parasita. Um resultado negativo não exclui a existência de infecção, uma vez que há animais que demoram algum tempo a desenvolver a resposta humoral e a atingir títulos de anticorpos considerados positivos. Assim, animais clinicamente suspeitos, ou com resultados duvidosos, devem repetir o teste passadas 4 a 6 semanas, ou recorrer a outro tipo de teste (Solano-Gallego *et al.*, 2014).

A sensibilidade destes testes é muito elevada devido à exagerada resposta imune humoral por parte dos cães (Noli & Saridomichelakis, 2014). O título de anticorpos tem apresentado uma relação direta com os sinais clínicos apresentados. (Reis *et al.*, 2006).

A especificidade também é muito elevada em áreas não endémicas de determinados agentes patogénicos, que podem ser responsáveis por resultados falso-positivos, devido a reações cruzadas, sendo, normalmente, os títulos de Ac são baixos (Noli & Saridomichelakis, 2014). Verificou-se este fenómeno de reação cruzada especialmente em animais infetados com o protozoário *Trypanosoma cruzi*, mas pode ocorrer, de forma esporádica, em animais que se encontram infetados por agentes patogénicos, como *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Toxoplasma Gondii*, *Neospora caninum* e *Hepatozoon canis*. Também podem surgir falsos-positivos por reações cruzadas com outras espécies de *Leishmania*, em testes que usam antígenos brutos do parasita (Solano-Gallego *et al.*, 2014).

O **IFAT** é considerado por alguns autores o “gold standard” dos testes serológicos, devido à sua elevada sensibilidade e especificidade (Maia & Campino, 2008b; Paltrinieri *et al.*, 2016).

No entanto, a sua interpretação poder ser subjetiva dependendo das competências e experiência do operador em interpretar os resultados (Solano-Gallego *et al.*, 2014) e apresenta a limitação de apenas poder ser realizado em laboratórios específicos, sendo um método laborioso, pelo que não é prático quando é necessário analisar um elevado número de amostras (Maia & Campino, 2008b). Apesar da existência de kits comerciais, as preparações de antígenos feitas no laboratório são mais efetivas (Maia & Campino, 2008b)

O **ELISA** também apresenta uma elevada sensibilidade e especificidade, embora os valores variem consoante os diferentes antígenos utilizados (Maia & Campino, 2008b; Mettler *et al.*, 2005). O uso de extratos de amastigotas como antígeno é o que permite a obtenção de

resultados mais sensíveis (Maia & Campino, 2008b). Quando comparado com o IFAT, este teste tem a vantagem de ser mais fácil de standardizar os resultados, uma vez que estes são lidos por um espectrofotómetro automático. Este teste permite avaliar um grande número de amostras de forma rápida, dado a sua facilidade de utilização (Maia & Campino, 2008b).

Num estudo realizado por Solano-Gallego *et al.* (2014), o teste ELISA apresentou uma sensibilidade de 92,5-95,3% e uma especificidade de 86,9-100%, enquanto o teste IFAT obteve uma sensibilidade de 91,7% e uma especificidade de 91,1%, resultados semelhantes ao estudo efetuado por Mettler *et al.* (2005). Mas, foi o IFAT que apresentou uma maior sensibilidade para diagnosticar a presença de infeção em animais sintomáticos. Dentro dos kits de ELISA testados, o que apresentou um melhor desempenho no diagnóstico foi o LEISCAN® (Solano-Gallego *et al.*, 2014).

Os **testes rápidos de imunocromatografia** (Speed Leish K®) são bastante atrativos, uma vez que permitem obter um resultado muito rapidamente e que é fácil de interpretar, possibilitando a intervenção quase imediata do médico veterinário e não requerem equipamento sofisticado, pelo que são ideais para a prática clínica (Solano-Gallego *et al.*, 2014). No entanto, o resultado obtido é apenas qualitativo e caso o resultado seja positivo, requer a realização de uma outra serologia para quantificar o nível de Ac, o que acresce o custo do diagnóstico (Solano-Gallego *et al.*, 2014).

O teste rápido (Speed Leish K®) demonstrou uma elevada especificidade (100%) e uma baixa sensibilidade (63,6%), sobretudo em animais com infeção subclínica (Mettler *et al.*, 2005; Solano-Gallego *et al.*, 2014).

A utilização destes testes rápidos têm sido recomendados pelo laboratório para verificar a presença de infeção por *L. infantum* antes de instituir o programa de vacinação CaniLeish®. Apenas podem ser vacinados os animais que tenham um resultado negativo, isto é, cães clinicamente saudáveis e seronegativos (EMA, 2011). Segundo Solano-Gallego *et al.* (2014), não se deveria recorrer ao teste rápido para selecionar os animais aptos a serem vacinados com a CaniLeish®, uma vez que dada a baixa sensibilidade deste teste, provavelmente são vacinados cães infetados com *L. infantum*, que são seronegativos segundo o teste rápido. Ainda são desconhecias as consequências de imunizar cães seropositivos, existindo um risco de alguns destes animais virem a desenvolver sintomatologia (Solano-Gallego *et al.*, 2014).

A vacinação dos cães contra a Leishmaniose estimula a produção de anticorpos anti-*Leishmania*, o que complica a interpretação de um teste serológico nestes animais. De momento não existem protocolos laboratoriais que permitam a distinção de uma resposta humoral devido à infeção por *L. infantum* ou vacinação (Paltrinieri *et al.* 2016).

1.11. TRATAMENTO

Não existe nenhum fármaco capaz de eliminar completamente o parasita e de evitar o aparecimento de recidivas (Manna *et al.*, 2015). O tratamento apenas permite alcançar a cura clínica, ocorrendo remissão temporária dos sinais clínicos. Também permite diminuir a carga

parasitária e, conseqüentemente, diminuir a capacidade infetante do animal para os flebótomos (Oliva *et al.*, 2010; Miró *et al.*, 2011).

Tal como já foi referido, consoante o estágio de doença do animal com Lcan são recomendados diferentes protocolos terapêuticos (Oliva *et al.*, 2010; Solano-Gallego *et al.*, 2011; Proverbio *et al.*, 2016). Na Europa, os três fármacos que têm vindo a ser utilizados com maior frequência no tratamento da Lcan são: os leishmanicidas, antimoniato de meglumina e miltefosina, e o leishmanioestático, alopurinol (Solano-Gallego *et al.*, 2011; Dantas-Torres *et al.*, 2011; Manna *et al.*, 2015) Existem outros fármacos de segunda linha para o tratamento da Lcan, como por exemplo Anfotericina B, Aminosidina, Pentamidina, Marbofloxacina, Enrofloxacina e a combinação Espiramicina com Metronidazol (Alvar *et al.*, 2004; Oliva *et al.*, 2010). Apesar de estes fármacos alternativos estarem disponíveis, a sua eficácia no tratamento da Lcan ainda carece de estudos (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

A administração repetida de fármacos leishmanicidas, como o antimoniato de meglumina e a miltefosina, em cães e humanos com recidivas, tem vindo a aumentar a pressão de seleção sobre os parasitas a estes quimio-terapêuticos, pelo que já foram reportados casos de resistência (Gramiccia *et al.*, 1992; Maia *et al.*, 2013). Assim sendo, Maia e seus colaboradores (2013) recomendam uma abordagem terapêutica combinada, para evitar a emergência de parasitas resistentes nas populações humanas e caninas, especialmente porque os fármacos utilizados no tratamento da Lcan são simultaneamente utilizados no tratamento da LV humana, ao que esta condição pode conduzir à existência de reservatórios permanentes, não suscetíveis aos fármacos utilizados na medicina humana (Gramiccia *et al.*, 1992).

1.11.1. Alopurinol

O Alopurinol é um análogo estrutural da hipoxantina que atua como um falso nucleótido, o qual é incorporado no RNA do protozoário, inibindo a síntese de proteínas pelo parasita e conseqüentemente a sua multiplicação (Alvar *et al.*, 2004).

O tratamento consiste numa dose diária 5-20mg/kg via oral, duas vezes por dia, ao longo de dois a vinte e quatro meses (Oliva *et al.*, 2010). Segundo as recomendações do grupo LeishVet, o tratamento só deve ser suspenso quando se reúnem as seguintes condições: a) Recuperação física e clínico patológica completa; b) Redução marcada do título de anticorpos. Este fármaco leishmanioestático costuma ser associado a fármacos leishmanicidas de forma a aumentar a eficácia do tratamento, prevenindo a ocorrência de recaídas futuras e aumentando o espaço temporal entre estas (Dantas-Torres *et al.*, 2011).

A utilização do Alopurinol como um tratamento de manutenção ao longo de grandes períodos de tempo tem a vantagem de manter os animais tratados com fármacos leishmanicidas em remissão clínica, mas também de diminuir a sua capacidade infetante. (Koutinas *et al.*, 2001; Miró *et al.*, 2011). Segundo o grupo LeishVet, em animais com doença moderada é recomendado que o tratamento com leishmanioestático se prolongue para toda a vida, de forma a evitar a recaída do animal (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Adicionalmente, este

fármaco apresenta a vantagem de ser económico, seguro e não ser utilizado no tratamento da Leishmaniose humana (Dantas-Torres *et al.*, 2011).

Os efeitos adversos são raros e resumem-se a xantúria, formação de urólitos de xantina e prurido, em casos de tratamentos prolongados (Dantas-Torres *et al.*, 2011; Manna *et al.*, 2015).

1.11.2. Antimoniato de n-metilglucamina

O Antimoniato de n-metilglucamina (Glucantime®, Merial) é um antimonial pentavalente que tem vindo a ser utilizado no tratamento de primeira linha tanto na Lcan, como na LV (Alvar *et al.*, 2004). O mecanismo de ação deste fármaco leishmanicida não é completamente conhecido, mas pressupõe-se que atua a nível do metabolismo energético do parasita, inibindo a produção de trifosfato de adenosina (ATP) e trifosfato de guanosina (GTP). Para além da sua atividade leishmanicida, estimula a capacidade fagocítica dos monócitos e dos neutrófilos (Alvar *et al.*, 2004).

Recomenda-se uma dose diária de 75-100mg/kg, administrada duas vezes por dia via subcutânea, ao longo de quatro a seis semanas (Solano-Gallego *et al.*, 2011). As zonas de administração devem ser alternadas e, caso o animal seja de grande porte deve-se repartir a dose total em diferentes pontos de inoculação, para assim evitar a formação de nódulos, fibrose ou a ocorrência de hemorragias disseminadas. Ao longo do tratamento, podem surgir outros efeitos adversos como vómitos, diarreia, anorexia, febre, apatia, dor local e sinais de nefrotoxicidade (Alvar *et al.*, 2004).

A recidiva da doença clínica surge passados meses até dois anos após o tratamento, especialmente quando o período de tratamento é inferior a quatro semanas (Oliva *et al.*, 2010).

1.11.3. Miltefosina

A miltefosina (Milteforan®, Virbac) é uma aquilfosfocolina que pertence ao grupo dos aquilfosfolípidos, que são análogos sintéticos da lisofosfocolina. Este fármaco leishmanicida promove a morte do parasita por apoptose, no entanto os mecanismos de ação concretos permanecem desconhecidos. Também estimula a atividade dos linfócitos T e dos macrófagos, bem como a produção de compostos de nitrogénio e oxigénio reativos capazes de eliminar o parasita (Alvar *et al.*, 2004).

Este fármaco apresenta a vantagem de poder ser administrado via oral. Atualmente, considera-se o tratamento de segunda linha a utilização deste fármaco em associação com o Alopurinol (Solano-Gallego *et al.*, 2011)

Os efeitos adversos associados à sua utilização são disorexia, vómitos e diarreia (Oliva *et al.*, 2010). Dada a sua baixa nefrotoxicidade é recomendada a sua utilização em animais com Leishmaniose, que concomitantemente sofram de IRC.

1.11.4. Imunoterapia

Ao tratamento específico convencional contra a Leishmaniose pode ser associada uma terapia imunomoduladora, recorrendo a fármacos imunodepressores ou imunostimulantes.

Fármacos imunodepressores como os glucocorticóides, nomeadamente a prednisona e a prednisolona, têm vindo a ser utilizados na presença de lesões consequentes à deposição de imunocomplexos. Estes fármacos atuam diminuindo a imunidade humoral, diminuindo por consequência a produção de anticorpos e a formação de imunocomplexos (Alvar *et al.*, 2004).

Fármacos imunostimulantes são usados para ativar a imunidade celular e macrófagos (Alvar *et al.*, 2004). Os fármacos utilizados nos cães com Lcan são o levamisol, as cicoquinas, o agregado proteico de magnésio-amoniofosfolinoleato-palmitoleato anihídrico (P-MAPA) e a domperidona.

A Domperidona (Leisguard®, ESTEVE, S.A.) na forma de suspensão oral apenas está disponível no mercado há relativamente pouco tempo e consiste num antagonista da dopamina, que bloqueia os recetores dopaminérgicos D2. Esta estimula a secreção de prolactina, que atua como uma citocina pró-inflamatória, estimulando a imunidade celular mediada pelas células Th1 CD4+ (Sabate *et al.*, 2014).

O uso do Leisguard® está indicado para o tratamento da Lcan em cães no estágio inicial de doença. O medicamento deve ser administrado diariamente ao longo de 30 dias consecutivos, a uma dose de 0,5 mg/kg, cada quatro meses (Sabate *et al.*, 2014). Mas ainda há necessidade de efetuar mais estudos para comprovar sua eficácia no tratamento (EFSA, 2015).

Foi descrito com pouca frequência a ocorrência de efeitos adversos, os quais resumem-se a suaves distúrbios gastrointestinais (diarreia, vômito) e galactorreia (Sabate *et al.*, 2014).

1.11.5. Monitorização do tratamento e prognóstico

Idealmente, animais considerados expostos ou infetados devem ser reavaliados para identificar a ocorrência de soroconversão passados dois a quatro meses. Já os animais infetados com expressão clínica de Lcan devem de ser monitorizados durante e após o tratamento, não só para avaliar a resposta do animal à terapia instituída, como também identificar antecipadamente a progressão da doença, no caso de animais que suspenderam o tratamento (Roura *et al.*, 2013). Nos animais infetados, para além da sorologia quantitativa, devem ser realizados exames complementares como hemograma, análises bioquímicas das enzimas hepáticas e renais, urianálise e eletroforese das proteínas séricas (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

O prognóstico dos animais tem vindo a melhorar significativamente nos últimos anos, especialmente aqueles que são tratados de forma efetiva e monitorizados, e claro na ausência de falência renal. A resposta dos animais sintomáticos ao tratamento varia de pobre a bom, dependendo da apresentação clínica e laboratorial inicial da Lcan e a sua resposta individual à terapia (Roura *et al.*, 2013). A presença de IRC é o principal fator de prognóstico da Lcan já

que, como referido anteriormente, é a principal causa de mortalidade ou da decisão de eutanasiar (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Assim sendo, o prognóstico é mais reservado em animais com comprometimento renal. O prognóstico é pobre quando IRC classificada como grau três ou quatro da *International Renal Interest Society* (IRIS; <http://www.iris-kidney.com/>) (Roura *et al.*, 2013) Segundo Dantas-Torres *et al.* (2011), os animais com doença moderada (estádio II segundo o grupo LeishVet) se instituído um bom tratamento, podem viver até nove anos com boa qualidade de vida.

1.12. PREVENÇÃO

Num inquérito conduzido por Neves *et al.* (2007) em Portugal, apurou que cerca de 50% dos proprietários de cães nunca ouviram falar da Lcan e 75% não sabe preveni-la. Os proprietários, deveriam ter conhecimento desta doença, para assim estarem mais sensibilizados em proteger o seu animal da transmissão desta infeção.

A prevenção desta infeção passa pela adoção de simples práticas como: 1) Manter o animal dentro de casa durante a actividade flebotómica, isto é, desde o anoitecer até a madrugada; 2) Reduzir os microhabitats favoráveis aos flebótomos, como acumulações de madeira e pedras, nas imediações da casa, ou locais onde o animal passa mais tempo; 3) Usar inseticidas ambientais (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Mas, também, passa pela utilização de produtos inseticidas e/ou repelentes, vacinação e/ou medicação dos cães.

O controlo do vetor através da aplicação de sprays inseticidas nas casas e nos abrigos de animais consiste numa medida de controlo pouco efetiva nos ambientes peridomésticos (WHO, 2010), dado ao facto de, como já referido anteriormente, a maioria das populações vetoras na Europa serem exofílicas (WHO, 2010). O seu efeito também é limitado em espaços exteriores, uma vez que é difícil identificar os locais de recria (Solano-Gallego & Baneth, 2012),

Atualmente não existe nenhuma medida preventiva disponível que permita proteger com uma eficácia de 100% os cães contra a infeção por *L. infantum*. O uso tópico de produtos repelentes/inseticidas de forma regular no cão tem demonstrado uma eficácia elevada na prevenção da infeção. Estas formulações são constituídas por piretróides (ex: deltametrina, permetrina e flumetrina), algumas das quais são combinadas com neonicotinóides (ex: imidaclopride e dinotefurano). Podem ser aplicados nos cães sobre a forma de “spot-on”, “sprays” e colares. A sua ação fundamental é evitar a picada de flebótomos e, assim, reduzir a capacidade vetorial. Apresentam um efeito inseticida secundário sobre os flebótomos capazes de se alimentar dos animais (EFSA, 2015).

Consoante o método de prevenção adotado, alguns devem ser aplicados com alguma antecedência, para garantir a proteção total do animal aquando a exposição (Solano-Gallego & Baneth, 2012). A duração da sua ação protetora também varia consoante o método de prevenção, nas formulações “spot-on” e “spray” este período é de três semanas (Miró *et al.*, 2007), enquanto os colares impregnados por deltametrina permitem proteger os animais por períodos mais longos, entre cinco a seis meses (Killick-Kendrick *et al.*, 1997).

O seu uso é recomendado em animais que habitam ou que viajam para zonas endémicas, sobretudo durante o período de actividade flebotomínica, que corresponde à época de transmissão. Também é importante o uso destas formulações em animais infetados que estão a ser tratados medicamente (Solano-Gallego & Baneth, 2012).

Com a sua aplicação foram relatados alguns casos de sensibilidade cutânea, letargia, alterações comportamentais, sinais gastrointestinais e neurológicos (EFSA, 2015).

Vacinação

A vacinação permite: 1) Reduzir a taxa de infeção em animais vacinados; 2) Diminuir o risco de infeção ativa e de doença clínica após o contacto com a *L. infantum* (Oliva *et al.*, 2012); 3) Menor carga parasitária em animais vacinados que ficaram infetados, diminuindo por consequência a sua capacidade infetante para o vetor (Gradoni, 2015).

Atualmente não existe nenhuma vacina capaz de proteger totalmente o animal contra a infeção por *L. infantum* (EFSA, 2015). Pelo que, a maioria dos médicos veterinários recomenda uma associação entre a aplicação de inseticidas tópicos e vacinação, para assim aumentar a eficácia da prevenção da infeção (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Existem três vacinas de segunda geração licenciadas, duas das quais no Brasil (Wylie *et al.*, 2014a). Apenas em 2011 foi licenciada a primeira vacina na Europa, a CaniLeish®, comercializada pelos laboratórios VIRBAC, uma formulação composta por proteínas de secreção/excreção de formas promastigotas e saponina (QA-21), como adjuvante (EMA, 2011).

Antes da sua administração o laboratório recomenda a realização de um teste serológico de diagnóstico rápido para deteção de Leishmaniose, uma vez que, a sua utilização é apenas indicada em cães saudáveis, não infetados. A vacinação pode ser iniciada a partir dos seis meses de idade, e a primovacinação consiste em três doses, espaçadas por um período de três semanas, e posterior revacinação anual, de apenas uma dose. O animal apresenta uma resposta imune efetiva aproximadamente quatro semanas após o decurso da vacinação primária, a qual tem a duração de um ano (EMA, 2011).

Mais recentemente, no final de 2016, foi autorizada a comercialização de uma nova vacina contra a Leishmaniose Canina na Europa, designada por Lefitend® (Laboratórios Leti). O que difere relativamente à vacina já existente no mercado é o imunogénio, que consiste numa proteína recombinante dita quimérica (proteína Q), e não tem adjuvante. As indicações de uso são semelhantes à vacina da Canileish®, apresentando a vantagem de na primovacinação ser necessária apenas a administração de única dose, e posterior revacinação anual (EMA, 2016). No entanto, aguarda-se informação mais detalhada sobre a eficácia da resposta humoral à vacina.

A vacinação induz o desenvolvimento de uma imunidade protetora mediada por células, predominantemente do tipo Th1 (Wylie *et al.*, 2014a). Os anticorpos produzidos pelos cães vacinados não podem ser distinguidos pelos métodos sorológicos atuais, o que condiciona a realização de testes de pré-movimento de cães provenientes de áreas endémicas para áreas livres de infeção por *L. infantum*. (EFSA, 2015). Dado o facto de a Canileish® ter começado a

ser comercializada há relativamente pouco tempo são necessários estudos que comprovem a sua eficácia a longo prazo, com animais expostos naturalmente à infecção por *L. infantum* (Oliva *et al.*, 2012; Wylie *et al.*, 2014a).

Alguns proprietários apresentam alguma relutância em relação ao uso da vacina, dado o risco de ocorrência de reações adversas posteriormente à sua aplicação. Em Setembro de 2014, após a venda de 1,8 milhões de vacinas Canileish®, fez-se um levantamento dos casos reportados na farmacovigilância e verificou-se uma incidência de 0,079% de reações adversas à vacinação, desde o lançamento efetuado a Março de 2011 (Coedo, 2013; Breton *et al.*, 2014).

As reações adversas que os animais podem vir a apresentar são semelhantes às vacinas com adjuvantes de saponinas (EFSA, 2015). As reações locais benignas são raras e transitórias (ex: tumefação, nódulo, dor à palpação ou eritema), muito raramente ocorre necrose da zona de inoculação da vacina. Outras reações mais generalizadas, como hipertermia, prostração e alterações digestivas, são muito raras de ocorrerem. Também podem desenvolver-se reações de hipersensibilidade, as quais em casos muito raros resultam na morte do animal (Breton *et al.*, 2014).

Terapia imunomoduladora

A domperidona (Leisguard®) além de ser um fármaco utilizado no tratamento de animais infetados, também está indicado o seu uso na prevenção da Lcan, de acordo com as informações já descritas. São necessários mais estudos para comprovar os seus benefícios como método profilático (Wylie *et al.*, 2014b; EFSA, 2015).

1.13. CONTROLO

O controlo da Lcan passa por integrar uma série de ações que já têm vindo a ser abordadas, como, um diagnóstico precoce, o tratamento dos animais infetados, o desenvolvimento de novas terapêuticas, a vacinação e a luta anti-vetorial.

A deteção precoce depende da existência de diferentes sistemas de vigilância que integrem fontes de informação na área epidemiológica, entomológica, ambiental e clínica. A primeira rede de vigilância epidemiológica nacional foi criada em Setembro de 2008 e designa-se por Observatório Nacional das Leishmanioses (ONLeish; www.onleish.org). Tem como objetivo a organização de dados e o acompanhamento da doença nos canídeos e humanos em Portugal. Este conhecimento permite estudar a distribuição dos casos de Leishmaniose, permitindo delinear eficazmente medidas de controlo da infecção nos cães e nos seres humanos. Também auxilia a direccionar os estudos entomológicos para as regiões prioritárias, onde se regista um maior número de casos. Em 2010, foi criada pela ONLeish uma rede de vigilância epidemiológica exclusiva para a Leishmaniose Canina, designada por LeishNet. Esta rede tem como objetivo identificar os canídeos diagnosticados em Portugal pelos médicos veterinários e Centros de Atendimento Médico-Veterinário (CAMV), permitindo estudar os

fatores de risco associados aos indivíduos infetados e determinar a evolução do número de casos clínicos reportados (Maia *et al.*, 2011).

A Leishmaniose é considerada uma doença de notificação obrigatória nas campanhas de vacinação anti-rábica em Portugal (Portaria nº 264/2013). Caso o animal apresente um resultado positivo à Leishmaniose, os detentores do animal serão notificados para procederem ao tratamento médico do animal, caso contrário serão submetidos a eutanásia.

Também existem alternativas que têm vindo a ser adotadas para controlar a Leishmaniose nas populações caninas em países endémicos, as quais têm gerado alguma controvérsia, como é o caso da prática da eutanásia de animais seropositivos e doentes. Esta prática não é bem aceite pelos proprietários dos animais e não se tem mostrado efetiva no controlo da dispersão da doença, pela existência de outras fontes de infeção, como os animais infetados assintomáticos e canídeos selvagens (Solano-Gallego & Baneth, 2012). Além disso, os métodos de diagnósticos utilizados não permitem que sejam identificados todos os animais e, uma população de novos indivíduos pode substituir os que foram eutanasiados (Dantas-Torres *et al.*, 2011).

1.14. IMPACTO NA SAÚDE PÚBLICA

O impacto real da Leishmaniose no humano está mundialmente subestimado, uma vez que a doença tem vindo a ser negligenciada por muitos países. Tal deve-se ao facto de apesar de ser uma doença endémica em 88 países, apenas é obrigatória a sua notificação em 32 desses países (WHO, 2010; Ready, 2010). Segundo a EFSA (2015), esta doença não está subestimada nos países Europeus.

A forma visceral é a manifestação clínica mais severa da infeção por *L. infantum* em humanos e, normalmente, é fatal se não tratada (WHO, 2010, Ready, 2010). Estimativas mais recentes referem que ocorram cerca de 0,2 a 0,4 milhões de novos casos de Leishmaniose Visceral por ano, com 90% destes ocorrendo apenas na Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia, sendo 10% destes casos fatais (Alvar *et al.*, 2012). A forma cutânea é mais benigna e pode manifestar-se pela presença de lesões cutâneas únicas ou múltiplas (WHO, 2010). A incidência da Leishmaniose Cutânea (LC) estima-se ser de 0,7 a 1,2 milhões de casos por ano e encontra-se mais globalmente distribuída (Alvar *et al.*, 2012).

Na Europa, apenas está provada a existência da LV e LC causada pela *L. infantum*, uma zoonose nos países pertencentes à bacia mediterrânica. Casos de LC são causados pela *L. tropica* e apenas ocorrem esporadicamente na Grécia, sendo a sua transmissão antroponótica (Ready, 2010).

Como já referido, a expressão clínica da Leishmaniose Visceral não é tão exuberante como a Leishmaniose Canina (Campino & Maia, 2010). Apesar de não existir uma relação direta entre a prevalência da Lcan e a da LV, verifica-se que a presença de cães infetados desempenha um papel relevante na disseminação e manutenção da infeção humana (Werneck *et al.*, 2006). Os fatores de risco que potenciam esta associação são as pobres condições sócio-económicas, densidade animal e a coexistência na mesma habitação. No Sul

da Europa, o *rácio* entre humanos clinicamente afetados e cães infetados é baixo, e o facto de possuir um cão não tem sido associado a um maior risco. (Serrada, 2010; Baneth & Solano-Gallego, 2012)

Na bacia mediterrânica a LV, deixou de ser uma doença predominantemente infantil, para estar associada a casos de coinfeção em adultos imunocomprometidos, sendo o Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) o fator predisponente mais importante. No entanto, com a introdução da Terapia Anti-Retroviral Altamente Reativa (HAART) na Europa, a incidência da infeção e o número de recidivas diminuiu significativamente, exceto em Portugal (Campino & Maia, 2010; Serrada, 2010).

Em Portugal, a LV é uma doença de notificação obrigatória desde 1950 (Portaria nº 1071/98). Podemos observar na Figura 13 o número de casos de LV reportados em Portugal ao longo dos últimos anos. No período entre 2010 e 2015, foram reportados em média cerca de 13 casos por ano, mas estima-se que a sua incidência real seja superior (Berger, 2017).

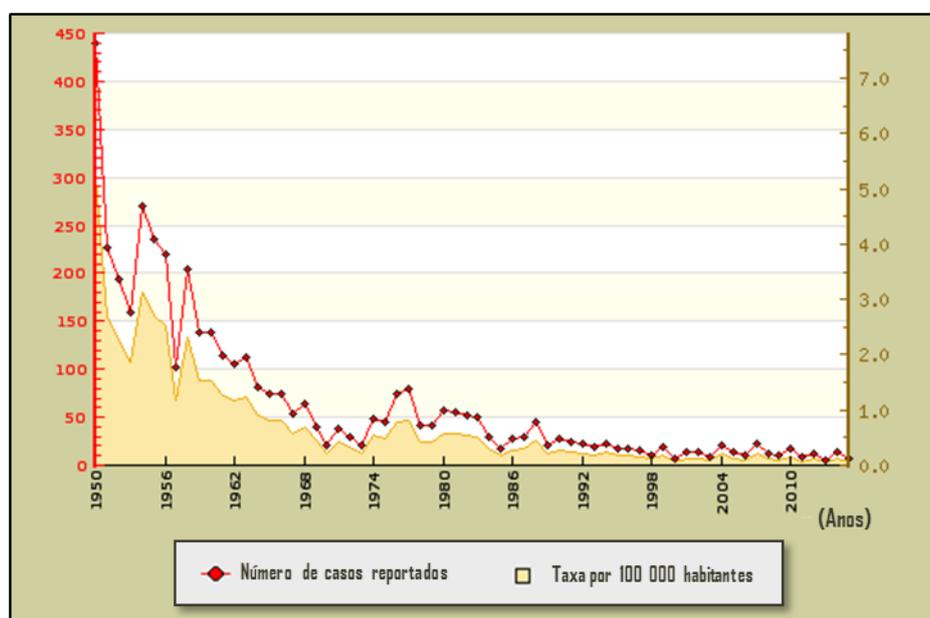


Figura 13 - Casos de Leishmaniose Visceral Humana reportados em Portugal, no período compreendido entre 1950 e 2015 (Adaptado de Berger, 2017).

Num estudo observacional descritivo relativo ao período de 2000 até 2009, a maioria dos doentes diagnosticados era residente na Região de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo (54,4%), verificando-se mais casos nas zonas urbanas do que nas rurais (Serrada, 2010). Pressupõe-se que tenha ocorrido uma urbanização ou domesticação de focos zoonóticos naturais, fenómeno designado por desvio trófico em meio rural. Um menor número de animais disponíveis nas áreas urbanas pode fazer com que a população humana fique mais vulnerável à infeção acidental, dado o vetor ser zoofílico (Abranches *et al.*, 1987, referido por Campino & Maia, 2010). Também se constatou, no estudo de Serrada (2010), que em 58% dos casos de LV que estiveram expostos a canídeos, também foi identificado o parasita no cão.

Infelizmente a Leishmaniose nos humanos e nos cães continua a ser um problema de saúde pública no nosso País. Para o controlo desta zoonose deve ser integrado um conceito

“One Health”. Isto é, o controlo e a prevenção desta infeção deve resultar do trabalho conjunto entre diversos especialistas nas áreas de medicina humana, medicina veterinária, ciência ambiental e conservação selvagem (Sousa & Day, 2011). Um controlo efetivo da Leishmaniose Canina poderá levar à diminuição da Leishmaniose humana nas zonas endémicas. O médico veterinário deve ser responsável por controlar a infeção nos hospedeiros reservatório (animais domésticos e silváticos), limitando assim a transmissão para o vetor e consequente dispersão da doença.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo geral avaliar a prática clínica, os fatores epidemiológicos e práticas profiláticas aplicadas no controlo da Leishmaniose, na população canina residente na Área Metropolitana de Lisboa, tendo como amostra os animais atendidos no Hospital Veterinário do Restelo (HVR), no período de Janeiro de 2014 até Março de 2016.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Foram definidos nove objetivos específicos:

1. Avaliar a frequência de positividade para *L. infantum* nos animais atendidos, independentemente do meio de diagnóstico utilizado;
2. Identificar as áreas geográficas de proveniência dos animais positivos a *L. infantum*;
3. Caracterizar os habitats das áreas geográficas identificadas;
4. Identificar potenciais fatores de risco para a infeção relacionados com as características individuais, tipo de habitat, a adoção ou não de medidas profiláticas, a presença de coinfeções e a convivência com outros cães com diagnóstico positivo a *L. infantum*;
5. Caracterizar o perfil clínico dos animais positivos a *L. infantum*;
6. Determinar qual foi a técnica de diagnóstico para *L. infantum* mais utilizada no HVR;
7. Relacionar a resposta humoral dos animais infetados com a apresentação clínica;
8. Relacionar o tipo de prevenção da Leishmaniose Canina com o número de casos de Leishmaniose na amostra;
9. Avaliar possíveis efeitos adversos da vacinação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. TIPO DE ESTUDO

O estudo clínico-epidemiológico tem um desenho observacional, transversal e descritivo, com uma abordagem analítica. A escolha deste tipo de estudo epidemiológico prende-se com o facto de este ser pouco dispendioso, exigir poucos recursos humanos e materiais para a sua realização, e ser a abordagem correta face aos dados existentes.

3.2. POPULAÇÃO EM ESTUDO

A população da qual se origina a amostra: todos os animais que foram consultados no Hospital Veterinário do Restelo, no período de Janeiro de 2014 até Março de 2016.

3.3. AMOSTRA

Para o presente estudo, foram considerados como elegíveis todos os canídeos que se apresentaram à consulta no Hospital Veterinário do Restelo, para diagnóstico de Leishmaniose, no período entre os anos de 2014 e 2016.

Critérios de inclusão: animais que se apresentaram à consulta no Hospital Veterinário do Restelo e foram submetidos a testes de diagnóstico diretos e/ou indiretos de Leishmaniose.

Critérios de exclusão:

- Todos os animais que não realizaram teste de diagnóstico, apesar de apresentarem manifestações clínicas sugestivas da doença;
- Animais que realizaram o teste de diagnóstico, mas em que não existe informação clínica sobre os mesmos;
- Animais que não residem na área de estudo (Área Metropolitana de Lisboa).

3.4. FONTES DE INFORMAÇÃO

As informações necessárias para a realização deste estudo foram obtidas na base de dados do software QVET® (Pontual, soluções informáticas Lda.), utilizado pelo Hospital Veterinário do Restelo para registar todas as fichas clínicas dos animais atendidos, bem como todos os resultados de exames realizados no Hospital e em laboratórios privados.

3.5. MÉTODO DE RECOLHA DE DADOS

A recolha dos dados foi realizada diretamente a partir das bases de dados anteriormente descritas. Inicialmente, criou-se uma listagem de consumíveis do Hospital Veterinário do Restelo através do sistema QVET, e foram identificados todos os animais que realizaram testes de diagnóstico serológico / molecular. Posteriormente, com base na data da realização do teste de diagnóstico e com o nome do proprietário, procedeu-se à pesquisa do animal e seu processo clínico. Os vários processos clínicos foram organizados, e identificaram-se os animais que realizaram testes de diagnóstico mais do que uma vez, para evitar a duplicação da informação. Os dados necessários foram recolhidos através da consulta dos ficheiros clínicos, após a autorização do diretor clínico do Hospital, com a condicionante de não contactar os proprietários dos animais.

3.6. MÉTODO DE TRATAMENTO DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados recolhidos foram introduzidos numa tabela criada numa folha de cálculo do Microsoft Office Excel® 2013 e caracterizados segundo as variáveis numéricas e categóricas definidas no início do estudo. Neste programa avaliaram-se as frequências absolutas e relativas das diferentes variáveis, tendo sido elaboradas tabelas e gráficos para facilitar a comparação entre as mesmas.

Posteriormente, para a realização dos testes estatísticos importou-se a informação necessária para o programa IBM SPSS Statistics 24®, no qual foram realizados os testes não paramétricos para verificação de hipóteses (teste do Qui-quadrado, teste exato de Fisher, teste de Mann-Whitney) e a análise regressão logística binária. O intervalo de confiança definido para os testes estatísticos foi de 95%, isto é, correspondente a um nível de significância de $p \leq 0,05$.

Com base na informação dos códigos postais da morada do detentor do animal, recorreu-se ao programa ArcGIS® Online (Esri, Produtos de Software; disponível em: www.arcgis.com) para realizar o mapeamento geográfico dos animais testados, e assim facilitar a análise da sua distribuição.

3.7. VARIÁVEIS

Variáveis relativas às características do animal:

- Idade
- Raça
- Sexo
- Estado reprodutivo
- Comprimento do pelo
- Porte

Variáveis relativas à caracterização do habitat do animal:

- Residência (Código Postal, Município)
- Tipo de Habitat (Interior / Exterior / Misto)
- Co-habita com outros animais com diagnóstico positivo a Leishmaniose

Variáveis relativas à história clínica:

- Reavaliação de Leishmaniose diagnosticada
- Presença de outras coinfeções (*Babesia canis*; *Ehrlichia canis*; *Rickettsia conorii*)

Variáveis relativas à manifestação clínica da Leishmaniose:

- Linfadenomegalia Generalizada
- Emagrecimento
- Anorexia
- Letargia
- Mucosas Pálidas
- Esplenomegalia
- Poliúria
- Polidipsia
- Febre
- Vômito
- Diarreia
- Lesões dermatológicas
- Lesões oculares

Variáveis relativas ao diagnóstico serológico:

- Motivo da realização do teste
- Teste utilizado numa primeira abordagem
- Teste utilizado numa segunda abordagem
- Teste utilizado numa terceira abordagem

Variáveis relativas às alterações laboratoriais identificadas:

- Hiperproteinémia
- Redução do *rácio* albumina / globulina
- Hiperglobulinémia (Gamopatia Policlonal / Monoclonal)
- Hipoalbuminémia
- Aumento da FAS
- Aumento da Creatinina
- Aumento da Ureia
- Anemia não regenerativa
- Leucocitose
- Leucopénia
- Trombocitopénia
- Proteinúria

Variáveis relativas à profilaxia contra a Leishmaniose:

- Métodos de profilaxia adotados (6 meses antes / após a consulta de diagnóstico)
- Existência de reações adversas devidas à vacinação
- Reações adversas
- Momento em que se verificaram as reações adversas

4. RESULTADOS

4.1. Frequência de positividade independentemente do meio de diagnóstico:

No total, procedeu-se à análise das fichas clínicas de 364 cães que foram sujeitos a testes de diagnóstico de Leishmaniose Canina, no período de Janeiro de 2014 a Março de 2016. Após a análise cuidada de todas as fichas clínicas, verificou-se que apenas 284 casos preenchiam os critérios de inclusão definidos para o estudo.

No período designado, foram diagnosticados no total 26 (9%) animais como positivos para *Leishmania infantum*. Destes, 16 (62%) novos casos, com recurso a diferentes técnicas serológicas e/ou moleculares: 12 pela técnica de ELISA (Leiscan®); um pela técnica de PCR do soro sanguíneo e um através da realização de um teste rápido, e posterior confirmação através da realização de um teste Leiscan®.

Dez (38%) dos animais já tinham sido diagnosticados em anos anteriores. No entanto, dois destes animais foram negativos após a realização do teste Leiscan®, e um apresentou um resultado negativo após a realização do teste de PCR de uma amostra de tecido conjuntival. Apesar destes resultados negativos, os animais foram considerados como infetados, uma vez que todos já tinham sido submetidos a protocolos terapêuticos no passado, inclusive dois destes animais encontravam-se a fazer imunoterapia com Leisguard® no momento da realização do teste de diagnóstico.

4.2. Áreas geográficas de proveniência dos animais positivos:

Os 284 animais testados foram agrupados segundo o seu município de residência na AML. Verificou-se que apesar de o Hospital Veterinário do Restelo se localizar no município de Lisboa, recebe animais oriundos dos vários municípios da AML, tal como podemos verificar no Gráfico 1.

A maioria dos animais provêm do município de Lisboa (48%), seguido dos municípios de Oeiras (20%), Cascais (9%), Amadora (8%) e Sintra (7%). Também se registou, embora em menor número, animais provenientes dos municípios de Odivelas, Loures, Vila Franca de Xira, Almada, Moita e Montijo.

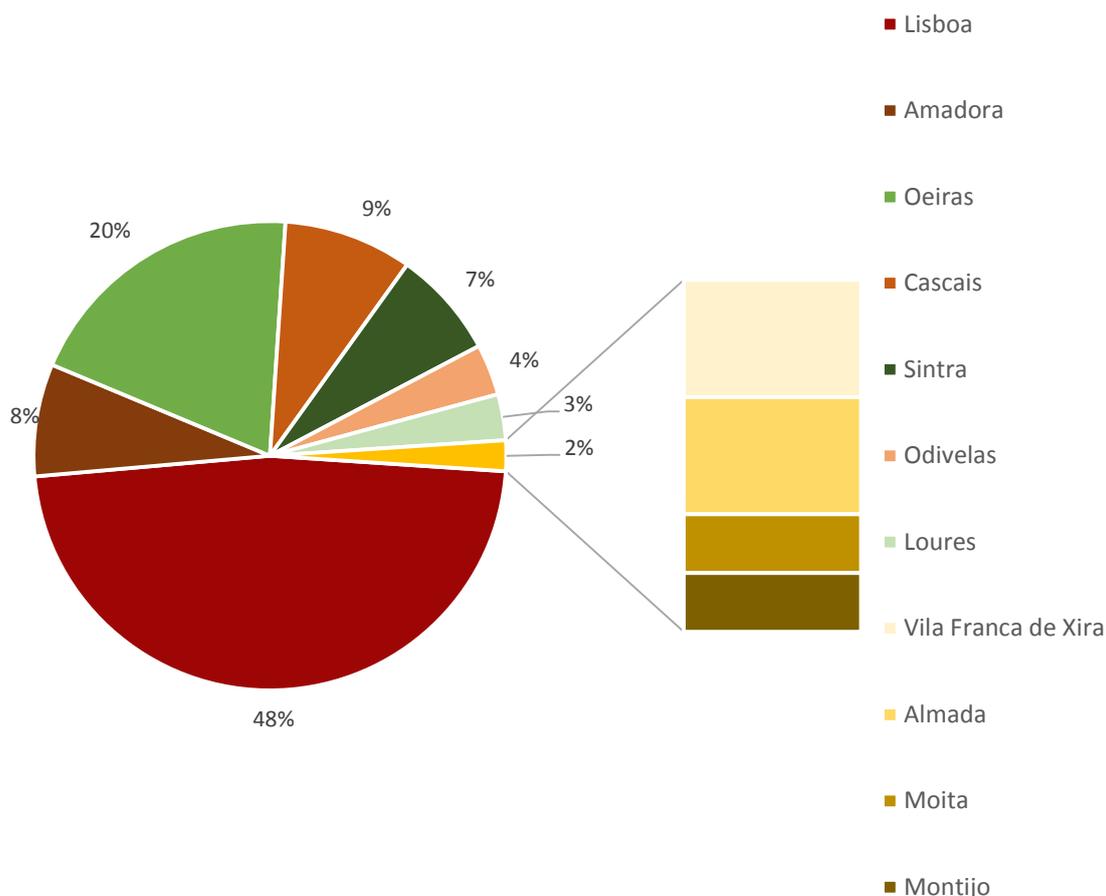


Gráfico 1 – Frequência dos animais testados por município de residência, na AML (n = 284).

Foi analisada a distribuição espacial dos casos de animais com diagnóstico positivo, incluindo os que já tinham sido diagnosticados no passado (n=26). Os animais provêm maioritariamente de cinco municípios da AML, nomeadamente doze (46%) de Lisboa, seis (23%) de Oeiras, três (12%) de Cascais, dois (8%) de Sintra e dois (8%) de Odivelas.

A informação do código postal possibilitou a georeferenciação dos 284 animais testados, através do programa ArcGIS® Online. Observou-se uma distribuição heterogénea dos casos positivos, com especial destaque para duas áreas, nas quais se evidencia uma maior concentração de casos positivos (Figura 14). A Área A, a qual está inserida no município de Lisboa, e a Área B, que engloba os municípios de Lisboa e de Oeiras.

Área A

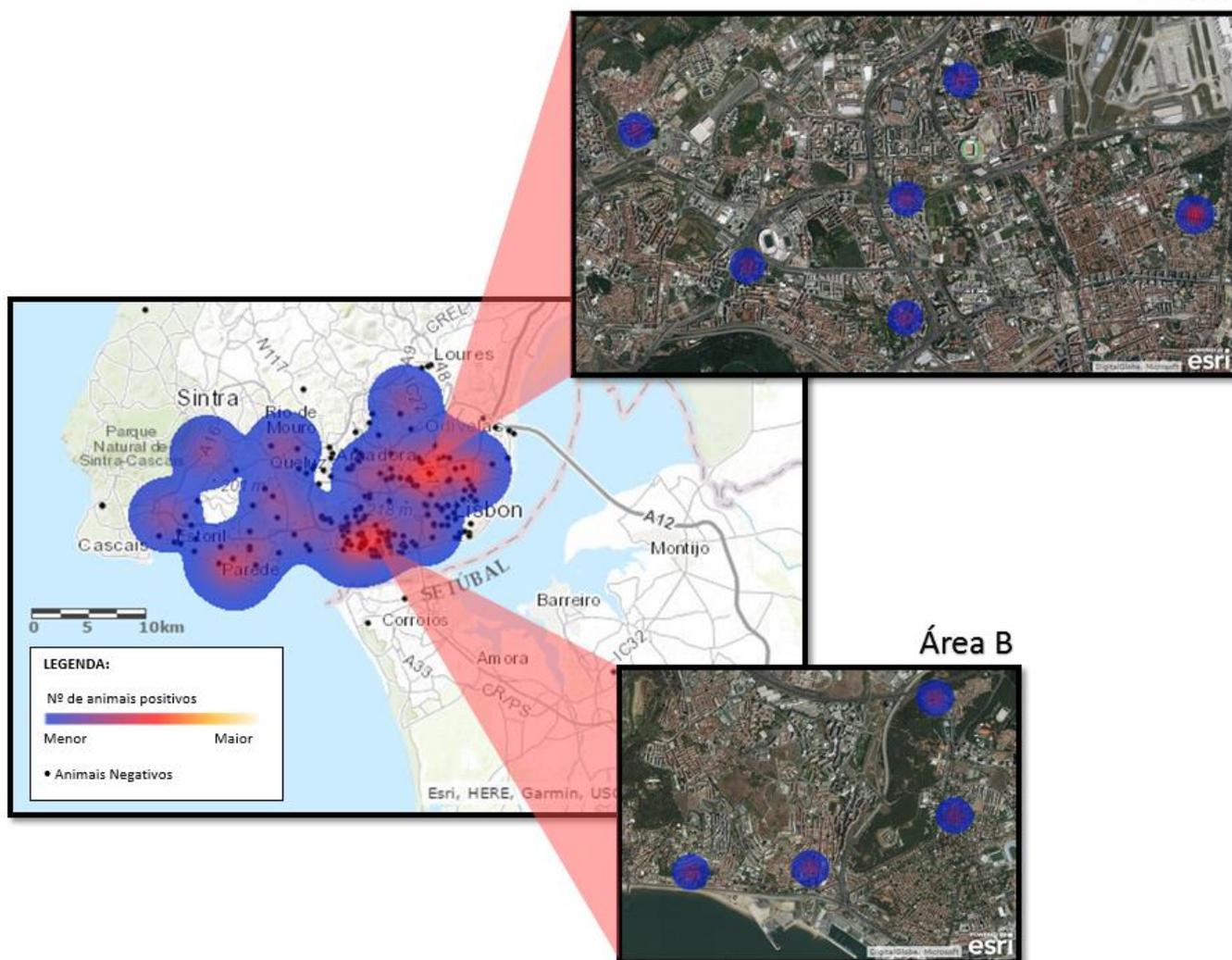


Figura 14 – Mapa da AML com distribuição do total de animais testados (n=284), e imagens satélites respetivas às áreas de maior concentração de animais positivos.

4.3. Caracterização dos habitats das áreas geográficas identificadas:

Em termos gerais a AML reúne um conjunto de paisagens diversificadas, desde urbanas a rurais, e litorais, de montanha ou lezíria. Como podemos observar nas imagens satélite 3D obtidas pelo serviço Google Maps®, as características urbanas referentes às duas áreas identificadas são bastante distintas (Figura 15). Enquanto a Área A caracteriza-se sobretudo por uma paisagem urbana, com cobertura verde do tipo parque público e pátios, a Área B caracteriza-se por uma paisagem peri-urbana, isto é, com presença de edifícios urbanos e moradias, sendo a grande maioria dos espaços verdes privados.



Figura 15 - Imagens satélite 3D representativas das características urbanas, da Área A e B.

4.4. Potenciais fatores de risco para a transmissão de *L. infantum*:

A Tabela 3 apresenta as frequências absolutas e relativas do total da amostra e o número total de animais estudados e de animais positivos.

As idades dos animais foram agrupadas em intervalos, correspondendo à categoria **jovem** os animais com idade até aos doze meses de idade, a **adulto** os animais de um ano até aos sete anos, e a **sênior** os animais com mais de sete anos.

O intervalo de idades dos animais infetados variou entre os 7 e os 172 meses (14 anos), à data da realização do teste de diagnóstico, com uma média de 100 meses (≈ 8 anos) e uma mediana de 102 (≈ 8 anos). Verificou-se que os animais com menos de um ano de idade são os menos afetados (3,85%) e que a maioria dos animais infetados tem mais do que sete anos de idade (65,38%).

Classificaram-se os canídeos de acordo com o peso, foram considerados animais de **pequeno porte** aqueles com um peso inferior a 10kg, de **médio porte** aqueles um peso compreendido entre os 10kg e os 25kg e **grande porte** com um peso superior a 25kg. A maioria dos animais infetados possuía um porte grande (42,31%), seguido dos animais de porte médio (15,38%) e pequeno (7,69%). Desconhece-se o porte de 34,62% dos animais infetados.

Quanto à raça, verificou-se que as mais acometidas foram as raças puras (65,38%), comparativamente aos animais de raça cruzada (34,62%). As mais representadas foram as raças Golden Retriever ($n=3$), Labrador Retriever ($n=2$) e Epagneul Breton ($n=2$) e Boxer ($n=2$).

Relativamente ao sexo, os animais infetados na grande maioria pertencem ao sexo masculino (65,38%) e são inteiros (76,92%).

Quanto às características do pelo, verificou-se que os animais positivos na sua maioria tinham uma pelagem curta (50%), seguidos dos animais de pelagem longa (19,23%) e média (7,69%). Desconhece-se o comprimento do pelo de 23,08% dos animais infetados.

	Animais testados (n = 283)	Animais positivos (n = 26)	Animais positivos (%)
Idade			
Jovem	80	1	3,85%
Adulto	125	8	30,77%
Sênior	79	17	65,38%
Porte			
Pequeno	60	2	7,69%
Médio	51	4	15,38%
Grande	103	11	42,31%
Raça			
Pura	214	17	65,38%
Cruzada	70	9	34,62%
Sexo			
Feminino	118	9	34,62%
Masculino	166	17	65,38%
Estado Reprodutivo			
Inteiro	206	20	76,92%
Esterilizado	78	6	23,08%
Comprimento do pelo			
Curto	149	13	50,00%
Médio	47	2	7,69%
Longo	60	5	19,23%
Tipo de Habitat			
Exterior	16	4	15,38%
Interior	179	12	46,15%
Misto	68	7	26,92%
Adoção de medidas profiláticas			
Sim	83	4	25%
Não	72	2	12,5%
Presença de coinfeções			
<i>Rickettsia conorii</i>	16	4	80,00%
<i>Babesia canis</i>	1	1	20,00%
<i>Ehrlichia canis</i>	4	0	0,00%
Coabita com cães infetados com <i>L. infantum</i>			
Sim	4	0	0,00%

Tabela 3 – Frequências totais e relativas das variáveis independentes e variável dependente positiva.

A maioria dos animais infetados por *L. infantum* habitam num ambiente exclusivamente interior (46,15%). Os restantes 26,92% habitam no interior da habitação com acesso ao exterior e 15,38% habitam exclusivamente no exterior. Desconhece-se o tipo de habitat de 11,54% dos animais infetados.

Existem quatro animais que coabitam com outros cães com infeção por *L. infantum*, e que no entanto não apresentam a infeção.

Não existia nenhum registo em relação à prática profilática em mais de metade dos animais infetados (62,5%). No pequeno número de animais que se conseguiu obter esta informação (n= 6), verificou-se que a maioria dos animais infetados (25%) adotava medidas de prevenção contra a infeção, e que apenas (12,5%) não adotava qualquer tipo de medida profilática.

Dos cinco animais com Leishmaniose que realizaram testes de ELISA para avaliar a presença de outros hemoparasitas, detetou-se a presença de *Rickettsia* em quatro animais e de *Babesia* em apenas um animal.

Foram realizados testes estatísticos para verificar a existência de uma associação entre a variável dependente (presença / ausência de infeção) e as várias variáveis independentes, mais concretamente o teste do qui-quadrado. Excluiu-se desta análise, as variáveis “adoção de medidas profiláticas”, “presença de coinfeções” e “convivência com outros animais infetados com *L. infantum*”, dado o número reduzido da amostra. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 4.

Algumas variáveis foram agregadas para a análise: na variável comprimento do pelo agruparam-se os animais de pelo médio e longo, e na variável tipo de habitat agruparam-se os animais que habitam totalmente ou parcialmente no exterior. De todas as variáveis analisadas estatisticamente, apenas se verificou associação entre a idade do animal e a presença de infeção $X^2 (2, N=5,991) = 21,67, p \leq 0,05$. Pelo que, estatisticamente, rejeitou-se a hipótese de associação entre a presença de infeção e as variáveis porte, raça, sexo, estado reprodutivo, comprimento do pelo e tipo de habitat para a nossa amostra.

Variáveis independentes	p value	X ²	X ² _c
Idade	P ≤ 0,05	21,67	5,991
Porte	0,142	3,9	5,991
Raça	0,2116	1,531	3,841
Sexo	0,452	0,567	3,841
Estado Reprodutivo	0,599	0,277	3,841
Comprimento do pelo	0,521	0,412	3,841
Tipo de habitat	0,87	2,926	3,841

Tabela 4 - Verificar a associação os diferentes variáveis e a presença de infeção por *L. infantum*, recorrendo ao teste do qui-quadrado, baseado na tabela de contingência.

No sentido de investigar o contributo das várias variáveis na infeção por *L. infantum* no cão foi realizada uma regressão logística binária, os resultados obtidos encontram-se representados na Tabela 5.

Perante os resultados, verificou-se uma associação estatisticamente significativa entre a idade do animal e a presença da infeção. Deste modo, os animais com mais de sete anos de idade apresentam uma probabilidade de infeção 24 vezes superior (“Odds Ratio” (OR) = 23,9; Intervalo de confiança (IC) 95% = 2,8 – 203,7), comparativamente aos animais com menos de

um ano de idade. Também se verificou que, a probabilidade dos animais adultos apresentarem infecção é oito vezes superior (OR = 8 ; IC 95% = 0,9 – 68,2) em relação aos animais jovens, no entanto este último resultado não é estatisticamente significativo.

Verificou-se que comparativamente aos animais de pequeno porte, os animais de médio e grande porte apresentam uma probabilidade quatro e três vezes superior, respetivamente.

Animais de raça pura não apresentam um risco de infecção superior (OR = 2,5 ; IC 95% = 0,3 – 4,1) comparativamente aos animais de raça cruzada, já que o resultado não é estatisticamente significativo.

Em relação ao sexo do animal, verificou-se que o risco de infecção é 1,5 vezes superior (OR = 1,5 ; 95% IC = 0,5 – 4,4) em animais do sexo masculino. Para além de não existir uma associação estatisticamente significativa, esta variável pode estar associada a um fator de confundimento, que possibilite uma maior exposição ao vetor.

Variáveis		β	p value	Exp (β)	IC 95%
Idade	Jovem*				
	Adulto	2,085	0,056	8,046	0,949 – 68,188
	Sénior	3,176	0,004	23,939	2,813 – 203,716
Porte	Pequeno*				
	Médio	1,404	0,102	4,071	0,758 – 21,875
	Grande	1,278	0,123	3,589	0,708 – 18,181
Raça	Cruzada*				
	Pura	0,130	0,841	1,138	0,320 – 4,052
Sexo	Feminino*				
	Masculino	0,394	0,483	1,482	0,493 – 4,454
Estado Reprodutivo	Inteiro*				
	Esterilizado	-1,051	0,106	0,350	0,98 – 1,249
Comprimento do pelo	Curto*				
	Médio	-0,862	0,305	0,422	0,081 – 2,192
	Longo	-0,015	0,981	0,985	0,291 – 3,338
Tipo de habitat	Interior*				
	Exterior / Misto	0,898	0,091	2,454	0,866 – 6,954

Tabela 5 - Análise das diferentes variáveis relativas às características individuais do animal em relação à presença de infecção por *L. infantum*, recorrendo a uma regressão logística binária. *Categoria de referência

Para estado reprodutivo, verificou-se que há menos animais esterilizados infetados (OR = 0,4 ; IC 95% = 0,98 – 1,249), no entanto o resultado não tem significância estatística e pode estar associado a diferentes fatores de confundimento.

No que respeita ao comprimento do pelo, verificou-se que o tamanho médio (OR = 0,4; IC 95% = 0,1 – 2,2) parece constituir um fator de proteção para a infecção. Ao determinar o risco de o animal ter um pelo longo comparativamente a ter um pelo curto, o valor obtido é igual a 1 (OR = 1 ; IC 95%: 0,3 – 3,3), este facto sugere que a probabilidade da ocorrência de infecção é igual, independentemente do comprimento do pelo.

Apesar de como já referido, a maioria dos animais com diagnóstico positivo de Leishmaniose habitar no interior da habitação, verificou-se um risco de infeção 2,5 vezes superior (OR = 2,5; IC 95% = 0,9 – 7) nos animais que habitam exclusivamente ou parcialmente no exterior.

4.5. Perfil clínico dos animais infetados por *L. infantum*:

A informação relativa aos sinais clínicos e às alterações laboratoriais foi obtida através da análise individual do historial clínico, no qual consta a informação relativa à história pregressa do animal e aos resultados dos exames físico e/ou laboratoriais aquando a consulta de diagnóstico.

Cerca de 90% (93/103) dos animais que foram classificados como suspeitos, foram com base na presença de sinais clínicos característicos de Leishmaniose. Destes animais, apenas 14% (13/93) se revelaram positivos ao diagnóstico de *L. infantum*.

Na tabela 6 encontram-se descritas as manifestações clínicas identificadas em todos os animais testados com suspeita clínica, incluindo também os animais previamente diagnosticados, e respetiva frequência.

	Animais suspeitos (n)	Animais com diagnóstico positivo (n)	Animais com diagnóstico positivo (%)
Manifestações clínicas			
Lesões dermatológicas	37	9	35%
Sinais Digestivos	22	8	31%
Prostração	34	7	27%
Emagrecimento	16	4	15%
Mucosas Pálidas	8	4	15%
Anorexia	27	3	12%
Lesões Oftalmológicas	6	3	12%
Desordens vasculares	16	3	12%
Linfadenomegalia			
Generalizada	11	2	8%
Polidipsia	5	2	8%
Claudicação	15	2	8%
Sinais neurológicos	8	2	8%
Desidratação	10	1	4%
Esplenomegalia	5	1	4%
Poliúria	4	0	-
Febre	8	0	-
Atrofia muscular	2	0	-

Tabela 6 - Lista dos sinais clínicos registados nos animais considerados suspeitos (n=93) e dos animais com diagnóstico positivo de infeção por *L. infantum* (n=13).

Os sinais clínicos reportados com maior frequência nos animais diagnosticados como positivos à infecção foram: lesões cutâneas, vômito, prostração, emagrecimento e mucosas pálidas. Não foi descrito a presença de febre, poliúria e atrofia dos músculos mastigadores.

Dos animais que evidenciaram sinais digestivos (n=8), todos apresentaram vômitos e apenas dois também apresentavam diarreia. Dos quatro animais que perderam peso, nenhum apresentou anorexia.

Apenas três animais apresentaram sinais clínicos compatíveis com desordens vasculares.

As lesões oftalmológicas detetadas nos animais diagnosticados como positivos a *L. infantum* foram: conjuntivite (n=3) e queratoconjuntivite (n=1).

As lesões dermatológicas identificadas nos animais positivos (n=9), resumidas no Gráfico 2, foram: dermatite erosiva-ulcerativa (n=5), dermatite exfoliativa (n=3) e dermatite pustular (n=1). Não foram registados casos de animais positivos com dermatite nodular ou papular. Também foram registadas outras alterações, como a presença de alopecia (n=2), onicogrifose (n=2) e prurido (n=1), num animal com dermatite erosiva-ulcerativa.

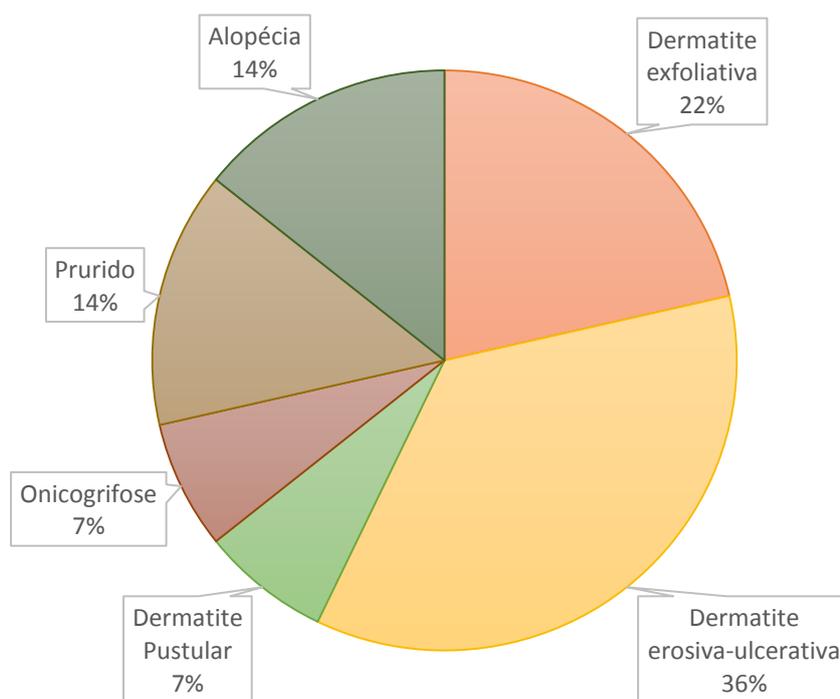


Gráfico 2 - Frequência das diferentes lesões dermatológicas presentes nos animais positivos a *L. infantum* (n=9).

Os restantes 10% (10/103) de animais classificados como suspeitos foram-no com base na presença de alterações laboratoriais indicativas da presença de uma infecção. Nenhum dos testes efetuados nestes animais foi positivo.

Em todos os animais classificados como suspeitos de Leishmaniose que realizaram exames laboratoriais (hemograma, análises bioquímicas, proteinograma e/ou urianálise), foi

analisada a ocorrência de alterações documentadas como sugestivas de infecção por *L. infantum* (Tabela 7).

Apenas em 16 animais com diagnóstico de Leishmaniose se efetuou o exame para avaliar as células sanguíneas. As alterações predominantes na nossa amostra foram a anemia não regenerativa e a leucocitose (31%), seguidas da presença de leucopénia e de trombocitopénia (13%).

	Animais suspeitos		Animais com diagnóstico positivo		
	Testados (n)	Com alteração (n)	Testados (n)	Com alteração (n)	Com alteração (%)
Alterações hematológicas					
Anemia não regenerativa	63	18	16	5	31%
Leucocitose	63	15	16	5	31%
Leucopénia	63	10	16	2	13%
Trombocitopénia	63	11	16	2	13%
Trombocitopatia	-	-	-	-	-
Alterações Bioquímicas / Urianálise					
Hiperproteinémia	66	21	21	10	48%
Hipoalbuminémia	41	18	17	8	47%
Hiperglobulinémia	17	12	11	9	82%
Diminuição do RAG	17	6	11	5	45%
Aumento ALT	60	14	17	0	0%
Aumento FAS	60	26	17	8	47%
Aumento da Creatinina	64	23	19	7	37%
Aumento do BUN	63	27	19	8	42%
Proteinúria	19	10	7	7	57%

Tabela 7 - Lista das alterações laboratoriais registadas nos animais classificados como suspeitos e nos animais com diagnóstico positivo de infecção por *L. infantum*.

Ao avaliar o perfil bioquímico das enzimas renais (Ureia e Creatinina) de 19 animais com diagnóstico de Leishmaniose, verificou-se que 37% (n=7) dos animais tinham ambas as enzimas elevadas, entre os quais, apenas quatro realizaram a tira reagente de urina, verificando-se a presença de proteína em todos estes. Quanto às enzimas hepáticas (ALT e FAS) verificou-se que nos 17 animais testados, 47% apresentavam elevação da FAS e nenhum animal evidenciou elevação da ALT.

Dos 11 animais com diagnóstico positivo para *L. infantum* que realizaram o exame de eletroforese das proteínas plasmáticas, a alteração registada com maior frequência foi a

hiperglobulinemia (82%), em 56% do tipo policlonal e em 44% do tipo monoclonal (Gráfico 3). Neste exame, também foram documentadas outras alterações, 48% dos animais apresentaram hiperproteinemia, 47% hipoalbuminemia e 45% diminuição do rácio albumina / globulina.

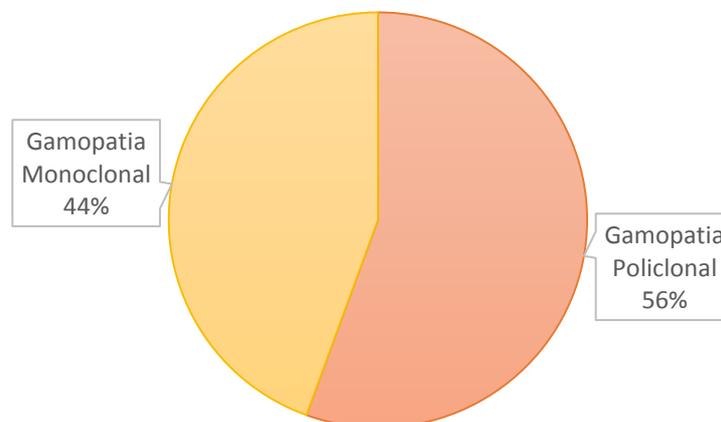


Gráfico 3 – Frequência do tipo de gamopatia observada no proteinograma sérico dos animais infetados por *L. infantum* (n=9).

4.6. Técnica de diagnóstico mais utilizado no Hospital Veterinário do Restelo:

Foram realizados, no período definido, um total de 316 testes específicos para detetar a presença de *L. infantum*, dos quais 10 animais (3%) realizaram teste de diagnóstico mais do que uma vez. Os motivos que levaram à sua realização foram variados tal como se pode verificar no gráfico 4, seja para iniciar profilaxia da doença através da vacinação ou imunoterapia (n=163), seja para confirmar a presença de infeção em animais clinicamente suspeitos (n=103), fazer um “check up” geral (n=35), ou para reavaliar animais infetados que já tinham sido diagnosticados em anos anteriores (n=15).

Os animais que foram submetidos a um “check up” foram aqueles que foram capturados na rua ou adotados em associações, animais que coabitam com outros animais infetados e os “check ups” geriátrico ou pré-cirúrgicos.

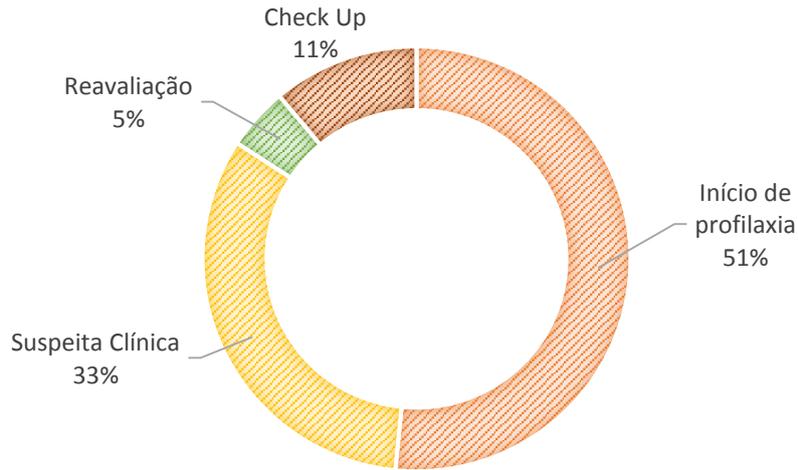


Gráfico 4 – Frequência do motivo para a realização de testes de diagnóstico específicos de *L. infantum* (n=316).

Avaliou-se quais os testes de diagnóstico empregues consoante o motivo que conduzia à sua realização (Gráfico 5).

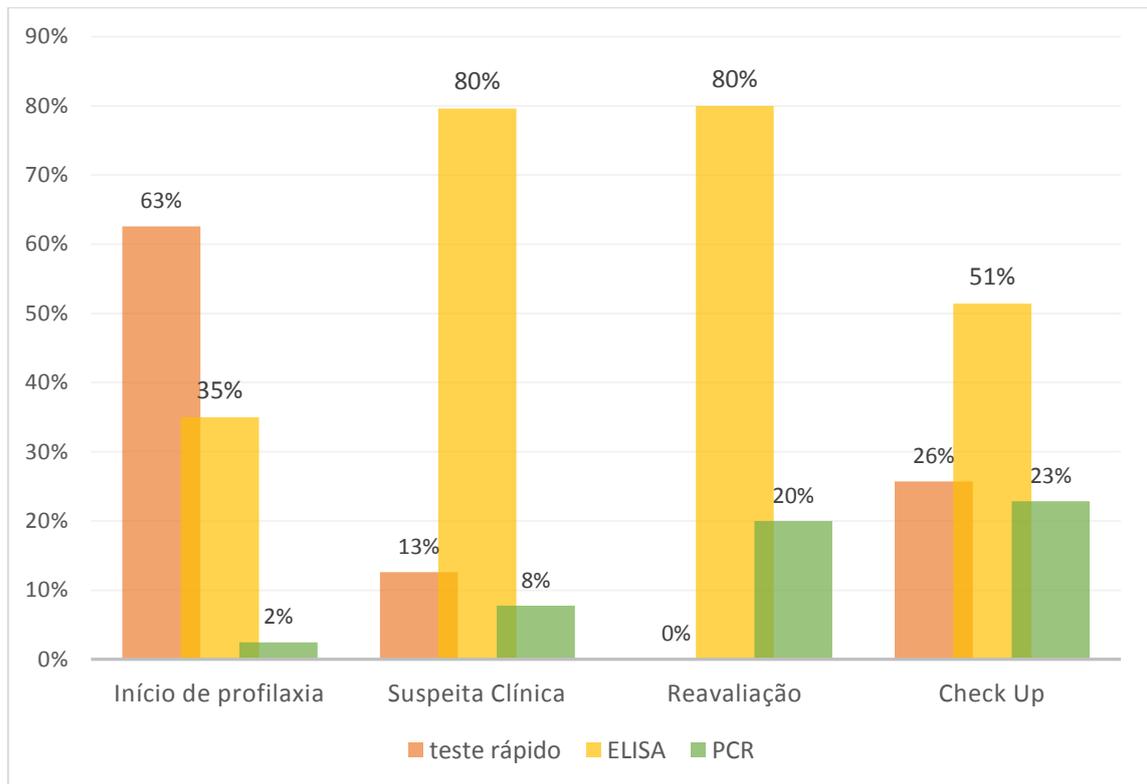


Gráfico 5 – Frequência dos testes de diagnóstico adotados dependendo do motivo da sua realização (n=316).

Dos 163 testes realizados com o objetivo de iniciar profilaxia, o mais utilizado foi o teste rápido (Speed Leish K®) (n=124), seguido pelo teste de ELISA (n=57) e, posteriormente, a técnica de PCR (n=4).

Já dos 103 testes realizados com o intuito de diagnosticar a presença de infecção por existir uma suspeita clínica, o que foi empregue na grande maioria dos casos foi o teste de ELISA (n=82), seguido do teste rápido (n=13) e da técnica de PCR (n=8).

Os 15 testes utilizados para reavaliar animais já infetados limitaram-se apenas à técnica de ELISA (n=12) e a técnica de PCR (n=3).

Aquando a realização de um “check up” do estado geral do animal (n=35), o teste mais utilizado foi o ELISA (n=18), seguido do teste rápido (n=9) e da técnica de PCR (n=8).

4.7. Relacionar a resposta humoral dos animais infetados com a forma clínica:

Pretendeu-se avaliar a associação entre a resposta humoral dos animais diagnosticados com infecção por *L. infantum* (n=26) e o seu quadro clínico (sintomático / assintomático). Dos vinte e seis animais estudados, três não realizaram nenhuma técnica sorológica quantitativa, pelo que não puderam ser incluídos nesta análise. Os restantes animais que realizaram teste de ELISA (n=23) obtiveram um resultado positivo (Gráfico 6).

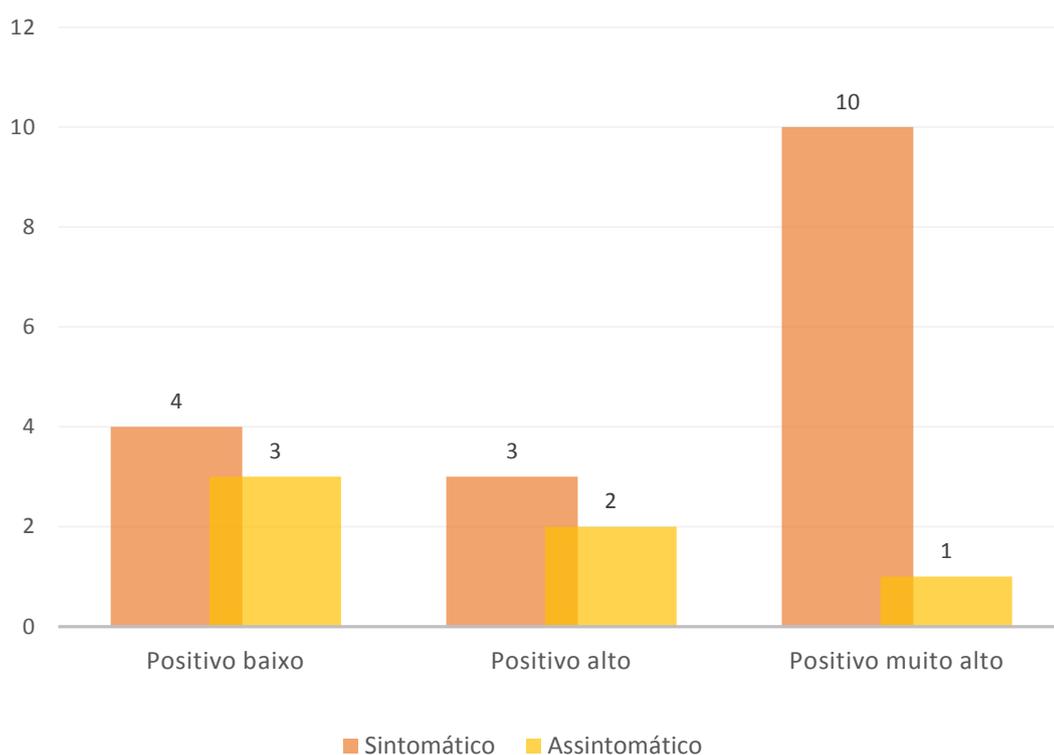


Gráfico 6 – Proporção de animais sintomáticos (n=17) e animais assintomáticos (n=6), segundo o título de anticorpos Anti-Leishmania obtido no teste LEISCAN®.

Dezassete animais exibiam sinais clínicos, dos quais 59% apresentaram um resultado positivo muito alto, 18% um resultado positivo alto e 23% um resultado positivo baixo. Os seis animais que não tinham manifestações clínicas, a maioria (50%) apresentou um resultado positivo baixo, 33% apresentaram um resultado alto e 17% um resultado muito alto.

Para averiguar a presença de diferenças entre animais sintomáticos e assintomáticos e o título quantitativo de Ac foi realizado um teste de Mann-Whitney. No entanto, não se verificou a presença de uma associação estatística entre estas populações (p value = 0,063).

4.8. Relação entre o tipo de prevenção da Leishmaniose Canina com o número de casos de Leishmaniose na amostra:

Foram identificadas as profilaxias adotadas pelos proprietários, até 6 meses antes e após a consulta em que foi realizado o teste de diagnóstico, com base no histórico do animal.

Verificou-se que os 16 animais que foram diagnosticados pela primeira vez, dois não faziam profilaxia da doença, dois encontravam-se vacinados com a Canileish®, um fazia o Leisguard® e um colocava a coleira Scalibor®. Desconhece-se esta informação nos restantes 10 animais.

Dos animais que já tinham sido diagnosticados com Leishmaniose (n=10), apenas se sabe que dois animais efetuavam profilaxia, um com o xarope Leisguard® e um com a coleira Scalibor®.

4.9. Efeitos adversos verificados após vacinação:

Aquando a consulta os proprietários são alertados pelo médico veterinário sobre os possíveis efeitos adversos da vacina, e é administrado um anti-inflamatório (Inflacam®, VIRBAC) para minimizar a ocorrência / gravidade dos efeitos adversos, tal como recomendado (Coedo *et al.*, 2013). Dos 106 canídeos que iniciaram a vacinação com a Canileish®, foi relatada a existência de efeitos secundários em 19 animais (18%) (1 administração = 1 animal).

Após a vacinação, foi relatado pelos proprietários dos animais a ocorrência de manifestações clínicas locais, como dor (n=2), e manifestações clínicas sistémicas, como diarreia (n=4), vômitos (n=5) e febre (n=1). Um dos animais, apresentou sempre vômitos após cada uma das 3 doses, que constituem a primeira vacinação, pelo que o proprietário optou por descontinuar o protocolo vacinal. Houve um animal que apresentou mais do que um sinal clínico.

Detetou-se a presença de uma reação de hipersensibilidade à vacina em sete animais (cinco angioedema e dois choque anafilático), os quais foram atendidos novamente no próprio dia, para receber os cuidados médico-veterinários necessários. Destes, apenas três descontinuaram o protocolo vacinal.

Na Tabela 8 encontra-se relacionada a ocorrência dos efeitos adversos e o momento da administração da vacina Canileish®. Verificou-se que as reações generalizadas estiveram presentes em todos os momentos de administração da vacina. A grande maioria dos animais que apresentou reação de hipersensibilidade foi após a administração da 3ª dose da vacina.

	Reação Generalizada	Reação Local	Reação de Hipersensibilidade
1ª Dose*	6	1	-
2ª Dose*	2	1	1
3ª Dose*	1	-	5
Reforço Anual	1	-	1

Tabela 8 – Relação entre o momento da administração da vacina Canileish® e os efeitos adversos observados. *Primovacinação.

Efetuaram-se testes estatísticos para verificar a existência de uma associação entre o porte do animal com a ocorrência de efeitos adversos, tendo-se verificado que a probabilidade de ocorrência de efeitos adversos nas raças de porte médio /grande é inferior às raças de pequeno porte (OR = 0,351; 95% IC = 0,111 – 1,105), apesar de o resultado não ser estatisticamente significativo (p = 0,09).

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Este capítulo será orientado de acordo com a sequência de resultados apresentados anteriormente, estabelecendo uma relação entre os resultados obtidos e a literatura consultada.

No período estudado, 9% dos animais testados no Hospital Veterinário do Restelo apresentaram um diagnóstico positivo para *L. infantum*. Face aos resultados de prevalência indicados por Cortes *et al.* (2012) este valor é consistente, já que a amostra inclui um grande número de animais com suspeita clínica, estando assim presente um viés de seleção para animais que tendencialmente são acompanhados no médico veterinário e/ou animais que têm a doença.

A ampla distribuição geográfica de animais diagnosticados com Leishmaniose nos vários municípios pertencentes à AML, mesmo que quantitativamente distinta, confirma a existência de condições favoráveis para o endemismo desta zoonose. Apesar das diferentes características associadas à zona urbana e peri-urbana, ambos revelam possuir biótopos favoráveis à manutenção do agente vetor, o qual é essencial para a transmissão da *L. infantum*. Este facto é corroborado por um estudo conduzido por Gouveia (2016), que confirmou a presença de ambas as espécies vetoras de *L. infantum* em Portugal, *P. perniciosus* e *P. ariasi*, numa zona urbana pertencente ao município de Lisboa. No entanto, carece-se de mais estudos entomológicos sobre os flebótomos vetores nas áreas urbanas e peri-urbanas da AML, uma vez que todos outros estudos existentes remontam de 70 anos atrás (Azevedo, 1946 referido por Gouveia, 2016).

Recorreu-se à realização de testes estatísticos para identificar a existência de associações entre diversas variáveis e a presença de infeção, algumas das quais tiveram que ser agregadas dado o número da amostra ser reduzido. Na nossa amostra, apenas se observou uma associação com significado estatístico entre a idade e a presença de infeção.

A Leishmaniose foi diagnosticada com maior frequência em animais com idade superior a 7 anos, e com menos frequência em animais inferiores a um ano de idade. Os resultados obtidos estão de acordo com outros estudos já existentes (Fisa *et al.*, 1999; Cardoso *et al.*, 2004; Cortes *et al.*, 2012), apesar de determinados estudos referirem uma distribuição bimodal (Miranda *et al.*, 2008; Gálvez *et al.*, 2010; Miró *et al.*, 2012). Os animais mais velhos apresentam um risco de infeção superior aos animais com menos de um ano de idade, provavelmente por estarem expostos ao vetor por um período mais prolongado, e também devido ao facto de a idade aumentar a suscetibilidade dos animais ao aparecimento de outras doenças concomitantes, infecciosas ou neoplásicas, que podem despoletar uma infeção latente.

No que diz respeito ao porte dos animais, observou-se uma maior prevalência de infeção em animais de porte grande, isto é, animais com mais de 25kg. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos noutros estudos (Gálvez *et al.*, 2010; Miró *et al.*, 2012). Possivelmente, dada uma maior massa corporal, também existe uma maior superfície exposta à picada do vetor, tal como já foi proposto para a transmissão de outros parasitas (Miró *et al.*, 2012). Adicionalmente, são os animais de porte médio e grande, os mais frequentemente usados em atividades de pastoreio ou guarda, passando maiores períodos de tempo no exterior, pelo que ficam mais expostos aos flebótomos (Gálvez *et al.*, 2010; Cortes *et al.*, 2012).

Quanto à raça, embora se tenha verificado uma maior frequência de diagnóstico de *L. infantum* nos animais de raça pura, comparativamente aos animais de raça cruzada, estes resultados não foram estatisticamente significativos, contrariando os resultados de Cortes *et al.* (2012). Apesar de os canídeos de todas as raças serem suscetíveis à infeção, existem estudos que comprovam que existem raças mais suscetíveis ou mais resistentes à doença. Os animais de raça Podengo de Ibiza e animais de raça cruzada são considerados animais resistentes por desenvolverem uma resposta imunitária predominantemente de tipo celular (Solano-Gallego *et al.*, 2000). As raças mais representadas no nosso estudo foram a Golden Retriever, a Labrador Retriever, a Epagneul Breton e a Boxer, embora sem diferenças significativas com outras raças (França-Silva *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 2008; Sanchez-Robert *et al.*, 2008).

Animais do sexo masculino foram diagnosticados mais vezes com *L. infantum*, embora sem validade estatística, tal como encontrado em alguns outros estudos em que os autores não consideram o sexo um fator determinante (Ciaramella *et al.*, 1997; Gálvez *et al.*, 2010; Cortes *et al.*, 2012; Miró *et al.*, 2012). Associam-se estes resultados obtidos, ao facto de serem normalmente machos que são utilizados como cães de guarda, o que implica uma maior exposição ao vetor, e conseqüente um maior risco de infeção dos mesmos (Campino, 2002; Miró *et al.*, 2008; Miranda *et al.*, 2008).

Segundo um estudo conduzido por Howe e colaboradores (2001), a esterilização de animais com menos de 24 meses de idade pode vir a favorecer a ocorrência de determinadas doenças infecciosas. No entanto, no estudo realizado verificou-se que a grande maioria dos

animais com diagnóstico positivo de Leishmaniose eram inteiros. De momento, não existem estudos epidemiológicos que relacionem o estado reprodutivo com a presença de infeção por *L. infantum*.

Verificou-se que animais de pelo curto e longo apresentam o mesmo risco de infeção. Provavelmente não se verifica a influência desta característica, uma vez que os flebótomos têm como local de alimentação preferencial as zonas glabras, que não estão condicionadas pelo tamanho do pelo (Campino, 2002), apesar de alguns estudos terem verificado um risco de infeção acrescido em animais com pelo curto (Cortes *et al.*, 2012; França-Silva *et al.*, 2003).

Os animais que habitam ou têm acesso frequente ao exterior apresentam um risco 2,5 vezes acrescido de adquirir a infeção, tal como já verificado em outros estudos (Gálvez *et al.*, 2010; Cortes *et al.*, 2012). Tal facto deve-se aos flebótomos serem exofílicos (WHO, 2010), um animal que permaneça no exterior durante período de actividade flebotomínica, isto é, entre o entardecer e o amanhecer, vai estar exposto ao vetor e, conseqüentemente, o risco de adquirir a infeção é substancialmente superior. Assim sendo, deve-se aconselhar os proprietários que evitem passear os seus animais nesses períodos, ou caso os animais habitem no exterior, idealmente estes devem ser resguardados e/ou aplicar produtos repelentes/inseticidas.

Apesar da informação ser limitada em termos da adoção ou não de medidas profiláticas, verificou-se na nossa amostra uma maior frequência de infeção em animais que adotaram medidas profiláticas, comparativamente aos animais que não adotaram nenhum tipo de profilaxia. Sabe-se que não existe nenhuma profilaxia que seja 100% eficaz (Solano-Gallego *et al.*, 2011), pelo que a adoção de apenas um método profilático para com estes animais, pode ter-se revelado insuficiente para proteger o animal da aquisição do parasita. Em alternativa, tal facto também pode estar relacionado com uma utilização incorreta dos produtos por parte do proprietário, seja na sua aplicação e/ou na sua frequência de re-aplicação. Outra hipótese alternativa é a informação incorreta por parte do proprietário, que não é passível de ser validada.

Foram detetados casos de animais diagnosticados não só com Lcan, mas também com outros hemoparasitas transmitidos por vetores. O agente patogénico identificado com maior frequência foi *Rickettsia Conorii*, em animais com e sem Leishmaniose. Na literatura existem bastantes registos de canídeos com Leishmaniose co-infetados com outros hemoparasitas (Trotz-Williams & Trees, 2003; Aguiar, 2011; Tommasi *et al.*, 2013), provavelmente porque os diferentes vetores procuram as mesmas condições climáticas e os mesmos nichos ecológicos. A presença de coinfeções dificulta o diagnóstico, uma vez que estas podem mascarar a presença da infeção por *L. infantum*, ou podem encontrar-se mascaradas aquando o diagnóstico de *L. infantum*, dado apresentarem o mesmo quadro clínico e alterações laboratoriais, tendo assim conseqüências na instituição de uma terapêutica, e conseqüentemente repercussões importantes a nível do prognóstico (Aguiar, 2011).

No estudo realizado constatou-se que apesar de existirem cães que partilham o mesmo espaço doméstico que outros animais já diagnosticados com Leishmaniose, nenhum

apresentou um resultado positivo para a infecção. Tal facto deve-se muito provavelmente, aos donos terem o cuidado de proteger os seus animais, livres de infecção, através da adoção de um conjunto medidas profiláticas por estarem sensibilizados para esta doença e suas consequências.

Na literatura existem grandes variações nas frequências dos sinais clínicos observados nos cães com Leishmaniose. Tais variações, provavelmente, devem-se aos diferentes métodos utilizados nos estudos, que na sua grande maioria são retrospectivos. Os resultados obtidos baseiam-se em registos clínicos pré-existentes, os quais estão dependentes do tipo e qualidade da colheita de informação junto de aos proprietários e médicos veterinários, bem como também estão dependentes de variações individuais dos animais, da patogenicidade do parasita, entre outros fatores. Para análise do perfil clínico de animais com Leishmaniose Canina, foram incluídos aqueles que já tinham sido submetidos a tratamento no passado, pelo que, uma vez que o tratamento ajuda a atenuar a manifestação clínica da doença, pode ter interferência nos resultados obtidos.

Optou-se pela realização do teste de diagnóstico de Leishmaniose após serem descartadas outras possíveis causas, mais prováveis, da sintomatologia exibida pelo animal, ou quando perante casos altamente sugestivos desta infecção. Apenas 14% dos animais considerados suspeitos de Lcan com base na presença de sinais clínicos sugestivos da doença apresentaram um diagnóstico positivo.

Embora as manifestações cutâneas tenham sido os sinais clínicos descritos mais frequentemente (35%), tal como reportado pela literatura, este valor é manifestamente inferior ao indicado por diferentes autores (Koutinas *et al.*, 1999; Miró & Molina, 2006). Esta variação pode dever-se à presença de outras doenças dermatológicas concomitantes, e/ou, à presença de complicações (ex: pioderma, dermatofitose, dermatite por *Malassezia* ou demodecose), que podem ocultar as lesões dermatológicas características de Lcan (Koutinas & Koutinas, 2014).

Apesar de, segundo a literatura, a dermatite exfoliativa ser a forma mais frequentemente descrita (Miró & Molina, 2006), na nossa amostra a sua frequência foi superada pela forma erosiva-ulcerativa. A onicogribose apenas foi encontrada em 2 dos 26 animais (8%), dos quais um também apresentava dermatite exfoliativa. Este sinal clínico é referenciado na bibliografia como sendo um sinal frequente na Leishmaniose Canina, observado em 24 a 30% dos animais (Ciaramella, *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999), e normalmente associado à presença de dermatite exfoliativa (Koutinas & Koutinas, 2014).

Os sinais clínicos digestivos são relatados na bibliografia como pouco frequentes nos animais com Lcan (Adamama-Moraitou *et al.*, 2007), mas no estudo foram dos sinais clínicos mais frequentemente descritos (31%). A teoria de que a presença deste tipo de sintomatologia está associada a uma insuficiência hepática ou renal resultante da evolução da doença (Koutinas *et al.*, 1999; Adamama-Moraitou *et al.*, 2007) pode explicar a frequência verificada, até porque 27% dos animais com Leishmaniose apresentavam alterações hepáticas e/ou renais.

A claudicação foi detetada em 8% dos animais com Lcan, estando de acordo com a frequência registada em outros estudos (Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999), apesar de Agut *et al.* (2003) ter observado esta alteração em 45% dos animais infetados.

Existem estudos que não reportam a existência de sinais neurológicos em animais com Lcan, mas não excluem a possibilidade de poderem ocorrer (Blavier *et al.*, 2001). Um estudo efetuado por Vinuelas *et al.* (2001) identificou a presença de sinais neurológicos em dois animais infetados com *L. infantum*. No estudo efetuado verificou-se a sua presença em dois animais infetados, embora não tenham sido descartados outros diagnósticos diferenciais que poderiam causar a sua presença, pelo que não se pode assumir concretamente esta associação.

A esplenomegalia é um achado cuja prevalência varia entre os 9% (Koutinas *et al.*, 1999) e os 53% (Ciaramella *et al.*, 1997), em estudos semelhantes. Apenas foi identificada esta alteração num animal (4%). Esta grande variação pode dever-se ao facto de ser uma alteração que muitas vezes não é perceptível à palpação, e geralmente, para a sua deteção ser necessário recorrer ao auxílio de métodos de diagnóstico complementares, como a radiologia ou a ultrasonografia (Koutinas *et al.*, 1999)

No estudo apenas foi detetada a presença de linfadenomegalia periférica em 8% dos animais, apesar de na literatura ser descrita entre os 62% e os 90% dos animais infetados com *L. infantum* (Ciaramella, *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999; Lima *et al.*, 2004; Baneth *et al.*, 2008; Cortes *et al.*, 2012). Existem autores que reportam a atrofia dos linfonodos em alguns animais sintomáticos (Giunchetti *et al.*, 2008), principalmente em estados avançados de doença, especialmente em animais com falência renal (Koutinas *et al.*, 1999).

Os três cães com Lcan que tinham lesões oculares também apresentavam outras manifestações clínicas. A frequência obtida (12%) está de acordo com a já descrita por outros autores (Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999; Peña *et al.*, 2000). Todos os animais evidenciaram sinais de conjuntivite, e apenas um, queratoconjuntivite, sendo que estas alterações segundo Peña *et al.* (2000) são bastante frequentes. No entanto nenhum animal apresentou uveíte anterior, alteração esta mais frequentemente descrita na literatura.

Outros sinais clínicos como anorexia, perda de peso, prostração, mucosas pálidas, polidipsia e desidratação foram observados com uma frequência muito aproximada da já relatada por outros autores (Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999; Cortes *et al.*, 2012)

Não foram identificados sinais clínicos como poliúria, febre e atrofia dos músculos nos animais infetados. Provavelmente tal facto deve-se ao diminuto tamanho da amostra, até porque são consideradas manifestações clínicas pouco frequentes (Koutinas *et al.*, 1999; Blavier *et al.*, 2001; Koutinas & Koutinas, 2014).

Cerca de 31% dos animais apresentavam anemia não regenerativa, normocítica e normocrômica. Esta foi uma das alterações, a nível do hemograma, mais registadas, tal como mencionado na literatura (Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999; Solano-Gallego, 2011). O desenvolvimento de um quadro de anemia está associada a inúmeros fatores, tais como

insuficiência renal crônica com redução de produção de eritropoietina, perdas de sangue, hipo ou aplasia medular ou mecanismos auto-imunes (Koutinas *et al.*, 1999; Paltrinieri *et al.*, 2016).

Um leucograma superior ao normal foi um achado tão frequente como a anemia e apenas 13% dos animais apresentaram leucopénia. Os valores obtidos diferem da bibliografia, as alterações do leucograma são considerados achados inconsistentes e portanto pouco específicos nesta doença (Baneth & Solano-Gallego, 2012).

Foi identificada a presença de trombocitopénia em apenas um dos três animais que apresentaram sinais clínicos indicativos de distúrbios de hemostase (um com epistáxis e dois com hematoquézia), pelo que, muito provavelmente, estas hemorragias podem estar associadas a outros fatores, como comprometimento da hemostase secundária, fibrinólise (Ciaramella *et al.*, 2005), hiperviscosidade sérica induzida pela hiperglobulinémia, trombocitopatia e rinite ulcerativa ou não, esta última no caso de epistáxis (Petanides *et al.*, 2008).

Considera-se existir lesão renal em praticamente todos os animais infetados, mas normalmente só surgem as primeiras alterações clínicas e séricas quando a maioria dos nefrónios está acometida, isto é, nas fases avançadas de doença (Baneth *et al.*, 2008). Verificou-se que 37% dos animais apresentaram valores aumentados de ambas as enzimas renais, ureia e creatinina, frequência a qual está de acordo com a bibliografia (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Destes animais, nos quatro que realizaram urianálise, identificou-se a presença de proteína na urina, que é indicativo de afeção glomerular. A insuficiência renal é a principal causa de morte em canídeos com Leishmaniose, pelo que esta é tomada em conta como fator de prognóstico da doença (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

A nível hepático apenas oito animais apresentaram a elevação da actividade da FAS, sendo que nenhum apresentou elevação da atividade da ALT. Também não se observaram sinais clínicos indicativos de falência hepática. Os resultados obtidos estão de acordo com o estudo conduzido por Rallis, que observou uma elevada prevalência de hepatite subclínica em animais infetados. O facto de nenhum animal apresentar elevação da atividade da ALT prende-se com o facto de ser uma doença hepática progressiva, e não de carácter agudo com extensa necrose dos hepatócitos (Rallis *et al.*, 2005).

Os valores séricos de proteínas e globulinas plasmáticas encontravam-se aumentados na grande maioria dos animais, tal como descrito na bibliografia, no entanto, com uma frequência inferior à já descrita (Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999), sendo que tal resultado pode estar associado à presença concomitante de hipoalbuminémia, que pode contribuir para uma normalização dos valores de proteína total obtidos.

A gamopatia do tipo policlonal é a mais frequente, e raramente se verificam casos de gamopatia monoclonal. No estudo, apesar da gamopatia policlonal ser a mais frequente, também se registou um elevado número de casos com gamopatia monoclonal. Estes resultados podem dever-se a possivelmente alguns animais apresentarem outras hemo-infeções concomitantes ou mieloma múltiplo (Paltrinieri *et al.*, 2016). Dos quatro animais que

apresentaram gamopatia monoclonal, dois foram testados para a presença de hemoparasitas e em ambos identificou-se uma infeção por *Rickettsia conorii*.

A diminuição da concentração de albumina sérica registada em 8 de 26 animais (47%), pode ser resultante de um distúrbio da síntese hepática, em casos de doença hepática crónica, de uma perda renal, em casos de doença glomerular, da diminuição da capacidade de absorção intestinal da proteína, ou então, pode estar associada a uma doença crónica (Koutinas *et al.*, 1999; Rallis *et al.*, 2005). A causa mais provável para a diminuição de albumina sérica serão as perdas renais, até porque 5 destes 8 animais apresentavam azotémia, e em dois destes animais, os únicos que realizaram urianálise, verificou-se a presença de proteína na urina.

Foi detetada a diminuição do RAG em 45% dos animais infetados, valor inferior ao observado na literatura. Dos seis animais no qual se descreveu alteração, cinco (83%) tinham Leishmaniose. Foi assim a alteração laboratorial com maior significado, tal como é considerado por alguns autores (Almeida *et al.*, 2005).

De uma forma geral, consoante os motivos para a realização do diagnóstico, variou a técnica de diagnóstico sorológico aplicada pelo médico veterinário, bem como a sua interpretação, tal como recomendado por diferentes autores (Solano Gallego *et al.*, 2009; Paltrinieri *et al.*, 2016).

A grande maioria dos canídeos que realizaram teste de diagnóstico, fizeram-no com o objetivo de iniciar a profilaxia da Leishmaniose com Canileish® ou Leisguard®. Os médicos veterinários seguiram as recomendações de verificar se o animal era sorologicamente negativo antes da administração da vacina, sendo maioritariamente empregue o teste rápido Speed Leish K®, tal como recomendado pelo laboratório (EMA, 2011). O teste de ELISA foi utilizado em alguns casos, provavelmente, o médico veterinário optou por este teste dado apresentar um desempenho de diagnóstico superior ao teste anterior. A técnica de PCR apenas foi realizada em animais que obtiveram resultados inconclusivos nos testes anteriormente descritos, tal como recomendado por Noli e Saridomichelakis (2014). Segundo Solano-Gallego *et al.* (2014), o teste rápido não devia ser utilizado para confirmar a ausência do parasita, dado a baixa sensibilidade do mesmo e provavelmente estarem a ser vacinados animais seropositivos. Também foi realizado o teste de diagnóstico em animais que iniciaram o Leisguard®, apesar de segundo as recomendações de utilização propostas pelo laboratório (AEMPS, 2015), não existir necessidade de o fazer.

Para descartar a presença de infeção por *L. infantum* em animais clinicamente suspeitos, a técnica mais adotada foi a sorologia quantitativa, tal como proposto pela bibliografia (Solano-Gallego *et al.*, 2014; Paltrinieri *et al.*, 2016), uma vez que tem a vantagem de permitir quantificar o nível de anticorpos presentes e, conseqüentemente, obter resultados mais consistentes em relação à presença da infeção. Num reduzido número de casos suspeitos recorreu-se à utilização do teste rápido, provavelmente, porque apesar da sua *performance* de diagnóstico ser inferior ao teste referido anteriormente, tem a vantagem de ser uma opção mais económica e permite obter um resultado rápido (Solano-Gallego *et al.*, 2014). Já a técnica de

PCR foi aplicada a um limitado número de casos com resultados inconclusivos, tal como indicado por Noli e Saridomichelakis (2014).

Um animal vacinado clinicamente suspeito apresentou um resultado positivo no teste rápido, mas acabou por confirmar-se a ausência do parasita por técnica de PCR. Esta problemática vai em conta com uma das grandes desvantagens da vacina, uma vez que não permite uma distinção entre os anticorpos vacinais e os produzidos pela resposta imunitária ao parasita (EFSA, 2015), apesar de Sagols e colaboradores (2012) suportarem que o teste rápido Speed Leish K® permite esta distinção.

Animais saudáveis nos quais se pretendia descartar a presença de infeção, o teste utilizado em cerca de metade dos animais foi o teste de ELISA. No entanto, em 26% dos animais optou-se pela realização de um teste rápido. A utilização deste último não é recomendada para o diagnóstico de animais com doença subclínica, uma vez que apresenta uma baixa sensibilidade (Solano-Gallego *et al.*, 2014), sobretudo em animais residentes em zonas endémicas de Leishmaniose (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Recorreu-se à técnica de PCR num reduzido número de casos, uma vez que os animais encontravam-se vacinados com Canileish®, para evitar uma possível interferência dos anticorpos vacinais. Sendo, no entanto este procedimento mais dispendioso e mais invasivo, dependendo do tipo de amostra a utilizar.

Para a monitorização de animais diagnosticados com Lcan, o teste optado foi essencialmente o teste quantitativo de ELISA, tal como recomendado por diferentes autores (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Oliva *et al.*, 2010; Torres *et al.*, 2010; Roura *et al.*, 2013). Este teste sorológico tem a vantagem de determinar o nível de anticorpos e, conseqüentemente, permite avaliar a resposta do animal à terapia instituída, bem como, identificar antecipadamente a progressão da doença, no caso de animais que suspenderam o tratamento. Uma redução do título de Ac é indicativo de uma resposta clínica favorável ao tratamento. Já se, o nível de Ac aumentar ou manter-se, é indicativo de uma ausência de resposta face ao tratamento, ou do reaparecimento da doença, caso o animal já tenha suspenso o tratamento (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Oliva *et al.*, 2010; Roura *et al.*, 2013). Um limitado número de casos já diagnosticados realizaram teste de PCR, um com o propósito de confirmar o diagnóstico de Leishmaniose efetuado noutra CAMV e um outro para avaliar a presença do parasita no tecido conjuntival, devido à presença de lesões oculares.

O valor do título de anticorpos anti-Leishmania obtido com a realização do teste quantitativo de ELISA variou consoante a presença / ausência de sinais clínicos. Apesar de não existir uma associação significativa, os resultados demonstram que animais sintomáticos exibem títulos de Ac superiores quando comparados com os animais assintomáticos. Os resultados suportam os estudos prévios (Reis *et al.*, 2006; Miró *et al.*, 2012). Reis e colaboradores (2006) sugerem que as IgG anti-Leishmania plasmáticas podem ser marcadores não só do estado clínico do animal, como também permitem inferir a carga parasitária nos tecidos, sendo por isso considerados bons indicadores da morbilidade da doença.

Não foi possível alcançar o objetivo de relacionar o tipo de profilaxia adotada com o número de casos de animais diagnosticados com *L. infantum*, dado o facto de a informação

disponível ser insuficiente, por existir um grande número de fichas sem o registo sobre a profilaxia desta infeção. Torna-se importante ressaltar que a informação obtida nas fichas clínicas é limitada, e que os animais poderão usar outros produtos veterinários profiláticos, já que estes podem ser adquiridos noutros CAMV ou em estabelecimentos comerciais legalizados para a venda de produtos farmacêuticos de uso veterinário.

Dos animais diagnosticados com Leishmaniose pela primeira vez, quatro faziam a profilaxia da infeção e dois não, apenas um destes animais estava protegido contra a aquisição da infeção através do uso de uma coleira repelente e inseticida (Scalibor®) e os restantes três animais estavam protegidos através da toma de um imunoestimulante (Leisguard®) ou da vacinação (Canileish®).

Os dois cães diagnosticados com a infeção por *L. infantum* que se encontravam vacinados, manifestavam uma grande variedade de sinais clínicos. Tal facto pode estar relacionado com a presença de uma coinfeção, que pode contribuir para exacerbar os sinais clínicos presentes, ou com falha de eficácia vacinal. No entanto, os estudos existentes até ao momento reportam a eficácia da vacina na prevenção do desenvolvimento de doença clínica (Oliva *et al.*, 2012; Wylie *et al.*, 2014a).

O animal que realizava Leisguard® apenas manifestou algumas lesões dermatológicas, não apresentando qualquer tipo de alteração a nível laboratorial. O Leisguard® estimula a imunidade celular pelo que além de prevenir a infeção, também minimiza o desenvolvimento da doença clínica (Sabate *et al.*, 2014), razão que pode justificar os poucos sinais clínicos observados. No entanto, este método profilático carece de mais estudos para confirmar a sua eficácia (EFSA, 2015).

Tendo em conta que não existe nenhuma medida profilática 100% eficaz e sendo Portugal uma zona endémica de Leishmaniose, torna-se crucial a adoção de mais do que uma medida profilática, o uso de inseticidas / repelentes, especialmente no período de actividade flebotómica, e se possível, vacinar os animais, ou instituir uma terapêutica imunoestimulante. Assim, caso os flebótomos escapem ao efeito inseticida / repelente, a vacina irá prevenir o estabelecimento da infeção (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Dos animais diagnosticados em anos anteriores e que já tinham efetuado tratamentos, dois faziam terapia imunomoduladora e um usava coleira repelente e inseticida. O tratamento para além de permitir uma remissão dos sinais clínicos, também é importante para diminuir a carga parasitária e assim diminuir a probabilidade de transmissão de *L. infantum* para o flebótomo. No entanto, é crucial o uso de formulações inseticidas e/ou repelentes, para assim prevenir as picadas dos flebótomos e sua infeção (Solano-Gallego *et al.*, 2011; Vulpiani *et al.*, 2011). Assim sendo, animais infetados deveriam estar protegidos por um conjunto de medidas de forma a controlar o seu papel de hospedeiro reservatório de *L. infantum*.

Após a administração da vacina Canileish® foi registado de forma muito frequente (18%) o aparecimento de sinais clínicos, os quais muito provavelmente estarão associados à utilização deste produto. O valor obtido não está de acordo com o último estudo oficial da VIRBAC, no qual se descreve a rara ocorrência (0,079%) de efeitos adversos (Breton *et al.*,

2014). A obtenção de um valor superior ao reportado na farmacovigilância pressupõe a existência de uma subnotificação dos casos, provavelmente porque muitas reações adversas já são encaradas com normalidade, quer pelo médico veterinário, quer pelo proprietário.

A maioria dos efeitos observados na nossa amostra foram sistémicos e os menos observados foram locais, apesar de segundo a bibliografia estes últimos serem os mais frequentemente observados. Esta diferença pode dever-se à ação local do anti-inflamatório administrado aquando a vacinação, ou então, por serem desvalorizados e assim não comunicados pelos proprietários, precisamente por serem sinais locais transitórios.

Ao contrário da literatura, verificaram-se sete casos (6,6%) de reações graves de hipersensibilidade, sobretudo na 3^o dose da primovacinação, apesar também se ter verificado a sua ocorrência na 2^o dose da primovacinação e no reforço anual. Coedo (2013) também descreve a ocorrência deste tipo de reações aquando da 2^o e 3^o doses.

A maioria dos animais acometidos eram de raça pequena, no entanto as reações mais graves foram mais frequentemente relatadas em animais de tamanho médio e grande, não se verificando no entanto a existência de uma associação estatística. Os resultados obtidos estão de acordo com Coedo (2013) e vão contra as especulações de que animais de pequeno porte são mais sensíveis ao aparecimento de reações adversas.

6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estímulo para a realização deste estudo prendeu-se com o facto de a Leishmaniose ser uma zoonose de carácter (re) emergente, possivelmente graças às alterações climáticas que se têm vindo a observar nos últimos tempos que tem favorecido o aumento da actividade flebotomínica e da duração da época de transmissão de *Leishmania infantum*. Além de, atualmente, devido à crise socioeconómica, muitos proprietários terem vindo também a descuidar na profilaxia dos seus animais de companhia.

Este estudo permite contribuir para a avaliação da situação atual, contribuindo assim para uma intervenção posterior no âmbito do diagnóstico, prevenção e controlo da doença. O aluno com a execução deste trabalho não só alcançou a maioria dos objetivos a que se propôs, como também desenvolveu competências relacionadas com as práticas da investigação científica.

Pode-se concluir que a Leishmaniose Canina é diagnosticada na prática clínica com relativa frequência, pelo que esta doença deve continuar a ser incluída na lista de diagnósticos diferenciais quando perante uma suspeita de infeção sistémica. Os animais diagnosticados provém de diferentes municípios pertencentes à Área Metropolitana de Lisboa, e verificou-se que a área em estudo reúne um conjunto de condições favoráveis à manutenção do seu vetor, cuja presença é fundamental para que ocorra a transmissão da Leishmaniose. Face a (re) emergência descrita noutros países pertencentes à Europa, torna-se importante otimizar as redes de vigilância entomológica e epidemiológica existentes no território nacional. Seria necessário avaliar a distribuição geográfica de um maior número de animais para conseguir

determinar as áreas de risco, o que permitiria dirigir de forma mais acertada as medidas de controlo necessárias a serem instituídas. Também seria interessante explorar a distribuição espacial dos casos de Leishmaniose Canina e os de Leishmaniose Humana, para assim estudar uma possível associação entre estes dois fenómenos.

A compreensão de fatores de risco associados à presença de infeção permitem auxiliar no diagnóstico e adotar estratégias preventivas a nível individual. No estudo realizado, os animais com mais de sete anos de idade apresentam um risco acrescido de serem positivos a *L. infantum*. Também, foi identificada a presença de coinfeções em animais com leishmaniose, o que não só dificulta o diagnóstico, como, também, pode ter repercussões negativas no prognóstico da doença.

Os animais infetados com *L. infantum* podem apresentar sintomatologia clínica bastante heterogénea, predominando as manifestações cutâneas. Alterações laboratoriais como anemia normocítica e normocrômica, alterações leucocitárias e/ou disproteïnemias, apesar de serem inespecíficas são indicadas na literatura como sugestivas de infeção. A diminuição do rácio Albumina / Globulina foi a alteração laboratorial mais concetânea com a presença de infeção por *L. infantum*. Pressupõe-se que com a introdução da vacinação se comecem a registar alterações a nível epidemiológico e no curso clínico da doença, pelo que será necessário a realização de mais estudos para avaliar este pressuposto ao longo do tempo.

A abordagem diagnóstica feita pelo médico veterinário varia consoante os animais. Dependendo do motivo do diagnóstico varia o teste de diagnóstico a ser utilizado, bem como a forma como os resultados destes testes são interpretados. O título de anticorpos anti-Leishmania, obtido através dos testes quantitativos de diagnóstico, pode refletir o estado clínico do animal (assintomático / sintomático). Atualmente, os clínicos deparam-se com algumas dificuldades no diagnóstico, nomeadamente em distinguir os anticorpos vacinais daqueles produzidos pela presença do parasita, pelo que seria importante o desenvolvimento de protocolos laboratoriais que permitam esta distinção.

Não foi possível avaliar a existência de uma relação entre a profilaxia adotada e os animais diagnosticados com leishmaniose. Foi diagnosticada a presença da infeção em animais que faziam a profilaxia da doença, pelo que deve-se reforçar a associação de mais do que uma medida profilática, mas também elucidar a sua correta aplicação aos proprietários dos animais. A profilaxia da infeção é determinante para o controlo não só da infeção canina, como da humana.

A ocorrência de reações adversas após a vacinação foi registada de forma muito frequente, afetando maioritariamente animais de raça pequena, apesar dos efeitos mais graves serem descritos, especialmente, em animais de porte médio a grande, pelo que serão necessários mais estudos e uma maior colaboração por parte dos médicos veterinários, para reportar casos de efeitos adversos aos serviços de farmacovigilância. Um maior volume de informações sobre a vacina permitirá avaliar de forma mais real a existência de reações adversas e sua frequência, sendo também fundamental para avaliar possíveis fatores de risco associados à sua ocorrência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abranches, P., Conceição-Silva, F. M. & Silva Pereira, M. C. (1984). The sylvatic cycle in the enzootic endemic focus of Arrábida. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 8, 197-200.
- Abranches, P., Pires, C., Conceição-Silva, F., Silva-Pereira, M. & Gomes, G. (1987). O kala-azar em Portugal. VI. Inquérito epidemiológico realizado na Região Metropolitana de Lisboa: Interpretação da estrutura e dinâmica do foco endêmico. *J Soc Cienc Med Lisboa*, 151: 364-379 In: Campino, L. & Maia, C. (2010). Epidemiologia das Leishmanioses em Portugal. *Acta Med Port*, 23, 859-864.
- Adamama-Moraitou K.K., Rallis T.S., Koytinas A.F., Tontis D., Plevraki K. & Kritsepi M. (2007). Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. *Am J Trop Med Hyg*, 76, 53-55.
- Adler, S. & Theodor, O. (1957). Transmission of Disease Agents by Phlebotomine sand Flies. *Ann Rev Entomol*, 2, 203-226.
- AEMPS - Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (2015): Ficha Técnica Leisguard - 5 Mg/MI Suspension Oral Para Perros. Disponível em: <https://www.aemps.gob.es> (consultado a 13/ 02/ 2017).
- Afonso, M. & Alves-Pires, C. (2008). Capítulo II: Bioecologia dos vetores. In: Santos-Gomes, G. & Pereira da Fonseca, I., Leishmaniose canina (pp. 27-40). Lisboa: Chaves Ferreira - Publicações, S.A.
- Aguiar, M. C. C. M. (2011). Estudo comparativo das alterações clínicas e laboratoriais em canídeos mono-infetados com *Leishmania infantum* versus canídeos co-infetados com *Leishmania infantum* e com *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e/ou *Rickettsia conorii*. Dissertação de Mestrado, Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa.
- Agut, A., Corzo, N., Murciano, J., Laredo, F.G. & Soler, M. (2003). Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs with *Leishmaniasis*. *Vet Rec*, 153, 648-652.
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J. & Marty, P. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349.
- Almeida, M.A., Jesus, E.E., Sousa-Atta, M.L., Alves, L.C., Berne, M.E., Atta, A.M. (2005). Clinical and serological aspects of visceral Leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol*, 127, 227-232.
- Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J. & Nieto, J., (2004). Canine *Leishmaniasis*. *Adv Parasitol*, 57, 1-88.
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J. & de Boer, M. (2012). *Leishmaniasis* worldwide and global estimates of its incidence. doi.org/10.1371/journal.pone.0035671.
- Alves, V.B., Freitas, R.A. & Barret, T. (2008). *Lutzomyia maruaga* (Diptera: Psychodidae), a new bat-cave sand fly from Amazonas, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 103, 251- 253.
- Alves-Pires, C., Afonso, M.O., Janz & Semião-Santos, S.J. (2004). The phlebotomine sand flies of Portugal. XII . The phlebotomine of the Évora leishmaniasis focus (1999-2000). *Acta Parasitológica Portuguesa*, 11, 41-45.

- Alves-Pires, C., Santos-Gomes, G.M., Pratlong, F., Ribeiro, H., Campino, L. & Abranches, P. (1991). Phlébotomes du Portugal. IV. Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* par *Leishmania infantum* MON-24 dans le foyer de l'Alto Douro. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 66, 47-48.
- Amusategui, I., Sainz, A., Aguirre, E. & Tesouro, M.A. (2004). Seroprevalence of *Leishmania infantum* in northwestern Spain, an area traditionally considered free of *Leishmaniasis*. *Ann N Y Acad Sci*, 1026, 154-157.
- Ashford, R. W. (2000). The *Leishmaniases* as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*, 30, 1269–1281.
- Azevedo, J. F. (1946). Novos dados sobre a biologia das espécies *Phlebotomus* de Lisboa e arredores. *Manuais do Instituto de Medicina Tropical*, 3, 7-20. In: Gouveia, S. (2016). A densidade e a variação sazonal de flebotomos (Diptera, Psychodidae), vetores de *Leishmania*, em área urbana da região de Lisboa: repercussões na transmissão vetorial. Dissertação científica do Mestrado em Parasitologia Médica, Universidade Nova de Lisboa (Portugal), pp. 29 – 62.
- Baneth, G. & Aroch, I. (2008). Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. *Veterinary Journal*, 175, 14-15.
- Baneth, G. & Solano-Gallego, L. (2012). *Leishmaniasis*. In: Greene, C. E. ed., *Infectious diseases of the dog and cat*, 4^o ed, Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri (Estados Unidos da América), pp. 734-748.
- Baneth, G., Koutinas, A., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P. & Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniasis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitology*, 24, 324-330.
- Bañuls, A.-L., Hide, M. & Prugnolle, F. (2007). *Leishmania* and the *Leishmaniases* : A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. *Advances in Parasitology*, 64.
- Berger, Stephen (2017). *Visceral Leishmaniasis: Global Status*. Gideon E-BOOK Series (edição 2017). GIDEON Informatics, Los Angeles (Estados Unidos da América), pp.97 - 99
- Blavier, A., Keroack, S., Denerolle, P., Goy-Thollot, I., Chabanne, L., Cadoré, J.L. & Bourdoiseau, G. (2001). Atypical forms of canine leishmaniasis. *Vet J.*, 162, 108–120.
- Bourdeau, P., Saridomichelakis, M.N., Oliveira, A., Oliva, G., Kotnik, T., Gálvez, R., Manzillo, V.F., Koutinas, A.F., Pereira da Fonseca, I. & Miró, G. (2014). Management of canine leishmaniasis in endemic SW European regions: a questionnaire-based multinational survey. doi.org/10.1186/1756-3305-7-110.
- Branco, S., Alves-Pires, C., Maia, C., Cortes, S., Cristovão, J., Gonçalves, L., Campino, L. & Afonso, M.O. (2013). Entomological and ecological studies in a new potential zoonotic leishmaniasis focus in Torres Novas municipality, central region, Portugal. *Acta Trop*, 125, 339–348.
- Brandonisio, O., Carelli, G., Altamura, M., Varvara, B. & Ceci, L. (1990). Circulating immune complexes and autoantibodies in canine Leishmaniasis. *Parasitologia*, 32, 275–81.
- Brandonisio, O., Panunzio, M., Faliero, S.M., Ceci, L., Fasanella, A. & Puccini, V. (1996). Evaluation of polymorphonuclear cell and monocyte functions in *Leishmania infantum*-infected dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 53, 95–103.
- Brazil, R.P. & Oliveira, S.M. (1999). Parthenogenesis in the sandfly *Lutzomyia mamedei* (Diptera: Psychodidae). *Med Vet Entomol*, 13, 463-464.

- Breton, C., Frontczak, N. & Gardey, L. (2014). CaniLeish® Vaccine - A review of three and a half years of pharmacovigilance data. *Pharmacovigilance Department, VIRBAC, Carros (França)*.
- Campino, L. & Maia, C. (2010). Epidemiologia das Leishmanioses em Portugal. *Acta Med Port*, 23, 859-864.
- Campino, L. (2002). Canine reservoirs and Leishmaniasis: epidemiology and disease. In: *World Class Parasites – Leishmania (Vol 4)* ed. Farrel, Jay O. Kluwer Academic Publishers, Londres, pp. 45 – 57.
- Cardoso, L., Schallig, H.D., Neto, F., Kroon, N. & Rodrigues, M. (2004). Serological survey of Leishmania infection in dogs from the municipality of Peso da Regua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta Trop*, 91, 95-100.
- Chamaille, L., Tran, A., Meunier, A., Bourdoiseau, G., Ready, P. & Dedet, J.P. (2010). Environmental risk mapping of canine Leishmaniasis in France. *Parasit Vectors*, 3, 31.
- Ciaramella, P. & Corona, M. (2003). Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. *Compendium on Continuing Education*, 25, 358–369.
- Ciaramella, P., Oliva G., Luna, R.D., 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*. *Vet Rec.*, 141, 539–543.
- Ciaramella, P., Pelagalli, A., Cortese, L., Pero, M. E., Corona, M., Lombardi, P., Avallone, L. & Persechino, A. (2005). Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet J*, 169, 465-467.
- Coedo, R. (2013). CaniLeish®: un año de experiencia en España. *BIONEWS - Boletín informativo sobre avances en Biología*, nº10.
- Cortadellas, O., del Palacio, M.J., Bayon, A., Albert, A. & Talavera, J. (2006). Systemic hypertension in dogs with Leishmaniasis: prevalence and clinical consequences. *J Vet Intern Med*, 20, 941–947.
- Cortes, S., Afonso, M.O., Alves-Pires, C. & Campino, L. (2007). Stray dogs and Leishmaniasis in Urban Areas, Portugal. *Emerg Infect Dis*, 13, 1431–1432.
- Cortes, S., Vaz, Y., Neves, R., Maia, C., Cardoso, L. & Campino, L. (2012). Risk factors for canine Leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Vet Parasitol*, 189, 189-196.
- Coutinho, M. T. Z. & Linardi, P. M. (2007). Can fleas from dogs infected with canine visceral Leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Veterinary Parasitology*, 147, 320–325.
- Coutinho, M. T. Z., Bueno, L. L., Sterzik, A., Fujiwara, R. T., Botelho, J. R., De Maria, M., Genaro, O. & Linardi, P. M. (2005). Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral Leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 128, 149–155.
- Dantas-Torres, F. & de Brito, M.E., Brandão-Filho, S.P. (2006). Seroepidemiological survey on canine Leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Vet Parasitol*, 140, 54-60.
- Dantas-torres, F. (2007). The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.007.

- Dantas-torres, F., Solano-gallego, L., Baneth, G., Ribeiro, V. M., Paiva-cavalcanti, M. & Otranto, D. (2012). Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. doi.org/10.1016/j.pt.2012.08.007.
- Dantas-Torres, M., Bardagí, M., Roura, X., Zanna, G., Ravera, I. & Ferrer, L. (2011). Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J*, 188, 346-351.
- Dedet, Jean-Pierre (2002). Current Status of epidemiology of Leishmaniasis. In: *World Class Parasites – Leishmania* (Vol 4) ed. Farrel, Jay O. Kluwer Academic Publishers, London,
- EMA - European Medicines Agency (2011): CaniLeish - Canine vaccine against *Leishmania infantum* adjuvanted. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu>
- EMA - European Medicines Agency (2016): Letifend - Canine *Leishmaniasis* vaccine (recombinant protein). Disponível em: <http://www.ema.europa.eu>
- European Food Safety Authority (EFSA) (2015). Scientific Opinion on canine leishmaniosis. *EFSA Journal*, 13, 4075.
- Ferreira, M.G., Fattori, K.R., Souza, F. & Lima, V.M., (2009). Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. *Vet. Parasitol.* 165, 150–154.
- Ferrer L. (2004) Simultaneous presentation of leishmaniosis and other infectious diseases: clinical approach and mechanisms. In: *Proceedings of the International Congress on Canine Leishmaniasis*. Naples, Italy, SCIVAC, 37–8.
- Fisa, R., Gállego, M., Castillejo, S., Aisa, M. J., Serra, T., Riera, C., Carrió, J., Gallego, J. & Portús, M. (1999). Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. *Vet Parasitol.* , 83, 87–97.
- França-Silva, J.C., da Costa, R.T., Siqueira, A.M., Machado-Coelho, G.L., da Costa, C.A., Mayrink, W., Vieira, E.P., Costa, J.S., Genaro, O. & Nascimento, E. (2003). Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol*, 111, 161-173.
- Gálvez, R., Miró, G., Descalzo, M.A., Nieto, J., Dado, D., Martín, O., Cubero, E. & Molina, R. (2010). Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniosis in the Madrid region (central Spain). *Vet Parasitol*, 169, 327-334.
- Gaskin, A.A., Schantz, P., Jackson, J., Birkenheuer, A., Tomlinson, L., Gramiccia, M., Levy, M., Steurer, F., Kollmar, E., Hegarty, B.C., Ahn, A. & Breitschwerdt, E.B. (2002). Visceral Leishmaniasis in a New York Foxhound Kennel. *Journal of veterinary internal medicine*, 16, 34-44.
- Gharbi, M., Mhadhbi, M., Rejeb, A., Jaouadi, K., Rouatbi, M. & Darghouth, M.A. (2015). Leishmaniosis (*Leishmania infantum* infection) in dogs. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 34, 613-626.
- Giunchetti, R.C., Martins-Filho, O.A., Carneiro, C.M., Mayrink, W., Marques, M.J., Tafuri, W.L., Corrêa-Oliveira, R. & Reis, A.B. (2008). Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral Leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 121, 23–33.
- Gouveia, S. (2016). A densidade e a variação sazonal de flebótomos (Diptera, Psychodidae), vetores de *Leishmania*, em área urbana da região de Lisboa: repercussões na transmissão vetorial. Dissertação científica do Mestrado em Parasitologia Médica, Universidade Nova de Lisboa (Portugal), pp. 29 – 62.

- Gradoni, L. (2002). The diagnosis of canine leishmaniasis. In: *World Class Parasites – Leishmania* (Vol 4), Ed. Farrel, Jay O. Kluwer Academic Publishers, London, pp. 33 – 43.
- Gradoni, L. (2015). Canine Leishmania vaccines: Still a long way to go. doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.003
- Gramiccia, M., Gradoni, L. & Orsini, S. (1992). Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. *Ann Trop Med Parasitol*, 86, 613-620.
- Helhazar, M., Leitão, J., Duarte, A., Tavares, L. & da Fonseca, I.P. (2013). Natural infection of synanthropic rodent species *Mus musculus* and *Rattus norvegicus* by *Leishmania infantum* in Sesimbra and Sintra: Portugal. *Parasit. Vectors*, 6, 88.
- Holzmuller, P., Bras, R. & Lemesre, J.-L. (2006). Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. *Parasitology*, 132, 19– 32.
- Howe, L.M., Slater, M.R., Boothe, H.W., Hobson, H.P., Holcom, J.L. & Spann, A.C. (2001). Long-term outcome of gonadectomy performed at an early age or traditional age in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 218, 217-221.
- Killick-Kendrick R, Wilkes TJ, Bailly M, Bailly I & Righton LA. (1986). Preliminary field observations on the flight speed of a phlebotomine sandfly. *Trans. R. Soc. Trop.Med. Hyg.* 80, 138–142.
- Killick-Kendrick, R. (2002). The biology and control of phlebotomine sand flies. In: *World Class Parasites – Leishmania* (Vol 4), Ed. Farrel, Jay O. Kluwer Academic Publishers, London, pp. 33 – 43.
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Focheux, C., Dereure, J., Puech, M.P. & Cadiergues, M.C. (1997). Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine Leishmaniasis. *Med Vet Entomol*, 11, 105-111.
- Koutinas, A. F. & Koutinas, C. K. (2014). Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Vet Pathol*, 51, 527
- Koutinas, A.F., Polizopoulou, Z.S., Saridomichelakis, M.N., Argyriadis, D., Fytianou, A. & Plevraki, K.G. (1999). Clinical considerations on canine visceral Leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989–1996). *J Am Anim Hosp Assoc*, 35, 376–383.
- Koutinas, A.F., Saridomichelakis, M.N., Mylonakis, M.E., Leontides, L., Polizopoulou, Z., Billinis, C., Argyruadis, D., Diakou, N. & Papadopoulos, O. (2001). A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol*, 98, 247–261.
- Lainson, R & Shaw, JJ. (1987). Evolution, classification and geographical distribution In: DEDET, Jean-Pierre (2002). Current Status of epidemiology of *Leishmaniases*. In: Farrel, Jay O. *World Class Parasites - Leishmania* (Vol 4), Londres: Kluwer Academic Publishers
- Lane, R.P. (1993). Sandflies (Phlebotominae). In: Lane, R.P. & Crosskey R.W., *Medical Insects and Arachnids*, Londres: Chapman & Hall, pp. 78-119.
- Léger, N. & Depaquit, J. (2001). *Les phlebotomes et leur role dans la transmission des Leishmanioses*. *Rev. Fr. Lab.*, 338, 41-48.
- Lewis, D. J., Young, D.G., Fairchild, G.B. & Minter, D.M. (1977). Proposals for a stable classification of the Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Systematic Entomology*, 2, 319-332.

- Lewis, D.J. & Domoney, C. R., (1966). Sugar meals in Phlebotominae and Simuliidae (Diptera). *Proceedings of the Royal Entomological Society of London. Series A, General Entomology*, 41, 175–179.
- Lima, W.G., Michalick, M.S.M., Melo, M.N., Tafuri, W.L. & Tafuri, Wg. L. (2004). Canine visceral Leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Trop*, 92, 43–53.
- Maia & Campino (2008a): Maia, C. & Campino, L. (2008). Importance of Cats in Zoonotic *Leishmaniasis* in Portugal. <http://doi.org/10.1089/vbz.2007.0247>.
- Maia & Campino (2008b): Maia, C. & Campino, L. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 158, 274–287.
- Maia, C. & Cardoso, L. (2015). Spread of *Leishmania infantum* in Europe with dog travelling. *Veterinary Parasitology*. doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.05.003.
- Maia, C., Maurício, I., Campino, L., Cardoso, L., Madeira de Carvalho, L., Afonso, O., Neves, R. & Vila de Brito., T. (2011). Primeiro relatório regular da LEISHnet: ONLeish – Observatório Nacional das Leishmanioses. *Veterinary Medicine*, 22–26.
- Maia, C., Nunes, M., Marques, M., Henriques, S., Rolão, N. & Campino, L. (2013). In vitro drug susceptibility of *Leishmania infantum* isolated from humans and dogs. *Exp Parasitol*, 135, 36–41.
- Maia, C., Ramada, J., Cristo, J. & Campino, L. (2007). Diagnosis of canine Leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. doi:10.1016/j.tvj.2007.08.009.
- Manna, L., Corso, R., Galiero, G., Cerrone, A., Muzj, P. & Gravino, A.E. (2015). Longterm follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. *Parasit Vectors*, 8, 289.
- Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N. & Gradoni, L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of Leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27, 123–147.
- Maroli, M., Rossi, L., Baldelli, R., Capelli, G., 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. *Trop Med Int Health*, 13, 256–264.
- Martinez, S.S., Strauss-Ayali, D., Cerón, J.J. & Baneth, G. (2011). Acute phase protein response in experimental canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 180, 197–202.
- Martin-Sanchez, J., Gallego, M., Baron, S., Castillejo, S. & Morillas-Marquez, F. (2006). Pool screen PCR for estimating the prevalence of *Leishmania infantum* infection in sandflies (Diptera: Nematocera, Phlebotomi- dae). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*, 100, 527–532. In: Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. & Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165, 1–18.
- Masucci, M., De Majo, M., Contarino, R. B., Borruto, G., Vitale, F. & Pennisi, M. G. (2003). Canine *Leishmaniasis* in the newborn puppy. *Veterinary Research Communications*, 27, 771–774.
- Menn, B., Lorentz, S. & Naucke, T.J. (2010) Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. *Parasit Vectors*, 3, 34.

- Mettler, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, H. & Deplazes, P. (2005). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *Journal Clinical Microbiology*, 43, 5515-5519.
- Millán, J., Ferroglio, E. & Solano-gallego, L. (2014). Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. doi.org/10.1007/s00436-014-3929-2
- Miranda, S., Roura, X., Picado, A., Ferrer, L., & Ramis, A. (2008). Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniasis diseased dogs. http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.09.003.
- Miró, G. & Molina, R. (2006). Leishmaniasis canina: Manejo clínico y situación actual en España. *Bayer HealthCare Edition*, pp. 114.
- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Oliva, G. & Baneth, G. (2008). Canine leishmaniasis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology*, 24, 371–377.
- 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. *Parasit Vetors*, 5, 60.
- Miró, G., Gálvez, R., Fraile, C., Descalzo, M.A. & Molina, R. (2011). Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. *Parasit Vetors*, 4, 52.
- Miró, G., Gálvez, R., Mateo, M., Montoya, A., Descalzo, M.A. & Molina, R. (2007). Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Vet Parasitol*, 143, 375-379.
- Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andrés, M., González, F., Castillo, J.A., Lucientes, J. & Alvar, J. (1994). Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 88, 491-493.
- Molina, R., Jiménez, M.I., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., Melero, S. & Bernal, J. (2012). The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet. Parasitol*, 190, 268–271.
- Moreno, J. & Alvar, J. (2002). Canine Leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, 18, 399–405.
- Moreno, P. (1999). Evaluation of secondary haemostasis in canine Leishmaniasis. *Vet Rec*, 144, 169–17.
- Neves, R., cardoso, L., afonso, M. O. & Campino, L. (2007). Leishmaniose canina em Portugal Continental - o que sabem os proprietários de cães acerca desta zoonose parasitária. *Vet. Med.*, pp.47-54.
- Newstead (1911): L. Parrot, A. Donatien, and F. Lestoquard, "Sur le developpement de la Leishmaniose canine visceral chez *Phlebotomus major* var. perniciosus Newstead," Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique, vol. 23, pp. 724–726, 1930. In: Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J. & Nieto, J., (2004). Canine *Leishmaniasis*. *Adv Parasitol* 57, 1–88
- Nicolle, C. & Comte, C. (1908) Origine canine du Kala-azar. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, vol.1, pp. 299–301. In: Bettini, S., Gradoni, L. (1986). Canine Leishmaniasis in the Mediterranean area and its implications for human Leishmaniasis. *Insect Sci. Applic.*, 7, 241-245.

- Noli, C. & Saridomichelakis, M.N. (2014). An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*), *The Veterinary Journal*, 3, 425-435.
- Oliva, G., Nieto, J., Foglia Manzillo, V., Cappiello, S., Fiorentino, E., Di Muccio, T., Scalone, A., Moreno, J., Chicharro, C., Butaud, T., Guegand, L., Martin, V., Cuisinier, A.M., Guenguen, S., Cañavate & C., Grandoni, L. (2012). Evidence for protection against active infection and disease progression in naïve dogs vaccinated with LiESP/QA-21 (CaniLeish®) exposed to two consecutive *Leishmania infantum* transmission seasons. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8, 10.
- 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. *J Am Vet Med Assoc*, 236, 1192-1198.
- Oliva, G., Scalone, A., Foglia Manzillo, V., Gramiccia, M., Pagano, A., Di Muccio & T., Gradoni, L. (2006). Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J Clin Microbiol*, 44, 1318–1322.
- Owens, S. D., Oakley, D. A., Marryott, K., Hatchett, W., Walton, R., Nolan, T. J., Newton, A., Steurer, F., Schantz, P. & Giger, U. (2001). Transmission of visceral Leishmaniasis through blood transfusions from infected English Foxhounds to anemic dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 219, 1076–1083.
- Paltrinieri, S., Gradoni, L., Roura, X., Zatelli, A., & Zini, E. (2016). Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine Leishmaniasis. *Veterinary Clinical Pathology*, 45, 552-578.
- Paltrinieri, S., Solano-Gallego, L., Fondati, A., Lubas, G., Gradoni, L., Castagnaro, M., Crotti, A., Maroli, M., Oliva, G., Roura, X., Zatelli, A. & Zini, E. (2010). Guidelines for diagnosis and clinical classification of Leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 236, 1184–1191.
- Paz, G.F., Ribeiro, M.F., Michalsky, E.M., da Rocha Lima, A.C., Franca-Silva, J.C., Barata, R.A., Fortes-Dias, C.L. & Dias, E.S. (2010). Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral Leishmaniasis. *Parasitol Res*, 106, 523-528.
- Peña, M.T., Roura, X. & Davidson, M.G. (2000). Ocular and periocular manifestations of Leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). *Vet Ophthalmol*, 3, 35-41.
- Pennisi, M.G., Cardoso, L., Baneth, G., Bourdeau, P., Koutinas, A., Miró, G., Oliva, G. & Solano-Gallego, L. (2015). Leishvet update and recommendations on feline leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, 8, 302.
- Perego, R., Proverbio, D., Giorgi, G. B. De, & Spada, E. (2014). Prevalence of Dermatological Presentations of Canine Leishmaniasis in a Nonendemic Area : A Retrospective Study of 100 Dogs. doi.org/10.1155/2014/374613.
- Petanides, T.A., Koutinas, A.F., Mylonakis, M.E., Day, M.J., Saridomichelakis, M.N., Leontides, L.S., Mischke, R., Diniz, P., Breitschwerdt, E.B., Kritsepi, M., Garipidou, V.A., Koutinas, C.K., Lekkas, S. (2008). Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine Leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *J. Vet. Intern. Med.*, 22, 866–872.
- Pires, C.A., (1979). Contribuição ao conhecimento da distribuição e bioecologia dos flebótomos em Portugal (*Diptera, Psychodidae*). *Bolm. Soc. Port. Ciênc. Nat*, 19, 197-210.

Portaria nº 1071/98 de 31 de Dezembro de 1998. *Diário da República nº301* – I Série. Ministério da Saúde. Lisboa.

Portaria nº 264/2013 de 16 de Abril de 2014. *Diário da República nº78* - II Série. Direção-geral de Alimentação e Veterinária. Lisboa.

Proverbio, D., Perego, R., & Spada, E. (2016). The Use of Two Clinical Staging Systems of Canine Leishmaniasis in a Clinical Setting: A Critical Evaluation. *Journal of Veterinary Clinical Practice and Petcare*, 1, 1–8.

Quinnell, R. J. & Courtenay, O. (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral Leishmaniasis. *Parasitology*, 136, 1915–1934.

Quinnell, R.J., Kennedy, L.J., Barnes, A., Courtenay, O., Dye, C., Garcez, L.M., Shaw, M.-A., Carter, S.D., Thomson, W. & Ollier, W.E.R. (2003). Susceptibility to visceral Leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics*, 52, 23–28.

Rallis, T. S., Day, M.J., Saridomichelakis, M.N., Adamama-Moraitou, K.K., Papazoglou, L., Fytianou, A. & Koutinas, A.F. (2005). Chronic Hepatitis Associated with Canine Leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a Clínicopathological Study of 26 Cases. *Journal of Comparative Pathology*, 132, 145-152.

Ready, P. D. (2008). Leishmaniasis emergence and climate change. *Rev. Scie. Tech. Off. Int. Epiz.*, 27, 399–412.

Ready, P. D. (2010). Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveillance: European Communicable Disease Bulletin*, 15, 19505

Ready, P. D. (2013). Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu Rev Entomol*, 58, 227–250.

Reis, A.B., Teixeira-Carvalho, A., Vale, A.M., Marques, M.J., Giunchetti, R.C., Mayrink, W., Guerra, L.L., Andrade, R.A., Corrêa-Oliveira, R. & Martins-Filho, O.A. (2006). Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*, 112, 102–116.

Rioux, J.A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien P. & Perières, J. (1990). Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 65, 111–125.

Rosypal, A. C., Troy, G. C., Zajac, A. M., Frank, G. & Lindsay, D. S. (2005). Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *Journal of Parasitology* 91, 970–972.

Roura, X., Fondati, A., Lubas, G., Gradoni, L., Maroli, M., Oliva, G., Paltrinieri, S., Zatelli, A., Zini, E. (2013). Prognosis and monitoring of Leishmaniasis in dogs : A working group report. doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.04.001

Sabate, D., Llinas, 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. *Prev Vet Med*, 115, 56-63.

Sagols, E., Martin, V., Claret, E., McGahie, D., Cuisinier, A.M. & Gueguen, S. (2012) Evaluation of the humoral immune response after vaccination with LiESP/QA-21 (CaniLeish®): Interest of

Leishmaniaspecific anti-kinesin antibodies detection. *World Congress WSAVA/FECAVA/BSAVA 2012*, Abstract 127.

Sanchez-Robert, E., Altet, L., Utzet-Sadurni, M., Giger, U., Sanchez, A., Francino & O. (2008). Slc11a1 (formerly Nramp1) and susceptibility to canine visceral Leishmaniasis. *Vet Res*, 39, 36.

Saridomichelakis, M.N. (2009). Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. *Vet Dermatol*, 20, 471–489.

Saridomichelakis, M.N., Mylonakis, M.E., Leontides, L.S., Koutinas, A.F., Billinis, C. & Kontos, V.I. (2005). Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine *Leishmaniasis (Leishmania infantum)* in symptomatic and asymptomatic dogs. *Am J Trop Med Hyg*, 73, 82–86.

Seblova, V., Sadlova, J., Carpenter, S., & Volf, P. (2014). Speculations on biting midges and other bloodsucking arthropods as alternative vectors of *Leishmania*. doi.org/10.1186/1756-3305-7-222.

Semião-Santos, S.J., Harith, A.E., Ferreira, E., Pires, C.A, Sousa, C.A. & Gusmão, R., (1995). Évora district as a new focus for canine Leishmaniasis in Portugal. *Parasitol. Research*, 81, 235-239.

Serrada, E. (2010). A Leishmaniose visceral em Portugal continental (1999-2009). Trabalho de projecto do Curso de Mestrado em Saúde Pública, Universidade Nova de Lisboa, pp. 38-90.

Shaw, S. E., Langton, D. A., Hillman, T. J. (2009). Veterinary Parasitology Canine leishmaniosis in the United Kingdom: A zoonotic disease waiting for a vector? doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.025.

Silva, F. L., Oliveira, R. G., Silva, T. M. A., Xavier, M. N., Nascimento, E. F. & Santos, R. L. (2009). Venereal transmission of canine visceral *Leishmaniasis*. *Veterinary Parasitology*, 160, 55–59.

Slappendel, R.J. (1988). Canine *Leishmaniasis*: a review based on 95 cases in The Netherlands. *Vet Q*, 10, 1–16.

Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. & Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165, 1–18.

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. *Vet Parasitol*, 90, 37-45.

Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. doi.org/10.1186/1756-3305-4-86.

Solano-Gallego, L., Villanueva-Saz, S., Carbonell, M., Trotta, M., Furlanello, T. & Natale, A. (2014). Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan®, ID Screen® and Leishmania 96®), a rapid test (Speed Leish K®) and an in-house IFAT. *Parasit Vectors*, 7, 111.

Sousa, C. B. P. & Day, M. J. (2011). One Health: The global challenge of epidemic and endemic *Leishmaniasis*. *Parasites & Vectors*, 4, 197.

Souza, T. D., Turchetti, A. P., Fujiwara, R. T., Paixão, T. A. & Santos, R. L. (2014). Visceral leishmaniasis in zoo and wildlife. *Veterinary Parasitology*, 200, 233–241

Sykes, J. E., Baneth, G., Petersen, C., 2013. Leishmaniosis. In: Sykes, J. E. ed, *Dog and Cat Infectious Diseases*, 1^o ed, Elsevier, pp. 713-723.

Tommasi, A. S. De, Otranto, D., Dantas-torres, F., Capelli, G., & Breitschwerdt, E. B. (2013). Are vector-borne pathogen co-infections complicating the clinical presentation in dogs? doi.org/10.1186/1756-3305-6-97.

Tonnoir (1921). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 47, 413–419. In: Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J. & Nieto, J., (2004). Canine *Leishmaniasis*. *Adv Parasitol* 57, 1–88

Trotz-Williams, L.A. & Trees A.J. (2003). Systematic review of the distribution of the major vector-borne parasitic infections in dogs and cats in Europe. *Vet Rec.*, 152, 97-105.

Vamvakidis, C.D., Koutinas, A.F., Kanakoudis, G., Georgiadis, G. & Saridomichelakis, M. (2000). Masticatory and skeletal muscle myositis in canine *Leishmaniasis (Leishmania infantum)*. *Vet Rec*, 146, 698–703

Vinuelas J, Garcia-Alonso M, Ferrando L, Navarrete, I., Molano, I., Mirón, C., Carcelén, J., Alonso, C. & Nieto, C.G. (2001). Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Vet Parasitol*, 101, 23–27.

Vulpiani, M. P., Iannetti, L., Paganico, D., Iannino, F., & Ferri, N. (2011). Methods of Control of the *Leishmania infantum* Dog Reservoir : State of the Art. <http://doi.org/10.4061/2011/215964>.

Werneck, G. L., Costa, C.H. N., Walker, A. M., David, J. R., Wand, M. & Maguire, J. H. (2006) Multilevel modeling of the incidence of visceral leishmaniosis in Teresina, Brazil. *Epidemiology and Infection*, 135, 195-201

World Health Organization (WHO), 2010. Control of the *Leishmaniasis*. Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of *Leishmaniasis*. In: *Technical Report Series 949*. 2010. WHO, Geneva (22–26 March).

World Organisation for Animal Health (OIE) (2017). *Leishmaniosis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, disponível em: <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>.

Wylie *et al.*, 2014a: Wylie, C. E., Carbonell-Antoñanzas, M., Aiassa, E., Dhollander, S., Zagmutt, F. J., Brodbelt, D. C. & Solano-Gallego, L. (2014). A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally-occurring canine leishmaniosis, part I: Vaccinations. doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.06.015.

Wylie *et al.*, 2014b: Wylie, C. E., Carbonell-Antoñanzas, M., Aiassa, E., Dhollander, S., Zagmutt, F. J., Brodbelt, D. C., & Solano-Gallego, L. (2014). A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally occurring canine leishmaniosis. Part II: Topically applied insecticide treatments and prophylactic medications. doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.06.016.