



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

Relatório Anual – Doutoramento em Ciências Veterinárias

(1º Ano – setembro de 2022 a julho de 2023)

“Parasitoses Gastrointestinais e Cardiopulmonares em Canídeos e Felídeos do Arquipélago dos Açores e suas Repercussões no Bem-Estar Animal e Saúde Pública”

- Doutoranda:** Romana Paula Carreiro Teixeira
Faculdade de Medicina Veterinária
Universidade de Lisboa
Contato: romanateixeira@gmail.com
- Orientador:** Luís Manuel Madeira de Carvalho
Professor Catedrático
Faculdade de Medicina Veterinária
Universidade de Lisboa
Contato: madeiradecarvalho@fmv.ulisboa.pt
- Coorientadora:** Maria Constança Matias Ferreira Pomba
Professora Associada com Agregação
Faculdade de Medicina Veterinária
Universidade de Lisboa
Contato: cpomba@fmv.ulisboa.pt
- Coorientador:** Carlos Augusto Pinto
Professor Auxiliar
Faculdade de Ciências Agrárias e do Ambiente
Universidade dos Açores
Contato: carlos.a.pinto@uac.pt
- Financiamento:**
- Bolsa do FRCT (M3.1.a/F/005/2022)
 - CIISA, Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária
 - AL4AnimalS, Laboratório Associado.
 - Laboratório Regional de Veterinária da ilha Terceira
 - Laboratório GeneVET

Instituição de Acolhimento: Faculdade de Medicina Veterinária (FMV/ULisboa)

Instituição que confere o Grau: Faculdade de Medicina Veterinária (FMV/ULisboa)

Ano de início do trabalho experimental: 2022

Data de matrícula como estudante de Doutoramento: 5 de setembro de 2022.

1) Resumo

As parasitoses do cão e do gato tornaram-se cada vez mais relevantes, devido a uma maior proximidade e convivência com os nossos animais de companhia, podendo constituir uma ameaça para a sua saúde e um perigo para a Saúde Pública, dado o caráter zoonótico que muitos destes parasitas apresentam.

O presente projeto de doutoramento tem como principais objetivos identificar os principais agentes parasitários gastrointestinais e cardiopulmonares e determinar a prevalência dos parasitas que sejam predominantes em canídeos e felídeos de todas as ilhas pertencentes ao arquipélago dos Açores, dadas as variações de clima, condições ambientais propícias ao seu desenvolvimento e disparidade de recursos sócio-económicos presentes neste território insular. Deste modo, com base nos dados que forem obtidos, poderão ser efetuados uma melhor prevenção e controlo, assim como uma melhor sensibilização das autoridades de saúde animal e humana, e em última análise a melhoria da saúde das populações animal e humana.

Este estudo permitirá ainda uma avaliação global e caracterização mais abrangente do parasitismo gastrointestinal e cardiopulmonar em carnívoros domésticos de todo o território insular açoriano, inexistente até ao momento, assim como as repercussões que estes organismos apresentam para a Saúde Pública e Bem-Estar Animal.

2) Atividades realizadas - 1º ano de Doutoramento

a) Caracterização das amostras

A colheita de amostras decorreu entre setembro de 2022 e junho de 2023. Durante este período, foram colhidas um total de 413 amostras, 15 provenientes da ilha do Corvo, 25 das Flores, 140 da Terceira e 233 de São Miguel, com a distribuição presente na tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição da amostra das ilhas participantes do estudo.

ESPÉCIE			
ILHA	Cães	Gatos	Total
Corvo	10	5	15
Flores	15	10	25
Terceira	70	70	140
São Miguel	98	135	233

O estudo envolveu animais provenientes de tutores e de centros de recolha oficial ou associações, de modo a obter uma amostragem de maiores dimensões, aleatória e heterogénea, acrescendo assim o valor representativo da população.

A colheita de fezes foi efetuada durante 3 dias consecutivos, diretamente do solo ou caixa de areia, após os animais defecarem. As amostras frescas foram acondicionadas em sacos de plástico individuais, identificadas e, posteriormente, refrigeradas a 4°C. No que se refere aos tutores, estes efetuaram a colheita em casa, tendo-lhes sido pedido que acondicionassem as amostras num saco de plástico ou frasco de vidro, e as mantivessem isoladas, de modo a evitar a exposição ao sol, antes de procedermos à sua recolha. O processamento e análise das amostras foram realizados no Laboratório Regional de Veterinária da ilha Terceira ou no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.



Figura 1 – Entidades participantes do estudo e seus animais (cães) (Fotos cedidas pelos centros de recolha).



Figura 2 – Entidades participantes do estudo e seus animais (gatos) (Fotos cedidas pelos centros de recolha).

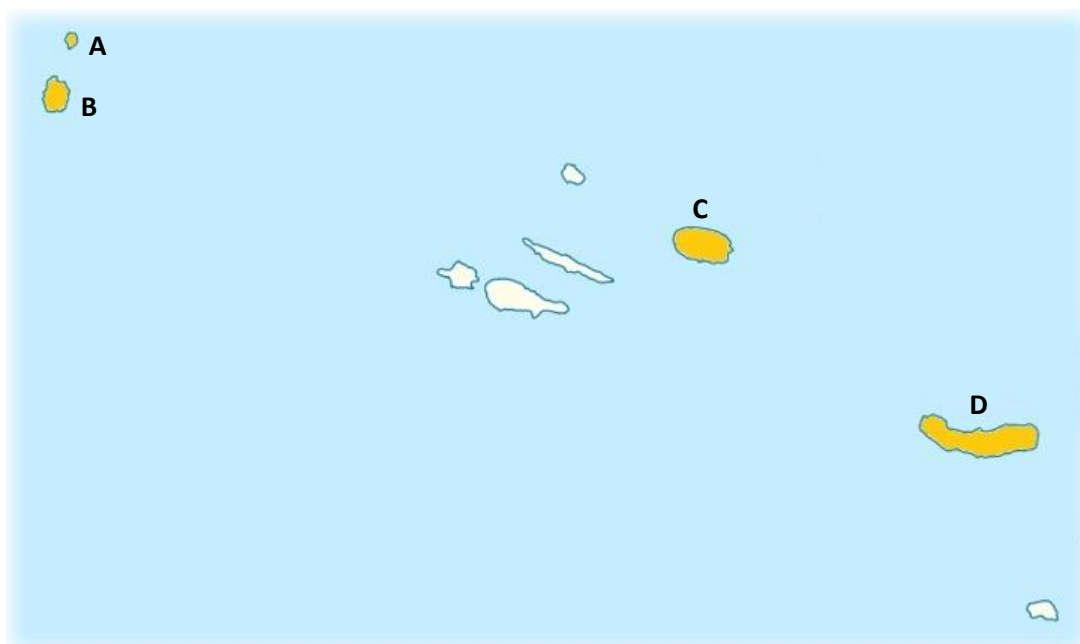


Figure 3 – Ilhas do Arquipélago dos Açores abrangidas até ao momento pelo estudo (a amarelo) (A – Corvo; B – Flores; C – Terceira; D – São Miguel.) - NordNordWest – Wikimedia Commons.

b) Realização de Inquéritos

Para cada amostra foi preenchido um inquérito que pretendeu determinar, não só fatores predisponentes para as doenças parasitárias em estudo, como também efetuar o registo dos dados de cada animal no que respeita aos seus programas preventivos de saúde, nomeadamente no que respeita à terapêutica e profilaxia das parasitoses.

De momento, encontra-se também a decorrer um inquérito online, disponível a todos os médicos veterinários da Região Autónoma dos Açores, sobre medidas de controlo e prevenção das parasitoses efetuadas por esta classe profissional no arquipélago.

c) Métodos Coprológicos

Todas as amostras foram submetidas a métodos coprológicos qualitativos e quantitativos, o que permitiu não só a identificação morfológica de formas parasitárias (ovos, oocistos e larvas), como também o cálculo do nível de eliminação que estas apresentam nas fezes.

Nos métodos qualitativos executados, a flutuação de Willis foi utilizada para identificação de ovos de nematodes e oocistos de protozoários gastrointestinais, enquanto a técnica de Baermann foi efetuada para observação de larvas L1 de nematodes pulmonares (Zajac & Conboy, 2012; Bowman, 2014).

As técnicas de McMaster e Mini-FLOTAC foram utilizadas para calcular os níveis de eliminação de parasitas nas fezes (ovos por grama de fezes – OPG; oocistos por grama de fezes – OoPG; larvas por grama de fezes – LPG). Para além disso, é de salientar que estas duas técnicas permitem isolar ovos de Trematoda, Cestoda e Nematoda, larvas de 1º estágio de nematodes respiratórios e oocistos e quistos de protozoários, sendo verdadeiramente métodos universais de diagnóstico coprológico e simultaneamente métodos quantitativos e qualitativos (Barda et al., 2013; Cringoli et al., 2017).

Após a análise, foi realizada a comparação entre os diversos métodos coprológicos.



Figure 4 – Técnica de Baermann para observação de nematodes pulmonares (original).



Figure 5 - Mini-FLOTAC e coletores Fill-FLOTAC, utilizados para coprologia quantitativa e qualitativa (original).

d) Métodos de Biologia Molecular

A identificação molecular de parasitas pulmonares é obtida após isolamento de larvas L1 nas fezes, seguida da sua análise através do método de PCR e posterior sequenciação (Bretagne et al., 1993; Davidson et al., 2009; Guerra et al., 2013).

e) Análise Estatística

A informação recolhida dos inquéritos realizados até à presente data e os resultados dos métodos coprológicos efetuados foram inseridos num ficheiro do programa Microsoft Excel 2010®, sendo posteriormente, importados para o programa R versão 3.3.0, com a extensão RCommander. Com recurso ao programa R, procedeu-se à análise dos dados através tabelas de contingência (*two-way table*) e teste de Qui-quadrado de Pearson, sendo os resultados considerados estatisticamente significativos quando o valor de p é inferior a 0,05.

3) Resultados

a) Parasitismo Gastrointestinal e Pulmonar

A prevalência global de parasitismo gastrointestinal em canídeos foi de 40%, em que os resultados obtidos, para cada parasita/grupos de parasitas, foram os seguintes: Ancylostomatidae (32%), *Toxocara canis* (18%), *Trichuris vulpis* (18%) e *Cystoisospora* spp. (9%).

A prevalência global de parasitismo gastrointestinal em felídeos foi de 46%, onde cada parasita/grupo de parasitas registaram as seguintes prevalências: Ancylostomatidae (31%), *Toxocara cati* (18%) e *Cystoisospora* spp. (11%).

A prevalência de parasitismo pulmonar foi de 0% nos canídeos e 15%, nos felídeos, tendo sido detetada até ao momento apenas a espécie *Aelurostrongylus abstrusus*, em gatos.

Os níveis de eliminação de parasitas nas fezes (OPG/OoPG/LPG) revelaram-se superiores nos gatos, estando os seus valores representados na tabela 2.

Relativamente às ilhas, nos cães, a percentagem de amostras com resultado positivo foi a seguinte: Corvo (70%); Flores (67%); São Miguel (28%); Terceira (47%). Nos gatos, os valores registados foram os seguintes: Corvo (60%); Flores (80%); São Miguel (42%); Terceira (49%). As prevalências e níveis de eliminação fecal estão descritos, com detalhe, nas tabelas 3 e 4.

Estes resultados preliminares parecem demonstrar desde já, que a disparidade de recursos, sobretudo nas ilhas mais a ocidente (Flores e Corvo), parece ter influência nos graus de parasitismo obtidos.

Tabela 2 – Níveis globais de parasitismo gastrointestinal e pulmonar em cães e gatos – prevalências e níveis de excreção fecal.

Espécie	Parasita	OPG/OoPG/LPG	Prevalência (%)
Cão	<i>Ancylostomatidae</i>	489 (10 – 1120)	32
	<i>Toxocara canis</i>	124 (10 – 420)	18
	<i>Trichuris vulpis</i>	199 (10 – 910)	18
	<i>Cystoisospora</i> spp.	223 (15 – 620)	9
Gato	<i>Ancylostomatidae</i>	611 (10 – 1265)	31
	<i>Toxocara cati</i>	421 (20 – 1015)	18
	<i>Cystoisospora</i> spp.	562 (15 – 2475)	11
	<i>Aelurostrongylus abstrusus</i>	102 (15 – 305)	15



Figure 6 - A – Ovo de *Ancylostomatidae* (gato); B – Larva L1 de *Aelurostrongylus abstrusus* (gato); C – oocisto de *Cystoisospora* sp.(gato); D – ovo de *Toxocara canis* (cão); E – ovo de *Trichuris vulpis* (cão).

Tabela 3 – Níveis de parasitismo gastrointestinal, por ilha, em cães do arquipélago dos Açores – prevalências e níveis de excreção fecal.









Ilha	Parasita	OPG/OoPG	Prevalência (%)
 Corvo	<u>Ancylostomatidae</u>	440 (145 – 635)	50
	<u>Toxocara canis</u>	108 (25 – 210)	50
	<u>Trichuris vulpis</u>	105 (45 – 165)	30
	<u>Cystoisospora spp.</u>	65 (25 – 105)	20
 Flores	Ancylostomatidae	362 (55 – 665)	53
	<u>Toxocara canis</u>	52 (25 – 125)	33
	<u>Trichuris vulpis</u>	113 (25 – 225)	40
	<u>Cystoisospora spp.</u>	68 (15 – 115)	20
 Terceira	Ancylostomatidae	542 (25 – 1120)	36
	<u>Toxocara canis</u>	202 (10 – 420)	17
	<u>Trichuris vulpis</u>	289 (10 – 605)	19
	<u>Cystoisospora spp.</u>	67 (105 – 620)	7
 São Miguel	Ancylostomatidae	485 (10 – 1070)	24
	<u>Toxocara canis</u>	83 (10 – 180)	12
	<u>Trichuris vulpis</u>	170 (10 – 910)	12
	<u>Cystoisospora spp.</u>	217 (45 – 520)	7

Tabela 4 – Níveis de parasitismo gastrointestinal e pulmonar, por ilha, em gatos do arquipélago dos Açores – prevalências e níveis de excreção fecal.

Ilha	Parasita	OPG/OoPG/LPG	Prevalência (%)
 Corvo	<u>Ancylostomatidae</u>	208 (175 – 235)	60
	<u>Toxocara cati</u>	70 (70)	20
	<u>Cystoisospora</u> spp.	25 (25)	20
 Flores	<u>Ancylostomatidae</u>	268 (45 – 525)	60
	<u>Toxocara cati</u>	83 (25 – 120)	30
	<u>Cystoisospora</u> spp.	82 (55 – 115)	30
 Terceira	<u>Ancylostomatidae</u>	672 (20 – 1265)	31
	<u>Toxocara cati</u>	128 (20 – 270)	23
	<u>Cystoisospora</u> spp.	479 (255 – 925)	10
	<u>Aelurostrongylus abstrusus</u>	105 (45 – 305)	19
 São Miguel	<u>Ancylostomatidae</u>	663 (10 – 1080)	27
	<u>Toxocara cati</u>	724 (205 – 1015)	15
	<u>Cystoisospora</u> spp.	759 (15 – 2475)	10
	<u>Aelurostrongylus abstrusus</u>	100 (15 – 105)	15

b) Comparação de métodos coprológicos

Após a sua análise, 77/193 (40%) das amostras de cães e 102/220 (46%) das amostras de gatos apresentaram resultado positivo, quando submetidas a pelo menos um dos quatro métodos coprológicos utilizados.

No que se refere aos cães, 77 das amostras (40%) registaram resultados positivos, tanto para o método de flutuação de Willis como para MF, enquanto que o método de McMaster efetuou a deteção de 67 amostras positivas (36%). Nenhuma das amostras apresentou resultado positivo, ao utilizar a técnica de Baermann. Nos gatos, de modo semelhante, 102 (46%) apresentaram resultado positivo para os métodos de flutuação e MF, 93 (42%) para McMaster e 33 (15%) para o método de Baermann (Tabelas 3 e 4).

Relativamente aos métodos quantitativos, o MF mostrou ser um método mais sensível que o McMaster, para níveis de excreção fecal inferiores a 50 OPG/OoPG (gráficos 1 e 2). Porém, no que se refere à deteção de larvas de metastrongilídeos, a técnica de Baermann mostrou maior sensibilidade, comparativamente ao MF (gráficos 3 e 4).

Tabela 5 - Número (n) e percentagem (%) de amostras positivas em cães, consoante os métodos coprológicos aplicados num total de amostras (T).

Espécie	Flutuação n/n T (%)	McMaster n/n T (%)	Mini-FLOTAC n/n T (%)
Ancylostomatidae	61/193 (32)	53/193 (28)	61/193 (32)
<i>Trichuris vulpis</i>	33/193 (18)	25/193 (13)	33/193 (18)
<i>Toxocara canis</i>	34/193 (18)	24/193 (12)	34/193 (18)
<i>Cystoisospora</i> spp.	17/193 (9)	14/193 (7)	17/193 (9)
Total *	77/193(40)	67/193 (36)	77/193(40)

* Total de animais positivos com infeção simples ou múltipla.

Tabela 6 - Número (n) e percentagem (%) de amostras positivas em gatos, consoante os métodos coprológicos aplicados num total de amostras (T).

Espécie	Flutuação n/n Tot (%)	Baermann n/n Tot (%)	McMaster n/n Tot (%)	Mini-FLOTAC n/n Tot (%)
Ancylostomatidae	68/220 (31)	0/220 (0)	64/220 (29)	68/220 (31)
<i>Toxocara cati</i>	40/220(18)	1/220(0,5)	35/220 (16)	40/220(18)
<i>Cystoisospora</i> spp.	24/220 (11)	0/220 (0)	22/220 (10)	24/220 (11)
<i>Aelurostrongylus abstrusus</i>	11/220 (5)	33/220 (15)	3/220 (1)	11/220 (5)
Total *	102/220(46)	34/220(15,5)	93/220 (42)	102/220(46)

* Total de animais positivos com infeção simples ou múltipla.

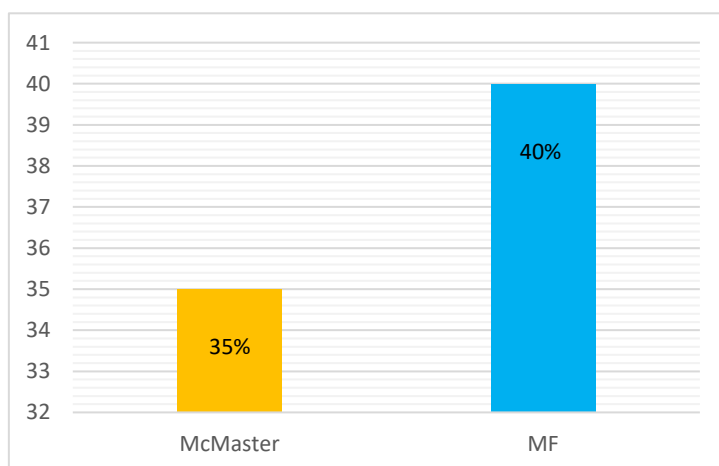


Gráfico 1 – Prevalência de amostras positivas para o método de McMaster (67/193) e MF (77/193) em cães dos Açores.

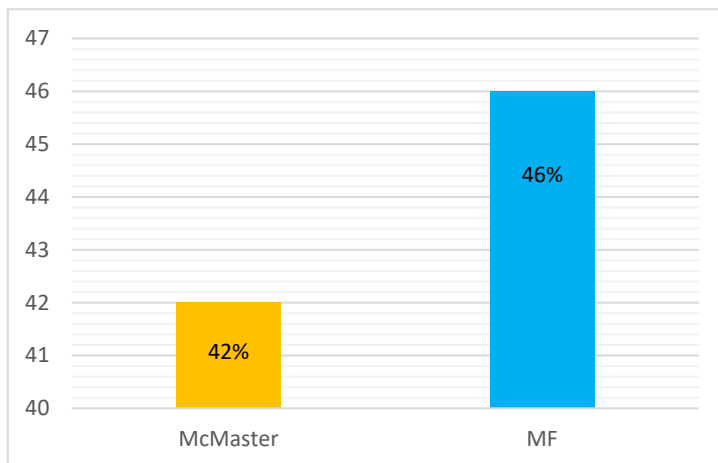


Gráfico 2 – Prevalência de amostras positivas para o método de McMaster (93/220) e MF (102/220) em gatos dos Açores.

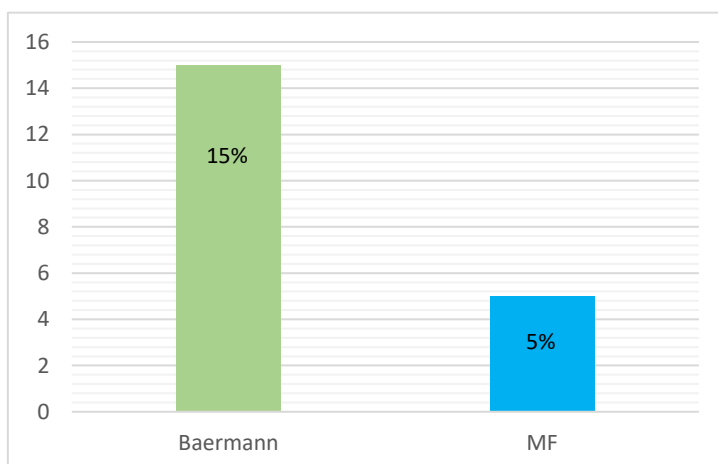


Gráfico 3 – Prevalência de amostras positivas para *A. abtrusus* utilizando a técnica de Baermann (33/220) e MF (11/220) em gatos dos Açores.

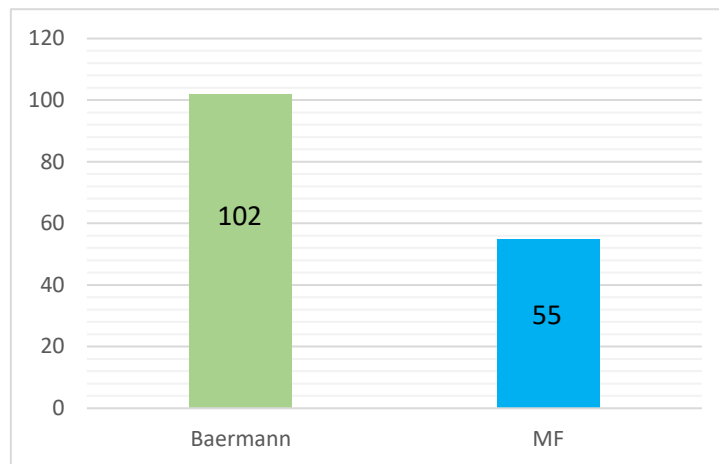


Gráfico 4 – Nível de eliminação fecal (\overline{LPG}) de amostras positivas para *A. abtrusus* utilizando a técnica de Baermann (15 – 305 LPG) e MF (15 – 65 LPG) em gatos dos Açores.

c) Biologia Molecular

Nesta primeira fase, uma amostra de 43 felídeos foi examinada recorrendo à técnica de Baermann como método de isolamento larvar, sendo as larvas L1 preservadas em álcool a 70% e congeladas, para posterior extração de DNA. Uma vez que a extração de DNA ainda se encontra em processamento, não foi possível dar início à identificação molecular. Este processo de isolamento e caracterização morfológica de L1 de metastrongilídeos e a sua posterior análise por PCR e sequenciação, é efetuado, respetivamente, no laboratório CIISA de Parasitologia e Doenças Parasitárias e no Laboratório GeneVET.

Em síntese, foram cumpridos os principais objetivos propostos para o primeiro ano de doutoramento, sendo que no próximo ano pretende-se:

- dar início à análise de amostras de sangue;
- proceder à colheita de fezes nas restantes ilhas do arquipélago, para criação de mapas com zonas de maior risco epidemiológico;
- classificar molecularmente as diferentes larvas L1 de metastrongilídeos;
- dar continuidade à realização de inquéritos;
- avaliar o impacto sazonal na taxa de infeção parasitária, uma vez que, neste primeiro ano, grande parte das colheitas foram realizadas entre fevereiro e maio.

4) Bibliografia

Abbasi I, Branzburg A, Campos-Ponce M, Abdel Hafez SK, Raoul F, Craig PS (2003) Coprodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection in dogs by amplification of a newly identified repeated DNA sequence. *American J Trop Med Hyg* 69:324–330
Brandt JR, Sewell MM (1981) *In vitro* hatching and activation of *Taenia taeniaeformis* oncospheres. *Vet Res Comm* 5:193–199

Barda, B.D., Rinaldi, L., Ianniello, D., Zepherine, H., Salvo F., Sadutshang, T., Cringoli, G., Clementi, M. e Albonico, M. (2013) Mini-Flotac, an Innovative Direct Diagnostic Technique for Intestinal Parasitic Infections: Experience from the Field. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 7(8): e2344

Barda, B.; Cajal, P.; Villagran, E.; Cimino, R.; Juarez, M.; Krolewiecki, A.; Rinaldi, L.; Cringoli, G.; Burioni, R.; Albonico, M. (2014) Mini-FLOTAC, Kato-Katz and McMaster: Three methods, one goal; highlights from north Argentina. *Parasites Vectors*, 7, 271.

Bowman, D. D., Lynn, R. C., Eberhard, M. L. & Alcaraz, A. (2006) *Parasitologia Veterinária de Georgi's*. (8ª ed.). Tamboré, São Paulo: Manole Ltda.

Cringoli G, Maurelli M, Levecke B, Bosco A, Vercruyssen J, Utzinger J, Rinaldi L. (2017) The Mini-FLOTAC technique for the diagnosis of helminth and protozoan infections in humans and animals. *Nat Protoc*. 12(9):1723-1732.

Gaglio, G.; Cringoli, G.; Rinaldi, L.; Brianti, E.; Giannetto, S. (2008) Use of the FLOTAC technique for the diagnosis of *Aelurostrongylus abstrusus* in the cat. *Parasitol. Res*. 2008, 103, 1055–1057.

Lima, V.F.; Cringoli, G.; Rinaldi, L.; Monteiro, M.F.; Calado, A.M.; Ramos, R.A.; Meira-Santos, P.O.; Alves, L.C. (2015) A comparison of mini-FLOTAC and FLOTAC with classic methods to diagnosing intestinal parasites of dogs from Brazil. *Parasitol. Res.*, 114, 3529–3533.

Morelli, S.; Traversa, D.; Diakou, A.; Colombo, M.; Russi, I.; Mestek, A.; Chandrashekar, R.; Beall, M.; Paoletti, B.; Iorio, R.; et al. (2022) A Comparison of Copromicroscopic and Molecular Methods for the Diagnosis of Cat *Aelurostrongylosis*. *Animals*, 12, 1024.

Teixeira, R. (2020) Rastreo de parasitas gastrointestinais e pulmonares em canídeos e felídeos da região autónoma dos Açores – Ilhas de São Miguel e Terceira”. *Dissertação de MIMV, FMV- ULisboa*, 78 pp.

Zajac A, Conboy G. (2012). Fecal Exam Procedures. In: Zajac A, Conboy G, editors. *Veterinary Clinical Parasitology*. 8th ed. UK: Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons, Inc.; p. 4-15.

5) Comunicações e publicação de resultados

a) Publicações

Teixeira, R.; Lozano, J.; Flor, I.; Gomes, L.; Pinto, C.; Pomba, M.C.; Madeira de Carvalho. L. (2023). Helminthic pulmonary parasites in the Azores islands – *Aelurostrongylus abstrusus* as agent of respiratory disease in domestic cats. WSAVA World Congress 2023. **(submitted)**

Teixeira, R.; Lozano, J.; Flor, I.; Pinto, C.; Pomba, M.C.; Madeira de Carvalho. L. (2023). Mini-FLOTAC technique for diagnosis of major gastrointestinal parasites in dogs of the Azores islands. WSAVA World Congress 2023. **(submitted)**

Teixeira, R.; Flor, I.; Nunes, T.; Madeira de Carvalho. L. (2023). Survey of gastrointestinal parasites and lungworms in cats and dogs from Azores islands. Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports. **(in progress)**

6) Outras atividades desenvolvidas

a) Comunicações Orais

Comunicação oral por Convite - “Parasitoses Gastrointestinais e Pulmonares em Canídeos e Felídeos da Região Autónoma Açores: Prevalências, Fatores Predisponentes, Zoonoses, Impacto no bem-estar animal e na saúde pública”, promovido pelo Conselho Regional dos Açores – OMV, 10 de fevereiro de 2022, São Miguel - Açores.

b) Outros

Bolseira de Doutoramento pelo FRCT (M3.1.a/F/005/2022).