

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**A Utilização de Testes Rápidos no Diagnóstico de Doenças Infeciosas em
Clínica de Animais de Companhia**

-Versão Definitiva-

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Tiago José Gomes da Rocha Pereira

Orientador: Professora Doutora Ana Cláudia Coelho



Vila Real, 2021

A Utilização de Testes Rápidos no Diagnóstico de Doenças Infeciosas em Clínica de Animais de Companhia

-Versão Definitiva-

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Tiago José Gomes da Rocha Pereira

Orientador: Professora Doutora Ana Cláudia Coelho

Composição do Júri:



Vila Real, 2021

O conteúdo do presente trabalho é de inteira responsabilidade do autor.

Agradecimentos

À Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro pelas facilidades concedidas para a realização desta dissertação.

À minha orientadora, Professora Doutora Ana Cláudia Coelho por ter sido tão prestável e paciente relativamente a todas as dúvidas que iam surgindo na elaboração deste trabalho. Um enorme obrigado por todo o apoio, a motivação, o entusiasmo, a disponibilidade e energia.

A todo o corpo clínico e funcionários do Hospital Veterinário de Gaia que me acompanharam ao longo de cinco meses. Obrigado pela oportunidade, por todos os conhecimentos transmitidos e por todos os bons momentos que passei. Foram quatro meses de trabalho, mas repletos de boa disposição e que deixam bastantes saudades.

Obrigado aos meus colegas de estágio Cláudia, Inês, Catarina, Nilson e Gonçalo por todos os bons momentos, trabalho de equipa e um ambiente de boa disposição

Um grande obrigado a todas as amigadas que fiz em Vila Real, especialmente aos meus colegas de casa Gonçalo, Miguel e Rui, mas também ao “Barrako 27”, à Inês, à Helena, à Mariana, à Daniela e à Tenreiro. Por todas as noitadas de estudo e por todas noitadas de diversão, por todas as horas de conversa e gargalhadas, todo o apoio e toda a amizade com que me proporcionaram ao longo destes 5 anos. Fizeram com que Vila Real se tornasse na minha segunda casa.

Um obrigado também a todos os meus amigos que já me acompanham antes de toda esta jornada da faculdade, em especial à Catarina, à Tita, ao Fábio, à Telma, à Rita, à Noronha e ao Rui. Apesar de alguns de vocês se encontrarem a milhares de quilómetros, sei que me estão sempre a apoiar.

E por fim, o maior obrigado destina-se à minha família. Às minhas avós por todo o carinho, apoio e todos os lanches típicos de avó que me fazem perder a fome para o jantar. Aos meus pais e irmã. Sem vocês, nada disto seria possível. São o pilar central que suporta a minha vida e que me possibilitou a concretização do sonho de seguir medicina veterinária.

Resumo

Atualmente, na prática clínica veterinária, recorre-se muitas das vezes a testes rápidos (kits) para se realizar o diagnóstico de uma doença infecciosa, dada a sua rapidez e um custo relativamente baixo. Deste modo, nesta dissertação foi realizada uma análise de doenças diagnosticadas através de testes rápidos e sobre a eficácia dos mesmos.

Durante o período de 29 de setembro de 2019 a 31 de janeiro de 2020, realizou-se um estágio curricular, no Hospital Veterinário de Gaia. O objetivo consistiu em analisar testes rápidos no diagnóstico de doenças infecciosas. Para este estudo foram estudados 44 animais de companhia, dos quais 16 (36,4%) eram cães e 28 (63,6%) eram gatos. Estes animais apresentaram-se com sinais clínicos de diferentes doenças (ou para efetuar o rastreio das mesmas). Destes animais 36 (81,8%) apresentavam-se com sinais clínicos e 8 (18,2%) não apresentaram qualquer sinal.

Dos 28 gatos em estudo, 46,4% foram positivos ao teste rápido para FIV e 28,6% foram positivos ao teste para deteção de FeLV. Dos animais que não apresentavam sinais clínicos, 4 gatos foram positivos a FIV e 2 gatos foram positivos a FeLV. Tiveram resultados positivos a ambos os testes, 21,4% dos gatos e, 46,4% gatos foram negativos a ambos os testes.

Dos 16 cães, 11 foram sujeitos ao Teste SNAP® Parvovirose, 27,3% tiveram resultado positivo e 72,7% tiveram resultado negativo.

Os testes rápidos (kits) são cada vez mais utilizados na prática clínica. Embora tenha sido utilizada uma amostra de conveniência, os resultados deste trabalho contribuem para a fiabilidade da utilização de testes rápidos no diagnóstico de doenças infecciosas.

Palavras-Chave: Doenças Infecciosas, Testes Rápidos, Diagnóstico, Clínica de Animais de Companhia.

Abstract

Currently, in veterinary clinical practice, rapid tests kits are often used to diagnose an infectious disease, given its speed and relatively low cost. Thus, in this dissertation, an analysis of diseases diagnosed through rapid tests and on their effectiveness was carried out.

During the period from September 29th, 2019 to January 31st, 2020, a curricular internship took place at the Hospital Veterinário de Gaia. The objective was to analyse the use of rapid tests kits in the diagnosis of infectious diseases. For this study, 44 animals were analyzed, of which 16 (36.4%) were dogs and 28 (63.6%) were cats. These animals presented clinical signs of different diseases (or to screen for them). Of these animals, 36 (81.8%) presented with clinical signs and 8 (18.2%) did not show any signs.

Of the 28 cats under study, 46.4% tested positive for the rapid test for FIV and 28.6% tested positive for FeLV. Of the animals that did not show clinical signs, 4 cats tested positive for FIV and 2 for FeLV. About 21.4% of cats analysed tested positive for both diseases while, 46.4% cats were negative for both tests.

Of the 16 dogs, 11 were subjected to the SNAP® Parvovirus test, 27.3% tested positive while 72.7% tested negative.

Rapid tests kits are increasingly used in clinical practice. Although a convenience sample was used, the results of this work contribute to the reliability of the use of rapid tests in the diagnosis of infectious diseases.

Keywords: infectious diseases, Rapid test kit, diagnosis, pets.

Índice

I - 1.Introdução:	1
2.Parvovirose Canina	1
2.1.Etiologia.....	1
2.2.Epidemiologia	1
2.3. Patogenia.....	2
2.4. Sinais Clínicos	3
2.5.Diagnóstico	4
2.5.1.Hemaglutinação	4
2.5.2.Isolamento Viral.....	5
2.5.3.Microscopia Eletrónica	5
2.5.4.Diagnóstico Serológico	6
2.5.5.Diagnóstico Molecular	7
2.6.Tratamento	8
2.7.Prevenção e controlo.....	9
3.Vírus da Imunodeficiência Felina	11
3.1.Etiologia.....	11
3.2.Epidemiologia:.....	11
3.3.Patogenia.....	12
3.4.Sinais Clínicos	13
3.5.Diagnóstico	14
3.5.1.Alterações bioquímicas	14
3.5.2.Diagnóstico serológico.....	15
3.5.3.Diagnóstico molecular e isolamento viral.....	16
3.6.Prevenção e Controlo	17
3.7.Tratamento	18
4.Vírus da Leucemia Felina	20
4.1.Etiologia.....	20
4.2.Epidemiologia	21
4.3.Patogenia.....	21
4.4.Sinais clínicos	23
4.5.Diagnóstico	24
4.5.1.Diagnóstico Serológico	24
4.5.2.Isolamento Viral.....	26
4.5.3.Diagnóstico Molecular	26
4.6.Prevenção e Controlo.....	27

4.7.Tratamento	28
5.Utilização de testes rápidos tipo SNAP® no Diagnóstico de Doenças Infeciosas	31
5.1. SNAP® Test	31
5.2.Componentes.....	32
5.3.Vantagens do Fluxo Bidirecional de Lavagem e Substrato	32
II -6. Objetivos	35
III -7.Materiais e Métodos	37
7.1. População e Amostra	37
7.1.1. Animais em Estudo	37
7.1.2. Colheita de Dados	37
8. Teste SNAP®.....	38
8.1. Método de realização do teste SNAP® Combo Plus	38
8.2. Método de realização do teste Snap® Parvo.....	38
8.3. Método de realização do teste Snap® Lepto.....	39
8.4. Método de Realização do teste Snap® Leishmania	40
IV -9. Resultados	42
9.1.Diagnóstico Rápido por Testes Rápidos	43
9.1.1 Resultados obtidos no diagnóstico de FIV e FeLV	43
9.1.2. Resultados obtidos no diagnóstico de Parvovirose	45
9.1.3. Resultados obtidos no diagnóstico de Leptospirose.....	47
9.1.4. Resultados obtidos no diagnóstico de Leishmaniose	48
10. Discussão	50
11. Conclusão e Considerações Finais	57
12.Bibliografia	60

Índice de Tabelas

Tabela 1- Caracterização demográfica dos cães (n=16).	42
Tabela 2- Caracterização demográfica dos gatos (n=28).....	43
Tabela 3- Frequência dos sinais clínicos dos cães testados ao teste rápido para a FIV/FeLV (n=20).....	44
Tabela 4- Resultados para o teste rápido SNAP® FIV/FeLV Combo.	44
Tabela 5- Resultados combinados para o teste rápido SNAP® FIV/FeLV Combo	45
Tabela 6- Frequência dos sinais clínicos dos cães positivos ao parvovírus (n=13).....	45
Tabela 7- Resultados para o teste rápido SNAP® Parvovirose.	46
Tabela 8- Distribuição dos sinais clínicos dos 13 cães pelo resultado para o teste rápido SNAP® Parvovirose	46
Tabela 9- Concordância entre a presença de diarreia sanguinolenta e o resultado ao teste SNAP® Parvovirose	47
Tabela 10- Distribuição dos sinais clínicos dos 2 cães pelo resultado para o teste rápido SNAP® Lepto	47

Índice de Figuras

Figura 1 - Dispositivo SNAP®.....	33
Figura 2 – Etapas do SNAP® Test.	33
Figura 3- Componentes do teste Snap® Parvo.	39
Figura 4- Snap Pro® Analyzer, onde se observa um resultado positivo de leptospirose a partir de um teste realizado no dia 30/01/2020.	40

Lista de Siglas e Abreviaturas:

Ac-Anticorpo

ADN-Ácido Desoxirribonucleico

ALB-Albumina

ALT-Alanina-Aminotransferase

AST-Aspartato-Aminotransferase

AZT- Azidotimidina

CPV-Parvovírus Canino

AST-Aspartato-Aminotransferase

CPV-2a-Parvovirus Canino subtipo 2a

CPV-2b-Parvovirus Canino subtipo 2b

CPV-2c-Parvovirus Canino subtipo 2c

DAT- Aglutinação direta

ELISA- Ensaio De Imunoabsorção Enzimática (“Enzyme-Linked Immunosorben Assay”)

FA-Fosfatase Alcalina

FeSV- Vírus do Sarcoma Felino

FIV-Vírus da Imunodeficiência Felina (Feline Immunodeficiency Virus)

FPV-Parvovirus Felino

HA-Hemaglutinação

HI-Prova de Inibição da Hemaglutinação

HVG-Hospital Veterinário de Gaia

IF-Imunofluorescência

IFAT- Imunofluorescência indireta (“Indirect fluorescent antibody test”)

IgA-Imunoglobulina A

IgG-Imunoglobulina G

IgM-Imunoglobulina M

IL-Interleucina

LAMP- “Loop Mediated Isothermal Assay”

ME-Microscopia Eletrónica

NNN-Novy-McNeal-Nicolle

PAP-Imunoperoxidase

PCR-Reação em Cadeia da Polimerase

PCR-rt-Técnica de PCR em tempo real

reHuIFN- α - Interferão α recombinante humano

rFeIFN- ω - Interferão ω recombinante felino

RNA-Ácido Ribonucleico Mensageiro

SNC- Sistema Nervoso Central

spp- Indicativo de várias espécies

SRD-Sem Raça Definida

WB- Western Blot

I - 1.Introdução:

A elaboração do presente documento, foi realizada no âmbito das doenças infecciosas, tendo por base a casuística observada no Hospital Veterinário de Gaia (HVG), durante a realização do estágio curricular, no período compreendido entre 29 de setembro de 2019 e 31 de janeiro de 2020. Neste trabalho são abordados cinco doenças cujo diagnóstico é possível através de testes rápidos de diagnóstico: Parvovirose Canina, Vírus da Imunodeficiência Felina e o Vírus da Leucemia Felina. Estas doenças infecciosas foram diagnosticadas no HVG através de testes rápidos e foram recolhidos dados relativamente aos animais testados.

Muitas das doenças de importância médico veterinária são causadas por microrganismos virais, bacterianos, helmintes, fungos, protozoários, entre outros. Estas doenças podem apresentar sinais clínicos semelhantes e isso dificulta muito um diagnóstico diferencial na ausência de exames laboratoriais. O diagnóstico definitivo de qualquer doença infecciosa requer a deteção direta ou indireta e/ou a identificação do agente, que pode ser encontrado em tecidos ou fluidos infetados pelo agente. As técnicas clássicas de laboratório usadas para isolar, cultivar e identificar organismos são trabalhosas, intensivas e caras, exigindo equipamento e uma experiência considerável. Embora sejam muito úteis na identificação e caracterização de microrganismos, estas técnicas não são exequíveis na prática clínica. O uso de testes rápidos imunoenzimáticos tem vindo a aumentar na prática clínica. A maioria inclui um substrato que produz uma cor quando se forma um complexo anticorpo-antígeno permitindo que a presença do agente seja observado visualmente sem ajuda de qualquer aparelho amplificador (Wright,1992; Greene, 2016; Alhajj *et al.*, 2020).

Para que se consiga realizar uma boa prática clínica, é necessário relacionar, conceitos clínicos e epidemiológicos, sinais clínicos, história e exame físico, de forma a determinar o mais rapidamente, o agente infeccioso que poderá estar envolvido. A prevenção da infeção é sempre preferível ao seu tratamento (Lappin, 2014).

2.Parvovirose Canina

2.1.Etiologia

Os parvovírus são vírus sem envelope, apresentam uma simetria icosaédrica e possuem uma cadeia simples de ADN). Este vírus pertence ao subgrupo do parvovírus felino dentro do género *Parvovirus*. O CPV emergiu como um agente patogénico em cães no final da década de 1970 como uma variante do parvovírus felino (FPV) (Markey *et al.*, 2013).

A cápside apresenta uma série de características superficiais que estão associadas ao seu funcionamento. O local de ligação do recetor dos parvovírus felinos e caninos, que determina o seu hospedeiro e o tropismo do tecido, está localizado na superfície da espícula que é também o local de ligação da maioria dos anticorpos dirigidos contra a cápside (Fenner, 2017). A cápside é composta por um total de 60 moléculas proteicas, aproximadamente, 90% sendo VP2 e aproximadamente 10% sendo a proteína VP1 sobreposta mas maior. Em alguns vírus, uma terceira proteína, VP3, é formada pela clivagem de péptidos na região amino-terminal da VP2 (MacLachlan *et al.*, 2011). Estas proteínas, com especial ênfase à VP2, são responsáveis pelo tropismo celular, pela ligação ao recetor, pelas propriedades antigénicas e pela estabilidade do vírus no ambiente (Fenner, 2017).

A enterite pelo parvovírus canino é provavelmente uma das doenças infecciosas mais comuns dos cães e o vírus mais prevalente em cães com diarreia infecciosa. Esta doença altamente contagiosa, muitas vezes fatal, é causada por estirpes de CPV-2 (2, 2a, 2b e 2c). O CPV-2, possivelmente teve origem numa evolução do FPV, levando a que o mesmo passasse a infetar carnívoros selvagens (Truyen, 2006). Esta doença altamente contagiosa, muitas vezes fatal, é causada por estirpes de CPV-2 (2, 2a, 2b e 2c) (Greene, 2016).

2.2.Epidemiologia

O vírus que revela a maior importância em doenças gastrointestinais em cães é o parvovírus canino tipo 2 (CPV-2). O CPV é o agente etiológico de uma doença contagiosa, caracterizada principalmente por sinais de gastroenterite clínica em cães mais novos. CPV-2 emergiu como um novo vírus no final dos anos 70 (Miranda & Thompson, 2016). Este vírus é considerado como um dos mais importantes vírus causadores de gastroenterites no cão (Decaro *et al.*, 2007)

A enterite aguda por CPV-2 pode ocorrer em cães de qualquer raça, idade ou sexo. No entanto, cachorros entre as 6 semanas e 6 meses de idade e da raça Rottweiler, Doberman Pinscher, Labrador Retriever, American Staffordshire Terrier, Pastor Alemão e Malamute do Alasca parecem ter um risco aumentado (Greene, 2016).

Em Portugal, as três variantes encontram-se em circulação e em diferentes frequências. Durante o período de 2012-2014, a CPV-2c foi a variante com maior prevalência, seguida da CPV-2b e por último a CPV-2a. A CPV-2b foi a variante mais predominante na região Norte e Centro, enquanto a CPV-2c liderou na região Sul e foi a única variante a ser detetada nas Ilhas (Miranda *et al.*, 2016)

O CPV é altamente contagioso e a maioria das infeções ocorrem como resultado do contacto com fezes contaminadas no ambiente. Além disso, fómites tais como equipamentos em instalações veterinárias, insetos e roedores podem servir de vetores. Os cães podem transportar o vírus no pelo por longos períodos. O período de incubação médio é de 7 a 14 dias (Khatri *et al.*, 2017).

2.3. Patogenia

O CPV reconhece como tecidos-alvo para replicação viral as criptas intestinais e os órgãos linfóides, mas o vírus pode disseminar-se para todos os tecidos, incluindo o cérebro (Decaro *et al.*, 2009).

Após a entrada do vírus na orofaringe, a replicação inicial do vírus ocorre no tecido linfóide da orofaríngeo, timo e gânglios mesentéricos (Prittie, 2004). Posteriormente, o vírus dissemina-se para outros órgãos e para a corrente sanguínea, ocorrendo uma virémia primária 1-5 dias após a infecção (Decaro & Buonavoglia, 2012). As células que têm recetores apropriados e que se encontram na fase S do ciclo celular são infetadas e mortas ou impedidas de entrar em mitose. O vírus replica-se em tecidos linfóides associados ao sistema gastrointestinal e é disseminado por leucócitos infetados ao epitélio germinal das criptas do intestino delgado, causando diarreia. A replicação do vírus nestes tecidos origina a viremia secundária, geralmente durante o 3º pós-infecção (Decaro *et al.*, 2009). Isto provoca a destruição e colapso do epitélio intestinal. Como resultado, o “turnover” celular (geralmente entre 1 e 3 dias no intestino delgado) é prejudicado e as vilosidades ficam encurtadas (McCaw & Hoskins, 2006). Infeções bacterianas secundárias da microbiota Gram-negativa e anaeróbia causam complicações adicionais relacionadas com danos intestinais, bacteriemia

e endotoxemia e coagulação intravascular disseminada. A excreção ativa das estirpes CPV-2 começa no terceiro ou quarto dia após exposição, geralmente antes de surgirem sinais clínicos evidentes. O CPV-2 começa a ser excretado em grandes quantidades 7 a 10 dias após a infecção (Decaro *et al.*, 2007b). A ocorrência de citólise da medula óssea e de outras células linfóides leva à linfopenia ou à leucopenia, enquanto a perda de células epiteliais intestinais pode levar à enterite hemorrágica. Pode envolver a perda das células progenitoras mieloides, diminuindo o número de trombócitos circulantes, eritrócitos, granulócitos e mastócitos. No entanto, hospedeiros e estirpes virais diferentes resultam em tropismos preferenciais do tecido e sinais clínicos diferenciados, de modo que a manifestação da doença clínica pode variar de grave a subclínica (Hoelzer & Parrish, 2010).

Os miócitos cardíacos também podem suportar o crescimento do CPV apenas nas primeiras 2-3 semanas de vida do cachorro, ocorrendo quando os mesmos são infectados no útero ou nas primeiras semanas de vida (Sime *et al.*, 2015). Quando a infecção ocorre em neonatos, o vírus poderá infectar as células do miocárdio, uma vez que o músculo cardíaco encontra-se numa rápida divisão celular na primeira semana de vida do animal. Consequentemente, a infecção pode levar à necrose do miocárdio e inflamação, levando a edema pulmonar e/ou congestão hepática devido a insuficiência cardíaca. Esta forma clínica de miocardite conduz, frequentemente, à morte súbita dos cachorros, no entanto, caso sobrevivam, poderão desenvolver insuficiência cardíaca entre as 6-8 semanas de idade (MacLachlan *et al.*, 2011).

2.4. Sinais Clínicos

A gastroenterite aguda é a manifestação mais comum de doença e surge frequentemente em cachorros não vacinados entre as 6 semanas e os 6 meses de idade (MacLachlan *et al.*, 2011).

Os sinais clínicos ocorrem após um período de incubação de 3-7 dias e consistem maioritariamente em anorexia, prostração, vômitos e diarreia sanguinolenta e/ou mucoide, desidratação e febre (Decaro *et al.*, 2005). Devido a diarreias hemorrágicas, as perdas de sangue podem levar a anemia. Um valor reduzido de proteínas plasmáticas e dos parâmetros de cloro, potássio e sódio também são observáveis devido a episódios de diarreia (Greene, 2016). A leucemia ocorre frequentemente, em que as contagens de glóbulos brancos a descenderem abaixo das 2000-3000 células/mL de sangue. No entanto, as contagens totais de

leucócitos podem estar dentro dos intervalos normais devido à linfopenia induzida pelo vírus concomitante com uma neutrofilia provocada por infecções por bactérias oportunistas (Decaro *et al.*, 2005).

A morte ocorre principalmente devido à desidratação, desequilíbrios eletrolíticos, choque endotóxico ou septicemia associada à destruição da mucosa intestinal e à leucopenia (Prittie, 2004).

A dispneia, prostração e o choro são sinais clínicos característicos do quadro cardíaco em cachorros. Muitas das vezes, acabam por morrer em menos de 24 horas após o início da sintomatologia (Evermann & Kennedy, 2011).

2.5.Diagnóstico

O diagnóstico clínico de casos fulminantes de parvovírus canino é relativamente fácil, dado que poucas doenças nos cães causam a enterite aguda, febre e leucemia (Greene, 2016).

O aparecimento súbito de diarreia sanguinolenta e de odor intenso num cão jovem (com menos de 2 anos) é frequentemente considerado indicativo da infecção pelo CPV. No entanto, nem todos os cães com diarreia sanguinolenta (com ou sem vômitos) estão necessariamente infetados com CPV e muitos dos casos de CPV não levam a uma diarreia hemorrágica. As infecções parasitárias e bacterianas enteropatogénicas, isoladas ou em combinação, também devem ser consideradas, bem como outras infecções virais (Castro *et al.*, 2007).

2.5.1.Hemaglutinação

Vários testes estão disponíveis para o diagnóstico do parvovírus canino entre eles, o teste de hemaglutinação (HA). Este foi um teste muito utilizado no século passado, um dos métodos tradicionais disponíveis para o rastreio do parvovírus canino, dado que este vírus através das suas hemaglutininas, tem o potencial de hemaglutinar eritrócitos de suínos/felinos/macacos-rhesus (Senda *et al.*, 1986). O teste HA é uma técnica simples que pode ser realizada mesmo em condições laboratoriais mal equipadas com resultados que podem ser interpretados após 4 horas. Este teste estuda a atividade de hemaglutinação do parvovírus canino, especialmente com glóbulos vermelhos suínos a 4°C. Os eritrócitos

de outras espécies podem ser usados, mas são difíceis de obter nas quantidades necessárias, ou são caros. No entanto, para uma leitura clara deste ensaio, devem ser assegurados eritrócitos de boa qualidade, uma vez que o ensaio é afetado por um coeficiente alterado de sedimentação eritrocitária que pode ocorrer em caso de stresse ou doença do suíno doador (Desario *et al.*, 2005).

No entanto, muito dos casos dão negativo, uma vez que a hemaglutinação só é normalmente detetada em amostras até 1 semana após a infeção, quando a carga viral nas fezes do cão é elevada (Desario *et al.*, 2005). Pode haver a possibilidade de perda de atividade de HA devido à degradação de hemaglutininas virais após longos períodos de congelamento repetido e descongelamento de amostras fecais (Al-Bayati *et al.*, 2010) e algumas estirpes CPV-2 inerentemente demonstram uma atividade hemaglutinante muito baixa ou ausente (Cavalli *et al.*, 2001).

2.5.2. Isolamento Viral

O isolamento viral é um processo demorado, requerendo um longo período de incubação (5-10 dias) e testes adicionais por imunofluorescência ou HA, a fim de detetar antigénios virais. Outra desvantagem é a baixa sensibilidade, provavelmente devido aos anticorpos no lúmen intestinal dos cães infetados que se podem ligar às partículas virais, impedindo ligações virais aos recetores celulares (Desario *et al.*, 2005).

2.5.3. Microscopia Eletrónica

O método de microscopia eletrónica é usado para identificar partículas virais com base no tamanho e forma do vírus. Durante a fase aguda, as partículas virais são observadas em fezes utilizando um contraste negativo (Khatri *et al.*, 2017). Ao longo do tempo, a microscopia eletrónica para visualização e identificação de partículas virais de CPV perdeu a sua utilidade diagnóstica, dado que é uma técnica muito demorada e também porque necessita de equipamento sofisticado e de um observador experiente (Mathys *et al.*, 1983 ; Khatri *et al.*, 2017).

2.5.4.Diagnóstico Serológico

2.5.4.1.Teste de Imunofluorescência Indireta

Na imunofluorescência indireta, é utilizado um corante fluorescente para marcar anticorpos. Posteriormente utiliza-se um microscópio fluorescente para se detetar a posição do anticorpo, quando o mesmo ao antigénio. Nesta técnica é utilizado tecido congelado ou então fixado com formalina, para a deteção do CPV, usando a imunofluorescência (IF) e imunoperoxidase (PAP). A PAP permite uma localização intracelular do antigénio com maior resolução. Apesar de serem bastante sensíveis, ambas as técnicas são dispendiosas e necessitam de um operador experiente e atualmente não são muito utilizadas (Khatri *et al.*, 2017).

2.5.4.2.Imunocromatografia e ELISA

Os testes imunocromatográficos e os que se baseiam no método ELISA são os mais utilizados na prática clínica, uma vez que são muito fáceis e rápidos de executar (Rodrigues & Molinari., 2018). Detetam a presença de partículas virais nas fezes, através de anticorpos monoclonais, todavia não permitem fazer a identificação do subtipo de parvovírus nem diferenciar as estirpes vacinais e as estirpes de campo. Estes testes são utilizados na prática clínica sob a forma de kits e necessitam de uma quantidade de antigénio na amostra suficiente para formar um complexo visível, na forma de uma banda colorimétrica evidente (Desario *et al.*, 2005). Ainda assim, estes testes apresentam maior sensibilidade do que o teste de hemaglutinação e são mais rápidos e simples de usar (Lacheretz *et al.*, 2003).

As partículas virais são excretadas nas fezes, aproximadamente dias 3 a 12 pós-infeção, e são facilmente detetáveis no pico de excreção viral (4-7 dias após a infeção). Os resultados falsos positivos podem ocorrer 3-10 dias após a vacinação com uma vacina contra o CPV. Os resultados negativos podem ocorrer secundários à ligação de anticorpos neutralizadores e partículas virais cessação/diminuição da carga viral fecal, 10-12 dias após a infeção. Deste modo, os testes têm que ser realizados de forma relativamente rápida (Prittie, 2004).

2.5.5.Diagnóstico Molecular

2.5.5.1.PCR

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) baseia-se em 3 passos, nomeadamente desnaturação, ligação e extensão. O método PCR é utilizado para um diagnóstico rápido da infecção pelo CPV. Este método utiliza “primers” para o gene VP2, um gene conservado para proteínas virais. Após a amplificação do gene, os padrões de clivagem de restrição do gene amplificado são comparados. Este método também é usado para a detecção de diferentes variantes do CPV (Khatri *et al.*, 2017).

Os métodos baseados em PCR (PCR convencional e em tempo real) foram demonstrados como mais sensíveis do que as técnicas tradicionais. Em particular, a PCR em tempo real é sensível, específica, mais reprodutível e permite a detecção e quantificação do ácido nucleico CPV-2 em poucas horas. Além disso, existe menos risco de contaminação cruzada que com PCR convencional (Decaro *et al.*, 2005). No entanto, os ensaios moleculares, especialmente o método de PCR em tempo real, requer equipamentos dispendiosos, reagentes e operadores especializados. Desta forma, a sua utilização como testes para a prática veterinária não é viável. Na aplicação desta técnica, amplifica-se o gene da VP2, cujo ADN pode ser posteriormente sequenciado para análise e subtipificação (Desario *et al.*, 2005; Khatri *et al.*, 2017). Também se pode realizar PCR com recurso a enzimas de restrição (RFLP), que se baseia na identificação de um local de restrição, apenas presente no CPV-2c, utilizando a enzima de restrição MboII, o que permite distinguir CPV-2c dos outros subtipos (Desario *et al.*, 2005).

Na PCR em tempo real, a amplificação do ADN é monitorizada, enquanto está a ocorrer. Esta técnica amplifica uma sequência nucleotídica específica numa amostra e monitoriza o progresso dessa amplificação, utilizando técnicas de detecção de fluorescência. A grande vantagem deste método é que, para além da identificação de ADN de parvovírus, permite a sua quantificação nas amostras a partir de valores tão baixos com 10^2 cópias de ADN. Uma variante desta técnica é a PCR-RT Multiplex (Khatri *et al.*, 2017).

2.5.5.2.LAMP

A LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) utiliza um conjunto de quatro “primers”, que reconhecem diferentes segmentos e utiliza a ADN polimerase para a amplificação do ADN (Khatri *et al.*, 2017). A LAMP tem sido usada para detecção direta de ADN de CPV em amostras fecais e é um processo bastante rápido, de elevada sensibilidade e relativamente barato, no entanto, necessita de um operador com alguma experiência. No futuro, poderá tornar-se um dos principais testes rápidos a ser realizado em clínica (Sahoo *et al.*, 2016)

2.5.5.3.Biossensor

Um biossensor é um dispositivo que converte respostas biológicas em sinais elétricos. Foi desenvolvido um biossensor (Quartz Crystal Microbalance) para uma rápida detecção de infecção por CPV. Este equipamento demonstrou valores de sensibilidade de 95,4% e 98% de especificidade quando comparado com a PCR. Permite fazer um diagnóstico rápido, com elevada sensibilidade e especificidade, em segundos e com baixas quantidades de amostra (Kim *et al.*, 2015).

2.6.Tratamento

O CPV continua a ser um importante agente patogénico canino em todo o mundo. A taxa de mortalidade sem tratamento pode atingir os 91%. No entanto, com um diagnóstico rápido e um tratamento eficiente, as taxas de sobrevivência podem ser de 95% (Prittie, 2004). A manutenção da hidratação e do suporte oncótico, bem como a correção do nível de eletrólitos são da grande importância. Cães que apresentem uma hipovolemia grave precisam de restabelecer o seu volume circulante em 1-2 horas. Uma solução cristalóide isotónica equilibrada (como o exemplo do Lactato de Ringer) é o fluido de eleição para a recuperação do volume intravascular inicial e da reidratação (Anastasio *et al.*, 2014). A hipoglicemia, secundária a uma elevada desnutrição, hipermetabolismo, disfunção hepática subjacente, ou septicemia, é geralmente observado em enterites provocadas pelo CPV. Em casos de vômito contínuo, não é recomendada uma alimentação por via entérica, dado que pode perpetuar a hipoglicemia. Após a reidratação, a suplementação intravenosa de 2,5a 5%

dextrose adicionada a uma solução de eletrólitos equilibrada, pode ser necessária para combater esta perturbação metabólica (Prittie, 2004).

A administração parentérica de antibióticos de largo espectro (como exemplo da ampicilina e cefalosporinas), devem ser utilizados devido ao alto risco de septicemia, resultante da destruição da barreira da mucosa intestinal e à neutropenia. Estes antibióticos promovem a proteção contra organismos Gram-positivos, Gram-negativo e anaeróbios. A enrofloxacinina revelou um efeito bastante positivo, mas pode provocar danos nas cartilagens em cães jovens que se encontram em crescimento. Aminoglicosídeos apenas devem ser administrados em animais bem hidratados, uma vez que podem provocar falência renal aguda (Abrams, 2006; McCaw & Hoskins, 2006).

Podem ser utilizados antieméticos tais como a metaclopramida e o maropitant, principalmente em casos de vômito mais severos. Embora o tratamento antiemético seja recomendado na enterite por parvovírus, alguns estudos demonstraram que a utilização de antieméticos prolongou os episódios de vômitos e a hospitalização (Mantione, 2005). Em caso de ausência de uma resposta aos antieméticos, deve-se considerar a possibilidade de obstrução por corpo estranho, intussusceção, esofagite do refluxo ou pancreatite (Prittie, 2004).

2.7.Prevenção e controlo

Os surtos de enterite por CPV são difíceis de controlar. O vírus é ubíquo, pode sobreviver por mais de 6 meses à temperatura ambiente e é facilmente transportado entre cães através de jaulas, roupa de cama suja, ou humanos. Em situações canis, as boas práticas higiénicas, incluindo a desinfeção vigilante de todas as superfícies expostas e do pessoal, são fundamentais para a prevenção da transmissão nosocomial da infeção viral (Prittie, 2004). A desinfeção de todas as superfícies expostas e do pessoal, são importantes, dada a natureza resiliente do vírus no ambiente. Hipoclorito de sódio (uma porção de lixívia para 30 de água) e peróxido de potássio (Virkon®) são viricidas eficazes, desde que o tempo de contacto seja de pelo menos 10 minutos (Greene & Decaro, 2012).

Mais importante do que uma boa higiene para a prevenção da infeção por CPV é garantir uma forte imunidade individual através da adoção de protocolos eficazes de vacinação. A imunização eficaz é essencial para a proteção individual e para a diminuição da população

de animais sensíveis numa região, promovendo assim a imunidade de grupo (Day *et al.*, 2016).

A titulação de anticorpos no soro está correlacionada com a imunidade. Cães seronegativos são suscetíveis e cães com titulações baixas de anticorpos normalmente não ficam doentes sistematicamente, porém excretam vírus nas suas fezes. Cães com uma titulação de anticorpos elevados, geralmente não desenvolvem uma infecção ativa ou contribuem para a propagação do vírus (Prittie, 2004). A vacinação é método mais ideal e barato para o controlo da infecção (Nandi *et al.*, 2013). Um dos protocolos de vacinação recomendado é a vacinação dos cães a cada 4 semanas, entre as 6 e as 8 semanas de idade, até por volta das 16 semanas de idade, concluindo a sua primovacinação. Posteriormente, os cães devem realizar um reforço um ano após a primovacinação e depois realizar um reforço a cada 3 anos, em vez de um reforço anual (Jakel *et al.*, 2012). As vacinas inativadas de CPV são consideradas inferiores às vacinas atenuadas, uma vez que são menos eficazes em impedir a excreção viral, permitindo a propagação do vírus (Decaro *et al.*, 2005). As vacinas são pouco eficazes na presença de anticorpos maternos (Nandi *et al.*, 2013). O período a partir do qual os níveis de anticorpos maternos se tornam baixos e em que os cachorros são capazes de desenvolver a imunidade ativa é a partir das 7 semanas (Decaro *et al.*, 2012).

3. Vírus da Imunodeficiência Felina

3.1. Etiologia

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) é um retrovírus, pertencente à subfamília Orthoretrovirinae, género *Lentivirus*. T. Os lentivírus são retrovírus complexos e possuem genes acessórios além do *gag*, *pol* e *env* (Fenner, 2017). O gene *gag* codifica, entre outros, a proteína de capsídeo p24 que é importante para o diagnóstico. O gene *pol* codifica as proteínas da protease, integrase, revertase e as da transcriptase, assim como outras enzimas importantes para a virulência do FIV. Tanto o *gag* como e o *pol* são relativamente conservados entre estirpes. O gene *env* codifica a glicoproteína viral (gp120) e a proteína transmembranar (gp41), que são as principais mediadoras da entrada do vírus na célula hospedeira e pela diversidade viral do FIV (Duarte *et al.*, 2012; Fenner, 2017). O FIV subdivide-se em vários subtipos que se baseiam em diferenças na sequência do gene *env*. No mundo, cinco subtipos principais foram reconhecidos: A, B, C, D e E. Os gatos europeus estão infetados com os subtipos A, B, C e D, sendo o subtipo A o principal subtipo nos países a norte e o subtipo B é mais importante nos países do Sul, como no caso de Portugal e Itália (Kann *et al.*, 2006) Estas diferenças do gene *env* acabam por apresentar potenciais obstáculos no desenvolvimento de vacinas contra o FIV. Gatos infetados podem albergar vários subtipos o que indica uma falta de proteção cruzada entre subtipos (Sykes, 2013).

3.2. Epidemiologia:

A prevalência de FIV é variável geograficamente e depende de fatores de risco como a condição de vida do animal. Um estudo de 2010 relativo a gatos errantes na área metropolitana de Lisboa, detetou uma prevalência de 10,2% (Duarte *et al.*, 2010). O FIV pode ser isolado no sangue, soro, plasma, fluido cefalorraquidiano e saliva em gatos infetados. A inoculação parenteral do vírus, que se encontra na saliva ou sangue, através de mordidas ou feridas, constitui a principal forma de transmissão (Hartmann, 2012) A infeção é muito mais comum nos machos do que nas fêmeas e o risco de infeção é maior em gatos que passam mais tempo no exterior. Gatos adultos também são infetados mais frequentemente do que gatos mais jovens, dado que o comportamento agressivo entre gatos é o meio predominante de transmissão natural (Scherk *et al.*, 2013a). A transmissão vertical é rara entre gatos do mesmo lar, apesar do “grooming” mútuo, alguma agressividade, tigelas de comida e caixas de areia partilhadas durante vários anos (Litster, 2014). Pode ocorrer a transmissão do vírus da mãe

para os filhos durante a gestação e a proporção de crias infetadas depende da carga viral da mãe (Greene, 2016). A transmissão de FIV através do colostro é uma ocorrência muito rara, no entanto pode conduzir a resultados falsos positivos, na pesquisa de anticorpos contra o FIV. Podem apresentar estes resultados durante os primeiros 3 meses de vida, devido à presença de anticorpos no leite, apesar de não se encontrarem verdadeiramente infetadas (MacDonald *et al.*, 2004). Na pesquisa de anticorpos, é incomum que os resultados positivos obtidos a partir de métodos como o método ELISA, sejam confirmados por outros métodos. Deste modo, a verdadeira prevalência da infeção pode ser sobrestimada numa população saudável, devido a resultados falsos positivos (Cohn, 2007b).

3.3. Patogenia

O vírus replica-se no tecido linfoide, incluindo o timo, baço, linfonodos, tecido linfóide associado à mucosa, medula óssea, mas também em tecidos não linfóides, como as glândulas salivares e o SNC (Dunham, 2006; Cohn, 2007).

Os principais alvos para a infeção por FIV são os linfócitos T CD4+ ativados, mas também infeta CD8+, linfócitos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e astrócitos. A glicoproteína gp120 do envelope liga-se a um recetor primário na superfície celular, o CD134, expresso primariamente em células CD4+ (Dunham & Graham, 2008). Uma mudança conformacional ocorre na gp120, o que permite uma segunda interação com o coreceptor CXCR4, desencadeando uma fusão de membrana e permitindo a entrada do vírus. Após o pico da viremia, o vírus circulante diminui para níveis baixos à medida que o hospedeiro desenvolve uma resposta imunitária ao FIV. Geralmente, os anticorpos anti-FIV tornam-se detetáveis em gatos infetados experimentalmente 2 a 4 semanas após a sua inoculação, embora a exposição a quantidades menores de vírus possa atrasar o aparecimento de respostas detetáveis (Dunham, 2006).

No decorrer desta fase, a carga viral mantém-se baixa e os animais não apresentam sinais clínicos, podendo ter uma duração de vários anos. No entanto, ocorre uma diminuição progressiva da função imunitária do animal, devido à diminuição do número de linfócitos T CD4+ no sangue periférico e a nível dos tecidos linfóides. As principais causas da perda celular podem incluir a diminuição da produção devido à infeção da medula óssea e do timo, a lise induzida de células infetadas pelo FIV, a destruição de células infetadas pelo sistema imunitário ou a morte por apoptose. Os gatos infetados apresentam uma diminuição seletiva e progressiva dos linfócitos T CD4+ e um aumento significativo dos linfócitos T CD8+, o que

subsequentemente leva a diminuição da relação CD4+: CD8+ (Kolenda-Roberts, 2008). De modo geral, a infecção parece levar a uma mudança de células T-helper 1 (Th-1) para T-helper 2 (Th-2), à desregulação de citocinas e à supressão da resposta imunitária celular e inata, acabando por levar à apoptose de linfócitos em tecidos linfoides primários (Fenner, 2017).

A disfunção neurológica e alterações histológicas no sistema nervoso central são eventos indiretos e não necessariamente uma consequência imediata da infecção celular do SNC ou da replicação viral dentro do SNC. As células do SNC infetadas pelo FIV incluem os astrócitos e as células da micróglia. A inflamação do SNC é provocada pelo aumento do complexo de histocompatibilidade microglial e o movimento de células inflamatórias mononucleares no cérebro, regido por células microgliais e astrócitos, como resposta ao vírus. Pensa-se que os astrócitos e macrófagos infetados alteram o metabolismo celular do SNC ou são responsáveis pela produção de neurotoxinas tais como citocinas inflamatórias ou moléculas sinalizadoras. Neurotoxinas como o glutamato foram descritos como uma causa de perda neural (Huitron-Resendiz *et al.*, 2004; Johnson, 2005).

3.4. Sinais Clínicos

As alterações clínicas provocadas pelo FIV podem ser muito semelhantes às alterações provocadas por FeLV (Cohn, 2007b). A maioria dos sinais clínicos apresentados pelos gatos infetados com FIV não são diretamente causados pelo próprio vírus, mas sim devido à imunodepressão que este induz. Deste modo, é crucial identificar a causa subjacente dos sinais e proceder ao seu tratamento (Scherk *et al.*, 2013a).

As fases clínicas reconhecidas em gatos incluem uma fase aguda, uma fase clinicamente assintomática de duração variável, e uma fase terminal de infecção comumente referida como SIDA felina. Também foram descritas duas outras fases em gatos infetados: linfadenomegalia generalizada progressiva que sucede a fase assintomática e posteriormente a fase do complexo associado à SIDA (ARC). A primeira fase ocorre nos primeiros 3 meses iniciais pós-infecção e corresponde ao pico inicial de virémia. Alguns dos gatos podem apresentar letargia, anorexia, linfadenopatia generalizada, neutropenia, linfopenia e febre e também outras alterações tais como enterites, estomatites, dermatites, conjuntivites ou doenças do foro respiratório. No entanto, muitos gatos não apresentam quaisquer sinais clínicos (Dunham, 2006; Kolenda-Roberts, 2008). A segunda fase caracteriza-se pela ausência de sinais clínicos, na qual não se evidenciam alterações clínicas, podendo durar vários anos (Arjona *et al.*,

2007). A carga viral é mantida a níveis extremamente baixos) e a infecção é controlada principalmente pelos linfócitos CD8+ T e linfócitos B. Surge um aumento persistente da concentração de IgG, em parte atribuível à produção de anticorpos específicos do FIV (Kolenda-Roberts, 2008). A terceira fase pode durar meses a poucos anos, em que se observa uma linfadenopatia generalizada com alguns sinais clínicos inespecíficos tais como febre recorrente, letargia, anorexia, estomatites, entre outros (Hartmann.,1998). A quarta fase engloba o complexo associado à SIDA e a quinta fase é referida como a SIDA felina. Durante estas fases mais tardias da infecção, os sinais clínicos são um reflexo de infecções oportunistas, neoplasia, mielossupressão e doenças neurológicas. Podem ser provocados por infecções oportunistas pela microflora endógena ou outros agentes patogénicos tais como bactérias, fungos, protozoários ou outros vírus (Sykes, 2013). Na fase final da doença, podem ser observadas alterações periodontais, doenças respiratórias, estomatite, anorexia, glomerulonefrite, alterações oftalmológicas, rinites e dermatofitoses difíceis de tratar (Sellon & Hartmann, 2012).

Alterações neurológicas incluem alterações comportamentais, convulsões, alterações dos ciclos de sono, aprendizagem deficiente e paresia (Hosie *et al.*, 2009). A SIDA coincide com o ressurgimento do vírus circulante, um declínio acentuado no número de linfócitos CD8+ T circulantes, uma deficiência persistente de linfócitos CD4+ e uma redução da resposta proliferativa à estimulação mitótica devido ao controlo imunológico ineficaz da replicação do vírus. Nesta fase os gatos apresentam uma maior probabilidade de disseminar o vírus na saliva e no sangue (Kolenda-Roberts, 2007).

Embora a divisão da infecção por fases clínicas possa revelar-se útil do ponto de vista do prognóstico de medição, não existe nenhuma distinção aguda entre eles, e nem todas as etapas serão aparentes na maioria dos gatos naturalmente infetados. Além disso, não há meios para prever de forma fiável a transição da fase assintomática para a fase ARC ou SIDA, embora um estudo tenha constatado que níveis mais elevados de viremia durante a fase aguda da infecção estavam associados a uma progressão mais rápida para as fases terminais da doença (Hartmann, 2012; Sykes, 2013).

3.5.Diagnóstico

3.5.1.Alterações bioquímicas

Várias alterações nos parâmetros bioquímicos foram descritas em gatos infetados com FIV, mas nenhum é específico ou patognomónico para a infecção. Durante a fase aguda da infecção,

os gatos podem apresentar neutropenia e linfopenia, que desaparecem à medida que o gato progride para a fase assintomática da infecção. Durante a fase assintomática, os resultados da contagem completa de células sanguíneas e análises bioquímicas estão frequentemente dentro dos limites de referência (Greene, 2016).

3.5.2. Diagnóstico serológico

3.5.2.1. Testes rápidos de ELISA e imunocromatográficos

Os testes rápidos de diagnóstico, vulgarmente denominados de kits rápidos de teste FIV detetam anticorpos que reconhecem proteínas estruturais virais, tais como a proteína da cápside p24 ou a proteína transmembranar gp40 e podem assumir a forma de testes ELISA ou imunocromatográficos (Weiss & Wardrop, 2010). Os testes baseados no método ELISA detetam anticorpos contra o FIV e baseiam-se no p24 e na proteína transmembranar gp40. A maioria dos gatos produz anticorpos 60 dias após a exposição, mas o desenvolvimento de anticorpos detetáveis pode ser consideravelmente mais tardio em alguns gatos. Como o FIV produz uma infecção persistente a partir da qual os gatos não recuperam, os gatos infetados geralmente desenvolvem elevadas quantidades de anticorpos especificados por FIV. A deteção de anticorpos tem sido historicamente sinónimo de infecção. No entanto, os testes de anticorpos têm de ser interpretados cuidadosamente em gatos com menos de 6 meses de idade. Os gatinhos até aos 6 meses de idade podem ter anticorpos anti-FIV adquiridos passivamente pela mãe, caso se encontre infetada (Arjona *et al.*, 2007). As crias raramente são infetadas por uma mãe infetada, portanto, a maioria dos gatinhos que inicialmente têm resultados positivos, acabarão por ter resultados negativos quando os anticorpos maternos diminuírem (Cohn, 2007).

Os resultados falsos negativos podem ocorrer em fases iniciais da infecção, quando os gatos se tornam provírus positivos, mas permanecem seronegativos por várias semanas a meses, mas também devido a possíveis erros na execução do teste. Além disso, os resultados falsos negativos podem também ser obtidos nas fases terminais da doença devido à imunodeficiência ou quando há elevadas cargas virais, podendo levar ao sequestro de anticorpos contra o FIV, devido a complexos vírus-anticorpo (Crawford & Levy, 2006).

3.5.2.2. Western Blot

O Western Blot é considerado mais sensível e específico na pesquisa de FIV e pode ser usado para confirmar resultados questionáveis, uma vez que permite a detecção de anticorpos que não foram previamente detetados com ELISA ou imunocromatografia (Greene, 2016). Este método permite a detecção de anticorpos que reagem a um maior número de proteínas virais. Caso ocorra uma reação relativamente a duas ou mais proteínas, considera-se o resultado positivo e em casos de apenas uma, considera-se duvidoso (Crawford & Levy, 2006). Porém, esta técnica é muito mais demorada, apresenta um custo mais elevado e requer equipamento especializado (Levy *et al.*, 2004).

3.5.2.3. Imunofluorescência indireta

A Imunofluorescência indireta não é muito utilizada, dado que requer uma maior experiência por parte de quem avalia e é considerada menos sensível relativamente a outros métodos na pesquisa de anticorpos (Levy *et al.*, 2017).

3.5.3. Diagnóstico molecular e isolamento viral

3.5.3.1. PCR

A PCR é um método com uma elevada sensibilidade e pode ser utilizado em casos de resultados inconclusivos obtidos a partir métodos serológicos. Em gatos de idade inferior a 6 meses, os anticorpos contra o FIV podem ser provenientes da imunidade materna (se a mãe se encontrar infetada), não sendo necessariamente resultantes da infeção pelo FIV. O PCR, uma vez que se baseia na detecção de antígenos, pode auxiliar num diagnóstico mais conclusivo. No entanto, apesar da sua elevada sensibilidade, alguns testes de PCR são variáveis no desempenho e podem, em alguns casos, ser inferiores a testes serológicos (Bienzle *et al.*, 2004, Levy *et al.*, 2004). Os ensaios de PCR atualmente disponíveis detetam com elevada sensibilidade os vírus do subtipo A, mas as outras estirpes apresentam resultados mais variáveis. Podem ocorrer resultados discrepantes em relação a testes serológicos (seropositivos, PCR negativos) pela presença de um subtipo FIV não reconhecido pela PCR, dada a grande variedade genética dos subtipos existentes e não pela ausência de infeção por FIV, no entanto, o mais provável é dever-se a possíveis erros técnicos (Hosie *et al.*, 2009). Os “primers” utilizados na PCR baseiam-se nas sequências nucleotídicas dos genes *env* e *gag* do FIV, deste modo podem não ser suficientes para detetar a grande variedade genética dos

subtipos virais existentes na natureza. Este método apresenta falsos-negativos que variam de 10% a 100% (Crawford & Levy, 2007). Para além destes casos, resultados falsos-negativos podem surgir quando a qualidade da amostra não é adequada ou quando não há uma carga viral suficiente no sangue (Sykes, 2013; Arjona *et al.*, 2007). Também é possível a obtenção resultados diferentes (seronegativo, PCR positivo) em gatos que vivem em contacto com gatos seropositivos infetados com FIV, dado que os mesmos podem tornar-se provírus positivos sem desenvolver níveis detetáveis de anticorpos no sangue. Estes gatos estão infetados e, na maioria dos casos, ocorrerá a seroconversão semanas a meses mais tarde. PCR falsos positivos devem-se, na sua grande maioria, a error (ex. contaminação cruzada) cometidos durante a sua execução (Crawford & Levy, 2007).

A PCR em tempo real pode ser utilizada para avaliar a progressão da doença (Levy *et al.*, 2008).

3.5.3.2. Isolamento viral

O isolamento viral é considerado como o “gold standard” dos métodos de diagnóstico. Este método consiste na recolha de sangue periférico e posteriormente proceder à cultura dos respetivos linfócitos com células T primárias de felino durante 2-3 semanas. A presença do vírus é confirmada pela medição dos níveis de proteínas virais presentes nos fluidos da cultura (Hosie *et al.*, 2009). Todavia, este método é tecnicamente exigente, dispendioso, demora várias semanas até se obter um resultado e não se encontra disponível de forma rotineira (Bienzle *et al.*, 2004).

3.6. Prevenção e Controlo

Não há vacinas disponíveis na Europa (Westman *et al.*, 2016). Evitar o contacto com possíveis gatos infetados e evitar que um gato infetado entre em contacto com gatos saudáveis são das melhores medidas de prevenção e de controlo (Hosie *et al.*, 2009). Animais infetados devem permanecer dentro de casa para evitar o contacto com outros animais, não só para evitar a transmissão do FIV a outros gatos, mas também de modo a impedir que sejam afetados por doenças provenientes de outros gatos, visto que são animais imunodeprimidos (Cohn, 2007b; Crawford & Levy, 2007). Todos os animais devem ser avaliados em relação à presença FIV antes de serem introduzidos num ambiente com outros gatos ou num gatil

(Hartmann *et al.*, 2007) A castração pode ajudar a reduzir o “roaming” e a agressividade relativamente a outros gatos vizinhos, diminuindo o risco de infecção. Gatos infetados devem ser examinados clinicamente pelo menos a cada 6 meses e monitorizados para a perda de peso. Devem ser considerados ensaios laboratoriais periódicos de rotina tais como a hematologia e a bioquímica (Hosie *et al.*, 2009).

Todos os objetos potencialmente contaminados com sangue ou saliva, tais como instrumentos cirúrgicos, material de administração de medicação, comedouros e bebedouros de um animal infetado, deverão ser esterilizados (Levy *et al.*, 2008).

3.7.Tratamento

Como não existe cura para o FIV, a terapia consiste no tratamento de infeções secundárias e por uma terapia antiviral e imunomoduladora, de modo a melhorar a resposta imunitária do animal (Cohn, 2007b). A identificação das infeções secundárias é essencial para se proceder a um tratamento com antibióticos e antifúngicos adequados. O uso de corticosteroides e de outros fármacos com um potencial imunossupressor devem ser evitados, a não ser que haja uma forte indicação para o seu uso (Sellon & Hartmann, 2012; Sykes, 2013).

O AZT (Azidotimidina) é um fármaco antiviral derivado da timidina que bloqueia a transcriptase reversa do retrovírus, impedindo a sua integração no DNA da célula hospedeira (Hosie *et al.*, 2009). Tem a capacidade de se integrar na cadeia de DNA em formação impedindo a infeção do vírus de novas células por parte do vírus. Deste modo, inibe a replicação do FIV o que leva a uma diminuição carga viral plasmática e uma melhoria clínica e imunológica dos gatos FIV positivos, promovendo a sua qualidade de vida (Sellon & Hartmann, 2012). Durante o tratamento, caso sejam administradas doses altas, deve-se realizar hemogramas completos semanalmente, durante o primeiro mês, devido à possibilidade de ocorrência de anemia não regenerativa (Hosie *et al.*, 2009; Sykes, 2014).

O AMD3100 poderá tornar-se uma boa opção como um antiviral para gatos. Este fármaco pertence à classe dos bicyclams que atuam como antagonistas seletivos do recetor CXCR4 que se encontra em células humanas e também felinas. Esta molécula liga-se a este recetor, que quando bloqueado com AMD3100, inibe a ligação do FIV a este recetor e, consequentemente, a sua entrada na célula (Hosie *et al.*, 2009; Greene, 2016).

Os imunomoduladores são fármacos muito utilizados como estimuladores inespecíficos do sistema imunitário em gatos infetados (Hosie *et al.*, 2009). Não existem evidências a partir de

estudos controlados de que estes compostos possuam efeitos benéficos sobre e a estimulação inespecífica do sistema imunitário através da utilização de imunomoduladores pode conduzir ao aumento da replicação viral através da ativação das células infetadas em estado latente contribuindo para a progressão da doença (Hosie *et al.*, 2009; Little *et al.*, 2020). Deste modo está contraindicado a utilização de imunomodeladores inespecíficos em gatos FIV positivos (ABCD, 2012a).

O interferão ω recombinante felino (reFeIFN- ω) e o interferão α recombinante humano (reHuIFN- α) não só possuem um efeito imunomodulador, mas também antiviral. Apesar de levar a uma melhoria dos parâmetros clínicos e ao aumento da esperança de vida em gatos infetados, o IFN- α recombinante humano apresenta a desvantagem de não ser específico da espécie felina, podendo tornar-se ineficaz ao fim de 6 semanas caos seja administrado em doses altas, devido ao aparecimento de anticorpos anti-IFN- α . Também pode levar ao progresso da infeção pelo FIV, devido à estimulação não-específica do sistema imunitário. O reFeIFN- ω , uma vez que é homólogo da molécula felina, pode ser utilizado com segurança ao longo da vida do animal sem estimular a produção de anticorpos neutralizantes (Hosie *et al.*, 2009; ABCD, 2012; Greene, 2016).

4. Vírus da Leucemia Felina

4.1. Etiologia

O vírus da leucemia felina (FeLV) é um retrovírus do tipo C, que pertence à subfamília Orthoretrovirinae e gênero *Gammaretrovirus*. Possuem um envelope e têm uma estrutura de três camadas: um complexo de genoma-nucleoproteína com simetria helicoidal, rodeado por um cápsideo icosaédrico, que por sua vez se encontra rodeado por um envelope com espinhos de glicoproteína (Fenner, 2017). Este vírus possui a enzima transcriptase reversa que, a partir de processos de transcrição, converte as cadeias de ARN em ADN que é posteriormente incorporado no ADN do hospedeiro, tornando-se parte integrante do genoma do gato e que, através da replicação celular, passa para novas células. O ADN viral que é integrado no genoma do hospedeiro é denominado de provírus. Este é reconhecido e transcrito pelas enzimas da célula hospedeira, levando a que as mesmas comecem a produzir ARN viral que possui informação para a produção de proteínas virais a partir dos ribossomas do hospedeiro (O'Brien *et al.*, 2012). FeLV é um agente que se replica dentro de muitos tecidos, incluindo medula óssea, glândulas salivares e epitélio respiratório e, caso a resposta imune não intervira após a infecção inicial, dissemina-se para a medula óssea e infeta as células precursoras hematopoiéticas (Greene, 2016).

O vírus codifica três genes principais: o gene *gag* que corresponde ao antigénio específico do grupo; o gene *pol* que é a responsável pela proteína da transcriptase reversa e o gene *env* que codifica proteínas tais como as transmembranares e as do envelope viral (Poulet *et al.*, 2007). O FeLV também é classificado em subtipos, de acordo com a variação na sequência do gene *env*, como FeLV-A, FeLV-B, FeLV-C e FeLV-T (Lutz *et al.*, 2009). O subtipo A é o mais frequente nas infeções em gatos domésticos, e a sua transmissão é horizontal, enquanto que os outros subgrupos surgem quando o subtipo A infeta um animal e ocorrem mutações e/ou recombinações entre o genoma viral do FeLV-A e elementos endógenos de FeLV no genoma do gato, tornando-o mais patogénico. O FeLV-B tem uma capacidade maior em desenvolver tumores, nomeadamente linfosarcomas. O subtipo C é raro e é o resultado de uma mutação no gene *env* de FeLV-A. O FeLV-C causa um rápido desenvolvimento de uma anemia aplástica severa (Fenner, 2017). O FeLV-T tem um citotropismo para os linfócitos T e pode levar a uma imunodepressão grave (Hartmann, 2006; Lairmore, 2011).

4.2.Epidemiologia

O FeLV é contagioso e transmite-se através de contacto próximo com gatos infetados e ocorre principalmente através da saliva, onde a concentração do vírus é maior do que no sangue. Pode ser transmitido por transmissão horizontal, mordeduras, arranhões, “grooming” mútuo, partilha de comedouros, bebedouros e de caixas de areia. A transmissão por fómites ou pulgas é passível de acontecer, no entanto é rara (Hartmann, 2012). Embora o vírus possa estar presente em muitos tecidos, fluidos corporais e secreções, é menos provável que se elimine através da urina e fezes (Greene, 2016). Também pode ocorrer transmissão vertical por via transplacentária e através do leite. A presença de FeLV em gatas gestantes pode resultar em morte embrionária, morte fetal ou em crias com uma infeção regressiva (Lutz *et al.*, 2009).

4.3.Patogenia

Na maioria dos casos, a infeção inicia-se na orofaringe, onde o FeLV se replica nos tecidos linfoides locais da mesma e posteriormente infeta os linfócitos, que são transportados para tecidos alvo tais como a medula óssea, o baço, o timo, o intestino e os linfonodos. Posteriormente, o vírus replica-se em células da medula, glândulas salivares, criptas intestinais, linfonodos e em células do trato urinário. Grandes quantidades de partículas virais são produzidas, e desenvolve-se viremia em algumas semanas. Em estágios iniciais da infeção principalmente linfócitos e monócitos, mais tarde durante a virémia, a maioria dos neutrófilos encontram-se infetados (Cattori *et al.*, 2008; Collado *et al.*, 2007).

A doença é de natureza crónica e geralmente há uma longa fase assintomática, na qual os gatos não apresentam sinais clínicos. Recentemente, novas ferramentas de diagnóstico, incluindo métodos muito sensíveis como a PCR, forneceram novos dados sobre o curso da infeção. Os gatos que são considerados imunes ao FeLV após a infeção, permanecem provírus-positivos. Os gatos antigénio-negativos e provírus-positivos são frequentemente encontrados e a sua relevância clínica, assim como o seu papel na epidemiologia ainda não são totalmente compreendidos. Os estudos sugerem que estes gatos são considerados portadores do FeLV e apenas excretam partículas virais após a reativação do vírus, agindo

como uma fonte de infecção. Como o provírus se encontra integrado no genoma do gato, é improvável que alguma vez se encontre totalmente livre de FeLV (Hartmann, 2012).

As diferentes formas da infecção por FeLV, tendo em conta a evolução da infecção do animal, são descritas como: infecção abortiva, em que a replicação viral é interrompida por uma resposta humoral e imunomediada eficiente. Estes gatos nunca se tornam virémicos e apresentam resultados negativos na cultura do vírus, pesquisa de, ARN viral e ADN proviral. Apresentam elevados níveis de anticorpos neutralizantes, mas nem o antigénio FeLV, nem o ARN viral ou o ADN proviral podem ser detetados no sangue em qualquer fase. Nestes gatos, o vírus nunca se dissemina de forma sistémica e a infecção geralmente permanece indetetável. A infecção abortiva é provavelmente causada por uma exposição de baixa dose ao FeLV (Hartmann, 2006; Pepin *et al.*, 2007); Infecção regressiva ocorre quando há uma resposta imunitária efetiva, impedindo a replicação do vírus antes da infecção da medula óssea. Depois da infecção inicial, o FeLV espalha-se geralmente dentro de células mononucleares (linfócitos e monócitos). Durante esta primeira fase, o antigénio FeLV-p27 livre é detetável, os gatos têm resultados positivos em testes que detetam antigénio livre no plasma (como por exemplo o ELISA) e podem excretar o vírus. A virémia inicial pode ser caracterizada por mal-estar, febre ou linfadenomegalia. O vírus dissemina-se para tecidos-alvo, incluindo o timo, o baço, linfonodos e glândulas salivares. Estes gatos também desenvolvem uma imunidade muito eficaz e são protegidos contra novas exposições ao vírus. Tem um baixo risco de desenvolver doenças associadas ao FeLV, porém o vírus encontra-se integrado no seu genoma e, portanto, pode ser detetado através da PCR. A replicação do vírus é contida e, a excreção viral não ocorre. As infecções regressivas podem reativar-se na gravidez em resultado da imunodepressão da progesterona endógena, o que também pode explicar o ressurgimento da infecção por FeLV em gatinhos. As glândulas mamárias de gatas infetadas regressivamente podem começar a produzir partículas virais infecciosas durante a indução da lactação; na infecção, o vírus do FeLV não é contido no início da infecção. Ocorre a replicação do vírus em primeiro lugar nos tecidos linfoides e posteriormente na medula óssea, mucosas e tecidos epiteliais glandulares. Estes gatos permanecem virémicos e são infecciosos para o resto da vida (Fenner, 2017; Hartmann, 2012).

Em infecções progressivas, a resposta imune não foi eficaz, por isso a virémia persiste durante mais de 16 semanas e os gatos permanecem virémicos, podendo infetar outros gatos, para o resto da vida. Os gatos com esta forma de infecção têm baixos níveis de anticorpo neutralizante detetável, e o vírus replica-se de forma persistente na medula óssea, baço,

linfonodos e glândulas salivares. Estes gatos desenvolvem doenças associadas à infecção por FeLV, e a maioria deles morre em 3 anos. Infecções regressivas e progressivas podem ser distinguidas por testes repetidos de antígeno viral no sangue periférico, dado que na maior parte dos casos de infecção regressiva, apresentam resultados negativos na pesquisa de antígeno ao fim de 2 a 8 semanas. No entanto, ambas as infecções regressivas e progressivas, quase sempre apresentam ADN viral no sangue. No entanto, as cargas de ARN proviral e viral de FeLV em subconjuntos de leucócitos, analisados pelo PCR quantitativo, indicam que a infecção progressiva por FeLV está associada à virémia secundária com origem na medula óssea, enquanto os gatos regressivos revelam uma infecção viral não produtiva com baixo número de linfócitos. Durante a infecção aguda, a carga viral de ARN proviral de gatos com infecções progressivas e regressivas não possuem um valor bem distinguível, mas após esta fase observam-se diferenças significativas nas cargas virais com a utilização do PCR quantitativa (Hofmann-Lehmann *et al.*, 2007; Greene, 2016)

Por fim, pode ser atípica/focal, uma forma raramente observada em infecções naturais, consistindo numa replicação viral local atípica persistente (por exemplo, em glândulas mamárias, bexiga e olhos). Também ocorre em gatos com infecção restrita a certos tecidos, tais como, o baço, os nódulos linfáticos, o intestino delgado ou as glândulas mamárias e pode levar à produção intermitente ou de baixa qualidade de antígeno p27. Por conseguinte, estes gatos podem ter resultados fracos positivos ou até mesmo negativos em testes de antígeno, podendo alternar. As gatas com infecção atípica das suas glândulas mamárias podem transmitir o vírus às suas crias através do leite, na fase em que a pesquisa de antígeno apresenta um resultado negativo (Hartmann, 2012; Pepin *et al.*, 2007).

4.4. Sinais clínicos

Os diferentes subgrupos podem causar diferente sintomatologia, sendo que as três principais manifestações são imunodepressão, anemia não regenerativa e doenças imunomediadas (A). As alterações incluem atrofia tímica, linfopenia e neutropenia, função neutrófila deficiente, entre outros. Quer os sinais clínicos estejam ou não presentes, todos os gatos com infecção por FeLV progressiva tornam-se imunodeprimidos, com respostas de anticorpos primários e secundários atrasadas (Cohn, 2007) A depressão imunitária pode ter alterações clínicas variadas e pode permitir a infecção com agentes aos quais os gatos seriam normalmente resistentes ou exacerbar possíveis infecções (Gleich *et al.*, 2009).

A maioria dos casos de anemia regenerativa estão relacionadas com infecções secundárias por agentes como *Mycoplasma haemofelis*. No entanto, o tipo de anemia mais característica é não regenerativa, aplástica, sem leucopenia e sem trombocitopenia (Ramsey & Tennant, 2010).

Este vírus pode provocar diferentes tumores em gatos, principalmente linfoma e leucemia, mas também outras malignidades não-hematopoiéticas. Os linfomas estão entre os tumores mais frequentes do gato e são por vezes causados pela infecção por FeLV (Hartmann, 2012). Diferentes formas de linfoma foram classificadas de acordo com a sua localização anatómica mais frequente: a forma tímica/mediastinal anterior; a forma digestiva, onde as células tumorais estão associadas aos órgãos do trato gastrointestinal; A forma multicêntrica ou periférica, que afeta os linfonodos; a forma atípica ou extranodal, apresentando-se com tumores isolados nos rins, SNC ou pele (Lutz *et al.*, 2009). O envolvimento do fígado, baço, medula óssea, envolvimento de órgãos não linfoides e/ou não está associado a um pior prognóstico (Vail, 2007). Também pode provocar fibrossarcomas, com uma maior incidência em gatos jovens, devido à sua associação com o vírus do sarcoma felino (FeSV) (Hartmann, 2012). Devido à possível infecção de várias partes do organismo, podem ocorrer enterites crónicas; alterações neurológicas tais como síndrome de Horner, hiperestesia, entre outras; alterações reprodutivas como a absorção fetal ou morte neonatal e doenças imunomediadas como glomerulonefrites, uveítes, poliartrites e anemia hemolítica (Gleich & Hartmann, 2009).

4.5.Diagnóstico

4.5.1.Diagnóstico Serológico

4.5.1.1.ELISA

Os métodos ELISA baseiam-se na deteção do antígeno proteico de capsídeo p27 solúvel livre e são os testes de rastreio mais utilizados para a pesquisa de FeLV. A presença deste antígeno conduz à insolubilização dos anticorpos conjugados com enzimas, resultando numa alteração de cor que é indicativa para a presença de p27 (Lutz *et al.*, 2009). Estes testes tornam-se positivos precocemente nas primeiras semanas após a infecção, antes da medula óssea ser afetada. Assim, os resultados positivos podem refletir uma virémia transitória, em gatos regressivamente infetados, ou uma virémia persistente (em gatos progressivamente infetados). A maioria dos gatos tem resultados positivos dentro de 28 dias após a exposição. Os métodos ELISA possuem uma sensibilidade de cerca de 90% e uma especificidade de

98%, no entanto podem apresentar resultados falsos positivos. Embora possa ser realizado com soro, plasma ou sangue, em alguns estudos verificaram-se taxas mais elevadas de resultados falsos positivos quando foram utilizadas amostras de sangue, especialmente quando as amostras foram hemolisadas (Levy *et al.*, 2008; Little *et al.*, 2011). Caso não seja possível a realização de testes adicionais para confirmação tais como a PCR ou o isolamento viral, deverá ser efetuado, no mínimo, um segundo teste baseado em ELISA para excluir um resultado falso positivo. Deve-se realizar um teste 10 semanas após o primeiro, de forma a avaliar a progressão da infecção. Caso após este tempo, o resultado do teste continue a ser positivo, o mais provável é estarmos perante uma infecção progressiva, em que o gato irá apresentar resultados positivos para o resto da sua vida (Hartmann, 2012; Greene, 2016). Este teste também pode ser realizado em saliva e lágrimas, no entanto não é considerado muito fiável, dado ao elevado número de falsos positivos e falsos negativos (Cohn, 2007).

4.5.1.2. Imunocromatografia

Os testes imunocromatográficos são semelhantes ao ELISA, uma vez que também se baseiam na deteção do antígeno p27 e possuem uma sensibilidade e especificidade de diagnóstico comparáveis (Lutz *et al.*, 2009). Tal como o método ELISA, são comercializados em kits de teste rápido e são muito utilizados na prática clínica. O teste deve ser repetido após 6 semanas para se avaliar a progressão da infecção e é recomendada a utilização de outros métodos tais como a PCR (Rand, 2006).

4.5.1.3. Imunofluorescência Direta

Este teste apenas apresenta um resultado positivo numa fase mais tardia da infecção em relação ao ELISA e em muitos dos casos positivos, estamos perante uma infecção progressiva. A imunofluorescência direta não é recomendada como um teste de rastreio, dado que gatos que se encontram nas primeiras semanas de virémia, mas que já são passíveis de transmitir a infecção a outros gatos podem não ser detetados (Dunham & Graham, 2008).

Os testes ELISA e IFA não devem ser realizados pouco tempo após uma vacinação, uma vez que a mesma pode induzir um resultado falso positivo (Ettinger *et al.*, 2010).

4.5.2. Isolamento Viral

O isolamento do vírus em cultura celular era considerado o melhor método para a detecção para a infecção progressiva do FeLV, mas desde a introdução de métodos de detecção mais recentes, é raramente considerado para testes de rotina (Hofmann-Lehmann *et al.*, 2006). Apesar de ser uma técnica difícil, demorada e que requer equipamento especializado, pode ser utilizada para a confirmação de resultados positivos e permite a detecção do vírus em fases muito precoces (Levy *et al.*, 2006).

4.5.3. Diagnóstico Molecular

4.5.3.1. PCR

A PCR difere dos métodos diretos de FA e ELISA, na medida em que não detecta um antígeno viral, mas as sequências virais de ácido nucleico (ARN viral ou ADN proviral em células). Pode ser realizado com a utilização de sangue, soro, medula óssea, tecidos, saliva e fezes (Arjona *et al.*, 2007), e se for realizado corretamente, é o procedimento com maior sensibilidade e especificidade (Hofmann-Lehmann *et al.*, 2006).

A detecção de provírus no sangue pode ser útil para a clarificação de testes inconclusivos de antígeno p27 e podem detectar o vírus numa fase inicial da infecção, podendo apresentar um resultado positivo antes dos métodos que pesquisam os antígenos p27 (Hartmann & Hofmann-Lehmann, 2020). No entanto, a PCR deve ser efetuada por laboratórios bem equipados e com pessoal experiente, uma vez que pequenas falhas no manuseamento de amostras podem provocar a destruição dos ácidos nucleicos ou levar a uma contaminação cruzada, conduzindo a resultados falsos negativos ou falsos positivos, respetivamente (Gomes-Keller *et al.*, 2006; Hofmann-Lehmann *et al.*, 2006). Além disso, a PCR é altamente específica da estirpe e dado que o FeLV se trata de um retrovírus, frequentemente ocorrem mutações, e pequenas variações da estirpe podem impedir a ligação dos “primers”, um passo necessário para amplificar o genoma viral. Os gatos infetados com FeLV mutante podem ter reações de teste negativas com uma PCR específica. Assim, um resultado negativo não significa necessariamente a ausência de infecção (Crawford & Levy, 2008).

A principal indicação para a PCR é a suspeita de uma infecção regressiva em gatos com linfomas, síndromes imunodepressoras da medula óssea ou lesões gengivais orais crónicas (Greene, 2016). Na infecção regressiva, não ocorre replicação viral ou esta é mínima, por isso,

testes como o ELISA que detetam o antigénio viral são negativos (Hofmann-Lehmann *et al.*, 2006; Hartmann, 2012). Além disso, a PCR em tempo real é usado para quantificar cargas virais e o provírus. Com a utilização da RT-PCR demonstrou-se que as cargas virais em gatos infetados com resultados negativos utilizando métodos como o método ELISA (isto é, que foram regressivamente infetados e que demonstraram uma boa resposta imunitária) eram muito inferiores às cargas virais em gatos com resultados positivos dos testes de antigénio (isto é, que estavam progressivamente infetados). A PCR quantitativa pode ser usada para investigar a carga viral em subconjuntos de leucócitos, tais como, os linfócitos T, permitindo a diferenciação de uma infeção regressiva de uma progressiva (Pepin *et al.*, 2007).

Também é possível detetar a presença de vírus na saliva utilizando a PCR. Observaram-se amostras de saliva com ARN e ADN de FeLV estáveis durante mais de 60 dias à temperatura ambiente. O uso da saliva pode representar uma alternativa para avaliar o estado infeccioso de um gato, sem levar a um stresse desnecessário em gatos mais agressivos, é fácil de recolher e podem ser avaliados grupos com vários gatos para a pesquisa de indivíduos positivos (Gomes-Keller *et al.*, 2006) Porém, apesar da elevada especificidade e sensibilidade, em certos casos, a PCR realizado com saliva, pode revelar um resultado negativo em gatos positivos ao antigénio do FeLV (Greene, 2016).

4.6.Prevenção e Controlo

Gatos infetados com FeLV devem ser mantidos separados de indivíduos não infetados e deve-se evitar que saiam para o exterior, de modo a impedir a propagação do vírus a gatos vizinhos. Antes da introdução de um animal num ambiente novo, deve realizar-se um teste de diagnóstico para a pesquisa de FeLV (Lutz *et al.*, 2009). O vírus é relativamente frágil e é sensível a todos os desinfetantes, incluindo o sabão comum. Deste modo, precauções simples como a lavagem das mãos e os procedimentos de limpeza de rotina podem impedir a transmissão do vírus no meio hospitalar (Pinches *et al.*, 2007b). Devem ser tomados cuidados de modo a evitar a transmissão através de fómite, comedouros, bebedouros, caixas de areia, camas ou até mesmo através de auxiliares, enfermeiros ou médicos veterinários (Hartmann *et al.*, 2007).

Várias vacinas parentéricas estão disponíveis para a prevenção da infeção por FeLV, que incluem vacinas inativadas adjuvantes. Nos programas de vacinação deve ter-se em conta a

vacinação de todos os gatos que têm acesso ao exterior, devido ao possível contacto com animais FeLV positivos, assim como dos animais que coabitam com animais infetados ou com estado portador desconhecido. No entanto, mesmo os gatos vacinados devem ser separados de animais FeLV positivo (Cohn, 2007)

As vacinas contra o FeLV têm sido associadas a sarcomas no local de injeção, pelo que apenas está indicada para gatos poderão estar expostos ao vírus. Deve ser realizada a partir das 8-9 semanas e realizar um reforço 3-4 semanas depois. Posteriormente, é feito um reforço 1 ano depois e depois apenas se realiza um reforço a cada 1-3 anos. O European Advisory Bureau on Cat Diseases (ABCD) sugere um reforço a cada 2 a 3 anos para gatos com idade superior a 3 a 4 anos, dada a menor suscetibilidade dos gatos adultos à infeção (Hartmann & Sykes., 2014). A imunização não é benéfica para animais infetados. Deste modo, apenas devem ser vacinados animais FeLV negativos. (Cohn, 2007b).

4.7.Tratamento

O tratamento de gatos infetados consiste principalmente numa terapia sintomática, de modo a controlar infeções secundárias causadas por agentes oportunistas (Sykes & Hartmann, 2013). Pode ter que se recorrer a antibióticos para controlar infeções secundárias, transfusões sanguíneas em casos de anemia, quimioterapia e/ou radioterapia para o tratamento de neoplasias provocadas pelo FeLV e períodos de fluidoterapia (Cohn, 2007). Deve-se evitar a administração de corticosteroides ou outros fármacos imunodepressores, a não ser que sejam indicados no tratamento de neoplasias ou de doenças imunomediadas associadas ao FeLV (Lutz *et al.*, 2009).

Tal como no tratamento de FIV, também se podem utilizar antivirais tais como o AZT que inibe a replicação do FeLV. Deve-se ter um cuidado especial com doses elevadas, dado que podem provocar uma anemia não regenerativa (Lutz *et al.*, 2009). No entanto, o AZT não tem é tão eficaz nos gatos FeLV positivos como nos gatos FIV positivos (Sykes & Hartmann, 2013).

Também se pode proceder a uma terapia imunomodeladora com Acemannan, proteína A de *Staphylococcus* e com interferão, entre outros (Hartmann, 2012).O Acemannan é um polímero que deriva da planta *Aloe Vera* que estimula a libertação de citocinas, incluindo a interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e prostaglandinas (Day, 2010). A

proteína A é uma proteína de origem bacteriana que estimula a atividade dos linfócitos T citotóxicos e do INF- γ (Cohn, 2007b).

O Interferão- α e o Interferão ω recombinante felino são frequentemente usados em gatos infetados como antivirais e imunomoduladores na esperança de que a carga viral possa ser reduzida e a recuperação dos sinais clínicos associados pode ser facilitada (Little *et al.*, 2020). Um estudo com o Interferão ω recombinante felino parenteral mostrou uma maior taxa de sobrevivência após 9 meses em gatos infetados com FeLV, comparativamente a um grupo de controlo de gatos também infetados com FeLV (Mari *et al.*, 2004). Porém, estes efeitos benéficos podem não ter sido atribuídos ao tratamento da infeção pelo vírus, mas sim ao tratamento de infeções secundárias. Até à data, não foram publicados estudos controlados com interferão felino oral em gatos infetados com FIV ou FeLV (Little *et al.*, 2020).

5.Utilização de testes rápidos tipo SNAP® no Diagnóstico de Doenças Infeciosas

O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) é um dos métodos de diagnóstico mais sensível e específico disponível. Este é um dos métodos mais utilizados em laboratórios de referência em todo o mundo, devido à sua precisão e facilidade na sua realização. O dispositivo SNAP® contém os reagentes necessários para a concretização dos passos associados ao ELISA, pode ser realizado numa clínica e não requer muito tempo ou experiência para a sua execução. O SNAP® supera algumas limitações de outros ensaios rápidos, que incluem testes rápidos de primeira geração, tal como testes com ouro coloidal e provas de aglutinação em látex (O'Connor *et al.*, 2015).

Atualmente existem mais de 20 tipos diferentes de testes SNAP®, em vários formatos de ensaio para uso em aplicações amplamente diferentes, utilizando vários tipos de amostras (sangue inteiro, soro, plasma, fezes e leite). Estes incluem ensaios para a deteção de antígenos e anticorpos tipicamente associados ao diagnóstico de doenças infecciosas, quantificação dos níveis metabólicos e hormonais, cardíacos e testes para os níveis de resíduos de antibióticos no leite. Os testes ELISA são imunoensaios, que contêm um anticorpo ou antígeno enzimático (geralmente referido como conjugado) e, geralmente incluem etapas como a de ligação do antígeno ao anticorpo, a de lavagem, e por fim, uma etapa na qual se forma uma coloração que surge a partir de uma reação enzimática que leva à formação de um produto de reação colorido (IDEXX).

5.1. SNAP® Test

A sua realização consiste na mistura de um conjugado enzimático com soro, plasma ou sangue inteiro num tubo, que posteriormente é colocada no poço de amostra do SNAP®. A mistura da amostra-conjugado flui através da matriz, interage com os pontos de teste e de controlo da matriz e atinge o círculo de ativação em aproximadamente 30 a 60 segundos. O dispositivo é ativado manualmente ou automaticamente com o dispositivo móvel SNAP®, quando a mistura chega ao círculo de ativação. A sua ativação provoca a perfuração dos reservatórios de tampão de lavagem e o de solução de substrato, que posteriormente entram em contacto com a matriz e percorrem-na. A extremidade da matriz que possui o poço está em contacto com um bloco absorvente que inverte o fluxo da amostra, forçando-a a atravessar a matriz. Com isto inicia-se o processo de fluxo inverso, em que o fluxo do tampão

de lavagem e da solução de substrato decorre no sentido dos reservatórios de reagente através até ao bloco absorvente, através da matriz. Na direção oposta, decorre o fluxo da amostra e do reagente conjugado.

Os resultados positivos são visualizados pela formação de produtos de reação coloridos em 6-10 minutos, dependendo do teste. Caso se observe a formação de uma cor mais escura do que a do controlo negativo, o teste é considerado positivo. O desenvolvimento da cor no controlo positivo indica que os reagentes de ensaio se encontram funcionais (O'Connor.T *et al.*, 2015).

5.2.Componentes

- O conjugado é um anticorpo ou antigénio ligado covalentemente à enzima peroxidase de rábano (HRPO). O reagente do conjugado reage especificamente à substância-alvo na amostra, formando um complexo de anticorpos-antigénios marcado pela HRPO.
- O tampão de lavagem é uma solução que contém detergente, proteína não específica e conservantes e remove o reagente não conjugado e detritos da matriz, o que promove um fundo limpo e claro, para que os resultados possam ser facilmente interpretados.
- A solução de substrato utilizada no ensaio SNAP contém TMB (tetrametilbenzidina). Esta é uma solução que precipita após a reação mediada pela enzima HRPO, tornando-se azul e insolúvel, no caso de resultados positivos.
- A matriz de fluxo é constituída por um polietileno branco e poroso e é a peça central do dispositivo SNAP, dado que a amostra, o reagente conjugado, o tampão de lavagem e a solução de substrato fluem através da mesma. Os reagentes imobilizados são aplicados na matriz em áreas separadas como pontos de teste e de controlo num padrão que permite que as reações ocorram de forma independente e de forma específica ao reagente (O'Connor *et al.*, 2015).

5.3.Vantagens do Fluxo Bidirecional de Lavagem e Substrato

O fluxo de tampão de lavagem e solução de substrato na orientação inversa é muito eficiente e tem várias vantagens: O tampão de lavagem interage diretamente com os pontos de ensaio na janela de leitura e não passa por conjugados em que não ocorreu reação ou

detritos da amostra nas proximidades do poço da amostra. Isto reduz o tempo de lavagem e a quantidade de material não ligado que precisa de ser lavado e minimiza a coloração do fundo. A mistura de reagente-conjugado de amostras está exposta aos reagentes nas duas direções, o que aumenta o tempo de contacto e oferece uma segunda oportunidade para se ligar aos pontos de teste. A solução de tampão de lavagem e de substrato estão contidas em reservatórios separados e fluem através da matriz ao mesmo tempo, mas sem misturas. Componentes não especificamente ligados e reagentes de conjugado que não reagiram são removidos por lavagem antes de expor a matriz ao substrato. Isto reduz interferências do fundo não e aumenta a capacidade de leitura dos resultados (O'Connor *et al.*, 2015).



Figura 1 - Dispositivo SNAP® (Fonte: IDEXX).

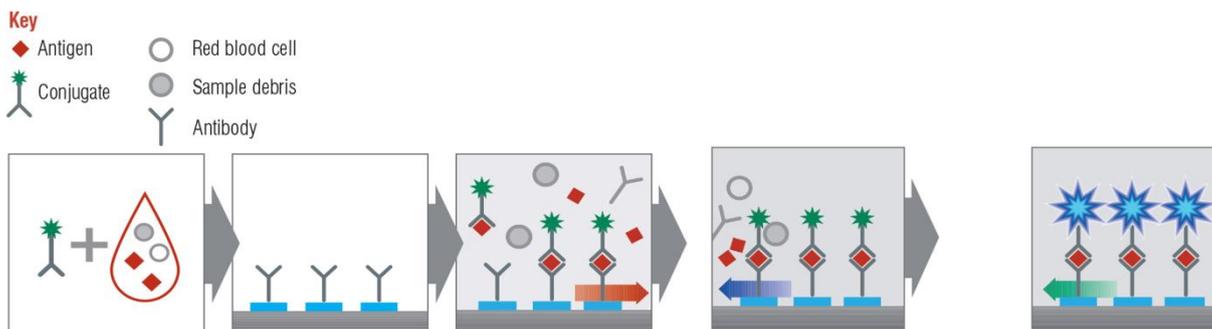


Figura 2 - Etapas do SNAP® Test (Fonte: IDEXX).

II -6. Objetivos

Em medicina veterinária, as doenças infecciosas representam um dos maiores obstáculos para a saúde e bem-estar animal. Médicos veterinários deparam-se constantemente com animais doentes devido a doenças infecciosas e uma das prioridades é o diagnóstico do agente infeccioso, de forma a proceder-se a um tratamento e manejo adequados. Atualmente, na prática clínica, recorrem-se muitas das vezes a testes rápidos para se realizar o diagnóstico de uma doença infecciosa, dada a sua rapidez e um custo relativamente baixo. Deste modo, foi realizada uma análise de doenças diagnosticadas através de testes rápidos e sobre a eficácia dos mesmos. Durante um período de quatro meses de estágio curricular realizado no Hospital Veterinário de Gaia (HVG), foi feito um acompanhamento de consultas, internamento dos animais, cirurgias e exames realizados e foi dado ênfase às doenças infecciosas diagnosticadas através de testes rápidos: Parvovirose Canina, Leishmaniose, FeLV, FIV e Leptospirose.

Os objetivos para a execução deste trabalho foram:

- Proceder à análise da utilização de testes rápidos no diagnóstico de algumas doenças infecciosas
- Proceder à discussão das opções de diagnóstico, tendo em conta a informação recolhida a partir encontradas da bibliografia;

III -7.Materiais e Métodos

7.1. População e Amostra

7.1.1. Animais em Estudo

Ao longo da elaboração deste trabalho foram contabilizadas as consultas gerais e de doenças infecciosas de cães e gatos que ocorreram durante o período de 29 de setembro de 2019 a 31 de janeiro de 2020. Os animais aos quais foram realizados testes rápidos para o diagnóstico de doenças infecciosas, foram alvo de registro de dados, independentemente da raça, gênero ou idade.

7.1.2. Colheita de Dados

A colheita dos dados para a realização deste trabalho foi efetuada no Hospital Veterinário de Gaia (HVG), Vila Nova de Gaia. Assim como a maior parte dos hospitais veterinários, o Hospital Veterinário de Gaia funciona com dois tipos de horários: normal e de urgência. Os estagiários têm horários rotativos, no entanto, nenhum dos horários inclui o horário da noite (das 00:00 às 08:00). Porém, os estagiários podem realizar o turno da noite caso pretendam realizá-lo, desde que seja comunicado ao hospital. Os estagiários têm a possibilidade de desempenhar funções em consulta, internamento e cirurgia, quer em serviço de funcionamento normal quer em serviço de urgência (a partir das 22:00 durante a semana e a partir das 20:00 durante o fim de semana). Durante o período acima referido, foram realizadas cerca de 3291 consultas e/ou cirurgias. A população total de animais foi de 993, dos quais 647 (65,1%) foram cães, 329 (33,2%) foram gatos e 17 (1,7%) corresponderam a outros animais como roedores, leporídeos e répteis. Apenas os casos em que foram utilizados testes rápidos para o diagnóstico de uma doença infecciosa foram registados, tendo sido registado a espécie, idade, raça, gênero, estado vacinal do animal e sinais clínicos. Os diagnósticos foram estabelecidos tendo em conta a história clínica, sinais clínicos, resultados de exames complementares realizados (incluindo o uso do teste rápido).

8. Teste SNAP®

Neste estudo, 42 amostras provenientes de animais com suspeita clínica ou para rastreio de FeLV, FIV, parvovirose, leptospirose e leishmaniose foram submetidas ao teste SNAP® da IDEXX respetivo para a pesquisa do agente infeccioso e, de acordo com as instruções do fabricante.

Dois cães foram diagnosticados com base no resultado positivo do seu cohabitante, totalizando 44 animais em estudo.

8.1. Método de realização do teste SNAP® Combo Plus

O teste rápido utilizado para a pesquisa de FIV e FeLV foi o SNAP® Combo Plus, que é capaz de detetar a presença de ambos os vírus. O conjugado e o teste SNAP® possuem anticorpos anti-FeLV e antigénios de FIV inativados. Os testes SNAP® devem estar armazenados a uma temperatura entre os 2-8 °C e só devem ser utilizados quando todos os componentes se encontram à temperatura ambiente. Deste modo, antes da realização do teste, o mesmo era aquecido com as mãos, para acelerar o seu aquecimento (não deve ser aquecido através de outros meios para não prejudicar os seus componentes).

Foi utilizada a pipeta que vinha juntamente com o dispositivo SNAP® para a colocação de três gotas de amostra (sangue total, soro ou plasma) para o frasco de amostra (que também vem incluído com o dispositivo). Depois foram adicionadas quatro gotas de conjugado ao frasco de amostra e procedeu-se à sua mistura ao inverter o frasco algumas vezes. Após a mistura, todo o conteúdo do frasco foi colocado no poço da amostra e passados cerca de 60 segundos, a amostra fluiu até ao círculo de ativação. Posteriormente, após a amostra chegar ao círculo de ativação, o teste SNAP® foi colocado no Snap Pro® Analyzer para ser ativado, colocando a parte do ativador (no entanto pode ser ativado manualmente, deprimindo o ativador). Passados cerca de 10 minutos, o resultado encontrava-se no ecrã do Snap Pro® Analyzer, no entanto também pode ser lido através da janela de leitura do teste SNAP®.

8.2. Método de realização do teste Snap® Parvo

O teste rápido utilizado para o diagnóstico de Parvovírus Canino foi o Snap® Parvo. Para além do dispositivo SNAP®, inclui também um objeto constituído por uma ampola com conjugado (contém anticorpos anti-Parvovírus), uma zaragatoa no extremo oposto que está inserida num tubo e uma válvula intermédia que separa estes dois componentes. Procedeu-se à remoção do tubo e foi colhido material fecal através da ponta da zaragatoa e posteriormente, o mesmo foi novamente colocado no interior do tubo. Na maior parte dos casos, a amostra fecal foi colhida a partir das fezes do animal, mas alguns deles foram colhidas diretamente do reto animal. Em seguida, a válvula foi quebrada (a válvula é dobrada até estalar), de modo a permitir que o reagente passe para o tubo com a zaragatoa. Após a quebra da válvula, a ampola deve ser apertada três vezes para que o conjugado passe para a zaragatoa e se misture com a amostra. Por fim, a zaragatoa é utilizada como uma pipeta e são colocadas cinco gotas da mistura no poço da amostra. Após cerca de 60 segundos, a amostra atinge o círculo de ativação e o dispositivo pode ser ativado.



Figura 3- Componentes do teste Snap® Parvo.

8.3. Método de realização do teste Snap® Lepto

O teste rápido utilizado para o diagnóstico de *Leptospira* foi o Snap® Lepto. A sua execução, as condições de uso e de armazenamento foram idênticas ao Snap® Combo Plus. O conjugado contém LipL32 recombinante, de modo a detetar anticorpos anti-*Leptospira*. Também foram misturadas quatro gotas de conjugado com três gotas de amostra (sangue total, soro ou plasma) para a realização deste teste.

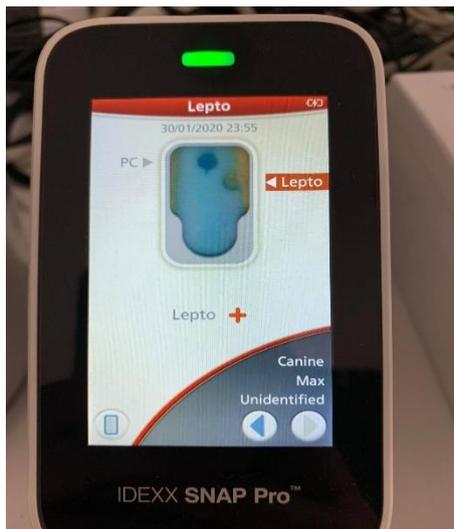


Figura 4- Snap Pro® Analyzer, onde se observa um resultado positivo de leptospirose a partir de um teste realizado no dia 30/01/2020.

8.4. Método de Realização do teste Snap® Leishmania

O teste rápido utilizado para o diagnóstico de *Leishmania* foi o Snap® Leishmania. A sua execução, as condições de uso e de armazenamento foram semelhantes às do Snap® Combo Plus e do Snap® Leptospira. O conjugado contém antígenos de *Leishmania*, de modo a que o teste detete anticorpos anti-*Leishmania*. Neste teste, são misturadas seis gotas de conjugado com apenas duas gotas de amostra (sangue total, soro ou plasma) para a sua execução.

IV -9. Resultados

Para este estudo foram analisados 44 animais de companhia, dos quais 16 (36,4%) eram cães e 28 (63,6%) eram gatos. Estes animais apresentaram-se com sinais clínicos de doenças infecciosas (ou para efetuar o rastreio das mesmas). Destes animais 36 (81,8%) apresentavam-se com sinais clínicos e 8 (18,2%) não apresentaram qualquer sinal. O resumo da caracterização demográfica dos cães e de gatos em estudo encontra-se nas Tabelas 1 e 2, respetivamente.

Quanto ao género dos cães, 75,0% (n=12) eram machos e 25,0% (n=4) eram fêmeas. Dos gatos, 60,7% (n=17) eram machos e 39,3% (n=11) eram fêmeas.

Relativamente aos cães, 43,8% (n=7) eram adultos, 56,3% eram jovens (n=9) e nenhum era idoso. Já em relação aos gatos, a maioria (57,1%; n=16) eram adultos, (32,1%; n=19) eram idosos e 10,7% (n=3) eram jovens.

Os cães sem raça definida (SRD) constituíram mais de metade da amostra (n=9; 56,25%). Foram ainda estudados 3 (18,75%) Pinscher Miniatura, 1 Bull Terrier (6,25%), 1 English Setter (6,25%), 1 Pastor Alemão (6,25%) e 1 Teckel (6,25%). Os gatos de raça Europeu Comum constituíram a maior parte da população estudada (n=25; 89,3%), tendo sido ainda alvo do estudo gatos de raça Siamesa (n=3; 10,7%).

Tabela 1- Caracterização demográfica dos cães (n=16).

Características	Cães (n.º; %)
Género	
Macho	12 (75,0%)
Fêmea	4 (25,0%)
Idade	
Jovem (inferior a 1 ano)	9 (56,3%)
Adulto (1-8 anos)	7 (43,8%)
Idoso (superior a 8 anos)	0 (0,0%)
Raça	
Bull Terrier	1 (6,25%)
English Setter	1 (6,25%)
Pastor Alemão	1 (6,25%)
Pinscher Miniatura	3 (18,75%)

SRD	9 (56,25%)
Teckel	1 (6,25%)

Tabela 2-Caracterização demográfica dos gatos (n=28).

Características	Gatos (n.º; %)
Gênero	
Macho	17 (60,7%)
Fêmea	11 (39,3%)
Idade	
Jovem (inferior a 1 ano)	9 (32,1%)
Adulto (1-8 anos)	16 (57,1%)
Idoso (superior a 8 anos)	3 (10,7%)
Raça	
Europeu Comum	25 (89,3%)
Siamês	3 (10,7%)

9.1.Diagnóstico Rápido por Testes Rápidos

Durante o período de estágio foram efetuados, na clínica, 42 testes rápidos (SNAP®) aos 44 animais em estudo, para 2 agentes infecciosos em gatos (FeLV e FIV) e 3 relativamente a cães, aos quais se suspeitou em termos clínicos a presença das doenças infecciosas parvovirose, leptospirose e leishmaniose.

9.1.1 Resultados obtidos no diagnóstico de FIV e FeLV

Os 28 gatos deste estudo foram todos rastreados à infeção por FIV/FeLV utilizando o mesmo teste rápido SNAP® FIV/FeLV Combo. Deste animais 20 (71,4%) apresentavam sinais clínicos e 8 (28,6%) não apresentavam sinais clínicos.

Na Tabela 3 apresentam-se a frequência dos sinais clínicos apresentados por 20 gatos. Os sinais clínicos mais frequentemente observados neste estudo foram as feridas causadas principalmente por mordeduras, arranhões de outros gatos (35,0%), anemia (25,0%), anorexia (25,0%), prostração (25,0%), perda de peso (25,0%), desidratação (20,0%), febre (15,0%),

conjuntivite (10,0%), panleucopenia (5,0%), IRC (5,0%), sinais respiratórios crônicos (5,0%).

Tabela 3-Frequência dos sinais clínicos dos cães testados ao teste rápido para a FIV/FeLV (n=20).

Presença de sinais clínicos nos gatos testados para FIV/FeLV	n.º; %
Feridas (mordeduras, arranhões de outros gatos)	7 (35,0%)
Anemia	5 (25,0%)
Anorexia	5 (25,0%)
Letargia/Prostração	5 (25,0%)
Perda de peso	5 (25,0%)
Desidratação	4 (20,0%)
Febre	3 (15,0%)
Conjuntivite	2 (10,0%)
Panleucopenia	1 (5,0%)
IRC	1(5,0%)
Sinais respiratórios crônicos	1 (5,0%)

Dos 28 gatos, 46,4% foram positivos ao teste para FIV e 28,6% foram positivos ao teste para FeLV. Dos animais que não apresentavam sinais clínicos, 4 gatos foram positivos a FIV e 2 gatos foram positivos a FeLV.

Tabela 4- Resultados para o teste rápido SNAP® FIV/FeLV Combo.

Resultados Teste SNAP® FIV/FeLV Combo	n.º; %
FIV	
Negativo	15 (53,6%)
Positivo	13 (46,4%)
FeLV	
Negativo	20 (71,4%)
Positivo	8 (28,6%)

Na Tabela 5 pode-se observar os resultados combinados para o teste rápido SNAP® FIV/FeLV Combo. Tiveram resultados positivos a ambos os testes, 21,4% dos gatos e, 46,4% gatos foram negativos a ambos os testes.

Tabela 5-Resultados combinados para o teste rápido SNAP® FIV/FeLV Combo

FIV	FeLV		
	Negativo	Positivo	
Negativo	13 (46,4%)	2 (7,2%)	15 (53,6%)
Positivo	7 (25,0%)	6 (21,4%)	13 (46,4%)
Total	20 (71,4%)	8 (28,6%)	28 (100%)

9.1.2. Resultados obtidos no diagnóstico de Parvovirose

Cerca de 13 (68,8%) dos 16 cães em estudo apresentaram sinais clínicos que levaram à suspeita da parvovirose. Destes 13 cães, 9 (69,2%) eram jovens e 4 (30,8%) eram adultos. Quanto ao gênero, 9 (69,2%) eram machos e 4 (30,8%) eram fêmeas. Quanto à raça, 8 (61,5%) eram SRD, 3 (23,1%) eram Pinscher Miniatura, 1 (7,7%) era Pastor Alemão e 1 (7,7%) era Bull Terrier. Na Tabela 6 apresentam-se a frequência dos sinais clínicos apresentados por estes 13 cães. Os sinais clínicos mais frequentemente observados neste estudo foram a presença de diarreia sanguinolenta e anorexia (76,9% para ambos), seguido de letargia/prostração (69,2%), febre e vômitos (53,8% para ambos), perda de peso (23,1%) e desidratação (15,4%). É de referir que 2 animais foram considerados positivos, apenas pela associação clínico-epidemiológica sem o uso do teste, uma vez que apresentavam sinais clínicos compatíveis e moravam no mesmo lar de um animal positivo. Após um dos cães ter apresentado um resultado positivo, os outros dois também foram considerados positivos.

Deste modo, 11 dos 13 cães que revelaram sinais clínicos foram submetidos ao teste SNAP® Parvo.

Tabela 6-Frequência dos sinais clínicos dos cães positivos ao parvovírus(n=13).

Presença de sinais clínicos nos cães testados para parvovirose	n.º; %
Diarreia sanguinolenta	10 (76,9%)
Anorexia	10 (76,9%)
Letargia/Prostração	9 (69,2%)
Febre	7 (53,8%)
Vômitos	7 (53,8%)
Perda de peso	3 (23,1%)
Desidratação	2 (15,4%)

Os resultados para o teste rápido SNAP encontram-se na Tabela 7. Dos 11 cães sujeitos ao Teste SNAP® Parvovirose, 76,9% tiveram resultado positivo e 23,1% tiveram resultado negativo.

Tabela 7-Resultados para o teste rápido SNAP® Parvovirose.

Resultados Teste SNAP® Parvovirose	n.º;%
Negativo	3 (27,3%)
Positivo	8 (72,7%)

Na Tabela 8 encontra-se a distribuição dos sinais clínicos dos 13 cães em estudo. Onze cães não se encontravam vacinados, à exceção do cão n.º 5 que fez a última vacinação há 2 anos e o cão n.º 7, que tinha as vacinas em dia e acabou por morrer devido à parvovirose.

Tabela 8-Distribuição dos sinais clínicos dos 13 cães pelo resultado para o teste rápido SNAP® Parvovirose.

Cão n.º	Sinais clínicos							Resultados
	Diarreia sanguinolenta	Anorexia	Letargia	Febre	Vómitos	Perda de peso	Desidratação	Teste SNAP®
1	X	X	X	X				Positivo
2	X	X	X	X	X			Positivo
3	X	X	X		X			Positivo
4	X	X	X	X	X			Positivo
5	X	X	X	X	X			Negativo**
6	X	X	X	X	X			Positivo
7	X	X	X	X	X			Positivo*
8	X	X				X		Positivo
9	X						X	Positivo
10			X			X		Positivo
11	X	X				X		Negativo
12				X	X			Positivo
13		X	X		X		X	Negativo

** Última vacinação há 2 anos

*Animal vacinado; Morreu

Em seguida apresenta-se a concordância entre o sinal clínico mais característico de parvovirose, a diarreia sanguinolenta e o resultado ao teste SNAP® parvovirose (Tabela 9). Pela análise da Tabela 8 e da Tabela 9 é possível constatar que a diarreia sanguinolenta

parece ser um sinal clínico muito concordante com o resultado positivo ao teste rápido. O conjunto de sinais clínicos diarreia sanguinolenta, anorexia, letargia, febre e vômitos foram também concordantes com um resultado positivo. De salientar que 2 cães positivos ao SNAP® teste apresentaram sinais clínicos muito inespecíficos.

Tabela 9-Concordância entre a presença de diarreia sanguinolenta e o resultado ao teste SNAP® parvovirose

Resultados Teste SNAP® Parvovirose	Presença de diarreia sanguinolenta	Ausência de diarreia sanguinolenta	Total
Negativo	2	1	3
Positivo	8	2	10
Total	10	3	13

9.1.3. Resultados obtidos no diagnóstico de Leptospirose

Cerca de 2 (12,5%) cães dos 16 cães em estudo apresentaram sinais clínicos que levaram à suspeita da leptospirose tendo sido submetidos ao Teste Rápido Leptospirose SNAP® Lepto para a confirmação do diagnóstico. Os 2 animais eram machos, adultos, um de raça SRD e outro de raça Teckel. O cão de raça SRD deu resultado positivo ao teste rápido. Este cão tinha sido vacinado há mais de 3 anos. O cão de raça Teckel deu resultado negativo. Este animal apresentava as vacinas atualizadas e também realizou um teste de PCR para a pesquisa de *Leptospira* que também apresentou um resultado negativo.

Na Tabela 10 apresentam-se os sinais clínicos pelo resultado do teste rápido de *Leptospira* SNAP® Lepto:

Tabela 1-Distribuição dos sinais clínicos dos 2 cães pelo resultado para o teste rápido SNAP® Lepto.

Cão n.º	Sinais clínicos							Resultados
	Poliúria/polidipsia	Desidratação	Vômitos	Febre	Alterações hepáticas	Alterações renais	Trombocitopenia	Teste SNAP® Lepto
1	X	X	X	X	X	X		Positivo
2				X	X	X	X	Negativo

9.1.4. Resultados obtidos no diagnóstico de Leishmaniose

Um cão (6,25%) dos 16 cães em estudo apresentaram sinais clínicos que levaram à suspeita de leishmaniose tendo sido submetidos ao Teste Rápido SNAP[®] Leishmania para a confirmação do diagnóstico. O cão era um macho, adulto, de raça English Setter, não vacinado. Os sinais clínicos compatíveis incluíam úlceras cutâneas, perda de pelo, linfadenopatia generalizada, anorexia, unhas quebradiças e encurvadas.

10. Discussão

Em medicina veterinária, as doenças infecciosas podem apresentar sinais clínicos semelhantes, o que dificulta o diagnóstico diferencial na ausência de diagnóstico laboratorial. O diagnóstico definitivo de qualquer doença infecciosa requer a detecção direta ou indireta e/ou a identificação do agente, que pode ser encontrado em tecidos ou fluidos infetados pelo agente. As técnicas clássicas de laboratório são laboriosas e dispendiosas. Embora sejam muito úteis na identificação e caracterização de microrganismos, estas técnicas não são exequíveis na prática clínica de rotina. O uso de testes rápidos baseados em princípios imunoenzimáticos tem vindo a aumentar na prática clínica. Neste trabalho efetuou-se uma análise sobre a utilização de testes rápidos no diagnóstico de doenças.

O Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) é dos agentes infecciosos mais prevalentes em gatos, principalmente transmitido a partir de mordeduras ou feridas (Hartman, 2012). Os gatos machos adultos podem ser bastante territoriais e agressivos em relação a outros gatos, tornando-os mais suscetíveis a ficarem infetados com FIV comparativamente a fêmeas ou gatos jovens. Considerando que os comportamentos agressivos entre gatos são o meio predominante de transmissão, e que a maioria dos gatos tinha acesso ao exterior, é normal que o número de machos adultos infetados se destaque (Scherk *et al.*, 2013a). No presente estudo que utilizou uma amostra de conveniência, dos 13 gatos positivos, 10 eram machos e apenas 3 eram fêmeas. Apesar do número de machos testados ser consideravelmente superior ao número de fêmeas, em termos proporcionais, a ocorrência do FIV em machos foi superior quando comparada em fêmeas. Alguns dos gatos foram testados por apresentarem mordeduras ou feridas, e na maioria destes casos, revelavam um historial de várias lutas com outros gatos não pertencentes ao mesmo lar/selvagens. Porém, outros gatos que não foram testados especificamente por apresentarem estas lesões, em princípio apresentaram um resultado positivo também devido a mordeduras ou feridas provocadas por outros gatos, considerando que os FIV-positivos são adultos e com uma idade média de 4 anos.

Em relação ao FeLV, 8 (28%) dos animais testados apresentaram um resultado positivo, em que 3 eram fêmeas e 5 eram machos. O FeLV, assim como o FIV, também é um dos agentes infecciosos mais comuns em gatos. No entanto, este vírus é mais contagioso. Para além de mordeduras ou feridas, é principalmente transmitido através de “grooming”, comedouros, bebedouros e caixas de areia (Lutz *et al.*, 2009). Dada a natureza de transmissão do vírus, ao contrário do FIV, os gatos machos adultos não apresentam um risco superior

considerável em contrair o vírus. Apesar dos comportamentos territoriais poderem aumentar o risco de infecção, o contacto próximo com outros gatos infetados é a principal causa de infecção, não necessitando de mordeduras ou feridas para ser transmitido. Dos gatos que apresentaram um resultado positivo ao FeLV, a proporção de machos infetados foi praticamente idêntica à de fêmeas infetadas. É importante realçar que nenhum dos gatos infetados com FeLV se encontravam vacinados, o que é demonstrativo da importância da vacina, especialmente considerando que a maioria dos gatos tem acesso ao exterior. Porém muitos dos gatos eram de rua (43%), sendo expectável que dos animais testados, a percentagem de animais não vacinados seja superior.

Dado que a maioria dos animais testados apresentava algum tipo de sintomatologia e que a amostra de testes foi de apenas 28, é de esperar que a percentagem possa ter um valor elevado, não refletindo a verdadeira prevalência deste vírus.

O teste rápido utilizado para FeLV/FIV SNAP® Combo Plus, usado nesta dissertação foi estudado anteriormente tendo revelado valores elevados de sensibilidade e de especificidade. Num estudo efetuado por Hartmann *et al.* (2007) com 535 amostras revelou 100% de sensibilidade e 99,6% de especificidade em relação ao FIV e em 528 amostras revelou 92,3% de sensibilidade e 97,3% de especificidade, relativamente ao FeLV. Nesse estudo os resultados de FIV do teste SNAP® foram comparados com o Western Blot e os de FeLV com o isolamento viral. Os valores negativos foram comparados com ambos os métodos (Hartmann *et al.*, 2007). Num outro estudo com 46 amostras, SNAP® Combo Plus apresentou uma sensibilidade de 91,5% e uma especificidade de 100% na deteção de FeLV quando comparado com a PCR (Krecic *et al.*, 2018). Uma investigação efetuada em 239 gatos, verificou-se uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 97% na pesquisa de FIV, quando comparados a um teste comercialmente disponível de PCR (Westman *et al.*, 2015). Num estudo realizado pela IDEXX, apresentou uma sensibilidade de 98,6% e especificidade de 9,2% e uma sensibilidade de 93,5% e uma especificidade de 100% para o FIV e o FeLV, respetivamente, em 237 amostras (IDEXX).

Deste modo, e atendendo aos valores observados em estudos anteriores é expectável que não tenham ocorrido falsos negativos ou falsos positivos na deteção do FIV. No entanto, existe a possibilidade que tenham ocorrido falsos negativos e, em menor grau, falsos positivos, na deteção de FeLV.

Nesta dissertação, também se estudou a utilização de kits rápidos relativamente à parvovirose. A parvovirose é uma doença infecciosa altamente contagiosa e transmite-se

principalmente através de fezes contaminadas no ambiente (Khatri *et al.*, 2017). Considerando que na sua grande maioria, os cães testados têm acesso ao exterior e são frequentemente passeados, os mesmos podem entrar em contacto com o vírus. Quanto aos 11 animais testados neste trabalho a partir do SNAP® Parvo para a detecção de Parvovírus, 7 (64%) apresentaram um resultado positivo, 3 (27%) apresentaram um resultado negativo e um animal apresentou inicialmente um resultado negativo e posteriormente um resultado positivo. Um dos animais testados obteve um resultado positivo após ter apresentado sintomatologia compatível com parvovirose. Um dia depois, dois dos cães que moravam no mesmo lar começaram a apresentar sinais clínicos idênticos e, por isso, não foram testados, tendo sido considerados positivos (associação clínico-epidemiológica). Dada a natureza infecciosa deste vírus é muito provável que ambos estariam infetados, deste modo, um teste serviu para diagnosticar três cães. Também ocorreu um outro caso em que um cachorro de apenas um mês, com sinais clínicos semelhantes aos da infecção por parvovírus, apresentou um resultado negativo no dia em que começou a apresentar sinais clínicos. Passados dois dias, uma vez que os sinais clínicos se mantiveram, foi realizado outro teste, no entanto, apresentou um resultado positivo. Geralmente, o início da excreção viral coincide com o início da sintomatologia, mas pode ocorrer apenas passados uns dias após o começo dos sinais clínicos (Decaro *et al.*, 2005). Também pode ter ocorrido um falso negativo no primeiro teste, que pode dever-se a uma carga viral baixa nas fezes no momento da sua realização.

Relativamente aos casos positivos observados nesta dissertação, apenas um estava corretamente vacinado, o que é demonstrativo da falta de imunidade nos cães testados. Porém, deve-se realçar que dos casos positivos, um dos cães foi reinfectado 1 ano após ter sido infetado pelo parvovírus e um dos cães era vacinado, denotando-se uma falha no desenvolvimento de imunidade em ambos estes casos. Um dos animais não se encontrava vacinado, dado que apenas tinha um mês de idade.

Num estudo realizado com 112 amostras, o teste SNAP® Parvo apresentou uma sensibilidade de 77,2% e uma especificidade de 100% (Silva *et al.*, 2013). Outro estudo foi realizado para estudar a sensibilidade relativamente a vários subtipos, em que o teste SNAP® foi capaz de detetar 80,4% do tipo 2a, 78,0% do tipo 2b e 77,0% do tipo 2c (Decaro *et al.*, 2010). Ambos os estudos acima mencionados foram comparados com resultados obtidos a partir de PCR. Houve também um estudo, em que 100 cães (40 sem sinais clínicos, 50 com diarreia hemorrágica aguda e 10 com diarreia crónica) foram analisados e este teste

demonstrou 50% de sensibilidade e 97,8% de especificidade e 18,4% e 100% de especificidade quando comparados com a microscopia eletrónica e a PCR, respetivamente (Schmitz, *et al.*, 2009).

Uma vez que todos os cães foram testados, não só por apresentarem sinais clínicos compatíveis com parvovirose, mas também por muitos deles não se encontrarem vacinados, a probabilidade de existirem casos verdadeiro positivos é maior. Considerando os dados recolhidos em relação à sua especificidade e sensibilidade, em princípio, dos 11 testes realizados, consideramos que, com elevada probabilidade, não houve falsos positivos, mas poderão ter ocorrido falsos negativos. Para um diagnóstico mais preciso com o SNAP® Parvo, cães suspeitos que apresentem um resultado negativo, deve-se repetir o teste.

Quanto ao diagnóstico de leptospirose, apenas dois testes foram realizados e estudados nesta dissertação, para a deteção de *Leptospira*, sendo que um deles revelou-se positivo e o outro revelou-se negativo. Ambos os cães tinham acesso ao exterior e eram passeados regularmente, por isso, poderiam ter entrado em contacto com leptospiras presentes em urina ou água infetada, sendo estas as principais fontes de contaminação (Goldstein, 2010).

No caso do cão que apresentou um resultado positivo, o mesmo não se encontrava vacinado há vários anos e era passeado em zonas de campo extensas, o que promoveu o risco de infeção. No entanto, o cão que apresentou um resultado negativo, encontrava-se vacinado. Este caso revelou-se peculiar, dado que o animal apresentava sintomatologia, alterações bioquímicas e imagens ecográficas sugestivas de leptospirose. Deste modo, para se confirmar a deteção de *Leptospira*, foi posteriormente realizado uma PCR que se revelou como negativa.

Em estudos anteriores relativos à utilização do teste SNAP® Lepto, o mesmo apresentou uma sensibilidade de 79,2% em 259 amostras, quando comparado com o teste de aglutinação microscópica (MAT). A sua sensibilidade correlacionava-se com o grau de titulação, tendo apresentado um mínimo de 55% e quando a titulação já era bastante elevada (1:25600), atingia os 100% (Curtis *et al.*, 2015). Noutro estudo o teste SNAP® Lepto apresentou uma média de 80% de sensibilidade na deteção de *Leptospira* em 22 casos confirmados. Porém, nestes 22 casos, quando a titulação se encontrava abaixo dos 1:800, apenas um teste SNAP® foi positivo comparativamente aos 4 que foram positivos a PCR. É mencionado que os cães provavelmente ainda se encontrariam numa fase aguda da doença como razão de apenas se ter detetado um animal positivo (Winzelberg *et al.*, 2015).

Num estudo experimental, a 32 cães, foram inoculados diversos serovares patogénicos de *Leptospira*. Os mesmos foram divididos em 4 grupos, cada grupo com 8 cães e um serovar patogénico diferente por grupo, durante 14 dias. No dia 10 pós-inoculação, o teste SNAP® apresentou o resultado com maior sensibilidade, de apenas 14,3%. No entanto, o MAT e um teste imunocromatográfico que deteta IgM *Leptospira*-específicas, apresentaram no dia 10, uma sensibilidade mínima de 87,5% e 100%, respetivamente. Segundo este estudo o teste SNAP® não detetou nenhum animal nos primeiros sete dias pós inoculação, porém o MAT e o teste imunocromatográfico apresentaram uma sensibilidade mínima de 25% e 50%, respetivamente, no dia 7. É mencionado que a razão pela qual o teste SNAP® apresentou uma sensibilidade baixa, provavelmente deveu-se ao facto de a pesquisa de leptospiros ter sido apenas realizada nos primeiros 14 dias, durante a fase aguda (Lizer *et al.*, 2017). O SNAP Lepto® deteta anticorpos específicos do LipL32, a lipoproteína externa mais abundante que é expressada em leptospiros patogénicas. Embora o LipL32 tenha o potencial de se ligar a anticorpos específicos às IgM e IgG, a sua afinidade é predominantemente IgG. A produção de anticorpos específicos de *Leptospira* durante a fase aguda da doença é principalmente do tipo IgM, enquanto os anticorpos de classe IgG são menos prevalentes. As IgM aumentam a partir da primeira semana e atingem o pico em duas semanas após a infeção, enquanto os títulos de IgG não aparecem até à segunda e terceira semana e atingem o seu pico, um mês pós-infeção (Flannery *et al.*, 2001; Lizer *et al.*, 2017).

Considerando os dados dos diversos estudos relativamente à sensibilidade do teste SNAP®, o mesmo deve ser realizado em conjunto com a PCR ou o MAT, para um diagnóstico mais preciso. Caso apresente um resultado positivo, em princípio o animal está infetado. No entanto, em resultados negativos, deve-se considerar a possibilidade de os mesmos serem falsos negativos. Contudo, em termos de prática clínica uma associação entre os sinais clínicos e um resultado positivo ao teste rápido são considerados suficientes para instituir a terapia ao animal, mesmo porque esta é sintomática e não dirigida ao agente etiológico.

Nesta dissertação, apenas se apresentou resultados de um teste SNAP® Leishmania que se demonstrou positivo. Os sinais clínicos da leishmaniose são altamente inespecíficos (Baneth *et al.*, 2008), no entanto, uma vez que o animal apresentava um quadro clínico compatível com o da leishmaniose, o teste foi realizado. Segundo um estudo realizado com 65 cães positivos e 44 cães negativos o SNAP® Leishmania, apresentou uma sensibilidade de 89,2% e uma especificidade de 100%, comparativamente aos resultados obtidos a partir de

imunofluorescência indireta (Athanasίου *et al.*, 2014). Num outro estudo apresentou uma sensibilidade de 96,3% e uma especificidade de 100% em 186 amostras, quando comparado com o método de detecção parasitológica (Souza *et al.*, 2019). Outra investigação revelou a sensibilidade de 76,8% e uma especificidade de 100% em 189 amostras, quando comparado com a imunofluorescência indireta (Ribeiro *et al.*, 2019).

De acordo com os estudos anteriormente referidos e tendo em consideração as especificidades observadas, provavelmente, será raro em clínica, aparecerem resultados falsos positivos, principalmente se se associar estes resultados a uma análise epidemiológica de fatores de risco presentes na região de proveniência do animal.

11. Conclusão e Considerações Finais

Não há nenhum método de diagnóstico ideal na detecção de qualquer agente infeccioso, sendo que frequentemente se recorre à combinação de diferentes métodos e técnicas. O melhor método de diagnóstico depende do agente infeccioso e da progressão e fase da infecção ou doença, mas também de fatores como a facilidade na sua execução, do seu custo, a urgência da sua realização, entre outros. Os testes rápidos são cada vez mais utilizados na prática clínica. Embora tenha sido utilizada uma amostra de conveniência, os resultados desse trabalho contribuem para a fiabilidade da utilização de testes rápidos no diagnóstico de doenças infecciosas. De um modo geral, os testes parecem apresentar uma boa sensibilidade e uma boa especificidade no diagnóstico de várias doenças, são fáceis de executar e são relativamente baratos e que em combinação com a suspeita clínico-epidemiológica contribuem para um diagnóstico e para a instituição da terapêutica.

A partir dos dados analisados na presente dissertação, denota-se que a grande maioria dos animais que foram testados e apresentaram um resultado positivo não se encontravam vacinados. No Hospital Veterinário de Gaia (HVG), ao longo dos quatro meses de estágio, verificaram-se vários casos de animais indevidamente vacinados, o que se devia maioritariamente a contingências socioeconómicas. Deste modo, muitas das infecções observadas nos animais estudados, em princípio, poderiam ter sido evitadas. No contexto de pandemia que vivemos, é expectável que estas doenças infecciosas venham a aumentar num período de tempo relativamente curto.

Outro aspeto relevante é que todos os testes rápidos que foram utilizados eram da mesma marca SNAP®. Este dispositivo, segundo estudos, apresenta uma precisão elevada para a maioria das doenças que foram descritas neste trabalho. Porém, devido a questões monetárias, nem sempre foi possível a sua realização em casos suspeitos. Apesar de não ter um custo elevado, após a realização de exames complementares como o hemograma e a bioquímica sérica, o teste SNAP®, muitas das vezes, não foi possível de ser executado. Também é importante compreender que um teste rápido não é o mais fiável para o diagnóstico de uma doença infecciosa, por isso, em casos suspeitos, os animais que apresentarem um resultado negativo, devem repetir o teste ou serem considerados possivelmente positivos. No HVG, animais que pudessem estar infetados com uma doença infecciosa transmissível, mesmo apresentando um resultado negativo, eram considerados como infecciosos, de modo a prevenir a transmissão do agente infeccioso para outros animais.

Em suma, o diagnóstico de um agente infeccioso é importante para se proceder a um manejo correto do animal. No entanto, tão importante como o diagnóstico ou o tratamento de uma doença infecciosa é a sua prevenção e o controle da infecção.

12. Bibliografia

Abrams-Ogg, A. (2012). Neutropenia. In: Day MJ, Kohn B, editors. *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*. 2nd ed. Gloucester: BSAVA: pp. 117–125.

Al-Bayati, H.A., Odisho M., Majeed H.A, (2010). Detection of canine parvovirus in Iraq by using rapid antigen test kit and haemagglutination-inhibition test. *Al-Anbar J. Vet. Sci.*, 3 (2): 17-23.

Anastasio, J.D., Fletcher, D.J., Rozanski, E.A. (2014). Crystalloid fluid therapy. In: Bonagura JD, Twedt DC, editors. *Kirk's Current Veterinary Therapy XV*. 15th ed. St Louis, MO: Elsevier: pp.2–7.

Arjona, A., Barquero, N., Doménech, A., Tejerizo, G., Collado, V.M., Toural, C., Martín, D., & Gomez-Lucia, E. (2007). Evaluation of a novel nested PCR for the routine diagnosis of feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV). *J. Feline Med. Surg.*, 9: 14-22.

Athanasiou, L. V., Petanides, T. A., Chatzis, M. K., Kasabalis, D., Apostolidis, K. N., & Saridomichelakis, M. N. (2014). Comparison of two commercial rapid in-clinic serological tests for detection of antibodies against *Leishmania* spp. in dogs. *J. Vet. Diag. Invest.*, 26(2): 286–290.

Gad, Baneth., Alexander, F. Koutinas., Laia, Solano-Gallego., Patrick, Bourdeau., Lluís Ferrer (2008). Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. , 24(7): 324–330.

Bienzle, D., Reggeti, F., Wen, X., Little, S., Hobson, J., & Kruth, S. (2004). The variability of serological and molecular diagnosis of feline immunodeficiency virus infection.

Biezus, G., Machado, G., Ferian, P.E., Costa, U.M., Pereira, L., Withoef, J.A., Casagrande, R. A. (2019). Prevalence of and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) in cats of the state of Santa Catarina, Brazil. *Comp. Immunol. Microb. Infect. Dis.*, 63: 17–21.

Biezus, G., Machado, G., Ferian, P. E., da Costa, U. M., Pereira, L. H. H. da S., Withoef, J. A., Casagrande, R.A. (2019). Prevalence of and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) in cats of the state of Santa Catarina, Brazil. *Comp. Immunol. Microb. Infect. Dis.*, 63: 17–21.

Cavalli, A., Bozzo, G., Decaro, N., Tinelli, A., Aliberti, A., Buonavoglia, D. (2001). Characterization of a canine parvovirus strain isolated from an adult dog. *New Microbiol.*, 24(3): 239–242.

Castro, T.X., Uchoa, C.A., De Albuquerque, M.C., et al. (2007). Canine parvovirus (CPV) and intestinal parasites: laboratorial diagnosis and clinical signs from puppies with gastroenteritis. *Int. J. Appl. Res. Vet. Med.*, 5: 72-76

Choi, J.W., Kim, Y.K., Lee, I.H., Min, J., & Lee, W.H. (2001). Optical organophosphorus biosensor consisting of acetylcholinesterase/viologen hetero Langmuir–Blodgett film. *Biosensors and Bioelectronics*.

Collado, V.M., Gómez-Lucía, E., Tejerizo, G., Miró, G., Escolar, E., Martín, S., & Doménech, A. (2007). Effect of type I interferons on the expression of feline leukaemia virus. *Vet. Microb.*, 123: 180-186.8

Cooper, B.J., Carmichael, L.E., Appel M.J. (1979). Canine viral enteritis. II. Morphologic lesions in naturally occurring parvovirus infection. *Cornell Vet*, 69:134.

Curtis, K., Foster, P., Smith, P., Monn, M., Stillman, B., Chandrashekar, R., et al. (2015). Performance of a recombinant Lip32 based rapid in-clinic ELISA (SNAP Lepto) for the detection of antibodies against leptospira in dogs. *International J. App. Res. Vet. Med.*, 13(3):182.

Curtis, K., Foster, P., Smith, P., Monn, M., Stillman, B., Chandrashekar, R., Goldstein, R. (2015). Performance of a Recombinant LipL32 Based Rapid In-clinic ELISA (SNAP® Lepto) for the detection of antibodies against *Leptospira* in dogs.

Decaro, N.; Desario, C.; Campolo, M.; Elia, G.; Martella, V.; Ricci, D.; Lorusso, E.; Buonavoglia, C. (2005). Clinical and Virological Findings in Pups Naturally Infected by Canine Parvovirus Type 2 Glu-426 Mutant. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 17(2): 133–138.

Decaro, N., Elia, G., Martella, V., Desario, C., Campolo, M., Di Trani, L., Tarsitano, E., Tempesta, M., Buonavoglia, C. (2005). A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. , 105(1): 19–28.

Decaro, Nicola, Buonavoglia, D., Desario, C., Amorisco, F., Colaianni, M. L., Parisi, A., Buonavoglia, C. (2010). Characterisation of canine parvovirus strains isolated from cats with feline panleukopenia. *Research in Veterinary Science*, 89(2): 275–278.

Decaro, N., Desario, C., Billi, M., Mari, V., Elia, G., Cavalli, A., Martella, V., Buonavoglia, C. (2009). Western European epidemiological survey for parvovirus and coronavirus infections in dogs. *J. Vet.*, 187: 195-199.

Decaro, N., Martella, V., Elia, G., Desario, C., Campolo, M., Lorusso, E., Colaianni, M., Lorusso, A., Buonavoglia, C. (2007b). Tissue distribution of the antigenic variants of canine parvovirus type 2 in dogs. *Vet. Microb.*, 121:39-44.

Decaro, N., Desario, C., Addie, D.D., Martella, V., Vieira, M.J., Elia, G., Thiry, E. (2007). The study molecular of epidemiology of canine parvovirus, Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, 13(8): 12–14.

Decaro, N., & Buonavoglia, C. (2012). Canine parvovirus- A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet. Microb.*, 155 (1): 1-12.

Desario, C., Decaro, N., Campolo, M., et al. (2005). Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus? *J. Virol. Methods*, 121: 179–185.

Duarte, A., Castro, I., Pereira da Fonseca, I. M., Almeida, V., Madeira de Carvalho, L. M., Meireles, J., Fazendeiro, M., Tavares, L. & Vaz, Y. (2010). Survey of infectious and parasitic diseases in stray cats at the Lisbon Metropolitan Area, Portugal. *J. Feline Med. Surg.* 12(6): 441–446.

Duarte, A., Gil, S., Leal, R., & Tavares, L. (2012). Vírus da imunodeficiência felina (VIF): da etiologia às novas abordagens terapêuticas. *Medicina Veterinária*, 66, 37-43.

Dunham, S.P. (2006). Lessons from the cat: development of vaccines against lentiviruses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 112: 67-77.

Dunham, S. P., & Graham, E. (2008). Retroviral Infections of Small Animals. *Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.*, 38(4): 879–901.

Ellis, W.A. (2014). Animal Leptospirosis. *Leptospira and Leptospirosis*, 99–137.

Ettinger, S., & Feldman, E. (2010). *Textbook of Veterinary Internal Medicine (7ª Edição ed.)*. St. Louis, USA: Elsevier.

European Advisory Board on Cat Diseases [ABCD]. (2012a). Guidelines: Feline Immunodeficiency.

Evermann, J.F., & Kennedy, M.A. (2011). Viral Infections. *Small Animal Pediatrics*: 119–129.

Fenner's *Veterinary Virology*, Fifth Edition (2017).

Ferroglio, E., Centaro, E., Mignone, W., Trisciuglio, A. (2007). Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot. *Vet. Parasitol*, 144 (1-2):162-6.

Flannery, B., Costa, D., Carvalho, F. P., Guerreiro, H., Matsunaga, J., Da Silva, E. D., Ko, A.I. (2001). Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked

immunosorbent assays for the serodiagnosis of Leptospirosis. *J. Clin. Microb.*, 39(9): 3303–3310.

Gleich, S. E., Krieger, S., & Hartmann, K. (2009). Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. *J. of Feline Med. Surg.*, 11(12): 985–992.

Gleich, S., & Hartmann, K. (2009). Hematology and serum biochemistry of feline immunodeficiency virus-infected and feline leukemia virus-infected cats. *J. Vet. Intern. Med. / American College of Veterinary Internal Medicine*, 23(3), 552–8.

Goldstein, R. E. (2010). Canine Leptospirosis. *Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.*, 40(6): 1091–1101.

Gomes-Keller, M., Gonczi, E., & Tandon, R. (2006). Detection of feline leukemia virus RNA in saliva from naturally infected cats and correlation of PCR results with those of current diagnostic methods. *J. Clin. Microbiol.*, 44, 916-922.

Greene, E & Decaro, N. (2012). Canine viral enteritis. In: Greene CE, editor. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4th ed. St Louis, MO: Elsevier Saunders: 67–80.

Hartmann, K. (1998). Feline immunodeficiency virus infection: an overview. *Vet. J.*, 155(2): 123–137.

Hartmann, K. (2012). Clinical Aspects of Feline Retroviruses: A Review. *Viruses*, 4(11): 2684–2710.

Hartmann, K., Griessmayr, P., Schulz, B., Greene, C., Vidyashankar, A., Jarrett, O., & Egberink, H. (2007). Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection. *J. Feline Med. & Surg.*, 9(6): 439–445.

Hartmann, K. & Hofmann-Lehmann, R. (2020). What's New in Feline Leukemia Virus infection. *Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.*

Hoelzer, K. & Parrish, C.R. (2010). The emergence of parvoviruses of carnivores. *Vet. Res.*, 41(6), 39.

Hofmann-Lehmann, R., Tandon, R., Boretti, F.S., Meli, M.L., Willi, B., Cattori, V., GomesKeller, M.A., Ossent, P., Golder, M.C., Flynn, J.N., & Lutz, H. (2006). Reassessment of feline leukaemia virus (FeLV) vaccines with novel sensitive molecular assays. *Vaccine*. 24, 1087-1094.

Hofmann-Lehmann, R., Valentino Cattori., Ravi Tandon., Felicitas, S. Boretti., Marina, L. Meli., Barbara, Riond., Andrea, C. Pepin., Barbara, Willi., Pete, Ossent., Hans, Lutz.

(2007). Vaccination against the feline leukaemia virus: Outcome and response categories and long-term follow-up. , 25(30), 0–5539.

Hosie, M. J., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Lloret, A. (2009). Feline Immunodeficiency: ABCD Guidelines on Prevention and Management. *J. Feline Med. Surg.*, 11(7), 575

Houston, D.M., Ribble, C.S., & Head L.L. (1996). Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 208: 542–548.

Huitron-Resendiz, S., de Rozières, S., Sanchez-Alavez, M., Buhler, B., Lin, Y.-C., Lerner, D. L., Elder, J. H. (2004). Resolution and prevention of Feline Immunodeficiency Virus-induced neurological deficits by treatment with the protease inhibitor TL-3. *J. Virol.*, 78(9): 4525–4532.

IDEXX Laboratories Inc. Trust your results with ELISA technology 2015 [cited October 16, 2015].

Jakel, V., Cussler, K., Hanschmann, K.M., Truyen, U., König, M., Kamphuis, E., Duchow, K. (2012). Vaccination against Feline Panleukopenia: implications from a field study in kittens. *BMC Vet.Res.* 8:62.

Kann, R., Seddon, J., Kyaw-Tanner, M., Schoeman, J. P., Schoeman, T., & Meers, J. (2006). Phylogenetic analysis to define feline immunodeficiency virus subtypes in 31 domestic cats in South Africa. *J. South African Vet. Assoc.*, 77(3), p–108.

Khatri, R., Poonam, Mohan, H., Minakshi, & CS, P. (2017). Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis and Treatment of Canine Parvovirus Disease in Dogs: A Mini Review. *Journal of Vet. Sci. & Med.Diag.* 06(03). <https://doi.org/10.4172/2325-9590.1000233>

Kolenda-Roberts, H. (2008). Immunopathogenesis of feline immunodeficiency virus infection in the fetal and neonatal cat. *Frontiers in Bioscience*, 12(8-12), 3668.

Konstantinou, G.N (2017). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol. Biol*; 1592: 79-94.

Krecic, M. R., Velineni, S., Meeus, P., Fan, H., & Loenser, M. (2018). Diagnostic performances of two rapid tests for detection of feline leukemia virus antigen in sera of experimentally feline leukemia virus-infected cats. *J. Feline Med. Surg., Open Reports*, 4(1), 205511691774811.

Lacheretz, A., Laperrousaz, C., Kodjo, A., Brajon, N., Crevat, D., & Guillosoy, S. (2003). Diagnosis of canine parvovirus by rapid immunomigration on a membrane. *The Veterinary Record*, 152(2), 48–50.

- Lairmore, M. D. (2011). *Fenner's Veterinary Virology* (4^a ed.). San Diego, USA: Elsevier.
- Lappin, M. R. (2014). Polysystemic Viral Diseases. In Richard W. Nelson & C. G. Couto (Eds.), *Small Anim. Intern. Med.* (5TH ed., p. 1341). St. Louis, Missouri: Elsevier Mosby
- Levett, P.N. (2001). Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Reviews*, 14(2): 296–326.
- Levy, J.K., Crawford, P.C., & Slater, M.R. (2004). Effect of vaccination against feline immunodeficiency virus on results of serologic testing in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 225, 1558-1561
- Levy, J., Crawford, C., Hartmann, K., et al. (2008). American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines. *J. Feline Med. Surg.*, 10: 300-316.
- Levy, J.K., Crawford, P.C. & Tucker, S.J. (2017). Performance of 4 point-of-care screening tests for Feline Leukemia Virus and Feline Immunodeficiency Virus. *J. Vet. Intern. Med.*, 31(2): 521–526.
- Levy, J.K., Scott, H.M., Lachtara, J.L., & Crawford, P.C. (2006). Seroprevalence of Feline Leukemia Virus and Feline Immunodeficiency Virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 228(3): 371–376.
- Lieb, M.S. (1992). Acute vomiting: A diagnostic approach and symptomatic management. In: Kirk R.W., Bonagura J.D., editors. *Current Veterinary Therapy XI*. WB Saunders; Philadelphia: p. 583.
- Litster, Annette L. (2014). Transmission of feline immunodeficiency virus (FIV) among cohabiting cats in two cat rescue shelters. *J. Vet.*, 201(2), 184–188. doi:10.1016/j.tvjl.2014.02.030
- Little, S., Bienzle, D., Carioto, L., Chisholm, H., O'Brien, E., & Scherk, M. (2011). Feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus in Canada: recommendations for testing and management. *Can. Vet. J.*, 52, 849 – 855.
- Little, S., Levy, J., Hartmann, K., Hofmann-Lehmann, R., Hosie, M., Olah, G., & Denis, K. S. (2020). 2020 AAEP Feline Retrovirus Testing and Management Guidelines. *J. Feline Med. Surg.*, 22(1): 5–30.
- Lizer, J., Velineni, S., Weber, A., Krecic, M., & Meeus, P. (2017). Evaluation of 3 serological tests for early detection of *Leptospira* -specific antibodies in experimentally infected dogs. *J. Vet. Intern. Med.*, 32(1): 201–207.
- Lutz, H., Addie, D., Belak, S., et al (2009). Feline leukaemia. ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.*, 11: 565-574.

MacDonald, K., Levy, J., Tucker, S., & Crawford, P. (2004). Effects of passive transfer of immunity on results of diagnostic tests for antibodies against feline immunodeficiency virus in kittens born to vaccinated queens. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 225, 1554- 1557.

MacLachlan, N. J., Dubovi, E. J., Stephen W. Barthold, Richard A. Bowen, Ronald P. Hedrick, Donald P. Knowles, ... Swayne, D. F. (2011). Parvoviridae. In N. J. MacLachlan & E. J. Dubovi (Eds.), *Fenner's Veterinary Virology* (4TH ed., pp. 225–232). London: Elsevier Inc.

Mantione, N.L., Otto, C.M. (2005). Characterization of the use of antiemetic agents in dogs with parvoviral enteritis treated at a veterinary teaching hospital: 77 cases (1997-2000). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 227(11): 1787–1793.

Mathys, A., Mueller, R., Pedersen, C. & Theilen, H. (1983). Comparison of hemagglutination and competitive enzyme-linked immunosorbent assay procedures for detecting canine parvovirus in feces. *American J. of Vet. Res.*, 44(1): 152– 154.

McCaw, D.L., Hoskins, J.D. (2006). Canine viral enteritis. In: Green CE, editor. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4th ed. St Louis, MO: Saunders: 63–73.

Miranda, C., & Thompson, G. (2016). Canine parvovirus: The worldwide occurrence of antigenic variants. *J. of Gen. Virol.*, 97(9): 2043–2057.

Nandi, S., Kumar, M., Mohapatra, T.K., Ravishankar, C. (2013). Emergence of Canine Parvovirus - 2 variants and its impact on vaccination. *World App. Sci. J*, 23(10):1366-1376.

Neuerer, F.F., Horlacher, K., Truyen, U., Hartmann, K. (2008). Comparison of different in-house test systems to detect parvovirus in faeces of cats. *J. Feline Med. Surg.*, 10(3):247-51.

O'brien, S.J., Troyer, J.L., Brown, M.A., Johnson, W.E., Antunes, A., Roelke, M.E., Pecon-Slattery, J. (2012) "Emerging viruses in the Felidae: shifting paradigms" *Viruses*, 4 (2), 236-257.

O'Connor, T., Lawrence, J., Andersen, P., Leathers, V., Workman, E. (2013). Immunoassay applications in veterinary diagnostics. In: Wild D, editor. *The Immunoassay Handbook*. 4th ed. Great Britan: Elsevier; 2013. p. 623.

O'Kennedy, R., Byrne, M., O'Fagain, C., Berns, G. (1990). Experimental section: a review of enzyme-immunoassay and a description of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of immunoglobulin concentrations. *Biochem. Educ.*, 18:130–40.

- Pepin, A.C., Tandon, R., Cattori, V., Niederer, E., Riond, B., Willi, B., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2007). Cellular segregation of feline leukemia provirus and viral RNA in leukocyte subsets of long-term experimentally infected cats. *Virus Res.*, 127: 9- 16
- Peter F. Wright (1992). *Animal health: Global support for diagnosing infectious diseases*
- Picardeau, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 43(1): 1–9.
- Pinches, M.D., Helps, C.R., Gruffydd-Jones, T.J., Egan, K., Jarrett, O., & Tasker, S. (2007b). Diagnosis of feline leukaemia virus infection by semi-quantitative real-time polymerase chain reaction. *J. Feline Med. Surg.*, 9: 8-13
- Poulet, H., Minke, J., Pardo, M.C., Juillard, V., Nordgren, B., & Audonnet, J.C. (2007). Development and registration of recombinant veterinary vaccines – The example of the canarypox vector platform. *Vaccine*. 25, 5606-5612.
- Prittie J. (2004). Canine parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention. *J. Vet. Emerg. Crit. Care*, 2004; 14(3): 167–176.
- Ramsey, I.K., Tennant, B.J. (2010). “Sistema linfopoético e linforeticular ” BSAVA – *Manual de Doenças Infeciosas em Cães e Gatos*, 2ª Ed, Roca, 87 – 70.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Bateman, A. (2014). Using the MEROPS database for proteolytic enzymes and their inhibitors and substrates. *Curr. Protoc. Bioinform.*, 2014; 48: 1-25–33
- Ribeiro, V. M., Miranda, J.B., Marcelino, A.P., de Andrade, H.M., Reis, I.A., Cardoso, M.S., Paz, F. (2019). Performance of different serological tests in the diagnosis of natural infection by *Leishmania infantum* in dogs. *Vet.Parasitol.*, 274, 108920.
- Robinson, W., Shaw, S., Alexander, R., & Robertson, I. (1990). Feline Immunodeficiency Virus. *Aust. Vet. J.*, 67(8), 278–280.
- Rodrigues, B. & Molinari, B.L.D. (2018). Diagnóstico e tratamento de parvovirose canina: revisão de literatura. *Braz. J. of Surg. & Clin. Res. – BJSCR*, v.21, n.2, p.127-134, fev., 2018.
- Sahoo, P.R., Sethy, K., Mohapatra, S., Panda, D. (2016). Loop mediated isothermal amplification: An innovative gene amplification technique for animal diseases. *Vet World*. 2016; 9(5): 465- 469.
- Schalm’s *Veterinary Hematology*, 6th Edition by Douglas, J., Weiss, K., Jane Wardrop

Scherk, M. A., Ford, R. B., Gaskell, R. M., Hartmann, K., Hurley, K. F., Lappin, M. R., Levy, J. K., Little, S. E., Nordone, S. K., & Sparkes, A. H. (2013a). Disease information fact sheet: feline immunodeficiency virus. *J. Feline Med. Surg.*, 15.

Schmitz, S., Coenen, C., Matthias, K., Heinz-Jürgen, T., & Neiger, R. (2009). Comparison of three rapid commercial Canine Parvovirus antigen detection tests with electron microscopy and polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 21(3): 344–345.

Sellon, R. K., & Hartmann, K. (2012). Feline immunodeficiency virus infection. In C.E. Greene (ed.) *Infectious diseases of the dog and cat*. (4th ed.). (pp.136 - 149). United States of America: Elsevier

Senda M, Hirayama, N., Yamamoto, H., & Kurata, K. (1986). An improved hemagglutination test for study of canine parvovirus. *Vet. Microbiol.*, 12: 1–6.

Silva, M.O., Castro, T.X., Costa, E.M., Trancoso, T.L., Mendes-de-Almeida, F., Labarthe, N.V., & Cubel Garcia, R.N. (2013). Comparison of three laboratorial tests for diagnosis of canine parvovirus infection. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65 (1): 149–152.

Sime, T. A., Powell, L. L., Schildt, J. C., & Olson, E. J. (2015). Parvoviral myocarditis in a 5-week-old Dachshund. *J. Vet. Emerg. Crit. Care*, 25(6): 765– 769.

Souza, C., Silva, V.L., & Labarthe, N. (2019). Evaluation of DPP® and SNAP® Rapid Tests for diagnosis of *Leishmania infantum* canine infections. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 52.

Sykes, J. E., Hartmann, K., Lunn, K.F., Moore, G.E., Stoddard, R.A., & Goldstein, R.E. (2010). 2010 ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Prevention. *J.Vet. Intern. Med.*, 25(1): 1–13.

Sykes, J. E. & Hartmann, K. (2013). Feline leukemia virus infection. In J. E. Sykes (ed.) *Canine and Feline Infectious Diseases*. (1rd ed.). (pp. 224 – 238). Missouri: Elsevier.

Sykes, J. E., & Hartmann, K. (2014). Feline Leukemia Virus Infection. *Canine and Feline Infectious Diseases*: 224–238.

Thatcher, B., Beall, M., Liu, J., Goldstein, R.E., Chandrashekar, R. (2015). Performance of the Anigen Rapid Caniv-4 Test Kit using characterized canine samples. *J. Vet. Intern. Med.* 2015; 29: 1209.

Thatcher, B., Liu, J., Bewsey, H., Beall, M., O'Connor, T., Chandrashekar, R. (2015). Evaluation of three in-clinic serological tests for specific detection of FeLV antigen in cats.

58th American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians; Oct 22, 2015; Providence, RI.

Vail, D.M. (2007). Feline lymphoma and leukemia. In Vail, D.M. & Withrow, S.J. (Eds). Withrow and Macewen's small animal clinical oncology. (4th ed.). (pp. 31-50). Missouri: Saunders Elsevier.

Vieira, M.J., Silva, E., Oliveira, J., Vieira, A.L., Decaro, N., Desario, C., Thompson, G. (2008). Canine Parvovirus 2c Infection in Central Portugal. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 20(4): 488–491.

Westman, M.E., Malik, R., Hall, E., Sheehy, P.A., & Norris, J.M. (2017). Comparison of three feline leukaemia virus (FeLV) point-of-care antigen test kits using blood and saliva. *Comparative Immunol. Microb. Infect. Dis.*, 50: 88–96.

Westman, M.E., Malik, R., Hall, E., Sheehy, P.A., & Norris, J.M. (2015). Determining the feline immunodeficiency virus (FIV) status of FIV-vaccinated cats using point-of-care antibody kits. *Comp. Immunol., Microb. Infect. Dis.*, 42: 43–52.

Winzelberg, S., Tasse, S., Goldstein, R.E., Chapman, P., Benedict, A., Mason, G., *et al.* (2015). Evaluation of SNAP Lepto in the diagnosis of leptospirosis infections in dogs: twenty two clinic cases. *Int. J. Appl. Res. Vet. Med.*, 13(3): 194.