



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO DE HEMOPARASITAS TRANSMITIDOS POR VECTORES, EM CÃES DE CANIL,
SETÚBAL, PORTUGAL.

INÊS PICANÇO CASTANHEIRA DA SILVA

CONSTITUIÇÃO DO JURÍ:

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca Sampaio

Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Dr. António Pedro Bispo Fachada

ORIENTADOR:

Dr. António Pedro Bispo Fachada

CO-ORIENTADOR:

Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles

2011

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO DE HEMOPARASITAS TRANSMITIDOS POR VECTORES, EM CÃES DE CANIL,
SETÚBAL, PORTUGAL.

INÊS PICANÇO CASTANHEIRA DA SILVA

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

CONSTITUIÇÃO DO JURÍ:

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca Sampaio

Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Dr. António Pedro Bispo Fachada

ORIENTADOR:

Dr. António Pedro Bispo Fachada

CO-ORIENTADOR:

Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles

2011

LISBOA

Agradecimentos

Aos meus pais, Renata e Artur, e irmão Tiago, por me aturarem estes anos todos, principalmente nas épocas de exame, o meu muito obrigada por toda a dedicação e apoio.

Ao Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles, por ter aceite o meu pedido de co-orientação e por toda a disponibilidade e apoio na realização da dissertação de mestrado.

Ao Dr. António Pedro Bispo Fachada, por ter aceite o meu pedido de orientação, por me ter guiado durante o estágio e realização da dissertação, por me transmitir valiosos conhecimentos na área de Medicina Interna e por toda a amizade.

À fabulosa equipa Linda-A-Vet, por me ter recebido de braços abertos. Aos Drs. Joana Pereira, João Soares e Virgínia Faria por todos os ensinamentos em cardiologia, cirurgia e imagiologia (respectivamente) e por toda a amizade e carinho. Às auxiliares Dana Burian, Filipa Rodrigues e Sara Aguiar por toda a amizade, apoio e ajuda com as “feras” durante o meu estágio.

À Dr^a Lídia Gomes, por me ter ensinado os procedimentos laboratoriais, pela sua disponibilidade e boa disposição.

À D. Milu e aos seus colaboradores pela disponibilidade e colaboração, e a toda a família de quatro patas “Cantinho da Milu” por todas as brincadeiras e amor.

Ao CIISA, pelo financiamento dos reagentes para os testes de IFI de *Leishmania infantum*.

Ao Dr. Telmo Nunes pela sua ajuda na realização da parte estatística deste trabalho.

À Dra. Rita Sousa do instituto Dr. Ricardo Jorge, pela cedência de artigos e pelo esclarecimento de dúvidas.

A todos amigos que me acompanharam nesta jornada, especialmente à Andreia Oliveira, à Jessica Gonçalves, ao João Fernandes, à Nara França e ao Ricardo Godinho.

À minha Tica e à minha Alfa por toda a inspiração.

A ti Gonçalo, por tudo o que és para mim.

Resumo- Estudo de hemoparasitas transmitidos por vectores, em cães de canil

As doenças transmitidas por vectores são causadas por parasitas, bactérias ou vírus e são veiculadas pela picada de artrópodes (principalmente ixodídeos e mosquitos). Estas doenças afectam cães a nível mundial e a maioria delas têm potencial zoonótico. Nestas estão incluídas as doenças sob estudo: Erliquiose, Babesiose, Riquetsiose, Anaplasmose e Leishmaniose.

A patogénese das doenças sob estudo, baseia-se fundamentalmente na resposta humoral exagerada e não protectora desenvolvida pelo hospedeiro, que provoca sintomas semelhantes aos de uma doença auto-imune. Isto é, ao contrário do que se podia pensar, não é o parasita em si que é responsável por todos os sintomas da doença, mas sim a resposta imunológica do hospedeiro à sua presença.

No que respeita ao diagnóstico, os médicos veterinários podem ter a sua tarefa complicada devido à ausência de sintomas específicos e à presença de co-infecções (infecção por mais do que um parasita). A compreensão por parte do clínico, da patogenia e imunologia das doenças transmitidas por vectores, é uma ferramenta essencial para o diagnóstico rápido e preciso.

Sob o ponto de vista zoonótico, se por um lado os canídeos actuam como sentinelas de doenças, por outro, são reservatórios de parasitas e importantes hospedeiros de transporte de vectores. Devido a isto um dos pontos fulcrais da prevenção destas hemoparasitoses é o controlo de vectores.

Neste estudo foi realizado o rastreio de cinco doenças transmitidas por vectores, causadas pelos agentes: *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia conorii*, *Babesia canis* e *Leishmania infantum*. Este estudo incidiu sobre uma população de um canil de Setúbal, no qual foram testados 80 cães (29 machos e 51 fêmeas) escolhidos aleatoriamente. Os testes utilizados foram testes comerciais de imunofluorescência indirecta (IFI). Dos animais testados 58,75% dos animais encontravam-se infectados (20% co-infectados e 38,75% mono-infectados). As prevalências de anticorpos contra os 5 agentes foram: *Rickettsia conorii* (23,75%), *Babesia canis* (20%), *Ehrlichia canis* (16,25%), *Leishmania infantum* (16,25%) e *Anaplasma phagocytophilum* (12,5%).

Palavras-chave: Hemoparasitas, Erliquiose, Babesiose, Riquetsiose, Anaplasmose e Leishmaniose.

Abstract- Vector-borne diseases in kennel dogs, a study

Vector-borne diseases are caused by parasites, virus and bacteria, and transmitted through the bite of arthropods. These diseases have a great zoonotic potential and affect dogs worldwide. The five diseases studied (Ehrlichiosis, Babesiosis, Rickettsiosis, Anaplasmosis and Leishmaniasis) are included in this category of illness.

The pathogenesis, it's based mainly on the humoral response developed by the host, that being exaggerated and not protective, causes symptoms similar to an autoimmune disease. Meaning, on the contrary to what might be thought, is not the parasite itself that is responsible for all the symptoms, but the host's immune response to their presence.

Concerning the diagnosis, veterinarians can have their task complicated by the absence of specific symptoms and the presence of co-infection (infection for more than a parasite). The understanding of the clinical, the pathogenesis and immunology of vector-borne diseases, is an essential tool for rapid and accurate diagnosis.

From the zoonotic point of view, dogs act as sentinels of disease, and are important reservoirs of parasites and carry vectors. Due to this, one of the key points for prevention of vector-borne diseases in animals and humans is vector control.

In this study was performed the screening of five vector-borne diseases caused by the agents: *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia conorii*, *Babesia canis* and *Leishmania infantum*. This study focused on a population of a kennel of Setúbal, in which 80 dogs (29 males and 51 females), randomly chosen, were tested. The tests used were indirect fluorescence antibody (IFA) commercial. 58.75% of the animals tested animals were infected (20% co-infected and 38.75% single infections). The point prevalence for different pathogens was: *Rickettsia conorii* (23.75%), *Babesia canis* (20%), *Ehrlichia canis* (16.25%), *Leishmania infantum* (16.25%) and *Anaplasma phagocytophilum* (12.5%).

Keywords: Hemoparasites, Ehrlichiosis, Babesiosis, Rickettsiosis, Anaplasmosis and Leishmaniasis.

Índice geral

1- Descrição das actividades desenvolvidas durante o estágio curricular	1
2- Introdução.....	3
2.1- Doenças transmitidas por vectores	3
2.2- Breve revisão taxonómica	4
3- Revisão bibliográfica.....	5
3.1- <i>Ehrlichia canis</i>	5
3.1.1- História e Epidemiologia	5
3.1.2- Microestrutura.....	6
3.1.3- Ciclo de vida	7
3.1.4- Patogénese	8
3.1.5- Sintomatologia	9
3.1.6- Alterações hematológicas e bioquímicas	9
3.1.7- Diagnóstico	11
3.1.8- Tratamento e profilaxia	12
3.1.9- Saúde pública.....	12
3.2- <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	13
3.2.1- História e epidemiologia.....	13
3.2.2- Microestrutura.....	13
3.2.3- Ciclo de vida	14
3.2.4- Patogénese	14
3.2.5- Sintomatologia	15
3.2.6- Alterações hematológicas e bioquímicas	15
3.2.7- Diagnóstico	15
3.2.8- Tratamento e profilaxia	16
3.2.9- Saúde Pública.....	16
3.3- <i>Rickettsia conorii</i>	16
3.3.1- História e Epidemiologia	16
3.3.2- Microestrutura.....	17
3.3.3- Ciclo de vida	17
3.3.4- Patogénese	18
3.3.5- Sintomatologia e alterações hematológicas e laboratoriais.....	18
3.3.6- Diagnóstico	18
3.3.7- Tratamento e profilaxia	19
3.3.8- Saúde Pública.....	19
3.4- <i>Babesia canis</i>	20
3.4.1- História e epidemiologia.....	20
3.4.2- Microestrutura.....	20
3.4.3- Ciclo de vida	20
3.4.4- Patogénese	22
3.4.5- Sintomatologia	24
3.4.6- Alterações hematológicas e bioquímicas	24
3.4.7- Diagnóstico	25
3.4.8- Tratamento e profilaxia	25
3.4.9- Saúde Pública.....	26
3.5- <i>Leishmania infantum</i>	26
3.5.1- História e epidemiologia.....	26
3.5.2- Microestrutura.....	27

3.5.3- Ciclo de vida	27
3.5.4- Patogénese	29
3.5.5- Sintomatologia	30
3.5.6- Alterações hematológicas e bioquímicas	30
3.5.7- Diagnóstico	31
3.5.8- Tratamento e profilaxia	31
3.5.9- Saúde Pública.....	32
3.6- Meios de diagnóstico complementar	33
3.6.1- Imunofluorescência Indirecta (IFI)	33
3.6.2- ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>).....	35
3.6.3- <i>Immunoblotting- Western blotting</i>	37
3.6.4- PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	38
3.7- Interações hospedeiro-vector, na transmissão de hemoparasitoses.....	39
3.8- Breve descrição dos principais vectores.....	41
3.8.1- <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	41
3.8.1.1- Taxonomia	41
3.8.1.2- Ciclo de vida.....	41
3.8.1.3- Transmissão biológica.....	42
3.8.2- <i>Dermacentor reticulatus</i>	43
3.8.2.1- Taxonomia	43
3.8.2.2- Ciclo de vida.....	43
3.8.2.3- Transmissão biológica.....	43
3.8.3- <i>Ixodes ricinus</i> e <i>I. ventralloii</i>	43
3.8.3.1-Taxonomia	43
3.8.3.2- Ciclo de vida.....	44
3.8.3.3- Transmissão biológica.....	44
3.8.4- <i>Phlebotomus perniciosus</i> e <i>P. ariasi</i>	44
3.8.4.1- Taxonomia	44
3.8.4.2- Ciclo de vida.....	44
3.8.4.3- Transmissão biológica.....	45
3.9- Controlo de vectores	46
3.9.1- Controlo de ixodídeos	46
3.9.1.1-Controlo químico	46
3.9.1.2- Vacinação	46
3.9.1.3- Controlo não químico	47
3.9.2- Controlo de flebotomos.....	47
3.9.2.1- Controlo químico	47
3.9.2.2- Gestão ambiental	48
3.9.2.3- Controlo biológico.....	48
4- Objectivos.....	48
5-Material e métodos	49
5.1-Área geográfica sob estudo.....	49
5.2-Clima.....	49
5.3-Characterização da amostra	51
5.3.1- Raça dos cães da amostra	51
5.3.2 Sexo dos cães da amostra.....	51
5.3.3 Idade dos cães da amostra	51
5.3.4 Comprimento do pêlo dos cães da amostra.....	51
5.4-Characterização do habitat em que se inserem.....	51
5.5-Colheita de sangue e processamento	52
5.6- Método analítico.....	52

5.6.1- Testes utilizados	53
5.6.2-Técnica de pesquisa de anticorpos.....	53
5.6.2- Limiar de positividade da técnica de IFI	54
5.7-Análise estatística de resultados	55
6- Resultados.....	55
6.1- Avaliação global.....	55
6.2- Resultados obtidos pela técnica de imunofluorescência indirecta	55
6.2.1-Resultados obtidos e seroprevalências.....	55
6.2.2- Título de anticorpos	59
6.3- Influência de factores	59
6.4- Co-infecções	60
7-Discussão	61
7.1-Prevalências.....	61
7.2- Interpretação de resultados.....	63
7.3-Influência de factores	64
7.4- Co-infecções	64
8-Conclusão.....	65
Bibliografia.....	66
Anexo 1- Características dos cães testados e títulos de anticorpos apresentados	84

Índice de gráficos

Gráfico 1- Proporção de positivos, negativos, infectados únicos e co-infectados.....	55
Gráfico 2- Número de animais positivos e seroprevalências dos diferentes agentes.	58

Índice de tabelas

Tabela 1- Correspondência entre a designação comercial do teste e do agente de pesquisa de anticorpos	53
Tabela 2- Seroprevalências dos agentes e respectivos intervalos de confiança	58
Tabela 3- Seroprevalência real de <i>L.infantum</i> na amostra e dados de sensibilidade e especificidade do teste.....	59
Tabela 4- Valores de p calculados através do teste exacto de Fisher e do teste de Wilcoxon ..	59
Tabela 5- Co-infecções e número de animais que as apresentavam	60

Índice de figuras

Figura 1- <i>E.canis</i> no citoplasma de um monócito, fotografia de microscópio electrónico.....	7
Figura 2- Formas <i>dense-cored cells</i> de <i>A.phagocytophilum</i> (original)	13
Figura 3- <i>R.conorii</i> em células endoteliais.....	17
Figura 4- Esquema do ciclo de vida de <i>Babesia canis</i>	22
Figura 5- Esquema de ciclo de vida da <i>Leishmania infantum</i>	28
Figura 6- Esquema do teste ELISA.....	36
Figura 7- Fotografia aérea da associação “Cantinho da Milu” (Google maps, 2011)	49
Figura 8- Mapas das temperaturas médias e máximas registadas em Portugal durante o mês de Março de 2011.....	50
Figura 9- Mapas de registos totais de pluviosidade e horas de insolação, durante o mês de Março de 2011.....	50
Figura 10 Fotografia original da área comum (esquerda) e dos parques (direita).....	52
Figura 11- Fotografia original de um parque grande (esquerda) e pormenor do interior da casas com as camas dos animais (direita).	52
Figura 12-Tinas de lavagem	54
Figura 13- Aspecto da técnica da IFI para <i>E.canis</i> , resultado positivo(esquerda) e resultado negativo (direita), ampliação de 600x aproximadamente (original).....	56
Figura 14 Aspecto da técnica da IFI para <i>A.phagocytophilum</i> , resultado positivo(esquerda) e resultado negativo (direita), ampliação de 600x aproximadamente (original)	56
Figura 15- Aspecto da técnica da IFI para <i>R.conorii</i> , resultado positivo(esquerda) e resultado negativo (direita), ampliação de 600x aproximadamente (original).....	56
Figura 16- Aspecto da técnica da IFI para <i>B.canis</i> , resultado positivo(esquerda) e resultado negativo (direita), ampliação de 600x aproximadamente (original).....	57
Figura 17- Aspecto da técnica da IFI para <i>L.infantum</i> , resultado positivo(esquerda) e resultado negativo (direita), ampliação de 600x aproximadamente (original).....	57

Índice de anexos

Anexo 1- Características dos cães testados e títulos de anticorpos apresentados 84

Índice de abreviaturas e símbolos

%	Porcentagem
µL	microlitro
µm	micrómetro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ASP	Antigénios solúveis do parasita
BID	duas vezes ao dia
DC	<i>dense-cored cells</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMC	Erliquiose monocítica canina
EUA	Estados Unidos da América
FIMP	Factor inibidor de migração plaquetária
IFI	Imunofluorescência indirecta
IFN	Interferão
Ig	Imunoglobulina
IM	Intramuscular
kg	quilograma
LCan	Leishmaniose canina
mg	miligrama
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
mL	mililitro
MSF	<i>Mediterranean Spotted Fever</i>
MV	Médico Veterinário
n.º	Número
NK	Células <i>natural killer</i>
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
pb	pares de bases
PCR	Reacção em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)

PO Via oral
PSE Proteínas secretadas e excretadas
q24 cada 24 horas
RC *reticulate cells*
RMSF *Rocky Mountain Spotted Fever*
rpm rotações por minuto
SC Subcutâneo
SID Uma vez ao dia
TAR Terapêutica anti-retroviral
Thelper Células T efectoras
p (valor de p) significância
WB *Western blotting*

Estudo de hemoparasitas transmitidos por vectores, em cães de canil

1- Descrição das actividades desenvolvidas durante o estágio curricular

O estágio curricular do Mestrado integrado em Medicina Veterinária, foi realizado na clínica veterinária Linda-A-Vet e no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina Veterinária da UTL.

O estágio realizado na clínica veterinária Linda-A-Vet, sob a orientação do Dr. António Pedro Bispo Fachada, permitiu também o acompanhamento do trabalho de toda a equipa clínica. Decorreu entre 6 de Setembro de 2010 e 26 de Fevereiro de 2011, com o horário de 2^a a 6^a das 10h às 20h, excepto 5^a (das 14h às 20h) e sábados das 10h às 15h. Durante este período foram realizadas actividades nas diversas áreas de clínica de pequenos animais: Medicina Interna, Internamento, Imagiologia, Cirurgia e gestão clínica. As espécies animais mais consultadas foram o cão (*Canis familiaris*) e o gato (*Felis catus*), ocasionalmente leporídeos.

Durante as consultas foi possível acompanhar e realizar: anamnese, exame de estado geral, diagnósticos diferenciais e exames complementares (hemograma, bioquímicas, observação microscópica, urianálises, análises coprológicas, raspagens de pele, biópsias, testes rápidos de diagnóstico, electrocardiogramas e medição de pressões arteriais). As áreas de consulta foram diversas: vacinação/desparasitação, hemotologia/infecciologia, nefrologia/urologia, oncologia, gastroenterologia, dermatologia, cardiologia, endocrinologia, oftalmologia, ortopedia e toxicologia. Os principais motivos de consulta além de vacinações/desparasitações, em gatos principalmente insuficiências renais, cistites, hipertiroidismo e oncologia, em cães hemoparasitoses, insuficiências renais e oncologia. As consultas permitiram um seguimento dos casos, o que se tornou vantajoso para a compreensão da evolução de várias doenças / estados clínicos. Possibilitaram também um contacto com o público, permitindo o desenvolvimento de capacidades comunicativas como Médica Veterinária.

No internamento foi possível a realização de venopunções, colocação de cateter endovenoso, pensos, administração de fármacos via oral, endovenosa, intramuscular e subcutânea, algaliações, quimioterapia e tipificação sanguínea. As principais causas de internamento foram

insuficiências renais, doenças infecciosas, lipidose hepática (em gatos) e hemoparasitoses (em cães). Durante o internamento, retiraram-se também valiosos conhecimentos relativos ao comportamento de um animal internado e ao maneio de animais agressivos.

No campo da imagiologia, foi possível observar, participar e realizar radiografias, endoscopias e ecografias (abdominal e cardíacas). Foi possível a observação de procedimentos ecoguiados como punções aspirativas com agulha fina (PAAF), biópsias e toraco e abdominocenteses. Na imagiologia retiraram-se conhecimentos de constantes radiológicas e posicionamento, manobração de um endoscópio e noções de ecografia (aspecto dos órgãos).

Em cirurgia foi possível auxiliar e realizar toda a preparação pré-cirúrgica desde a preparação da anestesia, administração anestésica e pré-medicação, à preparação do campo cirúrgico (rapar o pêlo e desinfecção). Durante a cirurgia realizaram-se funções de monitorização anestésica e ajudante de cirurgião. Como ajudante de cirurgião auxiliou-se em cirurgias de várias áreas como: oftalmologia (entrópions, remoção de calázios e resolução de úlceras); odontologia (destartarizações e remoção de dentes); gastroenterologia (remoção de corpos estranhos, resolução de torções gástricas com gastropexia e colocação de tubos endofágicos); reprodução (histerectomias e piómetras); urologia (remoção de cálculos na bexiga); ortopedia (resolução de fracturas) e outras de tecidos moles (remoção nódulos cutâneos, remoção de massas e resolução de hérnias). Realizou-se a castração electiva de gatos e cães. Na área cirúrgica retiveram-se conhecimentos relativos a protocolos e monitorização anestésica, realização de cirurgias, suturas e comportamento a ter numa sala de cirurgia.

Também foi possível a realização de necrópsias em alguns animais.

Em termos de gestão clínica, foram-me transmitidas noções de custos, organização e relações interpessoais. Obtiveram-se conhecimentos precisos de como reduzir nalguns custos e de como boas relações interpessoais e trabalho em equipa numa clínica, são fundamentais para o sucesso da mesma.

O facto da clínica Linda-A-Vet possuir 4 Médicos Veterinários possibilitou-me a observação de vários métodos de trabalho, contribuindo para a formação do meu, como Médica Veterinária.

O estágio que decorreu no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina Veterinária da UTL, permitiu a realização e observação de testes de imunofluorescência (IFI), de esfregaços de sangue e testes de Knott. Retirei conhecimentos fundamentais à realização das diversas técnicas laboratoriais, e à observação das mesmas. Contribuiu também para a percepção do comportamento a ter num laboratório, tendo noção de todos os perigos inerentes a este actividade.

2- Introdução

2.1- Doenças transmitidas por vectores

As doenças transmitidas por vectores são causadas por parasitas, bactérias ou vírus e são veiculadas pela picada de artrópodes (principalmente ixodídeos e mosquitos) (Stanneck, 2006; Beugnet & Marié, 2009). Esta multiplicidade de doenças, afecta cães em todo o mundo (Caprariis *et al.*, 2011) e a maioria delas têm potencial zoonótico (Parola, Davoust & Raoult, 2005b). Nestas doenças de grande importância veterinária, estão incluídas as doenças sob estudo: Erliquiose, Babesiose, Riquetsiose, Anaplasnose e Leishmaniose (Otranto & Dantas-Torres, 2010).

De entre as infecções transmitidas por ixodídeos considera-se que as provocadas por *Ehrlichia canis* e por *Anaplasma phagocytophilum* são as mais importantes, sendo a provocada pela *Rickettsia conorii* de menor aparente relevância. A Leishmaniose transmitida por flebótomos é de grande impacto causando doença clínica severa (Stanneck, 2006).

O facto dos anticorpos e agentes destas doenças poderem persistir no sangue ou tecidos do animal, por períodos de tempo prolongados, dificulta a interpretação dos testes de diagnóstico, especialmente em animais que habitam zonas endémicas à doença (Breitschewerdt, 2007). Assim, chegar a um diagnóstico pode ser uma tarefa complicada para o Médico Veterinário. Por um lado porque os sintomas podem ser inespecíficos e os sinais hematológicos e bioquímicos confusos, uma vez, que no mesmo animal poderemos encontrar a presença de co-infecções (activas ou não) (Caprariis *et al.*, 2011). Por outro, a detecção de anticorpos, antigénio, ADN ou ARN não sustenta directamente a relação causa-efeito entre, a detecção do microrganismo e as manifestações da doença no animal (Breitschewerdt, 2007). O ideal será a interpretação conjunta de todos os dados, desde a história pregressa e possível contacto com o vector, à análise dos testes complementares, passando por um minucioso exame clínico.

A compreensão por parte do Médico Veterinário da patologia e imunologia das doenças transmitidas por vectores, também são ferramentas essenciais para um diagnóstico mais rápido e preciso.

O princípio da prevenção destas doenças estabeleceu-se firmemente na medicina veterinária. A regra básica de que é preferível a profilaxia ao tratamento após a contracção da doença, está cada vez mais a ser aplicada na prática clínica de animais de companhia (Stanneck, 2006).

Neste estudo foi realizado o rastreio de cinco doenças transmitidas por vectores, causadas pelos agentes: *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia conorii*, *Babesia canis* e *Leishmania infantum*.

Um rastreio consiste no exame sistemático de uma população ou de uma amostra desta, independentemente do seu estado clínico, com o objectivo de aferir a prevalência de uma ou mais doenças. Esta prevalência quando determinada num dado momento é denominada prevalência de ponto (*point prevalence*), usualmente expressa sob a forma de percentagem. Qualquer técnica serológica pode ser utilizada como teste de rastreio, a escolha é usualmente feita favorecendo aquela que for mais simples, prática, rápida, com menores custos (Toma *et al.*, 2005) e com maior especificidade e sensibilidade.

2.2- Breve revisão taxonómica

As infecções transmitidas por ixodídeos são um problema mundial emergente em cães, que para além de causarem doença em climas tropicais e semi-tropicais, são também actualmente reconhecidas como causa de doença em climas temperados urbanos e sub-urbanos (Shaw, Birtles & Breitschwerdt, 2001).

Os agentes, sob estudo que pertencem ao reino Bacteria, filo Protobacteria, classe α -Protobacteria e ordem Rickettsiales, (*National Center for Biotechnology Information* [NCBI], 2009a) responsáveis pela “febre da carraça” em canídeos em Portugal, dividem-se nas famílias Anaplasmataceae e Rickettsiaceae (Baneth, 2006; NCBI, 2009a).

Os membros da família Anaplasmataceae são bactérias (cocos gram negativos) obrigatoriamente intracelulares, que se replicam na célula eucariótica hospedeira, quando contidos em vacúolos derivados da membrana (Rikihisa, 1991; Baneth, 2006).

Quanto à posição taxonómica, *Anaplasma phagocytophilum* sofreu uma reorganização, baseada no estudo filogenético do gene 16S rARN e do operão *groESL*, (Dumler *et al.*, 2001).

Sendo assim, a antiga *Ehrlichia phagocytophilum* passa a pertencer ao género *Anaplasma*, passando a designar-se *Anaplasma phagocytophilum* (Dumler *et al.*, 2001; NCBI 2009a). Assim como *Ehrlichia equi* que também se passará a designar *Anaplasma phagocytophilum* (Dumler *et al.*, 2001).

A espécie *Ehrlichia canis*, não sofreu qualquer alteração, continuando a pertencer ao género *Ehrlichia* (Dumler *et al.*, 2001; NCBI 2009a).

Todas as espécies pertencentes à família Rickettsiaceae são bactérias obrigatoriamente intracelulares, que se desenvolvem livremente no citoplasma das células eucarióticas hospedeiras (Dumler *et al.*, 2001). Desta família faz parte, o agente sob estudo, *Rickettsia conorii*, membro do género *Rickettsia* (Dumler *et al.*, 2001; NCBI, 2009a).

O outro agente sob estudo também responsável pela “febre da carraça”, pertence ao filo Apicomplexa, ordem Piroplasmida, (Irwin, 2009) família Babesiidae, género *Babesia* (NCBI, 2009c) e espécie *B. canis*.

Leishmania infantum é o agente da leishmaniose canina e é transmitido por flebótomos. É um agente eucariota, pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e género *Leishmania* (NCBI, 2009d).

3- Revisão bibliográfica

3.1- *Ehrlichia canis*

3.1.1- História e Epidemiologia

Ehrlichia canis é o agente da Ehrlichiose monocítica canina (EMC) (Rikihisa, 1991; Pinyoowong, Jittapalpong, Suksawat, Stich & Thamchaipenet 2008), tendo sido descoberto pela primeira vez em 1935 por Donatien e Lestoquard no instituto Pasteur na Argélia (Donatien & Lestoquard,1935). Designado na altura por *Rickettsia canis*, foi também reconhecido *Rhipicephalus sanguineus* como seu vector (Donatien & Lestoquard,1935). Em 1945, o agente da EMC passou-se a designar *Ehrlichia canis*, por Moshkovski em honra a Paul Ehrlich (Ristic & Huxsoll, 1984, citado por McDade, 1990)

A infecção por *E.canis* é de distribuição mundial (Shaw *et al.*, 2001; Neer, Breitschwerdt, Greene & Lappin, 2002), já tendo sido relatada em África, Ásia, América e Europa (Harrus, Kass, Klement & Waner, 1997; Cohn, 2003; Stich, Schaefer, Bremer, Needham & Jittapalong, 2008). Casos não importados (autóctones) de *E.canis* na Europa, foram relatados principalmente em Portugal, Espanha, sul de França, Itália, Balcãs, Turquia e Grécia (Baneth, 2010a) . A prevalência da Ehrlichiose monocítica causada por *E.canis* está relacionada com a distribuição geográfica do seu vector (Neer *et al.*, 2002; Breitschwerdt, 2004).

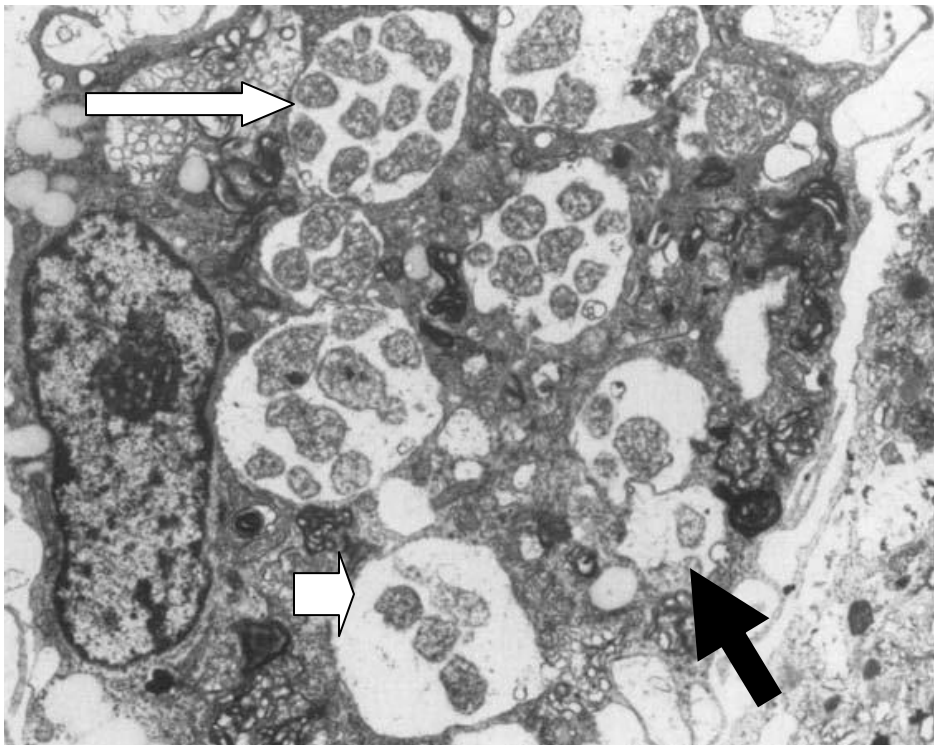
3.1.2-Microestrutura

A mórula de *E.canis* encontrada nos monócitos e macrófagos é uma "microcolônia" de bactérias (análogas à clamídia) (McDade, 1990), cercadas por um vacúolo revestido por uma membrana celular (Harrus *et al.*, 1990; Rikihisa, 1991; Cohn, 2003; Stich *et al.*, 2008).

E.canis apresenta 3 estados evolucionais: corpo elementar, corpos iniciais e mórula (Fig.1). O corpo elementar é a unidade *ehrlichiae*. São organismos gram negativos com aproximadamente 0,5µm de diâmetro, de forma redonda mas podendo exibir pleomorfismo (Rikihisa, 1991). Estes entram nos monócitos e macrófagos por fagocitose. Os vacúolos fagolisossomais não se fundem, contudo, cada corpo elementar começa a crescer e dividir-se através de divisão binária. Após 3-5 dias da infecção, pequenos corpos elementares agrupados formam um corpo inicial com cerca de 1.0-2.5 µm de diâmetro. Durante mais 7-12 dias dar-se-á crescimento adicional e os corpos iniciais desenvolvem-se em inclusões maduras com configuração de mórula. Quando a célula infectada ruptura, a mórula fragmenta-se em corpos elementares e o ciclo infeccioso repete-se (McDade, 1990; Rikihisa, 1991).

Ao nível do genoma a bactéria *E.canis* é constituída por uma molécula ADN, formando um único cromossoma circular de 1315030 pb (Mavromatis *et al.*, 2006). No entanto, esta bactéria é deficiente nalguns componentes estruturais, incluindo peptidoglicanos e lipossacáridos. A ausência destes componentes, resultou no desenvolvimento de complexas estruturas proteicas na membrana celular externa. Estas proteínas têm um papel importante na interação patógeno-célula e na estratégia adaptativa deste organismo (auxiliando-o na evasão imunológica) (Mavromatis *et al.*, 2006). Estes mecanismos de evasão permitem a continuidade da infecção uma vez que, impedem a fusão do fagossoma com o lisossoma e suspendem o mecanismo de apoptose, através da desregulação do sistema imunológico (Zhang, Sinha, Luxon & Yu, 2004). Esta desregulação é feita através da inibição da libertação de citocinas estimuladoras das células NK e Thelper, (Zhang *et al.*, 2004) e de mecanismos de inibição do metabolismo das mitocôndrias do hospedeiro (Liu *et al.*, 2011). Julga-se que neste último, proteínas da bactéria interagem com a permeabilidade da mitocôndria, resultando na sua hibernação. A mitocôndria dormiente não inicia um processo de apoptose e não compete por nutrientes com a *Ehrlichiae* (Liu *et al.*, 2011).

Figura 1- *E.canis* no citoplasma de um monócito, fotografia de microscópio electrónico.



Legenda: Adaptado de McDade (1990); Aspecto microestrutural de *E.canis*: corpo elementar (seta preta), corpo inicial (seta curta) e mórula (seta longa). Ampliação aproximadamente 10000x

3.1.3- Ciclo de vida

- Hospedeiro Invertebrado

O vector primário de *E.canis* é *Rhipicephalus sanguineus*, que infecta os hospedeiros vertebrados quando se alimenta do seu sangue, e que se infecta quando se alimenta de hospedeiros infectados (McDade, 1990; Shaw *et al*, 2001; Bowman, Lynn, Eberhard & Alcaraz, 2003; Bremer, 2005; Stich *et al.*, 2008). A transmissão transovárica também ocorre na ehrlichiose, passando assim o agente patogénico de uma descendência à seguinte (Stich *et al.*, 2008). A transmissão de *E. canis* é mecânica, o que permite que actos como o de uma transfusão sanguínea, possam também transmitir a doença (Waner & Harrus, 2000; Alleman, 2005).

- Hospedeiro Vertebrado

Os hospedeiros vertebrados habituais de *E.canis* pertencem à família Canidae (*Center of Food Security and Public Health*, 2005). São eles o cão doméstico, o coiote, a raposa, o chacal e o lobo, estes quando cronicamente infectados representam importantes reservatórios da doença (McDade, 1990; Neer & Harrus 2006; Stich *et al.*, 2008). A ehrlichiose monocítica canina

provocada por *E.canis* foi também detectada em gatos e em humanos (*Center of Food Security and Public Health*, 2005; Stich *et al.*, 2008).

3.1.4- Patogénese

A patogénese da EMC envolve um período de incubação de 8 a 20 dias, seguido de 3 fases: aguda, subclínica e crónica (Harrus *et al.*, 1997; McDade, 1990; Waner & Harrus, 2000; Neer & Harrus, 2006) .

Na fase aguda o parasita entra na corrente sanguínea e linfática, e localiza-se nos macrófagos do sistema reticuloendotelial do baço, fígado e linfonodos, onde se replica por divisão binária. A partir daí, células mononucleares infectadas disseminam a infecção a outros órgãos do corpo (Waner & Harrus, 2000; Neer & Harrus, 2006). Esta fase dura entre 1 e 4 semanas (Harrus *et al.*, 1997). A fase aguda geralmente resolve-se espontaneamente dando origem a uma fase subclínica, na qual o animal se encontra infectado mas, assintomático (McDade, 1990; Neer & Harrus, 2006). Esta fase subclínica pode durar meses a anos (Harrus *et al.*, 1997; Waner & Harrus, 2000). Acredita-se que animais imunocompetentes são capazes de eliminar o parasita durante esta fase (Waner & Harrus, 2000, Neer & Harrus, 2006).

Os animais permanentemente infectados podem subsequentemente desenvolver a forma crónica e severa da doença (Waner & Harrus, 2000; Neer & Harrus, 2006). Nem todos os animais infectados desenvolvem esta fase, e as condições que levam ao seu desenvolvimento não são evidentes (Harrus *et al.*, 1997; Waner & Harrus, 2000). No entanto, apesar de não haver qualquer predisposição na idade, raça ou sexo para a EMC, (Waner & Harrus, 2000; M'ghirbi *et al.*, 2009) considera-se que algumas raças podem ter uma predisposição no que se refere à evolução da doença (McDade, 1990; Waner & Harrus, 2000; Hess, English, Hegarty, Brown & Breitschwerdt, 2006). O Beagle tende a tornar-se portador crónico de *E.canis* sofrendo depressões cíclicas e ligeiras, na contagem de células sanguíneas (McDade, 1990). Por outro lado o Pastor Alemão, desenvolve infecção crónica severa, possivelmente devido a uma fraca resposta celular imunomediada (McDade, 1990; Waner & Harrus, 2000).

Quanto à patogénese da EMC (Harrus *et al.*, 1998) demonstrou que o baço desempenha um importante papel. Resultados clínicos e hematológicos deste estudo revelam que o processo da doença foi mais ligeiro em cães esplenectomizados, do que em cães intactos. Devido a esplenectomia, foram removidos grandes quantidades de linfócitos e macrófagos, e assim as moléculas pirogénicas secretadas durante a infecção foram também reduzidas. Logo, sendo o animal esplenectomizado não desenvolveu febre sentindo-se melhor e não diminuindo o apetite (Harrus *et al.*, 1998). As alterações hematológicas nos dois grupos diferiram (tendo sido mais

severas nos não esplenectomizados) (Harrus *et al.*, 1998). Harrus *et al.* (1998) propõe que *E.canis* induz a produção e/ou a elaboração de um factor esplénico que inibe a hematopoiese. Este factor pode desempenhar um papel importante na supressão medular, na fase crónica da doença.

Um outro estudo (Castro, Machado, de Aquino, Alessi & Costa, 2004) demonstra um grande envolvimento também do baço e dos linfonodos, em particular das suas células de resposta imunológica. Este sugere que a vasculite imuno-mediada é fulcral no desenvolvimento da patogénese da EMC, explicando a maioria das lesões importantes observadas nos órgãos e tecidos afectados.

3.1.5- Sintomatologia

A apresentação clínica da EMC pode variar amplamente e está associada a sinais não específicos (Harrus *et al.*, 1997; Waner & Harrus, 2000; Breitschwerdt, 2004; Irwin, 2007b). Os sinais clínicos mais comuns de uma infecção aguda por *E.canis* são depressão, letargia, anorexia, febre, linfadenomegália, esplenomegália e hemorragias (principalmente petéquias, equimoses e epistaxis) (Harrus *et al.*, 1997; Neer *et al.*, 2002; Breitschwerdt, 2004; Neer & Harrus, 2006; Irwin, 2007b). Os sinais mais comuns numa infecção crónica são fraqueza, depressão, anorexia, perda de peso crónica, mucosas pálidas, febre, edema periférico, sinais oculares e sinais neurológicos (Waner & Harrus, 2000; Breitschwerdt, 2004). As manifestações oculares que podem ocorrer na EMC incluem uveíte anterior, queratoconjuntivite, úlceras na córnea, hifema, glaucoma e descolamento da retina (Harrus *et al.*, 1997; Laus, 2000; Panciera, Ewing & Confer, 2001; Neer & Harrus, 2006). Os animais também podem apresentar sinais neurológicos, estes estão associados a vasculite, meningoencefalite, infiltração linfocítica dos nervos centrais e periféricos, síndrome vestibular ou a hemorragias (Harrus *et al.*, 1997; Neer & Harrus, 2006). Poliartrite (devido à deposição de imunocomplexos) e polimiosite também são sinais da infecção por *E.canis* (Harrus *et al.*, 1997; Hanson, Tarpley, Latimer & Moore, 2005; Neer & Harrus, 2006). Patologia renal também foi associada a EMC devido a glomerulonefrite também por deposição de imunocomplexos (Harrus *et al.*, 1997).

3.1.6- Alterações hematológicas e bioquímicas

Os sinais laboratoriais mais comuns de uma infecção por *E.canis* não são específicos mas, associados aos sinais clínicos podem ser sugestivos (Cohn, 2003).

Trombocitopenia é a alteração hematológica mais frequente, na EMC aguda (Waner & Harrus, 2000; Alleman, 2005; Hanson *et al.*, 2005; M'ghirbi *et al.*, 2009). No entanto, quando não se

verifica esta alteração, não se deve excluir a possibilidade de uma infecção por *E.canis* (Neer & Harrus 2006). Esta alteração ocorre devido a diversos mecanismos inflamatórios e imunológicos, que levam a um aumento do consumo de plaquetas devido a altos valores séricos de anticorpos IgG antiplaquetários (Harrus, Waner, Weiss, Keysary & Bark, 1996; Hanson *et al.*, 2005). Também uma citocina sérica, FIMP (factor inibidor de migração plaquetária), foi encontrada em cães com ehrlichiose. Esta é produzida por linfócitos quando em contacto com monócitos infectados (Hanson *et al.*, 2005; Neer & Harrus 2006). Além destes dois mecanismos, o tempo de semi-vida das plaquetas também é diminuído devido ao sequestro esplénico (Hanson *et al.*, 2005).

No entanto, a medula óssea responde a esta persistente trombocitopénia, uma vez que uma semana após a infecção pode notar-se um aumento dos megacariócitos. Ao contrário do que acontece na fase crónica da doença em que se desenvolve uma pancitopénia resultante de hipocelularidade severa da medula óssea (Wardrop, 2010).

Na fase subclínica o achado hematológico mais comum é também a trombocitopénia, justificado pela superprodução de anticorpos anti-plaquetas devido à persistente presença e proliferação de *E. canis* (Waner, 1997). O aumento no tamanho das plaquetas nesta fase, sugere que a medula óssea está activa realizando trombocitopoiese (Waner, 1997). Nesta fase também se verifica uma ligeira neutropénia, no entanto os cães não ficam leucopénicos ou neutropénicos (Waner, 1997). Estes achados sugerem que uma ligeira trombocitopénia e ligeira leucopénia podem sugerir a continuidade de variadas alterações patológicas, e que portanto, não devem ser menosprezadas, já que estes animais podem ser portadores subclínicos de *E. canis* (Harrus, Waner, Bark, Jongejan & Cornelissen, 1999).

Durante a fase crónica da EMC verifica-se frequentemente trombocitopénia severa, leucopénia e anemia. A pancitopénia severa marca a fase crónica da doença, ocorrendo como resultado da depleção da medula óssea (Waner & Harrus, 2000).

Os sinais bioquímicos mais frequentes são hiperproteinémia, hiperglobulinémia, hipoalbuminémia e aumento dos valores de alanina aminotransferase (ALT) e da fosfatase alcalina (FAS) (Neer & Harrus 2006). A hiperproteinémia resulta do aumento sérico das globulinas e dos anticorpos (Neer & Harrus, 2006). Esta hiperglobulinémia geralmente é policlonal (Harrus *et al.*, 1999), no entanto a infecção por *E.canis* também foi associada a gamopatias monoclonais (Breitschwerdt, Woody, Zerbe, De Buyscher & Barta, 1987a; Breitschwerdt, 2004). Os casos de gamopatia monoclonal demonstram um pico nas proteínas IgG e a ocorrência de plasmocitose na medula óssea (Hohenhaus, 1995), estes casos podem levar a confundir-se a infecção por *E.canis* com mieloma (Neer & Harrus, 2006). Esta resposta

humoral do sistema imunitário é exagerada e não protectora, uma vez que os anticorpos não representam qualquer papel no que toca à eliminação de *E.canis* (Hess *et al.*, 2006; Neer & Harrus, 2006). Está também associada às consequências mais devastas da EMC crónica, como a síndrome de hiperviscosidade e glomerulonefrite (Neer & Harrus, 2006). A hipoalbuminémia ocorre em associação com uma nefropatia perdedora de proteína (síndrome nefrótico) ou associada a uma diminuição recíproca da albumina devido à hiperglobulinémia (Breitschwerdt, 2004). Outros achados laboratoriais importantes incluem proteinúria, hematúria, aumento do tempo de coagulação e aumento da radiopacidade intersticial pulmonar (Neer & Harrus 2006). A infecção por *E.canis* resulta no desenvolvimento de anticorpos específicos. Waner (1997) reporta o aumento da α 1-globulinas em cães com EMC, incluindo assim as IgA, as IgM e as IgG. Harrus, Day, Waner e Bark (2001) também demonstram no seu estudo de infecção natural e experimental de *E.canis*, o aumento da concentração de IgG a partir do décimo quinto dia pós-infecção, assim como a circulação de imunocomplexos 45 dias após a infecção. Esta grande produção de imunoglobulinas leva ao desenvolvimento de hiperglobulinémia podendo ser mono (IgG), ou policlonal (Hohenhaus, 1995). Esta hiperglobulinémia pode levar ao aparecimento de síndrome de hiperviscosidade, caracterizado por sinais geralmente associados ao aumento da viscosidade do sangue (Forrester & Rogers, 2000). A hiperviscosidade sanguínea está geralmente associada a uma gammopatia monoclonal do tipo A (maior propensão para formação de dímeros), mas também pode ocorrer associada a IgG embora de menor peso molecular pode originar hiperviscosidade (Forrester & Rogers, 2000). As consequências estão associadas à diminuição do aporte sanguíneo aos tecidos e resulta em sinais oftálmicos, neurológicos, cardíacos ou coagulação anormal (Forrester & Rogers, 2000).

3.1.7- Diagnóstico

A maior parte dos casos de EMC ocorrem em áreas endémicas durante a primavera e o verão, altura em que a população de ixodídeos está mais activa (Waner & Harrus, 2000). O diagnóstico de EMC é baseado na anamnese e nos sinais clínicos e laboratoriais. Os testes laboratoriais como a imunofluorescência indirecta, testes imunoenzimáticos (ELISA), PCR e *immunoblotting*, são testes que auxiliam na confirmação do diagnóstico.

No entanto, o diagnóstico pode ser confirmado de forma mais directa, através da visualização da mórula de *E.canis* a partir de esfregaços de sangue ou de aspirados de baço, pulmão e linfonodo. Encontrar a mórula de *E.canis* é muito difícil, embora, possa ser optimizada se o esfregaço foi feito a partir de sangue periférico, por exemplo dos capilares da orelha (Neer &

Harrus, 2006). As mórulas também podem ser visualizadas no líquido sinovial (Neer & Harrus 2006; Hanson *et al.*, 2005).

3.1.8- Tratamento e profilaxia

No tratamento das hemoparasitoses é importante ter em conta, que o animal pode necessitar de tratamento de suporte antes e/ou durante a terapêutica específica. Este aspecto é essencial uma vez que ao querermos fazer tudo de uma só vez, podemos perder tudo.

A tetraciclina e a oxitetraciclina foram consideradas os fármacos de eleição, e apesar de ainda terem actividade sobre *Ehrlichia canis*, actualmente a doxiciclina e a minociclina são usadas mais frequentemente. Estas podem ser administradas durante menos tempo que a tetraciclina continuando a ser eficazes (Neer & Harrus 2006). A posologia de doxiciclina recomendada para o tratamento da EMC é de 10mg/kg PO q24h durante 28 dias (Neer *et al.*,2002) . A administração desta droga pode ter efeitos adversos como náusea, vômito e diarreia. A esofagite e ulceração do esófago (que podem advir da doxiciclina PO), podem ser evitados se administrado com alimento e/ou diluído em água (Ramsey, 2011). O mecanismo de acção da doxiciclina ao inibir a síntese proteica dos agentes procariontes (interagindo com a subunidade 30S ribossomal), (Ramsey, 2011) restaura a fusão entre os lisossomas e os fagossomas (provavelmente inibindo a secreção da proteínas que impede a fusão destes) (Wells & Rikihisa, 1988; Neer *et al.*, 2002). O dipropionato de imidocarb tem sido bem sucedido no tratamento da EMC resistente (Neer & Harrus, 2006).

A melhor forma de prevenir a doença é fazendo o controlo dos vectores, no entanto, a administração de doxiciclina também se faz de forma profilática (Cohn, 2003)

3.1.9- Saúde pública

E.canis não é considerada um agente zoonótico. Contudo em 1996 foi isolado de um homem na Venezuela um agente semelhante a *E.canis* (*E.canis*-like), sugerindo um possível potencial zoonótico desta bactéria (Harrus, Wanner, Bjöersdorff & Shaw, 2005).

3.2-*Anaplasma phagocytophilum*

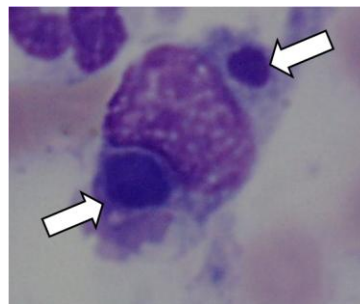
3.2.1- História e epidemiologia

A anaplasmoze granulocítica canina (antiga ehrlichiose granulocítica) causada por *Anaplasma phagocytophilum* (Dumler *et al.*, 2001; Harrus *et al.*, 2005; Greig & Armstrong, 2006), foi primeiramente descrito nos EUA por Madewell e Gribble em 1982 (citado por Woldehiwet, 2010). Este agente distribui-se por vários países do Hemisfério norte (EUA, e vários países da Europa e Ásia) (Santos, 2007; Greig & Armstrong, 2006) e afecta cães, gatos, cavalos, roedores, ruminantes e o Homem (Baneth, 2006; Ebani, Cerri, Fratini, Ampola & Andreani, 2008; Harrus *et al.*, 2005). A sua distribuição está intimamente correlacionada com a distribuição dos seus vectores (Santos, 2007). Na Europa o seu principal vector é *Ixodes ricinus* (Strle, 2004) contudo, em Portugal também foi reconhecido *I.ventaloi* (Santos, Santos-Silva, Almeida, Bacellar & Dumler, 2004).

3.2.2- Microestrutura

Anaplasma phagocytophilum é uma bactéria obrigatoriamente intracelular, de localização citoplasmática em vacúolos. Bactéria gram-negativa, de pequenas dimensões (0,2-2µm) e forma cocoide ou elipsoidal, pode-se apresentar de duas formas: *reticulate cells* (RC) nucleóide ligeiramente comprimido e disperso que se ligam à célula hospedeira, e *dense-cored cells* (DC) (Fig. 2) protoplasma condensado e denso intracelular (Santos, 2007; Popov *et al.*, 2007). Presente em células derivadas da medula óssea imaturas ou maduras, afecta principalmente neutrófilos mas também outros granulócitos como os eosinófilos, nos quais se multiplica por divisão binária. (Baneth, 2006; Harrus *et al.*, 2005; Carrade, Foley, Borjesson & Sykes, 2009)

Figura 2- Formas *dense-cored cells* de *A.phagocytophilum* (original)



Legenda: Formas *dense-cored* de *A.phagocytophilum* (setas), no citoplasma de monócito, colorado por Giemsa ampliado aproximadamente 5000x.

3.2.3- Ciclo de vida

- Hospedeiro invertebrado

Em Portugal os principais vectores de anaplasmosose são *Ixodes ricinus* e *I.ventalloi* (Santos *et al.*, 2004). Os ixodídeos infectam-se quando ingerem sangue de animais infectados (Nováková & Bronislava, 2010). Estudos demonstram que anaplasma tem capacidade de transmissão intraestadial (Hodzic *et al.*, 1998) e transovaricamente (Baldrige *et al.*, 2009).

- Hospedeiro vertebrado

A.phagocytophilum infecta diversos mamíferos (como referido), sendo que os roedores e os ruminantes são considerados na Europa hospedeiros reservatórios do agente (Harrus *et al.*, 2005). O cão e o Homem são considerados hospedeiros acidentais (Carrade *et al.*, 2009). A infecção é transmitida aos hospedeiros vertebrados pela mordida dos ixodídeos infectados, estudos (Plier, Breitschwerdt, Hegarty & Kidd, 2009) mostram que a transmissão da infecção para a descendência não ocorre em cães.

3.2.4- Patogénese

A patogénese da anaplasmosose granulocítica não está totalmente definida (Harrus *et al.*, 2005). As bactérias penetram na pele através da mordida do seu vector, e propagam-se pelo sangue e linfa. Bacteriémia é detectada em condições normais, 4 a 7 dias pós-infecção, este período é reduzido para 3 e 4 dias em animais susceptíveis, suspeita-se que este agente se desenvolva primeiramente nas células e só depois produza bacteriémia (Woldehiwet, 2010).

O anaplasma adere aos neutrófilos ligando-se a uma molécula membranar (P-selectin) que estes apresentam (Harrus *et al.*, 2005). Após a endocitose a bactéria multiplica-se nos fagossomas citoplasmáticos. O anaplasma tem a capacidade de impedir a fusão fagossoma-lisossoma, continuando a persistir na célula (Harrus *et al.*, 2005). A sua capacidade de adiar a apoptose dos neutrófilos infectados também contribui para perdurar no organismo (Carrade *et al.*, 2009). Estes factores juntamente com a variação antigénica das proteínas de superfície (Santos, 2007), constituem factores de virulência de *Anaplasma phagocytophilum*.

No entanto, a patogénese da anaplasmosose granulocítica não é somente causada pelo organismo em si, isto é sugerido pelo curso imunopatológico dos eventos em que há estimulação dos macrófagos mediado por citoquinas, actividade fagocitária mononuclear não específica e resposta inflamatória exagerada (Harrus *et al.*, 2005). As células endoteliais também podem ser infectadas por *Anaplasma phagocytophilum*, sugerindo que este fenómeno pode estar na origem da trombocitopénia devido à activação e consumo das plaquetas, uma vez que ao contrário de *E.canis* os fenómenos de destruição imuno-mediada e sequestro

esplénico não estão relacionados com a diminuição das plaquetas, na fase aguda da doença (Granick, Armstrong & Bender, 2009; Bexfield, Villiers & Herrtage, 2005). Outro dado a favor desta teoria, é o facto de haver proliferação de megacariócitos maduros e imaturos, na medula óssea (Lilliehöök & Egenvall & Tvedten, 1998). Porém, há casos relatados em que a trombocitopénia foi atribuída a uma destruição imuno-mediada (Bexfield *et al.*, 2005; Kohn, Galke, Beelitz & Pfister, 2008).

Todavia a infecção por *Anaplasma phagocytophilum* parece ser auto-limitante nos cães e não há relatos de infecções crónicas (Carrade *et al.*, 2009).

3.2.5- Sintomatologia

Os sinais clínicos mais comuns são letargia e febre (síndrome febril agudo), cujo período de incubação vai de 4 a 14 dias (Harrus *et al.*, 2005; Carrade *et al.*, 2009). Os cães com anaplasmoose granulocítica também podem apresentar anorexia, sinais gastrointestinais, sinais musculoesqueléticos como relutância ao movimento e claudicação, esplenomegália, linfadenomegália, e sinais neurológicos como convulsões e défices proprioceptivos. Também podem ocorrer manifestações sistémicas como hemorragias, choque e insuficiência multi-sistémica (Carrade *et al.*, 2009; Greig, Asanovich, Armstrong & Dumler, 1996; Kohn *et al.*, 2008).

3.2.6- Alterações hematológicas e bioquímicas

Fazem parte dos achados hematológico trombocitopénia, anemia normocítica e normocrómica de origem inflamatória (Lilliehöök *et al.*, 1998) ou auto-imune (Bexfield *et al.*, 2005) e leucopénia, sendo o primeiro, mais comum (Greig *et al.*, 1996; Lilliehöök *et al.*, 1998; Kohn *et al.*, 2008).

Nos sinais laboratoriais uma das principais alterações é o aumento sérico das enzimas hepáticas (Harrus *et al.*, 2005; Kohn *et al.*, 2008; Granick *et al.*, 2009). Outras como hiperglobulinémia, hipoalbuminémia e hiperproteinémia também se verificam (Kohn *et al.*, 2008; Carrade *et al.*, 2009).

3.2.7- Diagnóstico

A anaplasmoose granulocítica canina é uma doença sazonal e regional, pois a sua distribuição e aparecimento depende muito da actividade e distribuição do seu vector (Greig & Armstrong, 2006). O Médico Veterinário deve ter isto em conta, juntamente com os sinais clínicos (como

síndrome febril (Harrus *et al.*, 2005) e laboratoriais (como trombocitopénia) que o animal apresente à consulta. *A. phagocytophilum* pode ser detectado por observação microscópica das inclusões nos neutrófilos, em esfregaços de sangue corados por Giemsa. Este método tem a desvantagem de não permitir a distinção de *Anaplasma phagocytophilum* de espécies de *Ehrlichia* (Carrade *et al.*, 2009). Para colmatar este defeito pode-se utilizar outros meios de diagnóstico como IFI, ELISA, PCR e *Imunoblotting*.

3.2.8- Tratamento e profilaxia

O antibiótico de eleição para o tratamento da anaplasrose granulocítica canina é a doxiciclina (Carrade *et al.*, 2009; Greig & Armstrong, 2006; Harrus *et al.*, 2005). Na posologia de 5 a 10mg/kg PO durante 10 dias a 3 semanas (Harrus *et al.*, 2005). Na administração da doxiciclina devem ser tomadas medidas de precaução e devem ser considerados os seus efeitos adversos. No caso de *A.phagocytophilum* a melhor forma de profilaxia é o controlo de vectores,

3.2.9- Saúde Pública

A Anaplasrose granulocítica humana é uma infecção emergente, principalmente nos EUA (Harrus *et al.*, 2005). Os humanos infectados geralmente apresentam febre e dores de cabeça (enxaqueca) (Lotric-Furlan, Rojko, Petrovec, Avsic-Zupanc & Strle, 2006). A anaplasrose granulocítica humana geralmente é ligeira e auto-limitante, contudo, doença severa pode-se verificar em pessoas de avançada idade, imunossuprimidas e/ou que fazem quimioterapia (Carrade *et al.*, 2009).

Os cães actuam como sentinelas para os humanos, e têm um forte potencial como hospedeiros de transporte uma vez que trazem estes agentes para mais perto de nós (Carrade *et al.*, 2009).

3.3- *Rickettsia conorii*

3.3.1- História e Epidemiologia

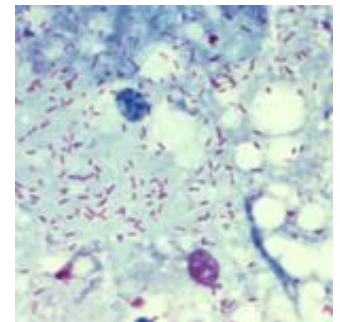
A febre Botonosa ou *Mediterranean spotted fever* (MSF) é causada por *Rickettsia conorii* e é uma das rickettsioses transmitidas por ixodídeos mais importantes em Portugal (Bacellar, Nuncio, Rehácek & Filipe, 1991; Rovey, Brouqui & Raoult, 2008). A MSF foi primeiramente descrita em 1910, (Rovey *et al.*, 2008) e é uma doença endémica na região mediterrânica (sul

da Europa e norte de África). Foram também descritos casos na Algéria, Malta, Cipro, Eslovénia, Croácia, Quênia, Somália, África do Sul e em países da zona do mar negro (Roverly *et al.*, 2008). Zhu, Fournier, Eremeeva e Raoult (2005) propuseram, a criação de 4 subespécies da espécie *Rickettsia conorii*: *Rickettsia conorii conorii*, *Rickettsia conorii indica*, *Rickettsia conorii caspia* e *Rickettsia conorii israelensis*. A bioecologia da *Rickettsia conorii* está interligada com a distribuição do seu vector (Renvoisé & Raoult, 2009).

3.3.2- Microestrutura

R. conorii é uma bactéria intracelular estrita, de dimensões 0,3-0,5x0,8-2µm, gram negativa cercada por um glicocálice (Renvoisé & Raoult, 2009) (Fig. 3). Disseminam-se amplamente pelo organismo infectando as suas células alvo, as células endoteliais (Li & Walker, 1992). A ligação inicial entre a bactéria e as células endoteliais é feita através de proteínas estruturais da célula e do microrganismo (Li & Walker, 1992).

Figura 3- *R. conorii* em células endoteliais



Legenda: Adaptado de http://www.infectionresearch.de/perspectives/detail/pressrelease/rickettsia_old_enemies_newly_defined/, acessado a 6/5/11, ampliação aproximadamente 2000x

3.3.3- Ciclo de vida

- Hospedeiro Invertebrado

O principal vector transmissor de *R. conorii* é a espécie *Rhipicephalus sanguineus* (Sousa *et al.*, 2007; Bacellar *et al.*, 1991; Renvoisé & Raoult, 2009; Roverly *et al.*, 2008; Sousa & Bacellar, 2004). Os ixodídeos infectam-se de duas formas: através da ingestão de sangue de um animal infectado ou pela transmissão à descendência, transovaricamente (Greene & Breitschwerdt, 2006).

- Hospedeiro Vertebrado:

Os hospedeiros e reservatórios da febre botonosa são o cão e os roedores. O Homem é um hospedeiro acidental de *Rickettsia conorii*, pois o ixodídeo só se alimenta deste se não houver cão disponível (Greene & Breitschwerdt, 2006; Parola, Paddock & Raoult, 2005a). No entanto, certos autores (Genchi, Beninati, Mortarino & Genchi, 2005) defendem que uma vez que os sinais são praticamente ausentes, os cães não podem actuar como reservatórios (como os ixodídeos). Todavia a seroprevalência é importante que seja definida uma vez que podem servir de sentinelas para os humanos (Genchi *et al.*, 2005). Estes hospedeiros são infectados pelos ixodídeos através da sua mordedura (Greene & Breitschwerdt, 2006).

3.3.4- Patogénese

Muitos aspectos da patogénese de *R.conorii* são ainda desconhecidos, e o estudo por modelos é difícil de extrapolar uma vez que a doença provocada pelas rickettsias varia amplamente de espécie para espécie (Parola *et al.*, 2005a). As rickettsias são veiculadas pela saliva dos ixodídeos e inoculadas subcutaneamente nos hospedeiros (Renvoisé & Raoult, 2009). A infecção inicia-se no local de inoculação, no entanto as células alvo iniciais não são conhecidas. A bactéria entra então em circulação acabando-se por ligar e penetrar nas células alvo principais, as células endoteliais (Renvoisé & Raoult, 2009). Segue-se o desenvolvimento de vasculite, responsável pelas manifestações clínicas e alterações laboratoriais (Renvoisé & Raoult, 2009; Sousa & Bacellar, 2004).

Um estudo de Walker, Popov, Wen e Feng (1994) mostra o desenvolvimento do processo patológico em ratos. Este demonstra que os animais nos quais se inoculou uma grande dose do agente patogénico, desenvolveram uma infecção endotelial disseminada no dia 1, ficando progressivamente mais doentes até morrerem dia 5 ou 6 com meningoencefalite e pneumonia intersticial devido a lesões vasculares. Os animais inoculados com doses menores ficaram doentes ao dia 5 e ao dia 10 já tinham recuperado. A remoção das rickettsias foi associada com perivasculite linfocitária. A infecção das células de Kupfer e dos hepatócitos pelas bactérias, levou à formação transitória de granulomas hepáticos (Walker *et al.*,1994).

3.3.5- Sintomatologia e alterações hematológicas e laboratoriais

Os cães geralmente são subclínicos (Nicholson, Allen, McQuiston, Breitschwerdt & Little, 2010; Parola *et al.*,2005a), no entanto, Solano-Gallego *et al.*, (2006b) e Alexandre (2011) reportaram manifestações da doença. Febre de início súbito, letargia, anorexia, vômito, diarreia, petéquias, trombocitopenia, anemia, aumento ligeiro das enzimas hepáticas e hipoalbuminemia (com ou sem hiperglobulinemia) foram sinais apresentados pelos animais que apresentavam infecção aguda. Estes sinais são muito similares aos apresentados pelos humanos, no caso de infecção aguda por *R.conorii* (Parola *et al.*, 2005a).

3.3.6- Diagnóstico

Como referido a infecção por *Rickettsia conorii* em cães geralmente é subclínica, e quando se manifesta clinicamente, geralmente é aguda (Solano-Gallego *et al.*, 2006b). Os seus sinais inespecíficos representam um grande desafio ao diagnóstico. Os meios complementares de

diagnóstico (IFI, ELISA, WB e PCR) são ferramentas importantes no estabelecimento do diagnóstico definitivo, no entanto, o clínico deve ter em atenção o carácter endémico e subclínico da doença e procurar outras causas para o quadro clínico.

3.3.7- Tratamento e profilaxia

O tratamento da febre botonosa pode ser feito com doxiciclina (Greene & Breitschwerdt, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2006b) 10-20mg/Kg PO bid, durante 1 semana (Greene & Breitschwerdt, 2006). A sintomatologia deve resolver-se em poucos dias (Solano-Gallego *et al.*, 2006b). A profilaxia realiza-se através do controlo de vectores.

3.3.8- Saúde Pública

As infecções rickettsiais são Zoonoses de grande importância, devido à sua natureza endémica, à sua grande prevalência e à sua gravidade quando mal tratadas ou mal diagnosticadas (Greene & Breitschwerdt, 2006). A febre botonosa é uma doença emergente ou mesmo reemergente em alguns países, por exemplo em Portugal e Itália a incidência desta doença aumentou substancialmente (Rovero *et al.*, 2008; Sousa, Nóbrega, Bacellar & Torgal, 2003). A febre botonosa sempre foi considerada uma doença benigna em comparação com a *Rocky Mountain Spotted Fever* (RMSF), e devido a esta negligência a sua real gravidade foi ignorada (Rovero *et al.*, 2008). Na verdade, a taxa de mortalidade da doença pode variar entre 3,2% e 32%, (Rovero *et al.*, 2008). Sousa *et al.* (2003) refere mesmo que a febre botonosa é a hemoparasitose transmitida por carraça mais importante em Portugal, e segundo Sousa e Bacellar (2004) só se equipara à brucelose.

A capacidade que a bactéria tem, de ser transmitida intrastadialmente e transovaricamente, no seu vector, faz de *Rhipicephalus sanguineus* um hospedeiro reservatório. Mais controversa é a opinião no caso dos cães. Contudo, são importantes como hospedeiros transporte, uma vez que trazem para mais perto dos humanos os ixodídeos infectados (Rovero *et al.*, 2008). E sendo que a maior via de infecção com *Rickettsia conorii* é a transmissão pelo seu vector, a presença de ixodídeos infectados na proximidade do Homem é provavelmente o maior factor de risco de infecção humana (Harrus *et al.*, 2007). Com isto em mente, o papel do Médico Veterinário é muito importante na educação da população, no que toca ao tratamento profilático contra estes vectores de doenças (Harrus *et al.*, 2007).

Autores Breitschwerdt *et al.* (1987b) e Harrus *et al.* (2007), através dos seus estudos seroepidemiológicos, sugerem que os cães servem como sentinelas ambientais para o estabelecimento geográfico de focos de febre botonosa em regiões endémicas.

3.4- *Babesia canis*

3.4.1- História e epidemiologia

Até recentemente pensava-se que apenas dois parasitas do género *Babesia* afectavam os cães, o piroplasma intra-eritrócitário relativamente grande (2,4µm x 5µm) classificado como *Babesia canis*, e um de menores dimensões (1µm x 3,2µm) a espécie *Babesia gibsoni*, agente da Babesiose asiática (Taboada & Lobetti, 2006; Irwin, 2007a). No final dos anos 80 com o avanço de ferramentas moleculares para estudos filogenéticos, identificaram-se 4 espécies de grandes dimensões e pelo menos outras 4 de pequenas dimensões (Irwin, 2009).

Babesia canis é um parasita que se encontra disseminado por todo o mundo (África, Ásia, Austrália, Europa, e América) (Taboada & Lobetti, 2006) , sendo Portugal considerado um país endémico à babesiose (Cardoso *et al.*, 2008).

Em Portugal as subespécies de *Babesia canis* importantes são *Babesia canis vogeli* e *Babesia canis canis* (Solano-Gallego & Baneth, 2011), transmitidas por *Rhipicephalus sanguineus* e por *Dermacentor reticulatus*, respectivamente (Irwin, 2009; Cardoso *et al.*,2008; Navarrete & Nieto, 1999; Cacciò *et al.*, 2002). A ocorrência e distribuição da babesiose está sujeita à distribuição e actividade dos seus vectores (Irwin, 2009; Martinod & Gilot, 1991; Cacciò *et al.*, 2002).

3.4.2- Microestrutura

B.canis é um protozoário piriforme, que pode ocorrer isoladamente ou sob a forma dupla, dentro dos eritrócitos do seu hospedeiro vertebrado, o cão (Taboada & Lobetti, 2006). Estas formas designam-se merozoítos, e ocorrem por multiplicação assexuada (Gelfand & Callahan, 2003; Navarrete & Nieto, 1999).

3.4.3- Ciclo de vida

- Hospedeiro Invertebrado

Os vectores biológicos da espécie *Babesia canis* em Portugal, são os ixodídeos *Rhipicephalus sanguineus* e *Dermacentor reticulatus* (Irwin, 2009; Cardoso *et al.*,2008; Navarrete & Nieto, 1999; Cacciò *et al.*, 2002; Finizio *et al.*, 2011).Os ixodídeos infectam-se por ingestão de sangue de um hospedeiro vertebrado infectado (Solano-Gallego & Baneth, 2011).No intestino do

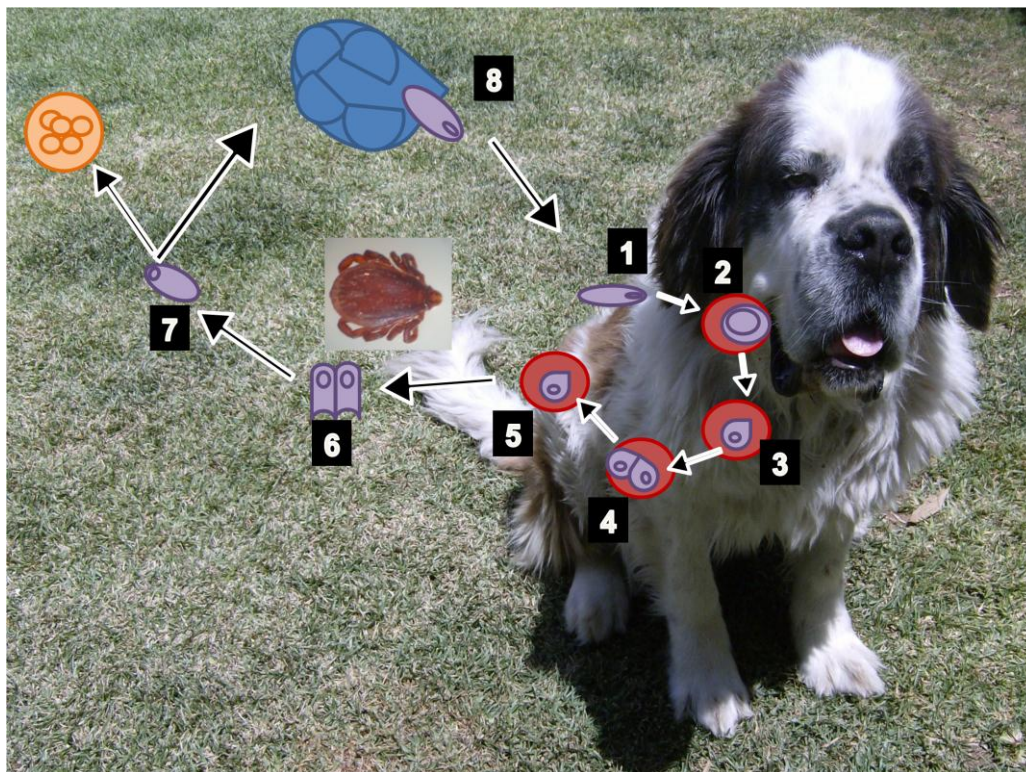
ixodídeo dá-se a gametogenia (reprodução sexuada), (Solano-Gallego & Baneth, 2011) segue-se a migração do parasita para os ovários e glândulas salivares onde se dá a esporogonia (reprodução assexuada) (Chauvin, Moreau, Bonnet, Plantard & Malandrin, 2009). A capacidade de transmissão transovárica e transtadial exibida pela *Babesia* spp. revela uma grande capacidade adaptativa. O facto de *babesia* persistir em todos os estadios do ixodídeo, significa que tanto este como o hospedeiro vertebrado são hospedeiros reservatório. Isto reflecte-se no ecossistema como uma presença da doença a longo prazo (Chauvin *et al.*, 2009).

- Hospedeiro Vertebrado

Os hospedeiros vertebrados de *Babesia canis* são canídeos (cão, lobo e chacal), nestes desenvolve-se a merogonia (reprodução assexuada) (Navarrete & Nieto, 1999). Os hospedeiros vertebrados são infectados pela inoculação de esporozoítos com a saliva durante a picada do ixodídeo. Os esporozoítos penetram nos eritrócitos e dividem-se dentro deste, por fusão binária, originando 2 merozoítos. Após a lise do eritrócito, cada merozoíto invade um novo eritrócito e ocorrem sucessivas merogonias (Chauvin *et al.*, 2009).

Está comprovado que *Babesia* spp. também pode ser transmitida por transfusões de sangue (Irwin, 2007a) e transplacentariamente (Taboada & Lobetti, 2006) .

Figura 4- Esquema do ciclo de vida de *Babesia canis*.



Legenda: Esquema original, baseado em Irwin (2005). 1-Esporozoítos são inoculados na corrente sanguínea pelo ixodídeo. 2- Tropozoítos (forma anelar). 3- Merozoítos. 4- Fisão binária. 5- Eritrócito infectado ingerido pelo ixodídeo. 6- Deu-se a lise do eritrócito e liberação da babesia, ocorre o desenvolvimento de gamontes e a sua fusão e formação do zigoto. 7- O zigoto migra para os ovários (laranja) e para as glândulas salivares (azul), onde se dá a esporogonia. 8- Durante a refeição o ixodídeo liberta esporozoítos da suas glândulas salivares introduzindo-os na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado.

3.4.4- Patogénese

A gravidade da infecção por *B.canis* nos cães varia entre infecção subclínica, desenvolvimento de uma anemia ligeira a uma falha geral dos órgãos e morte. A determinante crítica para esta variabilidade na patogénese é, fundamentalmente, à espécie a que pertence o piroplasma, porém, outros factores como a idade (jovens mais gravemente afectados) (Schoeman, 2008; Máthé, Vörös, Papp & Reiczigel, 2006), o estado imunológico do hospedeiro e afecções concomitantes também desempenham um papel importante (Irwin, 2009). Acredita-se que existe alguma predisposição rásica, que umas são mais resistentes (como o Beagle e o Fox Terrier) e outras mais susceptíveis (como o Cocker Spaniel e o Yorkshire Terrier) (Chauvin *et al.*, 2009). Não se verifica relação directa entre o grau de parasitémia e o grau de doença

(Navarrete & Nieto, 1999). O período de incubação varia entre 10 e 21/28 dias (Schoeman, 2008; Boozer & Macintire, 2003).

Quanto aos mecanismos de evasão imunitária utilizados por *Babesia* spp pelo menos cinco são conhecidos. São eles: variação antigénica, citoadesão/sequestro, ligação a proteínas do hospedeiro, indução de imunossupressão (facilitando a persistência do parasita) e expressão monoalélica de diferentes membros de uma família multigénica (que facilitará múltiplas infecções num hospedeiro imune e dispersão populacional em áreas endémicas) (Allred, 2003). A patogenia da babesiose é muito complexa, muitos dos mecanismos patogénicos resultam, na verdade, da resposta imunitária do hospedeiro ao invés da destruição directa dos eritrócitos pelo parasita. Dois mecanismos estão envolvidos na patogenia da babesiose: a anemia hemolítica e a síndrome do choque hipotensivo induzido por mediadores inflamatórios (Boozer & Macintire, 2003).

A anemia hemolítica é uma das principais características da babesiose. Ocorrem danos provocados directamente aos eritrócitos, hemólise intra e extravascular. Anticorpos anti-eritrócitos, IgG, oxidação eritrocitária, fagocitose, fragilidade osmótica e factores hemolíticos estão envolvidos na destruição dos glóbulos vermelhos (Otsuka, Yamasaki, Yamato & Maede, 2002; Taboada & Lobetti, 2006).

A babesiose não anémica está associada a uma grande resposta inflamatória mediada por citocinas, óxido nítrico, factor activador das plaquetas e eucasinóides (Boozer & Macintire, 2003). Esta resposta inflamatória é dos aspectos mais importantes da patogénese da babesiose e estará correlacionada com a síndrome de resposta inflamatória sistémica e a síndrome de disfunção multi-orgânica subsequente (Welzl, Leisewitz, Jacobson, Vaughan-Scott & Myburgh, 2001).

A síndrome “red biliary” ou “red babesia” é geralmente superaguda e associada a uma hemólise maciça e aumento da permeabilidade vascular, originando um estado de hemoconcentração (Boozer & Macintire, 2003). É um fenómeno paradoxal uma vez que existe hemoconcentração apesar das proteínas plasmáticas se encontrarem nos níveis normais (Taboada & Lobetti, 2006).

Antigénios solúveis do parasita (ASP) também estão envolvidos na anemia (Boozer & Macintire, 2003) e noutros sinais como a pirexia (Finizio *et al.*, 2011).

Em muitos casos a babesiose pode ser complicada por infecções concomitantes, como por exemplo *Ehrlichia canis* (Boozer & Macintire, 2003).

3.4.5- Sintomatologia

A apresentação clínica da babesiose canina é altamente variável (Matijatko *et al.* 2007) e pode resultar nas fases hiperaguda, aguda, subclínica ou crônica (Taboada & Lobetti, 2006). A manifestação hiperaguda, apesar de pouco comum pode ser devastadora para o animal (Taboada & Lobetti, 2006). É caracterizada por choque hipotensivo, hipóxia, lesão extensa tecidual, e estase vascular. Uma grande percentagem de cães com esta forma da doença morre, apesar do tratamento (Taboada & Lobetti, 2006).

A fase aguda da doença é a mais comum e os primeiros sinais clínicos são febre e letargia (Taboada & Lobetti, 2006; Máthé *et al.*, 2006). Os animais também podem apresentar anorexia, vômito, hematuria e icterícia (Taboada & Lobetti, 2006).

A fase crônica da doença é caracterizada por febre intermitente, linfadenopatia, diminuição do apetite e perda de peso (Taboada & Lobetti, 2006).

Hepatopatias, pancreatite, insuficiência renal aguda, e coagulação intravascular disseminada, são complicações frequentes da babesiose canina. Anemia hemolítica imunomediada, síndrome de dificuldade respiratória aguda e babesiose cerebral são complicações relativamente raras (Máthé *et al.*, 2006).

3.4.6- Alterações hematológicas e bioquímicas

Os achados hematológicos mais comuns são trombocitopenia, hiperfibrinogénemia e anemia hemolítica tanto associada a anisocitose e policromasia (regenerativa) como não(não regenerativa) (Solano-Gallego & Baneth, 2011; Furlanello, Fiorio, Caldin, Lubas & Solano-Gallego, 2005; Zygner, Gójska, Rapacka, Jaros & Wedrychowicz, 2007).

Também se podem verificar alterações no leucograma, como neutrofilia com desvio à esquerda, no entanto, estas alterações parecem estar dependentes da subespécie causadora da doença (Furlanello *et al.*, 2005).

Os valores séricos bioquímicos geralmente estão normais (Taboada & Lobetti, 2006). No entanto, os animais podem apresentar um aumento sérico da mioglobina, da creatinina kinase, da ureia, das enzimas hepáticas, das globulinas e da bilirrubina (Taboada & Lobetti, 2006; Boozer & Macintire, 2003; Schoeman, 2008). O animal também pode apresentar bilirrubinúria (Boozer & Macintire, 2003).

3.4.7- Diagnóstico

O diagnóstico deve ser baseado na anamnese, nos sinais clínicos e laboratoriais.

A detecção microscópica das babesias pode ser feita a partir de esfregaços de sangue corados por Giemsa (Taboada & Lobetti, 2006; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Gelfand & Callahan, 2003). Este teste é considerado “*gold standard*” (Irwin, 2007a), no entanto, este teste contém as suas limitações. Primeiro, o grau de parasitemia não está relacionado com o grau de doença que o animal aparenta, podendo um animal com um alto grau de doença apresentar uma baixa parasitemia, assim como num doente crónico (Taboada & Lobetti, 2006; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Boozer & Macintire, 2003; Irwin, 2007a). Segundo, a simples visualização não nos permite a identificação da espécie (Irwin, 2007a). Estas duas lacunas podem ser colmatadas com o auxílio de outros métodos complementares de diagnóstico (IFI, ELISA e PCR) (Irwin, 2007a; Aboge *et al.*, 2007; Irwin, 2009; Taboada & Lobetti, 2006) .

Para os testes que fazem a detecção de anticorpos é importante reconhecer que os anticorpos anti-babesia levam 8 a 10 dias a desenvolver-se (Boozer & Macintire, 2003).

3.4.8- Tratamento e profilaxia

Para o tratamento de *Babesia canis* é eficaz o dipropionato de imidocarb (Taboada & Lobetti, 2006) (6,6mg/kg; IM ou SC; duas injeções com o intervalo de 2 a 3 semanas) (Ramsey, 2011). Os seus mecanismos de acção não são claros mas pensa-se que interfira com a absorção do inositol pelo eritrócito parasitado ou com o metabolismo da poliamida. Este tratamento pode ter efeitos adversos como sinais colinérgicos (salivação, vômito, diarreia, agitação, taquipneia e choque hipovolémico severo), que podem ser aliviados pela administração prévia de atropina. O local de injeção pode sofrer ligeira inflamação (Ramsey, 2011). O imidocarb além de eliminar o parasita do hospedeiro, elimina também a infectividade por ixodídeos (Vercammen, De Deken & Maes, 1996), até 4 semanas após o tratamento (Taboada & Lobetti, 2006) .

A diamizina em administração única IM ou SC na dose 3,5mg/kg, também pode ser utilizada no tratamento da babesiose canina (Schoeman, 2008, Taboada & Lobetti, 2006). No entanto, estudos Collett (2000) citado por Boozer (2003) confirmaram um grande número de resistentes e/ou recidivas aquando do uso da diamizina.

Estudos (Vercammen, De Deken & Maes, 1996) demonstram a eficácia da doxiciclina no tratamento profilático da babesiose canina. Relatam que na dose de 5 mg/kg/dia evita sintomas fortes da doença e que numa dose superior 20mg/kg/dia previne parasitemia e doença clínica.

A vacina contra *Babesia canis* é baseada em antígenos solúveis do parasita (ASP). Existem vacinas que veiculam só os ASP de uma estirpe e outra que veicula os ASP de duas estirpes da *Babesia* spp. Quando se usa a vacina que se baseia apenas nos ASP de uma estirpe o espectro de protecção é mais estreito (Schetters, 2005). Ambas as vacinas induzem protecção parcial contra a babesiose, uma vez que reduzem a gravidade dos sinais clínicos, parasitémia e duração da doença (Solano-Gallego & Baneth, 2011).

3.4.9- Saúde Pública

A babesiose é uma zoonose emergente em muitas partes do mundo, no entanto, com algumas excepções, as babesias características dos animais de companhia não estão implicadas na transmissão zoonótica (Irwin, 2005). Aparentemente não existe nenhuma babesia que tenha como hospedeiro específico o Homem, este quando afectado é apenas um hospedeiro accidental.

A doença que apresenta é normalmente ligeira, auto-limitante ou facilmente tratável, doença severa é extremamente rara (Taboada & Lobetti, 2006). A babesiose humana torna-se mais importante nos indivíduos imunocomprometidos e deve ser considerada no diagnóstico diferencial de infecção ou de febre de origem desconhecida especialmente em pacientes esplenectomizados, que receberam uma transfusão de sangue ou portadores do vírus da SIDA (Hunfeld, Hildebrandt & Gray, 2008). Apenas uma vez foi reportada babesiose humana devido a *B.canis*, com sintomatologia renal aguda (Marsaudon *et al.*, 1995 citado por Taboada e Lobetti, 2006). Porém deve-se ter em conta, que os nossos cães nos expõem a vectores, que muitas vezes veiculam organismos que poderão afectar-nos mais severamente (Taboada & Lobetti, 2006).

3.5- *Leishmania infantum*

3.5.1- História e epidemiologia

Leishmania infantum é o agente da Leishmaniose na região Mediterrânea (Baneth, Day, Roura & Shaw, 2005; Campino & Maia, 2010; Baneth, 2010b). A Leishmaniose canina é uma das principais doenças zoonóticas e é endémica em mais de 70 países, (Baneth, 2010b) incluindo Portugal (Maia *et al.*, 2010a) onde os casos de Leishmaniose têm vindo a aumentar (Observatório nacional das Leishmanioses, 2011). É enzoótica no sul da Europa, África, Ásia, América do Sul e Central, e mais recentemente emergiu nos EUA (Baneth, 2010b). A

leishmaniose foi descrita pela primeira vez na Tunísia em 1908 por Nicolle e Comte (Pereira, 2008). A Leishmaniose é um grupo de doenças com um padrão clínico diverso, (Dantas-Torres, 2007) assim, baseado nos sintomas apresentados pelos humanos, a doença pode ser classificada em Leishmaniose cutânea, muco-cutânea e visceral. *Leishmania infantum* é o agente da leishmaniose cutânea e visceral, na Europa (Tomás & Romão, 2008; Slappendel & Ferrer, 2006; Baneth *et al.*, 2005; Baneth, 2010b).

As taxas de prevalência da Leishmaniose canina em zonas endémicas variam dependendo das condições ambientais necessárias à transmissão e dos métodos utilizados na detecção da infecção. A seroprevalência varia entre 10 e 37% no foco endémico mediterrânico. Métodos que implicam a detecção de ADN das leishmanias ou combinados de serologia e detecção de ADN, revelaram taxas de infecção de 70% nalguns focos (Baneth *et al.*, 2005; Baneth, 2010b).

3.5.2- Microestrutura

As espécies de leishmania definem-se como protozoários heteroxenos, com uma fase promastigota no insecto vector e uma fase amastigota nos macrófagos do hospedeiro vertebrado (Moreno, Nieto & Rodriguez, 1999). O promastigota é fusiforme (15 x 3µm) e possui um flagelo livre, a forma amastigota é ovoíde (2 x 4 µm) e possui um cinetoplasto (estrutura próxima do núcleo observada microscopicamente quando corado por exemplo com Giemsa). Esta forma no hospedeiro vertebrado após a sua divisão nos macrófagos, sai da célula infectando outros macrófagos (Tomás & Romão, 2008).

3.5.3- Ciclo de vida

- Hospedeiro Invertebrado

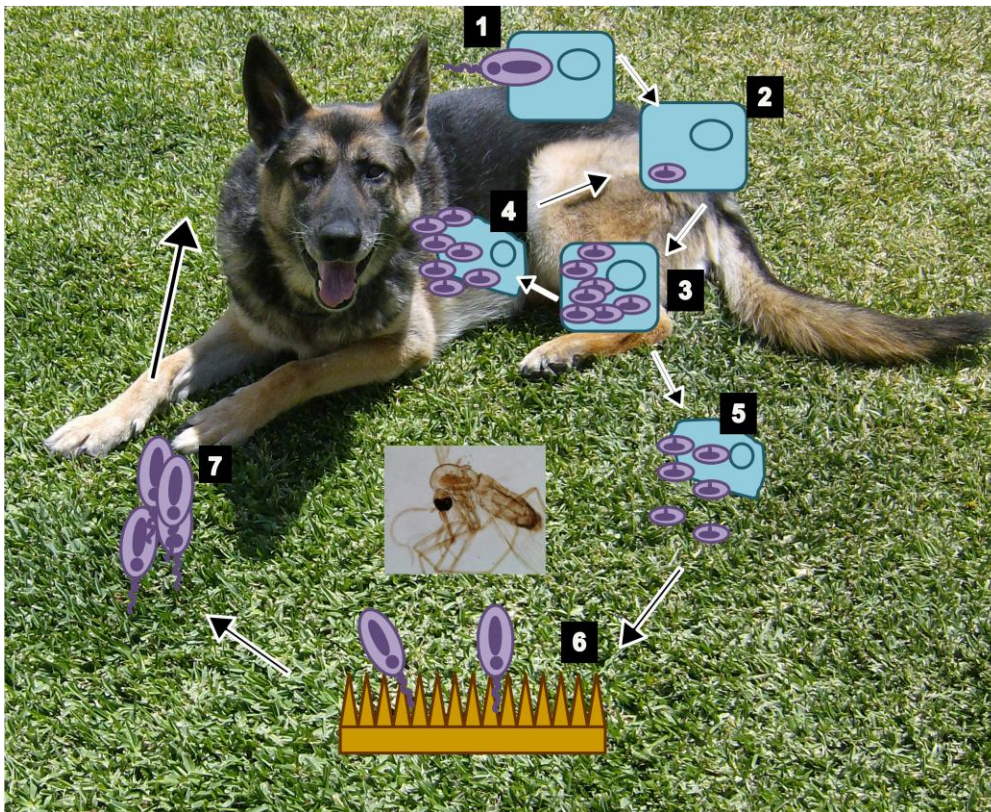
Phlebotomus perniciosus e *P. ariasi*, são os vectores de *Leishmania infantum* em Portugal (Maia, Afonso, Neto, Dionísio & Campino, 2009). Este infecta-se pela ingestão de sangue a partir de animais infectados. O parasita desenvolve-se então, no trato digestivo do mosquito onde ocorrem alterações morfológicas, propagação e migração para a parte anterior do mesmo (Dostálová *et al.*, 2011).

- Hospedeiro Vertebrado

O cão doméstico, as raposas e os chacais são hospedeiros vertebrados de *Leishmania infantum*, desempenhando um importante papel epidemiológico uma vez que são considerados hospedeiros reservatórios da doença. O cão é considerado o principal hospedeiro reservatório para a infecção humana (Baneth *et al.*, 2005). À semelhança de outros países também em Portugal foi detectada a infecção por *Leishmania infantum* em gatos, o papel epidemiológico

destes ainda estará por se definir (Maia *et al.*, 2010a). A principal via de infecção dos animais é através da picada do flebótomo fêmea (Baneth *et al.*, 2005; Baneth, 2010b; Dostálová *et al.*, 2011). No entanto, existem outras formas de transmissão. Estudos (Freitas, Melo, da Costa-Val & Michalick, 2006) demonstram que *L.infantum* pode ser transmitida por transfusões sanguíneas. Silva *et al.*, (2009) sugere a transmissão sexual entre os animais. Boggiatto *et al.*, (2011) demonstra a transmissão por via transplacentária e sugere que este facto pode constituir um problema uma vez que o controlo dos vectores passa a não ser suficiente para a não disseminação da doença.

Figura 5- Esquema de ciclo de vida de *Leishmania infantum*



Legenda: Esquema original, baseado em Baneth *et al.* (2005) 1- Durante a refeição sanguínea realizada pelo flebótomo, são inoculados com a saliva os promastigotas de leishmania, que são fagocitados pelos macrófagos. 2- Os promastigotas passam a formas amastigotas dividem-se por divisão binária. 3-O macrófago com as formas amastigotas pode 4- rupturar infectando mais células do hospedeiro vertebrado ou 5- ser ingerido por um flebótomo infectando-o. 6- Os amastigotas desenvolvem-se em promastigotas no sistema digestivo do flebótomo, multiplicando-se. 7- Quando atingem o proboscis do flebótomo são libertados durante a refeição do mesmo.

3.5.4- Patogénese

Cabral *et al.* (1998) demonstram que uma proporção da população canina não desenvolve sinais clínicos, permanecendo portadores assintomáticos de *L.infantum*. Um importante factor na progressão da doença para um estado sintomático ou assintomático, é a resposta imunológica que é montada pelo hospedeiro no momento que é infectado e daí em diante (Baneth, 2010b). Os cães que resistem à infecção e eliminam o parasita são denominados “cl clinicamente resistentes” e os que desenvolvem sintomas “susceptíveis” (Baneth, 2010b).

Numa infecção o parasita na sua forma promastigota é inoculado na pele do animal, dá-se então a infiltração de macrófagos nesse local aos quais *L.infantum* se adere (Baneth *et al.*, 2005). Seguidamente é fagocitada pelos macrófagos e transformada na sua forma amastigota, fenómeno que tem origem no reconhecimento da glicoproteína 63 da membrana do parasita (Alexandre-Pires, 2008).

Em animais susceptíveis a disseminação de macrófagos infectados para o linfonodo local, baço e medula ocorre poucas horas após a inoculação. Nos animais resistentes o parasita permanece circunscrito ao local de infecção ou, no pior dos cenários, circunscrito ao linfonodo local (Baneth *et al.*, 2005). O período de incubação para os animais susceptíveis pode variar de meses a anos, alguns autores (Slappendel & Ferrer, 2006; Miró, Cardoso, Pennisi, Oliva & Baneth, 2008) definem mesmo um período até ao aparecimento dos sinais clínicos entre 3 meses e 7 anos. A idade de distribuição da doença é bimodal com um pico de prevalência entre o 2-4anos e outro aos 7, no entanto todos os animais de todas as idades podem ser infectados (Baneth, 2010b) .

No animal monta-se uma resposta celular (Th1) e humoral (Th2) à leishmania. Os cães nos quais a resposta imunitária prevalente é a Th2 (humoral), desenvolvem doença progressiva e crónica. Naqueles cuja resposta imunológica principal é a Th1 (celular) a tendência é o não desenvolvimento de uma doença clínica ou apenas de uma ligeira e auto-limitante. Neste aspecto julga-se haver uma forte componente genética (Baneth *et al.*, 2005). Isto é comprovado por estudos (Altet, Francino, Solano-Gallego, Renier & Sánchez, 2002; Quinnell *et al.*, 2003) que sugerem que, no que respeita à susceptibilidade dos animais à infecção por *L.infantum*, existe uma associação genética. Animais com o alelo DLA-DRB1 (Quinnell *et al.*, 2003) e/ou o gene Slc11a1 (Altet *et al.*, 2002) são mais susceptíveis à infecção.

Existem diferenças claras nas respostas montadas por animais resistentes e animais susceptíveis. Nos primeiros, é montada uma resposta imunológica reduzida, mas uma forte resposta intradérmica à leishmania, e uma produção de citocinas relacionadas com Th1 em resposta ao estímulo antigénico. Os linfócitos destes animais resistentes, apresentam uma forte

capacidade de matar os parasitas. Esta acção é restrita à classe II do complexo de histocompatibilidade (MHC) e mediada pelos linfócitos CD8+ (NK) e CD4+ (T) que produz a citocina IFN- γ (Baneth *et al.*, 2005; Alexandre-Pires, 2008; Alexandre-Pires *et al.*, 2010).

Nos animais susceptíveis, há uma grande produção de anticorpos, mas uma fraca resposta celular o que os torna mais sensíveis à infecção (Guarga *et al.*, 2000; Baneth *et al.*, 2005). Os neutrófilos e os macrófagos destes animais, têm uma fraca capacidade de aniquilar as formas de leishmania. A resposta dominante Th2 tem um forte papel na patogénese da doença. Nestes animais ocorre uma produção de anticorpos policlonais devido à activação não específica dos linfócitos B que gera uma hiperplasia folicular linfóide e uma hipergamaglobulinémia sérica geralmente policlonal, por vezes monoclonal (do tipo IgG). Esta excessiva produção de anticorpos produz uma lesão tecidual e celular semelhante a processos auto-imunes (Baneth *et al.*, 2005).

3.5.5- Sintomatologia

Os sinais clínicos da leishmaniose canina (LCan) variam amplamente devido aos numerosos mecanismos patogénicos envolvidos, aos diferentes órgãos que são afectados, e à diversidade de respostas imunológicas montadas pelo hospedeiro (Ferrer & Koutinas, 2009). Nos cães a leishmania normalmente causa doença sistémica crónica (Slappendel & Ferrer, 2006), no entanto, os animais também se podem apresentar assintomáticos. Estes também têm um importante papel epidemiológico uma vez que estudos (Michalsky *et al.*, 2007) demonstram que são capazes de transmitir o parasita ao vector.

A história pregressa do animal quando se apresenta à consulta pode ser extremamente variável. Nesta podem estar incluídos os seguintes sinais: lesões cutâneas, problemas oculares, epistaxis, espirros, tosse, síncope, perda de peso, intolerância ao exercício, letargia, polifagia ou anorexia, polidipsia, poliúria, diarreia e vómitos (Baneth, 2010b; Slappendel & Ferrer, 2006; Lappin, 2004). Ao exame clínico juntam-se a estes sinais: linfadenomegália, esplenomegália, onicogrifose, má condição corporal, hipertermia, conjuntivite, queratite, uveíte, icterícia e pneumonia (Baneth, 2010b; Slappendel & Ferrer, 2006; Toplu & Aydogan, 2011).

3.5.6- Alterações hematológicas e bioquímicas

A anemia normocrómica e normocítica é um dos achados hematológicos mais comuns em cães infectados por *L.infantum* (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). A nível dos leucócitos podemos comumente encontrar linfopénia e leucocitose com desvio à esquerda (Lappin, 2004). A trombocitopénia é também um achado comum na LCan (Slappendel & Ferrer, 2006),

estudos (Terrazzano *et al.*, 2006) revelaram a presença de anticorpos anti-plaquetas em animais com leishmaniose.

Hiperglobulinémia, hipoalbuminémia, aumento sérico das enzimas hepáticas e azotémia são alterações bioquímicas comuns, num animal com LCan (Slappendel & Ferrer, 2006; Lappin, 2004 ; Maia, Nunes, Cristóvão & Campino, 2010b). A gamopatia é geralmente policlonal mas também pode aparecer como monoclonal (geralmente IgG) (Font, Closa & Mascort, 1994). A hipoalbuminémia está associada à glomerulopatia perdedora de proteína (Baneth *et al.*, 2005) assim como a azotémia (Baneth, 2010b). O aumento sérico das enzimas hepáticas está associado à presença do parasita no parênquima hepático (Alexandre-Pires, 2008).

3.5.7- Diagnóstico

O diagnóstico para além de necessário para se proceder ao tratamento, também serve para investigar a presença da infecção para estudos epidemiológicos, casos de transfusão de sangue, importação de animais de zonas endémicas ou monitorização de tratamento (Miró *et al.*, 2008). O diagnóstico deve ser baseado na história pregressa, no exame físico e nos sinais laboratoriais. Este pode ser um desafio para o médico veterinário uma vez que os sintomas são muito variáveis, no entanto, deve ter sempre em conta o local em que o animal habita e a sua possibilidade de contacto com o vector. O diagnóstico definitivo usualmente baseia-se na identificação microscópica das formas amastigotas da leishmania livres ou em macrófagos, em esfregaços de linfonodo e medula óssea corados por Giemsa (Slappendel & Ferrer, 2006), esta técnica é sensível e específica para o diagnóstico de LCan (Miró *et al.*, 2008). Contudo, por vezes não se conseguem visualizar as leishmanias no esfregaço, deve-se então recorrer a outros meios complementares de diagnóstico.

3.5.8- Tratamento e profilaxia

As leishmanias são altamente resistentes à terapêutica (Slappendel & Ferrer, 2006), e o tratamento dos animais afectados pela LCan não promove a eliminação total do parasita, apenas a cura clínica que pode ser apenas periódica (Ikeda-Garcia *et al.*, 2007; Meireles, 2008). As drogas utilizadas no tratamento da LCan são: amoniato de glucamina (1ª linha) e a miltefosina (2ª linha), cada um acompanhado pelo alopurinol (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Quanto aos agentes de 3ª linha, não é recomendado o seu uso no tratamento de cães, uma vez que são os agentes de 1ª linha no tratamento da leishmaniose humana (Solano-Gallego *et al.*, 2009). As posologias dos diferentes tratamentos são: amoniato de glucamina 75-100mg/kg SC sid durante 4 semanas (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Baneth *et al.*, 2005) acompanhado por

alopurinol 10 mg/kg PO bid durante 6 a 12 meses (Solano-Gallego *et al.*, 2009); ou miltefosina 2mg/kg PO sid acompanhado por alopurinol na mesma dosagem (Solano-Gallego *et al.*,2009). Ao contrário do que se pensava (Baneth *et al.*, 2005) a administração de alopurinol deve ser descontinuada se houver remissão completa de todos os sinais e marcada diminuição no título de anticorpos (Solano-Gallego *et al.*, 2009). É importante manter em mente que existem animais aos quais nunca vai ser possível a descontinuação do alopurinol por não preencherem os requisitos (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Os fármacos de tratamento da LCan têm efeitos adversos: o amoniato de glucamina tem efeitos nefrotóxicos, a miltefosina pode provocar vômitos e diarreia e o alopurinol promove a formação de cristais de xantina (Baneth *et al.*, 2005; Solano-Gallego *et al.*,2009).

Este ano, de 2011, foi lançada em Portugal uma vacina contra *Leishmania infantum* (CaniLeish, Virbac®), constituída por PSE (proteínas secretadas e excretadas) e por um adjuvante QA-21 (Virbac, 2011). Inclui-se na categoria das vacinas de fracções de *Leishmania* purificadas (Miró *et al.*, 2008). Além deste existem outros 3 tipos: mortas,antigénios recombinantes e vacinas de ADN (Miró *et al.*, 2008). O adjuvante adicionado à vacina tem um papel fundamental no reconhecimento do antigénio pelo sistema imunológico e na incitação de uma resposta pelo mesmo (Miró *et al.*, 2008).

3.5.9- Saúde Pública

A infecção por *Leishmania infantum* é uma zoonose de grande importância e o cão é o principal hospedeiro reservatório para o Homem (Ready, 2010; Campino & Maia, 2010; Slappendel & Ferrer, 2006). A presença de cães infectados desempenha assim, um importante papel na manutenção endémica do parasita (Campino & Maia, 2010). Mais de 350 milhões de pessoas em 88 países diferentes encontram-se em risco de infecção pelas várias espécies de leishmania (*World Health Organization* [WHO], 2011). Na verdade, tem-se verificado um aumento de casos reportados de leishmaniose humana, esta tendência deve-se parcialmente à melhoria dos meios de diagnóstico. Contudo, outros factores também contribuem para este facto:1) adaptação do ciclo de transmissão para locais peridomésticos devido à urbanização e desflorestação; 2) falha das campanhas de controlo de vectores e reservatórios; 3) resistências a fármacos; e 4) emergência da leishmaniose como infecção oportunista em pessoas infectadas pelo vírus da SIDA (Reithinger & Davies, 2002). Efectivamente é neste grupo de pessoas, VIH positivas, que a leishmaniose parece ser mais problemática no nosso país (WHO, 2011). Segundo a organização mundial de saúde 90% dos co-infectados da zona mediterrânea por leishmania e VIH situam-se em Portugal, Espanha, França e Itália (WHO, 2007). Destes

Portugal é o único país em que não se verificou uma diminuição destes casos desde a introdução de terapêutica anti-retroviral (TAR) (WHO, 2007). Além destes casos de co-infecção também se verifica a existência da doença em indivíduos imunocompetentes. Por ano estima-se que cerca de 15 a 20 casos como estes sejam diagnosticados (Campino & Maia, 2010). Este grupo, imunocompetentes, são geralmente crianças e normalmente subnutridos (Baneth *et al.*, 2005). Infelizmente a leishmaniose enquanto doença, ainda tem um peso significativo na nossa sociedade. Por isto, o médico veterinário pode-se deparar com o dilema (Baneth *et al.*, 2005) em termos de saúde pública, de manter um animal infectado tratando-o, ou ter de o eutanasiar (uma vez que mantê-lo sem tratamento está fora de questão). Esta decisão deve ser feita em conjunto com os donos explicando-lhes o tratamento, custos, prognóstico e monitorização, e o verdadeiro potencial zoonótico da doença uma vez que o tratamento não cura, apenas tem a capacidade de diminuir o risco de infecção dos flebótomos (Baneth *et al.*, 2005; Meireles, 2008).

3.6- Meios de diagnóstico complementar

3.6.1- Imunofluorescência Indirecta (IFI)

Imunofluorescência é o processo pelo qual fluorocromos são expostos a radiação ultra violeta (UV), luz violeta ou azul, para que se tornem fluorescentes ou que emitam uma luz visível.

Existem dois tipos de testes de fluorescência de anticorpos: a directa e a indirecta (Prescott, Harley & Klein, 2005). Imunofluorescência indirecta, é usada na detecção de anticorpos no soro, após a exposição do indivíduo ao microrganismo (Prescott, Harley & Klein, 2005). Nesta técnica o antigénio está fixo ao “poço”, junta-se o soro do indivíduo (cujos anticorpos específicos, se presentes, reagem com o antigénio). Posteriormente adiciona-se o soro anti-espécie (neste estudo, anti-cão), que estará marcado com fluoresceína. A visualização ao microscópio de fluorescência é possível logo que os processos de incubação e lavagem, sejam concluídos. À visualização microscópica a fluorescência revela a presença do anticorpo específico, para o antigénio testado (Prescott, Harley & Klein, 2005).

A quantidade de anticorpos da amostra é determinada pela diluição limite e os resultados são dados sob a forma de títulos (Kenny, 2005). Este limite ou limiar varia consoante o laboratório e os métodos utilizados (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

- ***Ehrlichia canis***

O teste de imunofluorescência indirecta é utilizado na detecção de anticorpos anti-*E.canis* e é considerado o teste “Gold standard” (Ristic, Huxsoll, Weisiger, Hildebrandt & Nyindo, 1972) na detecção da EMC.

Este teste tem desempenhado um papel importante na investigação e diagnóstico da doença (Waner *et al.*, 2001). Ristic *et al.* (1972) descreveram este teste para a detecção e titulação de anticorpos anti-*E.canis*. O desenvolvimento de métodos de cultivo de *E.canis in vitro* levou ao uso do teste sorológico da imunofluorescência indirecta (IFI) para a detecção destes anticorpos. A propagação *in vitro* do agente patogénico em monócitos de cão, permitiu que estes viessem a funcionar como antigénio no teste IFI (Ristic *et al.*, 1972).

Waner *et al.*, (2001) concluíram que o uso do teste IFI é um importante meio para confirmar a exposição de um animal a *E.canis*. No entanto, o clínico deve ter a noção das suas falhas, o processo da doença, as reacções cruzadas com outras espécies de *Ehrlichia* e persistência de anticorpos mesmo após tratamento, devem ser consideradas. Para colmatar estas falhas pode-se-á, se se justificar realizar juntamente um teste de *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Iqbal, Chaichanasiriwithaya e Rikihisa (1994) concluíram que PCR, principalmente associado a IFI providencia o diagnóstico mais sensato e rápido de EMC.

- ***Anaplasma phagocytophilum***

O teste de IFI permite a titulação dos anticorpos anti-*Anaplasma phagocytophilum*, no entanto apresenta a grande desvantagem de fazer reacção cruzada com outras espécies de *Anaplasma*, nomeadamente com *A.marginale* (Strik *et al.*, 2007) e com *A.platys* (Inokuma *et al.*, 2001). Apesar das suas desvantagens continua a ser o método mais utilizado para diagnóstico (Park, Heo, Choi, Dumler & Chae, 2003).

- ***Rickettsia conorii***

O teste de IFI é considerado um bom teste para o diagnóstico da febre botonosa, especialmente se for realizado um Micro-IFI onde se pode detectar imunoglobulinas específicas da infecção (Greene & Breitschwerdt, 2006). No entanto, este teste perde um pouco do seu valor numa zona endémica, sugere-se então, a utilização de testes mais específicos (como *Western blotting* ou PCR) (Babalís, Dupont, Tselentis, Chatzichristodoulou & Raoult, 1993).

- ***Babesia canis***

A IFI é actualmente o método de preferência na detecção serológica de babesiose, uma das suas grandes limitações são a incapacidade de diferenciar uma infecção aguda de uma crónica. Isto tem particular importância em zonas endémicas à doença (Irwin, 2007a).

Outra limitação é o facto de fazer reacção cruzada com outras espécies de babesia, nomeadamente *B.gibsoni* (Taboada & Lobetti, 2006). Para colmatar este defeito podemos juntar ao teste de IFI o teste de PCR. E apesar da discordância ocasional, a combinação do teste IFI com PCR parece ser o método ideal para atingir a eficiência óptima no diagnóstico de babesiose (Irwin, 2007a).

Todavia este teste tem muito valor em termos de saúde pública. Outra limitação deste teste é a possibilidade de reacção-cruzada com outras espécies de Rickettsias (Keysary & Strenger, 1997).

- ***Leishmania infantum***

O teste IFI, como todos os testes serológicos, determina a existência de anticorpos anti-leishmania, contudo não comprovam se a doença está activa ou não (Slappendel & Ferrer, 2006), é por isso importante relacionar sintomatologia com o teste IFI. Solano-Gallego *et al.* (2009) recomendam a repetição do teste de IFI 6 meses após o tratamento inicial para monitorização da leishmaniose. A diminuição só se considera significativa se houver uma diferença de pelo menos duas diluições.

3.6.2- ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

O teste ELISA, faz detecção de antigénio e anticorpos e pode ser fornecido como kits com um standard e controlo internos, usualmente são fáceis de utilizar (Modiano & Ritt, 2000). Este teste envolve a ligação de enzimas “marcadas” a antigénios ou a anticorpos. Dois métodos básicos são utilizados: o teste duplo de anticorpos (“*sandwich*”) e o teste indirecto de imunossorbência (*immunosorbent*). O teste “*sandwich*” utiliza-se na detecção do antigénio e o indirecto na detecção de anticorpos (Prescott, Harley & Klein, 2005) (Fig.6).

- ***Ehrlichia canis***

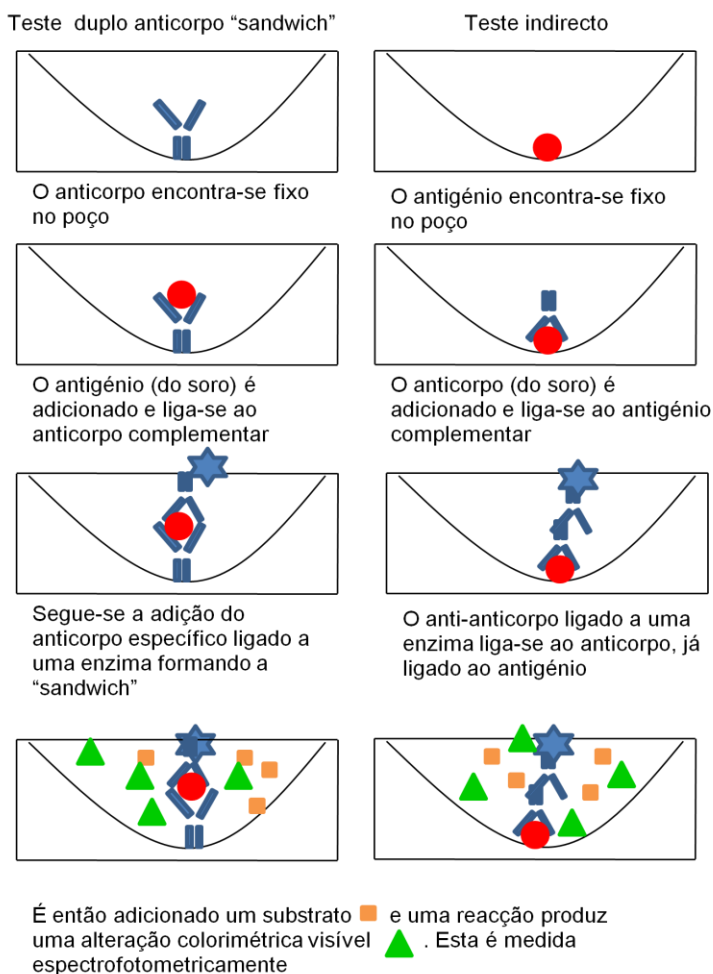
Waner, Strenger & Keysary (2000) relataram que a especificidade de ELISA era semelhante à da IFI, assim é importante considerar a hipótese de reacção cruzada com outras espécies de *Ehrlichia*. Concluíram também que o kit de ELISA permitia a identificação de anticorpos anti-

E.canis com equipamento laboratorial mínimo e sem pessoal especializado. Waner *et al.* (2000) considerou o teste de ELISA apto para a confirmação de diagnóstico de EMC.

- ***Anaplasma phagocytophilum*:**

O teste de ELISA é um bom método de diagnóstico especialmente quando é utilizado o ELISA de competição, no qual se notou que não havia reacção cruzada (Strik *et al.*, 2007).

Figura 6- Esquema do teste ELISA



Legenda: Esquema original baseado em Prescott, Harley e Klein (2005)

- ***Rickettsia conorii***

O teste de ELISA permite a identificação de *Rickettsia conorii* no soro do animal infectado, no entanto, tem a limitação de se poderem desenvolver reacções cruzadas com outras espécies de rickettsias (Keysary & Strenger, 1997).

- ***Babesia canis***

O diagnóstico de babesiose pode-se fazer através do teste de ELISA onde se vão detectar proteínas específicas, no entanto tem a grande desvantagem de poder ocorrer reacções cruzadas com outras espécies *Babesia* spp. (Aboqe *et al.*, 2007)

- ***Leishmania infantum***

Estes testes são indicados para um grande número de amostras, tendo uma boa sensibilidade e especificidade, no entanto, têm o inconveniente da detecção de falsos positivos (Pereira da Fonseca & Villa de Brito 2008; Vargas-Duarte, López-Páez, Escovar-Castro & Fernández-Manrique, 2009).

3.6.3- Immunoblotting- Western blotting

Western blotting é amplamente usado não só nos objectivos tradicionais, como a identificação de proteínas por immunoafinidade e a análise de respostas imunes, mas também como técnica interface genoma-proteoma. As técnicas de *immunoblotting* usam anticorpos (ou outros ligandos específicos) para identificar proteínas-alvo dentre um número de outras proteínas (Magi, & Liberatori, 2005). Este procedimento demonstra a presença de proteínas comuns e específicas de diferentes estirpes de microrganismos, permitindo assim a sua distinção (Prescott, Harley & Klein, 2005). O immunoblotting pode também ser utilizado na detecção de respostas imunológicas, especificamente dirigidas a uma estirpe de um microrganismo (Prescott, Harley & Klein, 2005). A técnica começa com uma complexa mistura de antígenos (melhor aplicado a proteínas) que é separada, segundo o seu peso molecular, através de electroforese em gel. As proteínas são transferidas e imobilizadas numa membrana inerte (nitrocelulose). Locais de ligação de proteínas são então bloqueados e a membrana é coberta com anticorpos primários contra o antígeno. Seguidamente adicionam-se anticorpos marcados ligados a uma enzima que provocam ligação assim que se junta o substrato. Esta precipitação permite a visualização de uma banda, cujo peso molecular será posteriormente determinado (Kenny, 2005).

- ***Ehrlichia canis***

Iqbal, Chaichanasiriwithaya e Rikihisa (1994) demonstraram que o *Western blotting* detecta anticorpos anti-*E.canis* tão cedo quanto 2 a 8 dias pós-exposição. Este método consegue também distinguir *E.canis* de outras espécies filogeneticamente próximas com *E. chaffeensis* e *E. ewingii* (Rikihisa, Ewing & Fox, 1994). No entanto de um ponto de vista prático a IFI continua a ser o teste de triagem de escolha (Neer & Harrus, 2006).

- ***Anaplasma phagocytophilum***

O *Western blotting* permite a identificação de *A.phagocytophilum*, contudo a sua especificidade pode ser questionável, principalmente devido à grande variabilidade genética apresentada pelo microrganismo (Park *et al.*, 2003).

- ***Rickettsia conorii***

Babalis *et al.* (1993) revelam no seu estudo que para um estudo seroepidemiológicos mais preciso o uso de *Western blotting* é essencial. Este faz a detecção de proteínas antigénicas específicas, ajudando a apurar a verdadeira seroprevalência de *Rickettsia conorii* de uma população, numa zona endémica à doença.

- ***Leishmania infantum***

Permite a detecção de anticorpos muito específicos (Navarrete & Nieto, 2005) têm um nível de detecção de doença muito semelhante aos outros métodos serológicos no entanto, pode ser melhorado com alterações na técnica (Vargas-Duarte *et al.*, 2009).

3.6.4- PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é extremamente valiosa nas diversas áreas de biologia molecular, medicina e biotecnologia. Esta técnica permite a síntese de grandes quantidades de fragmentos de ADN sem recorrer à clonagem (Prescott, Harley & Klein, 2005). A chave deste processo é o uso de uma ADN polimerase termoestável, que permanece activa durante os vários ciclos de aquecimento (Kenny, 2005). Depois de amplificado o ADN é lido por electroforese em gel. Em casos em que a cultura microbiológica é impossível, lenta ou indesejável devido a perigos biológicos, PCR tornou-se o método de preferência pela sua sensibilidade, selectividade e rapidez (Kenny, 2005).

- ***Ehrlichia canis***

PCR é um meio adequado para a detecção do ADN de *E.canis* no soro mesmo antes da seroconversão, facilitando o diagnóstico prematuro da doença (Mylonakis *et al.*, 2009).

- ***Anaplasma phagocytophilum***

PCR é uma técnica muito sensível e específica na detecção de *Anaplasma phagocytophilum*, sendo que a sua identificação é possível por um período mais longo do que através da observação microscópica (Harrus *et al.*, 2005). Estudos demonstram que o PCR é uma ferramenta capaz de tipificar sub-espécies e que em Portugal podemos ter 2 sub-espécies de *Anaplasma phagocytophilum* uma delas muito semelhante à identificada nos EUA (Santos, Santos-Silva, Sousa, Bacellar & Dumler, 2009).

- ***Rickettsia conorii***

O teste de PCR pode ser utilizado na detecção de *Rickettsia conorii*, permitindo a distinção desta, de outras espécies de rickettsias (Leitner, Yitzhaki, Rzotkiewicz & Keysary, 2002). Permite também a identificação das rickettsias antes da seroconversão (Kidd *et al.*, 2008).

- ***Babesia canis***

PCR é uma técnica sensível e específica e frequentemente aplicada no diagnóstico de babesiose. É particularmente útil na detecção de cães com uma baixa parasitémia e para especificação do parasita (Solano-Gallego & Baneth, 2011). Permite também a distinção das subsespécies de *Babesia canis* (Zahler, Schein, Rinder & Gothe, 1998).

- ***Leishmania infantum***

PCR melhorou a sensibilidade do diagnóstico de LCan, podendo utilizar diversos tecidos para efectuar a detecção do parasita (sangue, linfonodo, medula e baço) (Miró *et al.*, 2008).

3.7- Interações hospedeiro-vector, na transmissão de hemoparasitoses

A transmissão de agentes infecciosos por artrópodes hematófagos envolve uma interacção de três vias que se realiza entre o artrópode, o microrganismo e o sistema imunológico do

hospedeiro vertebrado. O objectivo do artrópode é obter a sua refeição, que faz penetrando a barreira epidérmica do hospedeiro, ao fazer a secreção de substâncias anticoagulantes promove a entrada de microrganismos no hospedeiro (Day, 2005).

Hoje em dia compreende-se que os “artrópodes não são agulhas e seringas rastejantes e voadoras”, isto é, que o seu papel nesta interacção de três vias, não é de forma nenhuma passivo (Wikel & Alarcon-Chaidez, 2001).

A interacção pode ser feita artrópode-microrganismo, e Sultana, (2010) comprovou que os agentes infecciosos, conseguem manipular a regulação genética dos artrópodes de forma a assegurar a sua transmissão. Ou artrópode-hospedeiro, em que os artrópodes produzem numerosas moléculas farmacologicamente activas, que lhes permite migrações através dos tecidos dos hospedeiros ou obter com sucesso as suas refeições (Wikel & Alarcon-Chaidez, 2001). Estas substâncias trazem benefícios aos vectores, uma vez, que reduzem ou inibem um ataque imunológico aos factores anti-hemostáticos e outras moléculas essenciais, assim como evitam que o animal se coce nessa região, durante a refeição (Wikel & Alarcon-Chaidez, 2001). Os artrópodes evadem o sistema imunológico do hospedeiro para sobreviverem mas existem importantes consequências (Wikel & Alarcon-Chaidez, 2001). Essa evasão é feita através de imunomodulação, isto é, a inoculação de moléculas salivares resulta na alteração da resposta imunológica do hospedeiro, tanto localmente como na região de drenagem do linfonodo (Day, 2005, Day, 2011). Estas moléculas promovem a resposta Th2 (humoral), suprimindo a Th1 (celular) (Day, 2011). A ausência de uma resposta celular protectora permite o estabelecimento da doença no hospedeiro, permitindo mesmo que artrópodes não infectados que se alimentem em local próximo possam tornar-se infectados (Day, 2005). O agente infeccioso está agora livre para se propagar, produzir parasitemia e infecção aguda.

A predisposição para uma resposta humoral está na base da infecção crónica, secundária e imuno-mediada (Day, 2005). As sequelas deste tipo de resposta podem ser várias: 1) hiperglobulinemia; 2) indução de auto-anticorpos ou de anticorpos de reacção-cruzada; 3) formação de imunocomplexos anticorpo-antígeno; 4) granulomas inflamatorios de agregados de macrófagos parasitados (Day, 2005).

3.8- Breve descrição dos principais vectores

3.8.1- *Rhipicephalus sanguineus*

As ixodídeos da família Ixodidae são vectores dos, intimamente relacionados géneros richettsiais, *Ehrlichia* e *Anaplasma*. (Stich *et al.*, 2008; Shaw, 2008)

Do ponto de vista etológico, *Rh. sanguineus* é endófilo (adaptado à vida no interior), monotrópico (todos estágios de desenvolvimento alimentam-se em hospedeiros da mesma espécie), e de três hospedeiros (cada fase da vida requer um novo hospedeiro para se alimentar). No entanto, apesar de muito endófilo, *Rh.sanguineus* também sobrevive no ambiente exterior, principalmente se encontrar refúgios (ex: paredes de pedra calcária). Além disso, embora monotrópico, esta carraça pode ocasionalmente alimentar-se de outros hospedeiros, que não pertencem à sua “cadeia trófica” natural. Isto indica que *Rh. sanguineus* é capaz de adoptar diferentes estratégias de sobrevivência (Dantas-Torres, 2010).

Como característica anatómicas, a base do capítulo é hexagonal, tem olhos e festões e o escudo não é ornamentado (Bowman *et al.*, 2003).

3.8.1.1- Taxonomia

Quanto à sua taxonomia pertence Filo Arthropoda, Classe Arachnida Ordem Ixodida, Família Ixodidae e Género *Rhipicephalus*.(NCBI, 2009b)

3.8.1.2- Ciclo de vida

Rhipicephalus sanguineus são ixodídeos de três hospedeiros, que se soltam do hospedeiro após cada refeição antes de passarem para o próximo estadio (Stich *et al.*,2008).

A fixação de *Rhipicephalus sanguineus* ocorre através do segmento distal dentado dos quelíceras, que rasgam a pele permitindo que nela se introduza o hipostoma (Meana & Vásquez, 1999; Shaw, 2008). Aproximadamente 10 minutos após a fixação, as glândulas salivares começam a segregar o cimento (líquido branco rico em lipoproteínas), que endurece formando um tubo à volta dos apêndices (Meana & Vásquez, 1999). À medida que o ixodídeo se vai alimentando vai segregando saliva, cujas moléculas são farmacologicamente muito activas, neutralizando assim os mecanismos hemostáticos e defensivos do hospedeiro (Meana & Vásquez, 1999; Shaw, 2008). Durante este processo de alimentação os ixodídeos infectam-se, pois os agentes patogénicos adaptados a esta transmissão penetram na mucosa intestinal; ou, infectam o hospedeiro (Shaw, 2008). De facto, todo o processo de ligação e alimentação estimula a re-activação, replicação e migração dos agentes patogénicos dos seus locais de sequestro para a saliva (Shaw, 2008).

O ciclo de vida inicia-se quando as larvas eclodem dos ovos e leva 2 a 3 meses a completar-se (Bowman *et al.*, 2003). As larvas (com seis patas) alimentam-se dos hospedeiros (ex: cão doméstico) durante uns dias, caindo e desenvolvendo-se em ninfas (oito patas). As ninfas alimentam-se do hospedeiro por aproximadamente uma semana, voltam ao solo e desenvolvem-se em fêmeas e machos adultos. As fêmeas são fertilizadas no hospedeiro e alimentam-se por mais uma a três semanas, altura pela qual ficam altamente ingurgitadas com sangue. Retornam ao solo para depositarem os seus cachos de 2000 a 4000 ovos, umas semanas mais tarde (Bowman *et al.*, 2003). Os ovos emergem do poro genital e acumulam-se à frente do ixodídeo, após a ovoposição a fêmea morre, e o ciclo repete-se (Stich *et al.*, 2008; Bowman *et al.*, 2003).

3.8.1.3- Transmissão biológica

Cada estadio alimentar do ixodídeo ou refeição de sangue é uma oportunidade de aquisição e transmissão de agentes patogénicos.

A transmissão horizontal pode ocorrer, “transestadialmente” quando uma carraça madura adquire o agente patogénico durante uma refeição e o transmite no seguinte estado de desenvolvimento, (Bremer, 2005) e “intraestadialmente” quando a carraça adquire e transmite a doença durante o mesmo estadio de desenvolvimento (Stich *et al.*, 2008).

A transmissão vertical ocorre “transovaricamente” da fêmea para as larvas da sua descendência (Stich *et al.*, 2008; Shaw, 2008).

No caso de de ixodídeos de 3 hospedeiros a transmissão transestadial é a mais importante (Stich *et al.*, 2008). A transmissão intrastadial é muito importante no caso dos machos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* uma vez que se demonstrou experimentalmente, a capacidade destes para transmissão de agentes patogénicos (Bremer, 2005). Conclui-se também que o facto de não ser necessário cópula para que o macho *Rhipicephalus sanguineus* realize múltiplas refeições (Bremer, 2005), juntamente com o facto de se irem alimentando de diferentes hospedeiros e de persistirem por toda a estação (Stich *et al.*, 2008), demonstra a importância da transmissão intraestadial dos ixodídeos.

Na verdade, os ixodídeos adultos conseguem sobreviver durante 155 a 568 dias sem se alimentarem, e transmitirem a infecção durante 155 dias após se infectarem (Waner & Harrus, 2000). Este fenómeno que lhes permite passarem o Inverno e infectarem os hospedeiros vertebrados na Primavera seguinte, juntamente com a transmissão transovárica, fazem dos ixodídeos reservatórios de doenças (Waner & Harrus, 2000; Alleman, 2005; Stich *et al.*, 2008).

3.8.2- *Dermacentor reticulatus*

Dermacentor reticulatus é um ixodídeo ornamentado com olhos, festões e um capítulo rectangular (Corrales, Vázquez & Campillo, 1999; Bowman *et al.*, 2003). Coloniza a Europa, é higrófilo (gosta de ambientes húmidos), e os adultos são mais activos na Primavera e no Outono, têm um comportamento endo-exofílo dependendo do estadio em que se encontram (Corrales *et al.*, 1999). Os adultos parasitam grandes mamíferos e as formas imaturas são exclusivamente endofílicas e parasitam principalmente roedores (Corrales *et al.*, 1999).

3.8.2.1- Taxonomia

Este artrópode pertence à classe Arachnida, ordem Ixodida, família Ixodidae e género *Dermacentor* (NCBI, 2009e).

3.8.2.2- Ciclo de vida

Dermacentor reticulatus apresenta um ciclo de vida de três hospedeiros assim como *Rh.sanguineus*, que dura aproximadamente um ano e meio. (Chauvin *et al.*, 2009)

3.8.2.3- Transmissão biológica

A transmissão dos agentes patogénicos (exemplo: *Babesia*) faz-se de modo transestadial, intrastadial e transovárica (Chauvin *et al.*, 2009).

3.8.3- *Ixodes ricinus* e *I. ventalloi*

Estes ixodídeos não são ornamentados e não têm festões ou olhos (Bowman *et al.*, 2003; Corrales *et al.*, 1999). Têm a particularidade de possuírem um sulco anterior à abertura anal, ao contrário de outras espécies que não o têm ou têm-no posteriormente à abertura anal (Bowman *et al.*, 2003). As larvas e os adultos comportam-se da mesma forma do que os do género *Dermacentor* (Corrales *et al.*, 1999).

3.8.3.1-Taxonomia

Estas espécies de ixodídeos taxonomicamente pertencem à classe Arachnida, ordem Ixodida, família Ixodidae e género *Ixodes* (NCBI, 2009f).

3.8.3.2- Ciclo de vida

Como os ixodídeos anteriores, os do género *Ixodes* também têm um ciclo de vida de três hospedeiros, com duração de 2-3 anos (Bowman *et al.*, 2003; Corrales *et al.*, 1999).

3.8.3.3- Transmissão biológica

A transmissão dos agentes patogénicos para este vector e deste vector para outros seres processa-se da mesma forma que os ixodídeos anteriormente referidos.

3.8.4- *Phlebotomus perniciosus* e *P. ariasi*

Os flebotomos são artrópodes pequenos (2-3 mm), delgados, acastanhados, com antenas longas e corpo coberto de sedas (Bowman *et al.*, 2003; Afonso & Alves-Pires, 2008). O seu corpo é constituído por 3 partes: cabeça, tórax e abdómen (Afonso & Alves-Pires, 2008). As suas asas têm veias que vão desde a base até à ponta da asa (Bowman *et al.*, 2003). São maus voadores apenas conseguindo voar umas centenas de metros, não se afastando muito da sua área de reprodução (Sharma & Singh, 2008; Mencke, Volf, Volfova & Stanneck, 2003). Voam junto ao chão e são incapazes de o fazer quando na presença de vento (Sharma & Singh, 2008). Os flebotomos na Europa assumem um comportamento exo-endofilo, tendo uma localização peridoméstica entrando mesmo nas nossas casas (Sharma & Singh, 2008 ,Afonso & Alves-Pires, 2008).

3.8.4.1- Taxonomia

Estes artrópodes pertencem à classe Insecta, ordem Diptera, família Psychodidae e género *Phlebotomus* (NCBI, 2009g).

3.8.4.2- Ciclo de vida

Tanto machos como fêmeas alimentam-se de soluções açucaradas (fitófagos), contudo, para a produção de ovos as fêmeas necessitam de se alimentar de sangue, pois as proteínas deste são necessárias ao desenvolvimento dos ovos (Sharma & Singh, 2008 ; Mencke *et al.*, 2003).

O ciclo de vida desde a primeira refeição sanguínea até novos adultos eclodirem dura aproximadamente 45 dias (laboratorialmente) e desenvolve-se em meio aéreo e terrestre (Afonso & Alves-Pires, 2008). As larvas que eclodem dos ovos, desenvolvem-se por 4 estádios

no solo, alimentando-se de matéria orgânica, até puparem, passados 10 dias eclode o mosquito adulto (Mencke *et al.*, 2003; Afonso & Alves-Pires, 2008).

Uma vez que apenas as fêmeas se alimentam de sangue, só elas são vectores de agentes patogénicos, apresentando uma actividade circadiana muito específica. Durante o dia mantêm-se em locais frescos e húmidos evitando o calor do dia e ao cair da noite iniciam e a sua actividade de procura de hospedeiros para realizarem a sua refeição de sangue (Mencke *et al.*, 2003). Uma vez encontrado o seu hospedeiro, procuram regiões glabras como à volta do nariz, olhos e boca (Mencke *et al.*, 2003).

As condições climatéricas influenciam a duração do ciclo de vida destes seres, por exemplo o aumento da temperatura ambiental, pode aumentar o período de actividade dos adultos e assim o número de gerações por ano. A diminuição da temperatura diminui a actividade dos flebótomos (Afonso & Alves-Pires, 2008; Sharma & Singh, 2008) .

3.8.4.3- Transmissão biológica

A fêmea infecta-se quando realiza uma refeição sanguínea a partir de um animal infectado, ingerindo as formas amastigotas da leishmania (Afonso & Alves-Pires, 2008). Estas formas desenvolvem-se no aparelho digestivo do flebótomo, onde se dá a diferenciação em promastigotas e a sua multiplicação (Afonso & Alves-Pires, 2008).

As formas promastigotas desenvolvem-se em formas metacíclicas, que são as formas que infectam os hospedeiros vertebrados aquando a picada do flebótomo (Afonso & Alves-Pires, 2008). Nesta altura as metacíclicas são injectadas juntamente com a saliva no hospedeiro (Mencke *et al.*, 2003).

A injeção da saliva é importante para a obtenção da refeição sanguínea uma vez que contém substâncias com propriedades anticoagulantes, vasodilatadoras, anti-inflamatórias, anti-hemostáticas e anestésicas (Mencke *et al.*, 2003). Além da função principal destas substâncias (obtenção de uma refeição de sangue), elas desempenham um importante papel na transmissão da infecção parasitária, como anteriormente descrito.

Um outro factor importante na transmissão das leishmanias é a alteração de comportamento que provoca no flebótomo, pois uma vez que formam um rolhão que bloqueia a via alimentar (Afonso & Alves-Pires, 2008), forçam o mosquito a realizar um maior número de refeições do que seria necessário, aumentando assim a dispersão da doença.

3.9- Controlo de vectores

A prevenção destas hemoparasitoses pode fazer-se em alguns casos por vacinação e/ou por administração de fármacos profilaticamente (como anteriormente referido), no entanto o controlo dos vectores das diferentes parasitoses é a forma de prevenção mais importante.

3.9.1- Controlo de ixodídeos

Quando procedemos ao controlo de ixodídeos é importante não nos esquecermos que apenas 5% dos ixodídeos se encontram no cão, e que os restantes 95% se distribuem pelo meio ambiente (Dantas-Torres, 2008). Assim a estratégia de controlo deve contemplar o animal e o ambiente em que se insere.

3.9.1.1-Controlo químico

Acaricidas em *spot-on*, *spray* ou em coleira são as medidas preventivas mais eficientes no controlo de ixodídeos (Shaw, Day, Birtles & Breitschwerdt, 2001). Estes podem veicular diferentes substâncias como amitraz, fipronil, permetrinas ou pyriprole. Estas actuam interferindo com a função neurológica dos ixodídeos em 24 a 48 horas, no entanto, é possível que neste tempo haja transmissão de agentes patogénicos.

As permetrinas actuam também como agentes repelentes (Taylor, 2001; Shaw, 2008). O uso de acaricidas geralmente é eficiente na eliminação e prevenção de infecções por ixodídeos durante um determinado período de tempo. A frequência e intensidade de tratamento depende do grau de infestação e duração do efeito do produto, de qualquer forma as directrizes do fabricante devem ser respeitadas (Dantas-Torres, 2008).

No que respeita ao controlo químico do ambiente, este só pode ser efectivo se for limitado a uma área restrita (Dantas-Torres, 2008). Alguns acaricidas como carbaryl, propoxur e deltametrinas podem ser utilizadas como pesticidas ambientais, contudo deve-se evitar a contaminação de cursos de água e áreas adjacentes (WHO, 2006).

3.9.1.2- Vacinação

Várias estratégias de vacinação foram propostas para o controlo de ixodídeos, no entanto até agora, contra os ixodídeos sob estudo, só a vacina contra *Rh.sanguineus* teve o efeito de redução no tempo de ligação e na fecundidade (Shaw, 2008).

Contudo, as investigações continuam, e num futuro próximo estas vacinas podem vir a desempenhar um papel muito importante no controlo destes vectores (Ghosh, Azhahianambi & Yadav, 2007).

3.9.1.3- Controlo não químico

O controlo não químico deve ser associado ao químico (Dantas-Torres, 2008), podendo ser mecânico ou biológico.

O controlo mecânico é feito pela remoção dos ixodídeos presentes no pêlo ou agarrados à pele do cão. Para isto o dono deve escovar regularmente o cão e deve ser ensinado pelo MV a remover ixodídeos já fixados (Shaw, 2008). Para proceder a este acto deve proteger-se com luvas, para evitar o contacto com fluídos das carraças (Dantas-Torres, 2008).

O controlo biológico de ixodídeos pode ser feito com recurso a fungos (*Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*) (Kirkland, Westwood & Keyhani, 2004) e a nemátodes (Samish & Glazer, 2001).

No que respeita ao controlo não químico do ambiente, fendas que possam existir em muros ou paredes devem ser seladas, pois alguns ixodídeos têm um comportamento endófilo. Quanto à vegetação, esta deve ser mantida cortada (Dantas-Torres, 2008).

3.9.2- Controlo de flebótomos

Os esforços para controlar a disseminação de *Leishmania* transmitida por estes vectores não têm sido bem sucedidos (Baneth *et al.*, 2005). E o abate de cães seropositivos praticado na América do Sul além de não ser bem aceite pelos donos, não tem o efeito desejado uma vez que permanecem no ambiente animais assintomáticos e animais silvestres que mantêm a transmissão do parasita aos vectores (Baneth *et al.*, 2005). Os principais métodos de controlo dos flebótomos são: controlo químico, gestão ambiental e controlo biológico (Sharma & Singh, 2008).

3.9.2.1- Controlo químico

O controlo químico feito nos cães pode ser efectuado através de coleiras impregnadas com deltametrina, estas têm um efeito que se prolonga por 6 meses, matando cerca de 50% dos vectores expostos ao produto (Alexander & Maroli, 2003).

Pode também ser feito através de *spot-on*, tendo a combinação de imidocloprid e permetrina demonstrado resultados muito satisfatórios como repelentes de flebótomos, sendo no primeiro

dia de 94,6% e no dia 22 de 72,8% (Mencke *et al.*, 2003). O potencial insecticida desta combinação era mais baixo, 60,0% no dia 1 e de 35,2% no dia 22 (Mencke *et al.*, 2003).

Quanto ao controlo químico de casas e abrigos pode-se proceder à pulverização dos locais com insecticidas (Maroli, 2009). O uso de redes mosquiteiras impregnadas com insecticidas também é uma forma simples e barata de impedir a entrada dos mosquitos (Maroli, 2009; Alexander & Maroli, 2003).

3.9.2.2- Gestão ambiental

A gestão ambiental passa pela eliminação de locais onde os flebótomos se possam reproduzir como fendas em muros ou paredes, ou poças de água permanentes devido a regas, para isto é necessário a educação da população (Sharma & Singh, 2008).

3.9.2.3- Controlo biológico

Pouca informação está disponível sobre o controlo biológico dos flebótomos, no entanto organismos como nemátodes, bacilos e fungos são capazes de matar flebótomos adultos e pré-adultos, em condições laboratoriais (Sharma & Singh, 2008). Outra alternativa são plantas como *Solanum jasminoides*, *Ricinus communis*, ou *Bougainvillea glabra*, que são tóxicas para os mosquitos adultos. Estas plantas representam uma alternativa viável aos insecticidas comerciais para o controlo dos flebótomos (Sharma & Singh, 2008).

4- Objectivos

Os objectivos deste estudo foram:

- Detecção de anticorpos contra os agentes patogénicos (*E.canis*, *A.phagocytophilum*, *R.conorii*, *B.canis*, *L.infantum*) numa população de cães, de canil externo em Setúbal;
- Determinação da sua seroprevalência numa amostra de uma população de cães, de canil externo;
- Determinação da influência dos diversos factores (sexo, idade e comprimento do pêlo);
- Detecção de co-infecções;
- Contribuição científica para a determinação da prevalência de doenças transmitidas por vectores em Portugal.

5-Material e métodos

5.1-Área geográfica sob estudo

O rastreio foi efectuado durante os dias 23, 24 e 25 de Março do ano de 2011, na associação “Cantinho da Milu”, que se localiza no Vale da Abrunheira, concelho de Palmela, distrito de Setúbal. A área (delimitada na figura 7), apresenta as coordenadas latitude 38.581887 e longitude 8.797353, localizando-se a aproximadamente 25 Km do estuário do Tejo e 10 Km do estuário do Sado (Fig. 7).

Figura 7- Fotografia aérea da associação “Cantinho da Milu” (Google maps, 2011)

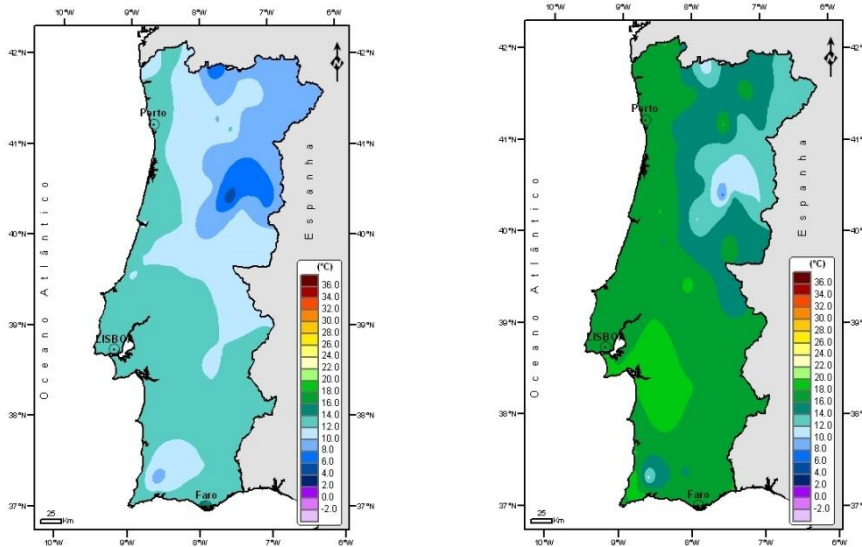


Legenda : escala 1cm=28m

5.2-Clima

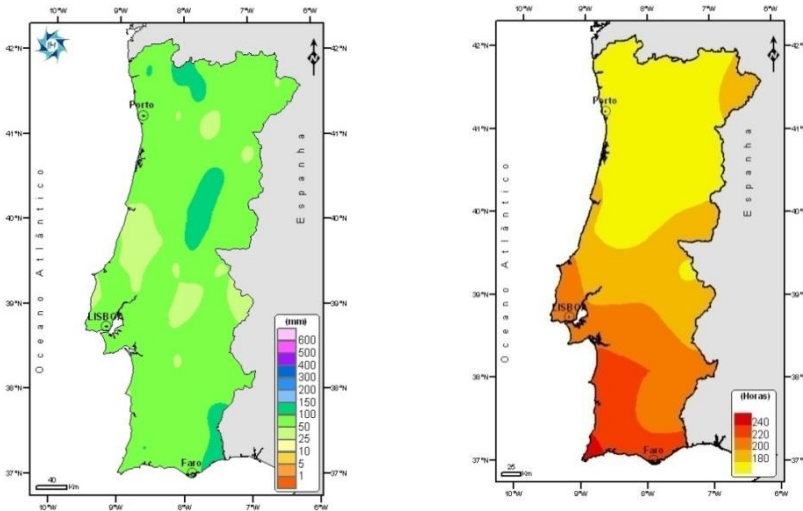
Durante o mês de Março de 2011, a temperatura média na região de Setúbal foi de aproximadamente 12°C com uma temperatura máxima de 18°C (Fig.8). Durante o mesmo mês a precipitação total foi entre 50 e 100 mm e o total de horas de insolação entre 200 e 220, (Fig.9) (Instituto de Meteorologia, Portugal, 2011).

Figura 8- Mapas das temperaturas médias e máximas registadas em Portugal durante o mês de Março de 2011.



Legenda: temperaturas médias (esquerda), temperaturas máximas (direita) adaptado de Instituto de Meteorologia, Portugal (2011)

Figura 9- Mapas de registos totais de pluviosidade e horas de insolação, durante o mês de Março de 2011.



Legenda: Pluviosidade (esquerda), horas de insolação (direita) adaptado de Instituto de Meteorologia, Portugal (2011)

5.3- Caracterização da amostra

A amostra era constituída por 80 cães de uma população total variável de 350 animais. Para cada cão foram registados dados referentes a: raça, sexo, idade e comprimento do pêlo.

5.3.1- Raça dos cães da amostra

Todos os animais testados eram de raça indeterminada.

5.3.2 Sexo dos cães da amostra

Dos 80 cães da amostra 29 (36,25%) eram machos e 51 (63,75%) eram fêmeas. Os machos eram todos inteiros, nas fêmeas era desconhecido devido à sua proveniência (cães de rua) e à dificuldade de controlo e averiguação de cios.

5.3.3 Idade dos cães da amostra

A média de idade da amostra era de 5 anos e 2 meses, a idade mínima era de 2 anos e a máxima de 12 e a moda das idades 3 .

5.3.4 Comprimento do pêlo dos cães da amostra

O pêlo dos cães foi classificado como curto e longo (tendo sido inserido nesta categoria o pêlo médio). Assim, dos 80 cães, 26 (32,5%) apresentavam pêlo longo e 64 (67,5%) pêlo curto.

5.4- Caracterização do habitat em que se inserem

O terreno onde os cães da amostra habitavam estava dividido em 2 áreas: uma grande área comum onde, durante o dia, os cães eram soltos num sistema rotativo; e uma outra constituída por parques onde co-habitavam 3 a 10 cães consoante a área de cada um. Na área comum e em alguns parques, havia vegetação intensa, alta e uma vinha. Em cada parque os cães tinham uma ou duas casas nas quais cada um tinha a sua cama de plástico coberta por mantas (Fig.10 e 11).

Figura 10- Fotografia original da área comum (esquerda) e dos parques (direita).



Figura 11- Fotografia original de um parque grande (esquerda) e pormenor do interior das casas com as camas dos animais (direita).



5.5-Colheita de sangue e processamento

A colheita de sangue foi feita maioritariamente a partir da veia cefálica, e ocasionalmente a partir da veia jugular e da veia safena. Primeiramente foi realizada a desinfecção do local com álcool etílico a 70%, e foram colhidos para um tubo seco entre 2 a 4 mL de sangue. Os tubos foram mantidos direitos e refrigerados até ao final do dia, altura em que se procedeu à extração do soro por centrifugação a 40 rpm durante 10 minutos. O soro resultante foi colocado em *ependorfs* e congelado(-20°C) para análise posterior.

5.6- Método analítico

O método analítico utilizado foi a Imunofluorescência indirecta (IFI) para a pesquisa de anticorpos contra *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia conorii*, *Babesia canis* e *Leishmania infantum*.

5.6.1- Testes utilizados

Os testes utilizados foram testes comerciais, para *E.canis*, *A. phagocytophilum*, *R. conorii* e *B. canis* pertencentes ao laboratório Megacor®, e ao laboratório bioMérieux® no caso da pesquisa de anticorpos contra *L.infantum*, (tabela 1).

Tabela 1- Correspondência entre a designação comercial do teste e do agente de pesquisa de anticorpos

Nome do teste	Agente
MegaScreen® FLUOEHRlichia canis (Ref. 715)	<i>E.canis</i>
MegaScreen® FLUOANAPLASMA ph. (Ref. FB725D)	<i>A. phagocytophilum</i>
MegaScreen® FLUORICKETTSIA con. (Ref. FB811)	<i>R. conorii</i>
MegaScreen® FLUOBABESIA canis (Ref. 822)	<i>B. canis</i>
<i>Leishmania</i> -Spot IF (França, Ref. 75 931)	<i>L.infantum</i>

5.6.2-Técnica de pesquisa de anticorpos

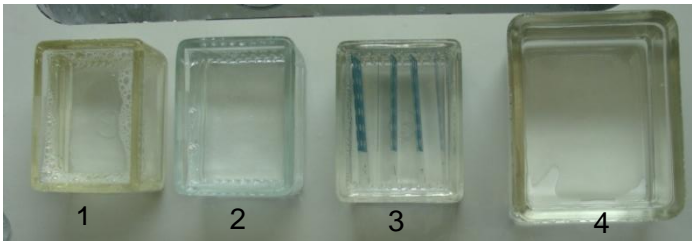
A técnica utilizada nos diferentes testes de imunofluorescência indirecta, foi a mesma. Para os testes da Megacor® os controlos positivo e negativo utilizados foram fornecidos no kit. Para o da *L.infantum* os controlos usados pertenciam à seroteca do Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária (UTL).

A realização da técnica foi de acordo com as indicações do fabricante:

1. As lâminas com antigénio, retiraram-se do frigorífico e colocaram-se à temperatura ambiente, durante 15 minutos;
2. Preparou-se o PBS, diluindo um frasco de PBS (BioMérieux® França, Ref. 75 931) em 1 litro de água destilada;
3. Preparou-se o PBS-Tween 80, através da junção de 1 mililitro de Tween 80 (Merck® Alemanha, Ref. 822 187) em 1 litro de PBS;
4. Descongelou-se as amostras de soro à temperatura ambiente;
5. Homogeneizou-se as amostras recorrendo ao agitador;
6. Numa microplaca, procedeu-se às diluições iniciais onde se juntou determinada quantidade de PBS e soro, tendo em conta o cutt-off (limiar de positividade) de cada teste. Primeiramente colocou-se o PBS, seguido do soro, procedendo-se então a uma correcta homogeneização.

7. Depositou-se 10 µl do soro diluído em 10 poços da lâmina no caso dos testes da Megacor e em 8 poços no caso dos da BioMérieux.
8. Depositar 10 µl de controlo positivo e negativo respectivamente, no poço 1 e 12 no caso dos testes da Megacor e 1 e 10 no caso dos da BioMérieux.
9. Incubou-se durante 30 minutos a 37 °C, em câmara húmida.
10. Procedeu-se à lavagem das lâminas: 1ª lavagem: rápida (1 a 2 segundos) com PBS/Tween 80; 2ª lavagem: 5 minutos mergulhadas num recipiente contendo PBS/Tween 80; 3ª lavagem: 5 minutos mergulhadas noutra recipiente contendo PBS/Tween 80; 4ª lavagem: rápida (1 a 2 segundos) com água destilada e secar as lâminas ao ar, ou com auxílio de um secador. (Fig. 12)

Figura 12-Tinas de lavagem



Legenda: 1- 1ª lavagem, 2- 2ª lavagem, 3- 3ªlavagem, 4- 4ª lavagem.

11. Depositou 10 µL do conjugado em cada poço.
12. Incubou-se durante 30 minutos a 37 °C em câmara húmida;
13. Repetiu-se o passo 11.
14. Procedeu-se à montagem definitiva colocando uma gota de meio de montagem fornecido com os kits e cobriu-se com uma lamela de 50x24 mm.
15. Efectuou-se de imediato a leitura em microscópio de fluorescência (Olympus DP10, Modelo BX50F), no comprimento de onda de 425 nm.

5.6.2- Limiar de positividade da técnica de IFI

Como referido anteriormente, a quantidade de anticorpos da amostra é determinada pela diluição limite (cutt-off) em que existe positividade. Esta positividade é determinada pelo operador, que avalia a presença de fluorescência. No caso dos testes do laboratório Megacor os limiares de positividade eram fornecidos, assim: *E. canis* 1:40, *A. phagocytophilum* 1:50, *R. conorii* 1:64 e *B. canis* 1:20. Para *L.infantum* 1:80 foi considerada a diluição limite (Gradoni, Gramiccia, Khoury & Marol, 2004) .

5.7-Análise estatística de resultados

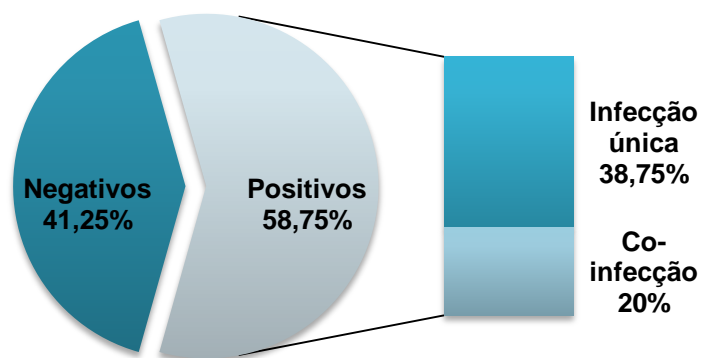
Os dados foram armazenados no software Microsoft Excel 2007[®], e para sua análise utilizou-se o software R 2.13.0[®] e a ferramenta Epitools[®]. Os resultados de todos os testes estatísticos foram considerados significativos quando o valor de p (significância) foi menor que 0,05. Para determinar a influência do sexo e do comprimento do pêlo, na transmissão das hemoparasitoses sob estudo, foi utilizado o teste exacto de Fisher. Para avaliar a influência das idades foi utilizado o teste de Wilcoxon.

6- Resultados

6.1- Avaliação global

Dos 80 animais testados 47 (58,75%) apresentavam-se positivos a pelo menos um agente sob estudo. Destes, 16 (20%) cães estavam positivos a mais do que um agente (co-infectado), e 31 (38,75%) apresentavam-se positivos a apenas um agente (Gráfico 1).

Gráfico 1- Proporção de positivos, negativos, infectados únicos e co-infectados (N=80)



6.2- Resultados obtidos pela técnica de imunofluorescência indirecta

6.2.1-Resultados obtidos e seroprevalências

Dos 80 cães testados pela técnica de IFI, a partir da diluição limite, estavam positivos: 13 animais apresentavam para *E.canis*, 10 para *A. phagocytophilum*, 19 para *R.conorii*, 16 para *B. canis* e 13 para *L. infantum*. As próximas imagens mostram o aspecto de um soro positivo e de um negativo dos diferentes agentes (Fig. 13,14, 15, 16 e 17)

Figura 13- Aspecto da técnica da IFI para *E.canis*, resultado positivo (esquerda) e resultado negativo (direita), ampliação de 600x aproximadamente (original)

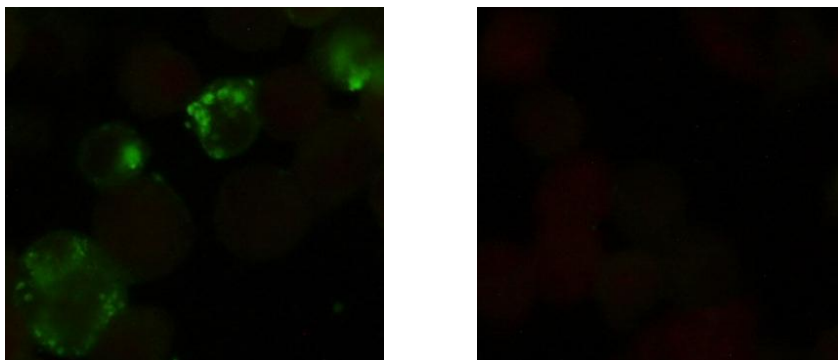


Figura 14- Aspecto da técnica da IFI para *A.phagocytophilum*, resultado positivo(esquerda) e resultado negativo (direita), ampliação de 600x aproximadamente (original)

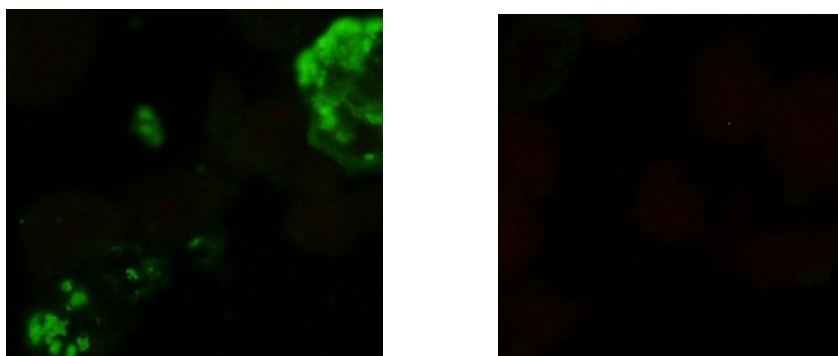


Figura 15- Aspecto da técnica da IFI para *R.conorii*, resultado positivo(esquerda) e resultado negativo (direita), ampliação de 600x aproximadamente (original)

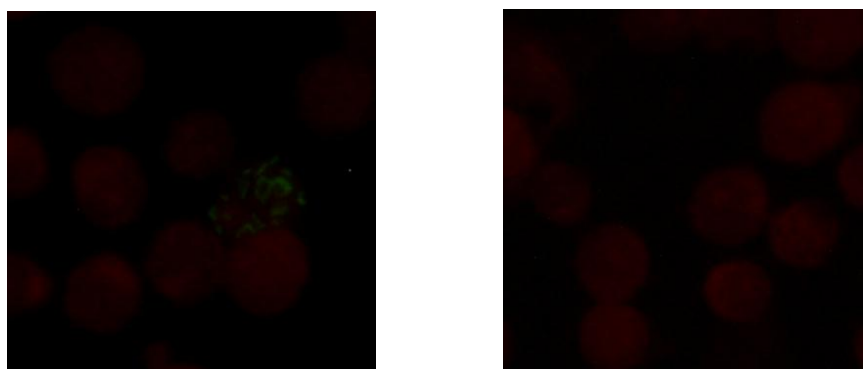


Figura 16- Aspecto da técnica da IFI para *B.canis*, resultado positivo(esquerda) e resultado negativo (direita), ampliação de 600x aproximadamente (original)

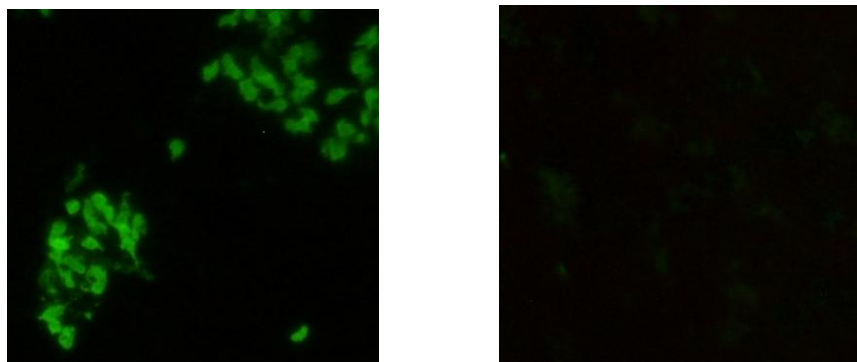
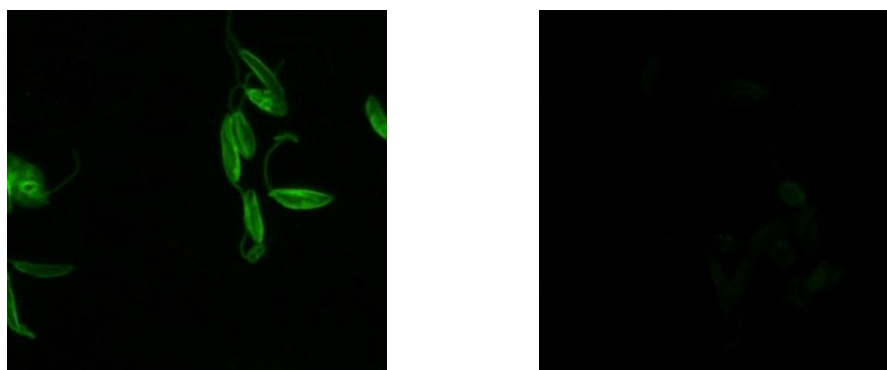


Figura 17- Aspecto da técnica da IFI para *L.infantum*, resultado positivo (esquerda) e resultado negativo (direita), ampliação de 600x aproximadamente (original)



Quanto às seroprevalências obtidas: a *R.conorii* apresentou a maior seroprevalência (23,75%), seguido de *B.canis* com 20%, *E.canis* e *L.infantum* apresentaram prevalência de 16,25% e *A.phagocytophilum* foi o menos seroprevalente (12,5%) (gráfico 2). Foi também possível o cálculo do intervalo de confiança das prevalências dos 5 agentes (tabela 2).

Gráfico 2- Número de animais positivos e seroprevalências dos diferentes agentes.

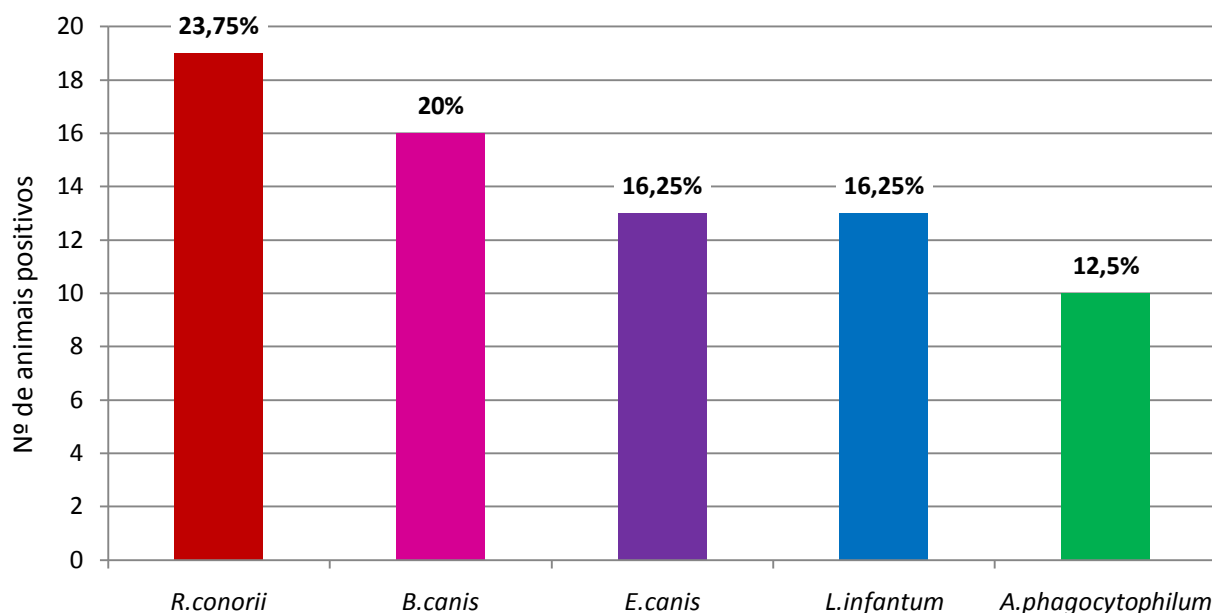


Tabela 2- Seroprevalências dos agentes e respectivos intervalos de confiança

Agente	Prevalência	Intervalo de confiança
<i>R.conorii</i>	23,75%	[14,73% - 32,79%]
<i>B.canis</i>	20%	[12,7% - 30%]
<i>E.canis</i>	16,25%	[9,75% - 25,84%]
<i>L.infantum</i>	16,25%	[9,75% - 25,84%]
<i>A.phagocytophilum</i>	12,5%	[6,9% - 21,5%]

As seroprevalências apresentadas são as seroprevalências aparentes, uma vez que para o cálculo das reais tem de se entrar em conta com a sensibilidade e especificidade do teste utilizado. Assim, para os agentes *E. canis*, *A. phagocytophilum*, *R. conorii* e *B. canis*, não foi possível calcular a seroprevalência real, pois o laboratório Megacor, não possui estudos que permitam a determinação da sensibilidade e especificidade dos seus testes (comunicação pessoal Stefanie Kimbacher, Laboratory product manager).

Quanto à prevalência real de *L.infantum*, já foi possível o seu cálculo, já que os dados de sensibilidade e especificidade do teste eram fornecidos. Esta foi calculada com o auxílio da ferramenta do EpiTools (tabela 3).

Tabela 3- Seroprevalência real de *L.infantum* na amostra e dados de sensibilidade e especificidade do teste.

Prevalência aparente	Prevalência real	Sensibilidade	Especificidade	Nível de confiança
16,2%	14%	94,4%	96,5%	95%

6.2.2- Título de anticorpos

- *R. conorii*- De entre os 16 animais positivos, 12 apresentavam título de 1:64 e 4 de 1:124.
- *B. canis*- Dos 16 cães positivos, 5 apresentaram título igual a 1:20, 6 título igual a 1:40 e 5 igual a 1:80.
- *E. canis*- Dos 13 animais positivos, 7 apresentavam títulos de 1:40 e 6 de 1:80.
- *L. infantum*- Dentro dos 13 positivos, 9 apresentavam título de 1:80 e 4 de 1:160.
- *A. phagocytophilum*- Dentro dos 10 positivos, 9 apresentavam títulos igual 1:50 e 1 igual a 1:100.

6.3- Influência de factores

Os factores sexo, idade e comprimento do pêlo do animal, foram avaliados quanto à influência que poderiam ter sobre a aquisição dos diferentes hemoparasitas por parte do animal. Nenhum destes factores aparentemente tem influência uma vez que o valor de $p < 0,05$, excepto no caso de *A.phagocytophilum* (tabela 4).

Tabela 4- Valores de p calculados através do teste exacto de Fisher e do teste de Wilcoxon

Agente patogénico	Sexo	Idade	Comprimento do pêlo
<i>R. conorii</i>	$p=0,41$	$p=0,08$	$p=0,77$
<i>B. canis</i>	$p=0,08$	$p=0,59$	$p=0,76$
<i>E.canis</i>	$p=0,76$	$p=0,07$	$p=0,33$
<i>L. infantum</i>	$p=0,28$	$p=0,29$	$p=0,53$
<i>A. phagocytophilum</i>	$p=0,74$	$p=0,02$	$p=0,28$

6.4- Co-infecções

Na amostra de 80 cães verificou-se a presença de 16 animais co-infectados, isto é, apresentavam-se infectados por dois ou mais agentes. As co-infecções por dois agentes representavam 6 combinações e 9 animais, enquanto que as provocada por três representavam 5 combinações e 7 animais (tabela 5). Foi calculado o nível de influência que os factores (sexo, idade e comprimento do pêlo), poderiam ter nas co-infecções e nenhum demonstrou ser significativo.

Tabela 5- Co-infecções e número de animais que as apresentavam

Co-infecções	Nº de animais
<i>B. canis</i> + <i>R. conorii</i>	1
<i>B. canis</i> + <i>E.canis</i>	1
<i>B. canis</i> + <i>A.phagocytophilum</i>	1
<i>E.canis</i> + <i>A.phagocytophilum</i>	4
<i>B. canis</i> + <i>L.infantum</i>	1
<i>R. conorii</i> + <i>L.infantum</i>	1
<i>B. canis</i> + <i>E.canis</i> + <i>R. conorii</i>	1
<i>B. canis</i> + <i>E.canis</i> + <i>A.phagocytophilum</i>	2
<i>E.canis</i> + <i>A.phagocytophilum</i> + <i>L.infantum</i>	1
<i>E.canis</i> + <i>R. conorii</i> + <i>L.infantum</i>	1
<i>B. canis</i> + <i>R. conorii</i> + <i>L.infantum</i>	2

Analisando a tabela 6, pode-se concluir que os agentes patogénicos *B.canis*, *E.canis* e *A. phagocytophilum* foram os que tiveram maior prevalência nos animais co-infectados 9, 9 e 8 respectivamente. *R.conori* e *L.infantum* tiveram menor prevalência, ambas 6 animais.

7-Discussão

Para a realização deste estudo foram analisados por IFI, 80 cães de um canil no distrito de Setúbal. A recolha de sangue foi realizada nos dias 23, 24 e 25 de Março de 2011 e a extracção do soro realizada ao final de cada dia. Os soros foram congelados e analisados posteriormente. Os agentes para os quais os cães foram testados (através da pesquisa de anticorpos anti-agente), são transmitidos por artrópodes. São eles: *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia conorii*, *Babesia canis* e *Leishmania infantum*. Estes agentes são transmitidos por ixodídeos, à excepção de *L.infantum* que é transmitida pelo flebótomo.

7.1-Prevalências

Os 80 cães, escolhidos aleatoriamente, eram todos de raça indeterminada, 51 (63,75%) fêmeas e 29 (36,25%) machos, idade média 5 anos e 2 meses, 26 (32,5%) cães tinham pêlo longo e 64 (67,5%) pêlo curto.

No que respeita à prevalência de infecção, numa análise global 47 (58,75%) cães encontravam-se positivos, semelhante ao resultado de 61% encontrado por Ferreira (2008). Destes 47, estavam positivos a apenas um agente 31 cães e a mais do que um agente 16 cães (co-infectados).

No caso de anticorpos anti-*E.canis*, foram considerados positivos ao teste de IFI 13 animais, assim a seroprevalência de *E.canis* na população foi de 16,25%. Este resultado difere dos de outros estudos realizados em Portugal, como o realizado por Alexandre (2005) que obteve 5,25%, ou dos 39% obtidos por Ferreira (2008), ou dos 44% conseguidos por Silveira (1992) ou mesmo dos 50% revelados pelo estudo de Bacellar, Dawson, Silveira e Filipe(1995), ambos realizados também no distrito de Setúbal. No entanto, os resultados obtidos aproximam-se de outros realizados em outros países da bacia mediterrânea. Como um estudo realizado em Espanha por Sáinz, Delgado, Amussategui, Tesouro e Cármenes (1996) que revelou uma prevalência de *E.canis* de 19,2%. Os resultados do estudo aproximaram-se ainda mais dos 16,7% obtidos por Solano-Gallego, Lull, Osso, Hegarty e Breitschwerdt (2006a), também em Espanha. Em estudos realizados em Itália, Otranto *et al.*, (2008) obteve 14,9% de seroprevalência de *E.canis* no sul do país e Torina e Caracappa (2006) obtiveram 21,7% em Sicília.

A seroprevalência de *A.phagocytophilum* foi de 12,5% (10 animais), resultado que se aproxima da prevalência 8,76% obtida por Ebani, Cerri, Fratini, Ampola, e Andreani (2008) em Itália e da de 11,3% obtida por Solano-Gallego *et al.*, (2006a) em Espanha, países da bacia mediterrânea.

A prevalência obtida no estudo, contudo, distanciou-se dos 54,5% demonstrados em Portugal (Santos *et al.*, 2009).

Quanto ao agente da febre botonosa, foram detectados anticorpos anti-*R.conorii* em 19 cães, 23,75%. Prevalência que se distanciou um pouco da obtida por Alexandre (2005) 38,5%, e dos 85,6% obtidos por Bacellar *et al.*, (1995). No entanto, não se distanciou muito dos 23,4% de Delgado e Cármenes (1995) e dos 26,1% obtidos por Segura-Porta *et al.*, (1998), ambos em Espanha. Apesar das diferenças que se verificaram em termos de percentagem de animais positivos a anticorpos contra *R.conorii*, é de notar que em vários estudos (Bacellar *et al.*, 1995; Alexandre, 2005; Ferreira, 2008; Duarte, 2008; Torina & Caracappa, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2006a), onde se realizou um rastreio a diferentes doenças transmitidas por ixodídeos, a infecção por *R.conorii* revelou-se sempre o agente mais prevalente, facto que foi também verificado no estudo realizado.

Em relação à *B.canis* apresentaram positividade no teste de IFI 20% dos animais, prevalência semelhante à obtida por Criado-Fornelio, Martinez-Marcos, Buling-Saraña e Barba-Carretero (2003), (18,18%) num estudo que incidiu sobre animais originários do sul da Europa incluindo Portugal. Em Portugal, foi também documentada a prevalência de 58,3% (Ferreira, 2008). Estudos realizados em diferentes zonas de Itália revelaram prevalências discrepantes 34% (Cassini *et al.*, 2009) e 5,17% (Torina & Caracappa, 2006).

A seroprevalência de *L.infantum* obtida neste estudo foi de 16,25% da população. Este resultado revelou-se superior aos obtidos pelos autores Coelho, Matos, Cardoso, Brancal e Martins (2009), que no seu estudo de leishmaniose canina na região da Cova da Beira tiveram uma prevalência de 12,5%. Foi também superior à do estudo Morales-Yuste *et al* (2009) (13,6%) realizado no sudeste de Espanha, também pertencente à bacia mediterrânea. Contudo, este estudo apresenta uma prevalência inferior à detectada no ano de 2003 no distrito de Setúbal, 21,3% (ONLEISH, 2011).

As prevalências verificadas neste estudo podem ser justificadas pelo habitat em que os cães estavam incluídos. A localização geográfica do canil, a presença de vegetação alta, grande densidade populacional, ausência de controlo químico ou biológico de vectores e as casas colectivas, são o ambiente que os vectores com características endo ou exofilicas procuram. Deste modo, uma vez confirmada a presença de vectores das doenças no distrito de Setúbal, nomeadamente de *Rh.sanguineus*, *I.ventalloi* e *I.ricinus* por Santos-Silva *et al.* (2011) e dos *P.perniciosus* e *P.ariasi* por Pires (2000) (citado por Afonso & Alves-Pires, 2008). E demonstrado que a distribuição dos agentes está relacionada com a dos seus vectores, compreende-se a prevalência apresentada neste canil.

7.2- Interpretação de resultados

A interpretação dos resultados deve entrar em conta com vários factores. A sensibilidade e especificidade dos testes, o limiar de positividade considerado, a possibilidade de reacção cruzada e a subjectividade inerente ao teste de IFI (uma vez que depende sempre da interpretação do operador).

No caso dos valores de sensibilidade e especificidade, como já referido, só foi possível adquirir os valores para o teste de IFI de *L.infantum*.

Quanto aos limiares de positividade (*cutt-off*) dos testes, foram escolhidos ou por serem recomendados, no caso dos testes da Megacor ou baseados em *guidelines* (Gradoni, Gramiccia, Khoury & Marol, 2004). e o facto de se tratar de uma doença endémica como no caso de *L.infantum*. No entanto, principalmente no caso dos testes às doenças transmitidas por ixodídeos (Megacor) este valor poderá ser questionado. Pois, uma vez que se tratam de doenças também elas endémicas o valor do limiar de positividade poderia ser aumentado. Por exemplo no caso de *R.conorii*, o valor de *cutt-off* considerado poderia ser 1:128 em vez dos considerados 1:64, uma vez que se trata de uma agente altamente disseminado (comunicação pessoal Dr^a Rita Sousa, Instituto Dr. Ricardo Jorge). Assim como o valor de *cutt-off* de *A.phagocytophilum* que no estudo de Santos *et al.* (2009) foi considerado 1:80.

As reacções cruzadas também devem ser contabilizadas, que apesar de não serem comuns já foi demonstrado que podem ocorrer (Waner, Strenger, Keysary & Harrus, 1998). O facto de em diversas lâminas se ter revelado bastante fluorescência basal poderá também significar que existiriam bastantes anticorpos em circulação, que poderiam dar origem a reacções cruzadas nos testes de IFI.

Quanto ao facto do resultado depender em grande parte da interpretação do operador, as medidas que foram tomadas no sentido de diminuir o erro foram: em todas as lâminas era colocado um controlo positivo e um negativo para servir de comparação (assim todos os poços teriam sofrido o mesmo processamento de lavagem, etc). O processamento e visualização de cada lâmina foi realizado sempre pelo mesmo operador, diminuindo assim a discrepância que poderia haver de operador para operador.

Uma nota importante na interpretação de resultados é lembrar que o facto dos animais possuírem anticorpos contra determinado agente, não significa que estejam doentes. Os animais poderão já ter tido doença e já estarem curados, no entanto, devido à longa duração dos anticorpos em circulação o teste de IFI continua positivo. Outra possibilidade são os animais assintomáticos, que apesar de desenvolverem anticorpos não desenvolvem sintomatologia.

7.3-Influência de factores

Uma vez que os 80 cães eram de raça indeterminada este factor não pode entrar em conta como uma influência. Assim sendo, considerou-se como possíveis factores influentes o sexo, a idade e o comprimento do pêlo. Todos estes factores, à excepção da idade no caso de *A.phagocytophilum*, apresentaram valores de $p > 0,05$, isto é nenhum dos factores exerce qualquer influência na aquisição de infecção. Estes dados estão de acordo com Sáinz *et al.*, (1996), M'ghirbi *et al.*, (2009), Waner e Harrus (2000) e Navarrete e Nieto, (1999) para *E.canis* pois nestes estudos demonstram que o sexo, a idade e o comprimento do pêlo do animal não exercem qualquer influência na aquisição de doença. Quanto a influência dos factores na infecção por *A.phagocytophilum*, verificou-se que o sexo e o comprimento do pêlo não teriam qualquer influência. No entanto, no caso da idade o valor de $p < 0,05$ o que pode indicar influência deste factor. Contudo, devido à pequena dimensão da amostra e às conclusões da bibliografia consultada (Jäderlund, Egenvall, Bergström & Hedhammar, 2007), não foi considerado importante nenhum factor nesta infecção.

Neste estudo não foi encontrado qualquer tipo de relação entre os factores e a infecção por *R.conorii*, à semelhança do descrito na bibliografia consultada (Delgado e Cármenes, 1995)

Em desacordo com Irwin (2005) para *B.canis* uma vez que estes afirmam a influência dos factores e neste estudo isso não se verificou. Na infecção por *L.infantum* parece de maior importância a resistência intrínseca de cada animal do que factores como o sexo, a idade ou o comprimento do pêlo. Esta resistência será determinada geneticamente e por isso aparentemente será mais significativo a presença de genes que a confirmam e consequentemente a raça do animal, do que outros factores (Baneth *et al.*, 2005).

7.4- Co-infecções

Neste estudo foram detectados 16 animais positivos a mais do que um agente no teste de IFI, isto é 20% da população estaria co-infectada. Infectados com dois agentes foram encontrados 9 cães: 1 por *B.canis* e *R.conorii*, 1 por *B.canis* e *E.canis*, 1 por *B.canis* e *A.phagocytophilum*, 4 por *E.canis* e *A.phagocytophilum*, 1 por *B.canis* e *L.infantum* e 1 por *R.conorii* e *L.infantum*. Infectados por três agentes foram encontrados sete animais: 1 por *B. canis*, *E.canis* e *R. conorii*, 2 por *B. canis*, *E.canis* e *A.phagocytophilum*, 1 por *E.canis*, *A.phagocytophilum* e *L.infantum*, 1 por *E.canis*, *R. conorii* e *L.infantum* e 2 por *B. canis*, *R. conorii* e *L.infantum*.

A presença de co-infecções foi também registada noutros estudos (Ferreira, 2008; Duarte,2008; Cardoso 2010; Harrus *et al.*, 2005;Baneth *et al.*, 2005)

Este fenómeno pode ser justificado pela partilha de vectores de diferentes doenças (Cardoso, 2010; Carrade *et al.*, 2009 ; Hartelt *et al.*, 2004) , como demonstrado por Alexandre (2005) que

no seu estudo encontrou *Rh.sanguineus* portadores de *R.conorii* e *E.canis*. Ou pela presença no mesmo local de diferentes vectores (Baneth, 2006), pois normalmente procuram as mesmas condições climáticas e os mesmos nichos ecológicos. Destas co-infecções podem advir complicações clinicopatológicas que além de dificultarem o diagnóstico, dificultam a terapêutica (Day, 2011).

8-Conclusão

Pode-se concluir que os objectivos do estágio curricular e do estudo realizado foram atingidos. No estágio realizado na clínica veterinária Linda-A-Vet, foram adquiridos preciosos conhecimentos nas áreas de medicina interna, imagiologia, cirurgia, internamento e gestão clínica, essenciais para o desenvolvimento de uma futura carreira em clínica de animais de companhia. No estágio no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina Veterinária da UTL, adquiriram-se conhecimentos laboratoriais fundamentais à realização do estudo e importantes para a profissão.

Através da revisão bibliográfica conclui-se que todas estas infecções podem aparecer sob diversas formas, que é essencial conhecer a sua patogénese para uma terapêutica correcta e que a melhor forma de as evitar é fazendo prevenção dos seus vectores. Este ponto é fulcral e o clínico deve transmitir essa ideia aos donos dos animais, “pois mais vale prevenir que remediar”.

Os objectivos estudo: detecção de anticorpos contra os agentes patogénicos, determinação da sua seroprevalência numa população, determinação da influência dos diversos factores (sexo, idade e comprimento do pêlo) e detecção de eventuais co-infecções, foram atingidos.

Fica por determinar, a existência de reacções cruzadas e a prevalência dos agentes por pesquisa do antigénio. Esta falha poderia ser colmatada sujeitando as mesma amostras a técnicas que façam a pesquisa do agente (exemplo: PCR), para que posteriormente se possa fazer o cruzamento de dados e tirar novas conclusões.

Foram contactados laboratórios e empresas farmacêuticas com o intuito de aprofundar este estudo, não foram obtidas respostas.

Bibliografia

- Aboge, G.O., Jia, H., Terkawi, M.A., Goo, Y., Kuriki, K., Nishikawa, Y., Igarashi, I., Suzuki, H. & Xuan, X. (2007). A novel 57-kDa merozoite protein of *Babesia gibsoni* is a prospective antigen for diagnosis and serosurvey of canine babesiosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Parasitology*, 149(1-2):85-94.
- Afonso, M. & Alves-Pires, C. (2008). Capítulo II: Bioecologia dos vectores. In G.M. Santos-Gomes, & I.M.P. Fonseca (Eds.). *Leishmaniose Canina*. (pp. 27-40). Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A.
- Alexander, B. & Maroli, M. (2003). Control of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*.17(1):1-18
- Alexandre, N., Santos A.S., Bacellar, F., Boinas, F.J., Nuncio, M.S. & Sousa, R. (2011) Detection of *Rickettsia conorii* strains in Portuguese dogs (*canis familiaris*). *Ticks and tick-borne diseases* 2:119-122
- Alexandre, N.M.L. (2005) Estudo clínico e epidemiológico de febre botonosa, ehrlichiose canina e borreliose de Lyme numa população de canídeos domésticos do Algarve. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária- Universidade Técnica de Lisboa.
- Alexandre-Pires, G., de Brito, M.T., Algueró, C., Martins, C., Rodrigues, O.R., da Fonseca, I.P. & Santos-Gomes, G. (2010) Canine leishmaniasis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 137(3-4):275-83.
- Alexandre-Pires GM. (2008) Capítulo IV: Patogenia e lesões da leishmaniose canina. In G.M. Santos-Gomes & I.M.P. Fonseca (Eds.). *Leishmaniose Canina*. (pp. 53-68). Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A.
- Alleman, A.R. (2005). The diagnosis and treatment of tick borne diseases in dogs. Proceeding of the North American Veterinary Conference. EUA: Orlando, Florida. Acedido a 7/4/11, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/navc/2005/SAE/192.pdf?LA=1>
- Allred, D.R. (2003) Babesiosis: persistence in the face of adversity. *Trends of Parasitology*. 19(2):51-5.
- Altet, L., Francino, O., Solano-Gallego, L., Renier, C. & Sánchez A. (2002). Mapping and sequencing of the canine NRAMP1 gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. *Infection and immunity*. 70(6): 2763-71.
- Babalís, T., Dupont, H.T., Tselentis, Y., Chatzichristodoulou, C. & Raoult, D. (1993). *Rickettsia conorii* in Greece: comparison of a microimmunofluorescence assay and western blotting for seroepidemiology. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. (6):784-92. [Abstract] Acedido a 15/5/11, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=rickettsia%20conorii%20in%20greece%3A%20comparasion%20of%20a%20microimmunofluorescence%20assay%20and%20western%20blotting>

- Bacellar, F., Dawson, J.E., Silveira, C.A. & Filipe, A.R. (1995) Antibodies against Rickettsiaceae in dogs of Setúbal, Portugal. *Central European journal of public health*, 3(2):100-2.
- Baldrige, G.D., Scoles, G.A., Burkhardt, N.Y., Schloeder, B., Kurtti, T.J. & Munderloh, U.G. (2009) Transovarial transmission of Francisella-like endosymbionts and *Anaplasma phagocytophilum* variants in *Dermacentor albipictus* (Acari: Ixodidae). *Journal of medical entomology*, 46(3):625-32.
- Bacellar, F., Núncio, M.S., Reháček, & Filipe, A.R. (1991). Rickettsiae and rickettsioses in Portugal. *European journal of epidemiology*, 7(3):291-3.
- Baneth, G. (2006). Canine Ehrlichiosis-A silent killer. Ip-Infectious & Parasitic Diseases, World Congress WSAVA/FECAVA/GSAVA, 479-481. Acedido a 6/2/11, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture16/Baneth1.pdf?LA=1>
- Baneth, G.(2010a) Ehrlichial and Anaplasma infections. Proceedings of the 35th World Small Animal Veterinary Congress. Geneva, Suíça. Acedido a : 6/5/11, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2010/d12.pdf>
- Baneth G. (2010b). Canine leishmaniasis. Proceedings of the 35th World Small animal Veterinary congress. Geneva, Suíça. Acedido a: 8/5/11 <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2010/d11.pdf>
- Baneth, G., Day, M., Roura, X. & Shaw, S. (2005). Leishmaniosis. In S. E., Shaw & M. J., Day (Eds.), *Arthropod-borne infectious diseases of dog and cat.* (pp.89-99). Manson Publishing Ltd
- Beugnet, F. & Marié, J.L. (2009) Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Veterinary Parasitology*,163(4):298-305.
- Bélangier, M., Sorenson, H.L., France, M.K., Bowie, M.V., Barbet, A.F., Breitschwerdt, E.B. & Alleman, A.R. (2002). Comparison of serological detection methods for diagnosis of *Ehrlichia canis* infections in dogs. *Journal of clinical microbiology*. 40(9):3506-8.
- Bexfield, N.H., Villiers, E.J. & Herrtage, M.E. (2005). Immune-mediated haemolytic anaemia and thrombocytopenia associated with *Anaplasma phagocytophilum* in a dog. *The Journal of small animal practice*, 46(11):543-8.
- Boggiatto, P.M., Gibson-Corley, K.N., Metz, K., Gallup, J.M., Hostetter, J.M., Mullin, K. & Petersen, C.A. (2011). Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. *PLoS neglected tropical diseases*. 5(4):e1019.
- Boozer, A.L. & Macintire, D.K. (2003). Canine babesiosis. *The Veterinary clinics of North America. Small Animal Practice*. 33(4):885-904
- Bowman, D.D., Lynn R.C., Eberhard, M.L. & Alcaraz, A. (2003). *Georgis' Parasitology for Veterinarians*, (8ª edição), (pp. 1-82). Philadelphia W.B. Saunders Company

- Breitschwerdt, E.B. (2004) Capítulo 166. Obligate intracellular bacterial pathogens. Ettinger, S.J., Feldman E. C. Textbook of veterinary internal medicine. 6ª edição, (pp. 631-636) Elseviers Saunders
- Breitschwerdt, E. (2007). Clinicians, causation, and infectious disease. Proceedings of the north American Veterinary conference. EUA: Orlando, Florida. Acedido a 4/5/11, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/navc/2007/SAE/201.asp?LA=1>
- Breitschwerdt, E.B., Moncol, D.J., Corbett, W.T., MacCormack, J.N., Burgdorfer, W., Ford, R.B. & Levy, M.G. (1987b) Antibodies to spotted fever-group rickettsiae in dogs in North Carolina. *American journal of veterinary research*. 48(10):1436-40. [Abstract] disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3118744>
- Breitschwerdt, E.B., Woody, B.J., Zerbe, C.A., De Buyscher, E.V. & Barta, O. (1987a) Monoclonal gammopathy associated with naturally occurring canine ehrlichiosis. *Journal of veterinary internal medicine*. 1(1):2-9.[Abstract] Acedido 3/3/11, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3506617>
- Bremer, W.G., Schaefer, J.J., Wagner, E.R., Ewing, S.A., Rikihisa, Y., Needham, G.R., Jittapalong, S., Moore, D.L. & Stich R.W. (2005). Transtadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology*, 131, 95-105
- Cabral, M., O'Grady, J.E., Gomes, S., Sousa, J.C., Thompson, H. & Alexander, J. (1998). The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology*, 76(3):173-80.
- Cacciò, S.M., Antunovic, B., Moretti, A., Mangili, V., Marinculic, A., Baric, R.R., Slemenda, S.B. & Pieniazek, N.J. (2002) Molecular characterisation of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. *Veterinary Parasitology*, 106(4):285-92.
- Campino, L. & Maia, C. (2010). Epidemiologia das leishmanioses em Portugal. *Acta médica portuguesa*, 23(5):859-64.
- Caprariis, D., Dantas-Torres, F., Capelli, G., Mencke, N., Stanneck, D., Breitschwerdt, E.B. & Otranto, D. (2011). Evolution of clinical, haematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-borne pathogens. *Veterinary microbiology*, 149(1-2):206-12.
- Cardoso, L., Costa, A., Tuna, J., Vieira, L., Eyal, O., Yisaschar-Mekuzas, Y. & Baneth, G. (2008). *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* infections in dogs from northern Portugal. *Veterinary Parasitology*, 156(3-4):199-204.
- Cardoso, L., Yisaschar-Mekuzas, Y., Rodrigues, F.T., Costa, A., Machado, J., Diz-Lopes, D. & Baneth, G. (2010). Canine babesiosis in northern Portugal and molecular characterization of vector-borne co-infections. *Parasites & Vectors*, 3(1):27.
- Carrade, D.D., Foley, J.E., Borjesson, D.L. & Sykes, J.E. (2009) Canine granulocytic anaplasmosis: a review. *Journal of veterinary internal medicine*. Nov-Dec;23(6):1129-41.

- Cassini, R., Zanutto, S., Frangipane di Regalbano, A., Gabrielli, S., Calderini, P., Moretti, A., Tampieri, M.P. & Pietrobelli, M. (2009). Canine piroplasmiasis in Italy: epidemiological aspects in vertebrate and invertebrate hosts. *Veterinary Parasitology*, 165(1-2):30-5.
- Castro M.B., Machado, R.Z., de Aquino, L.P., Alessi, A.C. & Costa, M.T. (2004). Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Veterinary Parasitology*, 119(1):73-86.
- Center of Food Security and Public Health, (2005). Ehrlichiosis. Iowa State University, Ames, IA, USA
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O. & Malandrin, L. (2009) Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary Research*, 40(2):37.
- Coelho, S., Matos A., Cardoso, L., Brancal, H. & Martins, M. (2005). Estudo sero-epidemiológico da leishmaniose canina na região da cova da beira. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 12 (1-2) 289
- Cohn, L.A. (2003) Ehrlichiosis and related infections. *Veterinary clinics of North America small animal practice*, 33: 863-884
- Corrales G.M., Vázquez F.A.R., Campillo, M.C. Capítulo 38, Parasitosis cutáneas. In M.C. Campillo, C.S. Acedo, S.H. Rodríguez, I.N. López-Cozar, P.D. Baños, H.Q. Romero & M.C. Varela. *Parasitología Veterinaria*. (pp. 700-725) McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U.
- Criado-Fornelio, A., Martínez-Marcos, A., Bulíng-Saraña, A. & Barba-Carretero, J.C. (2003). Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part I. Epizootiological aspects. *Veterinary Parasitology*, 113(3-4):189-201
- Dantas-Torres, F. (2010). Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors*, 3:26.
- Dantas-Torres, F. (2008). The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*, 152(3-4):173-85.
- Dantas-Torres, F. (2007). The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, 149(3-4) 139-146.
- Day, M.J. (2005). Capítulo 3 Interaction of the host immune system with arthropods and arthropod-borne infectious agents. In S.E. Shaw, M.J. Day. Arthropod-borne infectious diseases of dog and cat, (pp. 30-40). Manson Publishing Ltd
- Day, M.J. (2011) The immunopathology of canine vector-borne diseases. *Parasites & Vectors*.4:48.

- Delgado, S., Cármenes, P. (1995). Canine seroprevalence of *Rickettsia conorii* infection (Mediterranean spotted fever) in Castilla y León (northwest Spain). *European Journal of Epidemiology*, 11(5):597-600.
- Donatien, A. & Lestoquard, F.,(1935) Existence en Algerie d'une Rickettsia du chien. Acedido a : 4/5/11 disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ee/canis.html>
- Dostálová, A., Votýpka, J., Favreau, A.J., Barbian, K.D., Volf, P., Valenzuela, J.G. & Jochim, R.C. (2011) The midgut transcriptome of *Phlebotomus (Larrousius) perniciosus*, a vector of *Leishmania infantum*: comparison of sugar fed and blood fed sand flies. *BMC genomics*.12:223.
- Duarte, M.T.T.R (2008). Riquetsioses do grupo das febres exantemáticas em canídeos domésticos em Portugal: revisão bibliográfica e estudo retrospectivo. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária- Universidade Técnica de Lisboa.
- Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y. & Rurangirwa, F.R. (2001). Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Internal journal of systematic and evolutionary microbiology* 51, 2145–2165
- Ebani, V., Cerri, D., Fratini, F., Ampola, M. & Andreani, E. (2008). Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in domestic and wild animals from central Italy. *New Microbiologica*. 31:371-375
- Epitools (2009) Estimated true prevalence and predictive values from survey testing. Disponível em: <http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=TruePrevalence>
- Ferrer, L. & Koutinas, A. (2009). Leishvet symposium-Clinical staging of canine leishmaniosis: consensus statement presentation. Proceedings of Southern European veterinary conference. Barcelona, Espanha. Acedido a: 4/5/11, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/sevc/2009/eng/abstract3.pdf>
- Ferreira, M.F. (2008). Parasitoses caninas transmitidas por ixodídeos. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária- Universidade Técnica de Lisboa.
- Finizio, A.L., Kleuskens, J.A., Van De Crommert, J., Gorenflot, A., Carcy, B. & Schetters, T.P. (2011). Soluble parasite antigens from *Babesia canis* do not directly activate the kallikrein system in dogs infected with *Babesia canis*. *Veterinary Parasitology*, 176(2-3):132-8.
- Font, A., Closa, J.M. & Mascort, J. (1994) Monoclonal gammopathy in a dog with visceral leishmaniasis. *Journal of veterinary internal medicine*, 8(3):233-5.

- Forrester, S.D & Rogers, K. (2000). Capítulo 140 Hyperviscosity Syndrome. Seção XII. In J.D. Weiss & K.J. Wardrop. *Veterinary Hematology*. Quinta edição, (pp.929-931) Blackwell Publishing Ltd
- Freitas, E., Melo, M.N., da Costa-Val, A.P. & Michalick, M.S. (2006). Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology*, 137(1-2):159-67.
- Furlanello, T., Fiorio, F., Caldin, M., Lubas, G. & Solano-Gallego, L. (2005). Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form Babesia from dogs of northeastern Italy. *Veterinary Parasitology*, 134(1-2):77-85.
- Gelfand, J.A. & Callahan, M.V. (2003). Babesiosis: An Update on Epidemiology and Treatment. *Current Infectious Disease Reports*, 5:53-58
- Genchi, C., Beninati, T., Mortarino, M. & Genchi, M. (2005) Tick-borne diseases: an European perspective. Enfermedades transmitidas por garrapatas en Europa. Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association Cidade do México, México. Acedido a 4/5/11, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2005/27.pdf>
- Ghosh, S., Azhahianambi, P. & Yadav, M.P. (2007). Upcoming and future strategies of tick control: a review. *Journal of vector borne diseases*, 44(2):79-89.
- google maps, 2001- <http://maps.google.pt/maps?hl=pt-PT&tab=wl>
- Granick, J.L., Armstrong, P.J. & Bender, J.B. (2009). *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs: 34 cases (2000-2007). *Journal of American veterinary association*, 234(12):1559-65.
- Gradoni, L., Gramiccia, M., Khoury, C., Marol, M. (2004). Linee guida per il controllo del serbatoio canino della leishmaniosi viscerale zoonotica in Italia. Rapporti ISTISAN, 04/12. Istituto superior de sanità, Rome
- Greene, C., Breitschwerdt, E. (2006). Capítulo 29: Rocky mountain spotted fever, murine typhuslike disease, rickettsial pox, typhus, and Q fever. In C Greene. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3ª edição, (pp. 232-241) Elsevier Inc.
- Greig, B., Asanovich, K.M., Armstrong, P.J. & Dumler, J.S. (1996). Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. *Journal of clinical microbiology*, 34(1):44-8.
- Greig, B., Armstrong, J.P. (2006) Capítulo 28: Canine granulocytotropic anaplasmosis (*A.phagocytophilum* infection). In C. Greene. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3ª edição, (pp. 219-224). Elsevier Inc.
- Guarga, J.L., Moreno, J., Lucientes, J., Gracia, M.J., Peribáñez, M.A., Alvar, J. & Castillo, J.A. (2000) Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. *Research in veterinary science*, 69(3):249-53.

- Hanson, M., Tarpley, H.L., Latimer, K.S., Moore, H. (2005). Canine Granulocytic Ehrlichiosis with Joint Infection, a Study Case. College of Veterinary Medicine, University of Georgia, Athens,GA,
- Hartelt, K., Oehme, R., Frank, H., Brockmann, S.O., Hassler, D., Kimmig, P.(2004). Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia sp.*), *Wolbachia sp.*, *Rickettsia sp.*, and *Babesia sp.* in Southern Germany. *Internal journal of medical microbiology*, 293 Suppl 37:86-92.
- Harrus, S., Day, M.J., Waner, T. & Bark, H. (2001). Presence of immune-complexes, and absence of antinuclear antibodies, in sera of dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. *Veterinary microbiology*, 83(4):343-9.
- Harrus, S., Kass, P.H., Klement, E. & Waner, T. (1997). Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *Veterinary Record*, 141,360-363;
- Harrus, S., Lior, Y., Ephros, M., Grisaru-Soen, G., Keysary, A., Strenger, C., Jongejan, F., Waner, T. & Baneth, G. (2007) *Rickettsia conorii* in humans and dogs: a seroepidemiologic survey of two rural villages in Israel. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 77(1):133-5.
- Harrus, S., Waner, T., Bjöersdorff, A. & Shaw S. (2005). Ehrlichiosis and anaplasmosis. In S.E. Shaw & M.J. Day. Arthropod-borne infectious diseases of dog and cat. (pp. 120-133). Manson Publishing Ltd
- Harrus, S., Waner, T., Bark, H., Jongejan, F. & Cornelissen, A.W. (1999). Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *Journal of clinical microbiology*, 37(9):2745–9.
- Harrus, S., Waner, T., Keysary, A., Aroch, I., Voet, H. & Bark, H. (1998). Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 62(1):15-27.
- Harrus, S., Waner, T., Weiss, D.J., Keysary, A. & Bark, H. (1996). Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 51:13-20
- Hess, P.R., English,R.V., Hegarty, B.C., Brown, G.D. & Breitschwerdt, E.B. (2006). Experimental *Ehrlichia canis* in dog does not cause immunosuppression. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 109: 117-125
- Hodzic, E., Fish, D., Marezki, C.M., De Silva, A.M., Feng, S. & Barthold, S.W. (1998). Acquisition and transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes scapularis* ticks. *Journal of clinical microbiology*, 36(12):3574-8.
- Hohenhaus, A.E. (1995). Syndromes of hiperglobulinemia: diagnosis and therapy. In J. Bonagura & D. Twedt. *Kirk's Current Veterinary Therapy*. XII, (pp.523-530).Elsevier Inc.
- Hunfeld, K.P., Hildebrandt, A. & Gray, J.S. (2008). Babesiosis: recent insights into an ancient disease. *International journal for parasitology*, 38(11):1219-37.

- Ikeda-Garcia, F.A., Lopes, R.S., Marques, F.J., de Lima, V.M., Morinishi, C.K., Bonello, F.L., Zanette, M.F., Perri, S.H. & Feitosa, M.M. (2007). Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Veterinary Parasitology*, 143(3-4):254-9.
- Inokuma, H., Nane, G., Uechi, T., Yonahara, Y., Brouqui, P., Okuda, M. & Onishi, T. (2001) Survey of tick infestation and tick-borne ehrlichial infection of dogs in Ishigaki Island, Japan. *The journal of veterinary medical science*, 63(11):1225-7.
- Instituto de meteorologia, IP Portugal. (2011). Acompanhamento do clima. Março. Acedido a : 29/6/11 disponível em: <http://www.meteo.pt/pt/oclima/acompanhamento/index.jsp?selTipo=m&selVar=tx&selAno=a=me&selAno=-1>
- Iqbal, Z., Chaichanasiriwithaya, W. & Rikihisa, Y. (1994). Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. *Journal of clinical microbiology*, 32(7):1658-62.
- Irwin, P. (2005). Babesiosis and cytauzoonosis. In S.E. Shaw & M.J. Day. *Arthropod-borne infectious diseases of dog and cat*, (pp. 63-77) Manson Publishing Ltd
- Irwin, P.J. (2007a) Blood, bull terriers and babesiosis: a review of canine babesiosis. Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association. Sydney, Australia. Acedido a : 12/5/11, disponível em: http://www.ivis.org/proceedings/Wsava/2007/pdf/31_20070330002034_abs.pdf
- Irwin, P.J. (2009) Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasites & Vectors*, 26;2, Suppl 1:S4
- Irwin, J.P. (2007b) Pups pcrs and platelets: Ehrlichia and Anaplasma infectins of dogs in Australia. Proceedings of the WSAVA Sydney, Australia. Acedido a: 22/5/11, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/Wsava/2007/pdf/irwin1006.pdf>
- Jäderlund, K.H., Egenvall, A., Bergström, K. & Hedhammar, A. (2007) Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs with neurological signs. *Veterinary Record*, 160(24):825-31.
- Kenny, M. (2005) Laboratory diagnosis of arthropod-transmitted infections. In S.E. Shaw & M.J. Day. *Arthropod-borne infectious diseases of dog and cat*, (pp. 30-40) Manson Publishing Ltd
- Keysary, A. & Strenger, C. (1997). Use of enzyme-linked immunosorbent assay techniques with cross-reacting human sera in diagnosis of murine typhus and spotted fever. *Journal of clinical microbiology*, 35(4):1034-5.
- Kidd, L., Maggi, R., Diniz, P.P., Hegarty, B., Tucker, M. & Breitschwerdt, E. (2008). Evaluation of conventional and real-time PCR assays for detection and differentiation of Spotted Fever Group Rickettsia in dog blood. *Veterinary microbiology*. 129(3-4):294-303.
- Kirkland, B.H., Westwood, G.S. & Keyhani, N.O. (2004). Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae tick species

Dermacentor variabilis, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. *Journal of medical entomology*, 41(4):705-11. [Abstract] aceso a 14/5/11 disponvel em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15311464>

- Kohn, B., Galke, D., Beelitz, P. & Pfister, K. (2008). Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, 22(6):1289-95
- Lappin R. M. (2004) Capitulo 168. Protozoal and miscellaneous infections. Ettinger, S.J., Feldman E. C. *Textbook of veterinary internal medicine*. 6ª edio, (pp. 638-646) Elseviers Saunders.
- Laus, J.L. (2000) Uveitis in systemic disease in the dog. Proceeding of the SEV Conference, Barcelona, Espanha. Aceso a: 27/3/11, disponvel em: <http://www.ivis.org/proceedings/sevc/2009/eng/Laus2.pdf>
- Leitner, M., Yitzhaki, S., Rzotkiewicz, S. & Keysary, A. (2002). Polymerase chain reaction-based diagnosis of Mediterranean spotted fever in serum and tissue samples. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 67(2):166-9
- Li, H. & Walker, D.H. (1992). Characterization of rickettsial attachment to host cells by flow cytometry. *Infection and immunity*, 60(5):2030-5.
- Lilliehömök I, Egenvall A, Tvedten HW. 1998 Hematopathology in dogs experimentally infected with a Swedish granulocytic Ehrlichia species. *Veterinary clinical Pathology*, 27(4):116-122. [Abstract] aceso a: 26/3/11, disponvel em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=hematopathology%20in%20dogs%20experimentally%20infected%20with%20a%20swedish%20granulocytic%20ehrlichia>
- Liu, Y., Zhang, Z., Jiang, Y., Zhang, L., Popov, V.L., Zhang, J., Walker, D.H. & Yu, X.J. (2011). Obligate intracellular bacterium Ehrlichia inhibiting mitochondrial activity. *Microbes and Infection*, 13(3):232-8
- Lotric-Furlan, S., Rojko, T., Petrovec, M., Avsic-Zupanc, T. & Strle, F. (2006). Epidemiological, clinical and laboratory characteristics of patients with human granulocytic anaplasmosis in Slovenia. *Wien Klin Wochenschrift*, 118(21-22):708-13.
- Magi, B. & Liberatori, S. (2005) Immunoblotting techniques. *Immunochemical protocols. Methods in Molecular Biology*, 295:227-253, consultado a 3/5/11, disponvel em: <http://www.springerlink.com/content/xgr4512401431n62/#section=83736&page=1&locus=17>
- Maia, C., Afonso, M.O., Neto, L., Dionisio, L. & Campino, L. (2009). Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve Region, Portugal. *Journal of vector borne diseases*, 46: 268–272
- Maia, C., Gomes, J., Cristovao, J., Nunes, M., Martins, A., Rebello, E. & Campino, L. (2010ª) Feline Leishmania infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Veterinary Parasitology*, 174(3-4):336-40.

- Maia, C., Nunes, M., Cristóvão, J. & Campino, L. (2010b) Experimental canine leishmaniasis: clinical, parasitological and serological follow-up. *Acta Tropica*, 116(3):193-9.
- Maroli, M. (2009). Strategic control of leishmania vectors in urban areas. Proceedings of the 34th world small animal veterinary congress. São Paulo, Brasil. Acedido a: 24/5/11, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2009/lecture23/3.pdf?LA=1>
- Martinod, S., Gilot, B. (1991) Epidemiology of canine babesiosis in relation to the activity of *Dermacentor reticulatus* in southern Jura (France). *Experimental & applied acarology*, 11: 215-222
- Máthé, A., Vörös, K., Papp, L., Reiczigel, J. (2006). Clinical manifestations of canine babesiosis in Hungary (63 cases). *Acta veterinaria hungarica*, 54(3):367-85.
- Matijatko, V., Mrljak, V., Kis, I., Kucer, N., Forsek, J., Zivicnjak, T., Romić, Z., Simec, Z. & Ceron, J.J. (2007) Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Veterinary parasitology*, 144(3-4):242-50.
- Mavromatis, K., Doyle, C.K., Lykidis, A., Ivanova, N., Francino, M.P., Chain, P., Shin, M., Malfatti, S., Larimer, F., Copeland, A., Detter, J.C., Land, M., Richardson, P.M., Yu, X.J., Walker, D.H., McBride, J.W. & Kyrpides, N.C. (2006). The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. *Journal of bacteriology*, 188(11):4015-23.
- McDade, J.E. (1990). Ehrlichiosis- A Disease of Animals and Humans. *The journal of Infectious Diseases*, 161:609-617
- Meana, A. & Vásquez, F.A. (2005) Capítulo 24: Parasitosis cutáneas y afines. In M.C. Campillo, C.S. Acedo, S.H. Rodríguez, I.N. López-Cozar, P.D. Baños, H.Q. Romero & M.C. Varela. *Parasitología Veterinaria*. (pp.400-448) McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U.
- Meireles, J.A.F.S. (2008). Capítulo VII: Terapêutica e profilaxia da leishmaniose canina. In Santos-Gomes, G. M., Fonseca, I.M.P. (Eds.). *Leishmaniose Canina*. (pp. 27-40). Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A.
- Mencke, N., Volf, P., Volfova, V. & Stanneck, D. (2003). Repellent efficacy of a combination containing imidacloprid and permethrin against sand flies (*Phlebotomus papatasi*) in dogs. *Parasitology Research*, 90 Suppl 3:S108-11
- M'ghirbi, Y., Ghorbel, A., Amouri, M., Nebaoui, A., Haddad, S. & Bouattour, A. (2009). Clinical, serological, and molecular evidence of ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs in Tunisia. *Parasitology Research*, 104(4):767-74.
- Michalsky, E.M., Rocha, M.F., da Rocha-Lima, A.C., França-Silva, J.C., Pires, M.Q., Oliveira, F.S., Pacheco, R.S., dos Santos, S.L., Barata, R.A., Romanha, A.J., Fortes-Dias, C.L. & Dias, E.S. (2007). Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Veterinary Parasitology*, 147(1-2):67-76.

- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Oliva, G. & Baneth, G. (2008). Canine leishmaniosis-new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends of Parasitology*, 24(8):371-7.
- Modiano, J.F. & Ritt, M.G. (2000). Secção XII, Capítulo 137: Immunoassays. In J.D. Weiss, K.J. Wardrop. *Veterinary Hematology*. Quinta edição, (pp.910-916). Blackwell Publishing Ltd
- Morales-Yuste, M., Martín-Sánchez, J., Acedo-Sánchez, C., Barón, S., Díaz-Sáez, V., Franco, F.A.L. & Morillas-Márquez, F. (2009). Leishmaniosis canina en el sudeste de España: comparación de la inmunofluorescencia indirecta (IFI), PCR-ELISA Y dos kits de diagnóstico comerciales. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 16(1/2)108
- Moreno, A. M., Nieto, C.G. & Rodríguez S.H. (2005). Capítulo 36: Parasitosis Sistémicas In M.C. Campillo, C.S. Acedo, S.H. Rodríguez, I.N. López-Cozar, P.D. Baños, H.Q. Romero & M.C. Varela. *Parasitología Veterinaria*. (pp.352-393) McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U.
- Mylonakis, M.E., Siarkou, V.I., Leontides, L., Bourtzi-Hatzopoulou, E., Kontos, V.I. & Koutinas, A.F. (2009) Evaluation of a serum-based PCR assay for the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary microbiology*, 138(3-4):390-3.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2009a) Taxonomy Browser. Rickettsiales. Acedido a 5/4/11, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=766>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2009b) Taxonomy Browser. *Rhipicephalus sanguineus* Acedido a 5/4/11, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=34632>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2009c) Taxonomy Browser. *Babesia canis* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=5867&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> 24/5/11
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2009d) Taxonomy Browser. *Leishmania infantum*. Acedido a: 6/6/11, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=5671&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2009e) Taxonomy Browser. Dermacentor reticulatus. Acedido a: 17/5/11, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=57047>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2009f). Taxonomy Browser. Ixodes. Acedido a 22/5/11, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=6944&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2009g). Taxonomy Browser. *Phlebotomus*. Acedido a : 25/5/11, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=13203&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

- Navarrete, I. & Nieto L.C.G. (2005). Capítulo 36: Babesiosis. Hepatozoonosis. Citauzoonosis Felina. In M.C. Campillo, C.S. Acedo, S.H. Rodríguez, I.N. López-Cozar, P.D. Baños, H.Q. Romero & M.C. Varela. *Parasitología Veterinaria*. (pp.352-393) McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U.
- Nováková, M. & Bronislava, V. (2010). Granulocytic anaplasmosis — emerging tick-borne disease of humans and animals In *Biologia*, 65,6. Acedido a : 26/5/11, disponível em: <http://www.springerlink.com/content/b1w088k3wjn53207/>
- Neer, T.M., Breitschwerdt, E.B., Greene, R.T. & Lappin, M.R. (2002). Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM). *Journal of veterinary internal medicine*, 16(3):309-15.
- Neer, T.M. & Harrus, S. (2006). Capítulo 28: Canine monocytotropic ehrlichiosis and neorickettsiosis (*E.canis*, *E. chaffensis*, *E. ruminatum*, *N.sennetsu*, and *N.risticii* infections). In C. Greene. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3ª edição, (pp. 203-219). Elsevier Inc.
- Nicholson, W.L., Allen, K.E., McQuiston, J.H., Breitschwerdt, E.B. & Little, S.E. (2010) The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends of Parasitology*, 26(4):205-12.
- Observatório nacional das Leishmanioses (ONLEISH) (2011). Epidemiologia. Acedido a 4/5/2011, disponível em:<http://www.onleish.org/index.php?article=25&visual=3>
- Otranto, D. & Dantas-Torres, F. (2010). Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives. *Parasites & Vectors*, 11;3:2.
- Otranto, D., Paradies, P., Testini, G., Latrofa, M.S., Weigl, S., Cantacessi, C., Mencke, N., de Caprariis, D., Parisi, A., Capelli, G. & Stanneck, D. (2008). Application of 10% imidacloprid/50% permethrin to prevent *Ehrlichia canis* exposure in dogs under natural conditions. *Veterinary Parasitology*, 153(3-4):320-8.
- Otsuka, Y., Yamasaki, M., Yamato, O. & Maede, Y. (2002). The effect of macrophages on the erythrocyte oxidative damage and the pathogenesis of anemia in *Babesia gibsoni*-infected dogs with low parasitemia. *The journal of veterinary medical science*, 64(3):221-6.
- Pancieria, R.J., Ewing, S.A. & Confer, A.W. (2001). Ocular histopathology of Ehrlichial infections in the dog. *Veterinary Pathology*, 38(1):43-6
- Park, J.H., Heo, E.J., Choi, K.S., Dumler, J.S. & Chae, J.S. (2003). Detection of antibodies to *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis* antigens in sera of Korean patients by western immunoblotting and indirect immunofluorescence assays. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10(6):1059-64.
- Parola, P., Paddock, C.D. & Raoult, D. (2005a) Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4):719-56.

- Parola, P., Davoust, B. & Raoult, D. (2005b) Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Veterinary Research*, 36(3):469-92
- Pereira, M. (2008). Capítulo III Epidemiologia da leishmaniose canina. In G.M. Santos-Gomes & I.M.P. Fonseca (Eds.). *Leishmaniose Canina*. (pp. 41-52). Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A.
- Pereira da Fonseca, I.M. & Villa de Brito, M.T. (2008). Capítulo VI: Diagnóstico. In G.M. Santos-Gomes & I.M.P. Fonseca (Eds.). *Leishmaniose Canina*. (pp. 83-92). Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A.
- Pinyoowong, D., Jittapalapong, S., Suksawat, F., Stich, R.W. & Thamchaipenet A. (2008). Molecular characterization of Thai *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* strains detected in dogs. *Infection genetics and evolution*, 8(4):433-8.
- Plier, M.L., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C. & Kidd, L.B. (2009). Lack of evidence for perinatal transmission of canine granulocytic anaplasmosis from a bitch to her offspring. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 45(5):232-8.
- Popov, V.L., Korenberg, E.I., Nefedova, V.V., Han, V.C., Wen, J.W., Kovalevskii, Y.V., Gorelova, N.B. & Walker, D.H. (2007). Ultrastructural evidence of the ehrlichial developmental cycle in naturally infected *Ixodes persulcatus* ticks in the course of coinfection with Rickettsia, Borrelia, and a flavivirus. *Vector borne zoonotic diseases*, 7(4):699-716. [Abstract], aceso a: 19/5/11, disponivel em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=ultrastructural%20evidence%20of%20the%20ehrlichial%20developmental%20cycle%20in%20naturally%20infected%20>
- Prescott, L. M., Harley, J.P. & Klein, D.A. (2005). Capítulo 14. Recombinant DNA technology. *Microbiology*. 6ª edição, (pp. 311-334). Mc-Graw Hill
- Quinnell, R.J., Kennedy, L.J., Barnes, A., Courtenay, O., Dye, C., Garcez, L.M., Shaw, M.A., Carter, S.D., Thomson, W. & Ollier, W.E. (2003) Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics*, 55(1):23-8.
- Ramsey, I. British Small Animal Veterinary Association (BSAVA) (2011). *Small animal formulary* 7ª edição.
- Renvoisé, A. & Raoult, D. (2009). L'actualité des rickettsioses. *Medecine et maladies infectieuses*, 39(2):71-81.
- Ready, P.D. (2010). Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveillence*, 15 (10)
- Rikihisa, Y. (1991). The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 4, 286-308
- Rikihisa, Y., Ewing, S.A. & Fox, J.C. (1994). Western immunoblot analysis of *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, or *E. ewingii* infections in dogs and humans. *Journal of clinical microbiology*, 32(9):2107-12.
- Reithinger, R. & Davies, C.R. (2002). Canine leishmaniasis: novel strategies for control. *Trends of Parasitology*, 18(7):289-90.

- Ristic, M., Huxsoll, D.L., Weisiger, R.M., Hildebrandt, P.K. & Nyindo, M.B.A., (1972). Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. *Infection and Immunity*, 6, 226–231
- Rovero, C., Brouqui, P. & Raoult, D. (2008). Questions on Mediterranean spotted fever a century after its discovery. *Emerging Infectious Diseases*, 14(9):1360-7.
- Samish, M. & Glazer, I. (2001). Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. *Trends of Parasitology*, 17(8):368-71.
- Sáinz, A., Delgado, S., Amussategui, I., Tesouro, M.A. & Cármenes, P. (1996). Seroprevalence of canine ehrlichiosis in Castilla-León (north-west Spain). *Preventive Veterinary Medicine* 29:1-7
- Santos, A.S.P. (2007). *Anaplasma phagocytophilum* and human granulocytic anaplasmosis in Portugal. Dissertação de doutoramento em Ciências Biomédicas. Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical-Universidade Nova de Lisboa
- Santos, A.S., Santos-Silva, M.M., Sousa, R., Bacellar, F. & Dumler, J.S. (2009). PCR-Based Survey of *Anaplasma phagocytophilum* in Portuguese Ticks (Acari: Ixodidae). *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 9(1):33-40.
- Santos, A.S., Santos-Silva, M.M., Almeida, V.C., Bacellar, F. & Dumler, J.S. (2004). Detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in Ixodes ticks (Acari: Ixodidae) from Madeira Island and Setubal District, mainland Portugal. *Emergence of infectious diseases*, 10(9):1643-8.
- Santos, A.S., Alexandre, N., Sousa, R., Núncio, M.S., Bacellar, F. & Dumler, J.S. (2009). Serological and molecular survey of *Anaplasma* species infection in dogs with suspected tickborne disease in Portugal. *Veterinary Record*, 164(6):168-71.
- Santos-Silva, M.M., Beati, L., Santos, A.S., De Sousa, R., Núncio, M.S., Melo, P., Santos-Reis, M., Fonseca, C., Formosinho, P., Vilela, C. & Bacellar, F. (2011) The hard-tick fauna of mainland Portugal (Acari: Ixodidae): an update on geographical distribution and known associations with hosts and pathogens. *Experimental and Applied Acarology*. Acedido a: 1/6/11, disponível em: <http://www.springerlink.com/content/14k270w415417482/>
- Schoeman, J.P. (2008). Canine Babesiosis: an update. Proceedings of the 33rd World Small Animal Veterinary Congress. Dublin, Ireland
- Schettler, T. (2005). Vaccination against canine babesiosis. *Trends of Parasitology*, 21(4):179-84.
- Segura-Porta, F., Diestre-Ortín, G., Ortuño-Romero, A., Sanfeliu-Sala, I., Font-Creus, B., Muñoz-Espin, T., de Antonio, E.M. & Casal-Fábrega, J. (1998) Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in human beings and dogs from an endemic area of mediterranean spotted fever in Catalonia, Spain. *European Journal of Epidemiology*.
- Sharma, U. & Singh, S. (2008). Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *Journal of vector borne diseases*, 45(4):255-72.

- Shaw, S.E. (2008). Understanding transmission of infection by ticks and the new strategies for control. Proceedings of the 33rd WSAVA congress, Dublin, Irlanda
- Shaw, S.E., Day, M.J., Birtles, R.J. & Breitschwerdt, E.B. (2001). Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends in Parasitology* 17, 74-80.
- Slappendel R.J., Ferrer L. (2006) Capítulo 73: Leishmaniasis. In C. Greene Infectious diseases of the dog and cat. 3ª edição. Elsevier Inc.
- Silva, F.L., Oliveira, R.G., Silva, T.M., Xavier, M.N., Nascimento, E.F. & Santos, R.L. (2009). Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 160(1-2):55-9.
- Silveira, C.A.P. (1992). Ehrlichiose canina: estudo clínico de uma população animal, na região urbana e rural de Setúbal: implicações em saúde pública e saúde pública veterinária. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária- Universidade Técnica de Lisboa.
- Solano-Gallego, L. & Baneth, G., (2011). Babesiosis in dogs and cats—Expanding parasitological and clinical spectra. *Veterinary Parasitology* Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Babesiosis%20in%20dogs%20and%20cats%E2%80%94Expanding%20parasitological%20and%20clinical%20spectra>.
- Solano-Gallego, L., Lull, J., Osso, M., Hegarty, B. & Breitschwerdt, E. (2006a). A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Veterinary Research*, 37(2):231-44.
- Solano-Gallego, L., Kidd, L., Trotta, M., Di Marco, M., Caldin, M., Furlanello, T. & Breitschwerdt, E. (2006b). Febrile illness associated with *Rickettsia conorii* infection in dogs from Sicily. *Emerging Infectious Diseases*, 12(12):1985-8.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. & Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary parasitology*, 165(1-2):1-18.
- Sousa, R. & Bacellar, F. (2004). Morbi-mortalidade *Rickettsia conorii* em Portugal. XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, Ouro Preto, MG
- Sousa, R., Nóbrega, S.D., Bacellar, F. & Torgal, J. (2003) Mediterranean spotted fever in Portugal: risk factors for fatal outcome in 105 hospitalized patients. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990:285-94.
- Sousa, R., Santos-Silva, M., Santos A.S., Barros, S.C., Torgal, J., Walker, D.H. & Bacellar, F. 2007 *Rickettsia conorii Israeli* Tick Typhus Strain Isolated from *Rhipicephalus sanguineus* Ticks in Portugal In: *Vector-borne and zoonotic diseases*, Vol 7, nº3. Mary Ann Liebert, Inc.
- Stanneck D. (2006). Modern approaches to prevent canine vector borne diseases. International congress of the Italian association of companion animal veterinarians. Rimini, Itália,

- Stich, R.W., Schaefer, J.J., Bremer, W.G., Needham, G.R. & Jittapalapong, S. (2008). Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. *Veterinary Parasitology*, 158(4):256-73
- Strik, N.I., Alleman, A.R., Barbet, A.F., Sorenson, H.L., Wamsley, H.L., Gaschen, F.P., Luckschander, N., Wong, S., Chu, F., Foley, J.E., Bjoersdorff, A., Stuen, S. & Knowles, D.P. (2007). Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* major surface protein 5 and the extent of its cross-reactivity with *A. marginale*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(3):262-8.
- Strle, F. (2004). Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *International Journal of Medical Microbiology*, 293 Suppl 37:27-35. [Abstract]. Acedido a: 24/5/11, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15146982>
- Sultana, H., Neelakanta, G., Kantor, F.S., Malawista, S.E., Fish, D., Montgomery, R.R. & Fikrig, E. (2010). *Anaplasma phagocytophilum* induces actin phosphorylation to selectively regulate gene transcription in *Ixodes scapularis* ticks. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(8):1727-43
- Taboada, J., Lobetti, R. Babesiosis. (2006) Capítulo 77: Babesiosis. In Greene C. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3ª edição (pp. 722-736) Elsevier Inc.
- Taylor, M.A. (2001). Recent developments in ectoparasiticides. *The Veterinary Journal*, 161(3):253-68.
- Terrazzano, G., Cortese, L., Piantedosi, D., Zappacosta, S., Di Loria, A., Santoro, D., Ruggiero, G. & Ciaramella, P. (2006). Presence of anti-platelet IgM and IgG antibodies in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 110(3-4):331-7.
- Toma, B., Dufour, B., Sanaa, M., Bénet, J.J., Moutou, F., Louzà, A. & Ellis, P. (2004). Applied veterinary epidemiology and the control of disease in populations. AEEMA. Paris
- Tomás, A. & Romão, S. (2008). Capítulo I Biologia do parasita. In G.M. Santos-Gomes, & I.M.P. Fonseca (Eds.). *Leishmaniose Canina*. (pp. 7-26). Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A.
- Toplu, N. & Aydogan, A. (2011). An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniosis. *Parasitology Research*. Acedido a: 18/5/11 disponível em: <http://www.springerlink.com/content/fnhj20826710hm40/>
- Torina, A. & Caracappa, S. (2006). Dog tick-borne diseases in Sicily. *Parassitologia*. Jun;48(1-2):145-7. [Abstract]. Acedido a: 5/6/11, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16881419>
- Vargas-Duarte, J.J., López-Páez, M.C., Escovar-Castro, J.E. & Fernández-Manrique, J. (2009). Evaluacion por Western blot, inmunofluorescencia indirecta y ELISA de perros

infectados con *Leishmania (Leishmania) infantum*. *Revista de salud pública (Bogota)*, 11(4):641-52.

Vercammen, F., De Deken, R. & Maes, L. (1996). Prophylactic treatment of experimental canine babesiosis (*Babesia canis*) with doxycycline. *Veterinary Parasitology*, 66(3-4):251-5.

Virbac (2011). CaniLeish. Technical Product Profile. Virbac Animal Health

Walker, D.H., Popov, V.L., Wen, J. & Feng, H.M. (1994). *Rickettsia conorii* infection of C3H/HeN mice. A model of endothelial-target rickettsiosis. *Laboratory Investigation*, 70(3):358-68. [Abstract] disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7511715>

Waner, T. & Harrus, S., (2000). Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME). In: Recent Advances in Canine Infectious Diseases, L.E. Carmichael

Waner, T., Harrus, S., Jongejan, F., Bark, H., Keysary, A. & Cornelissen, A.W.C.A. (2001). Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. Review. *Veterinary Parasitology* 95 1–15

Waner, T., Strenger, C. & Keysary, A. (2000). Comparison of a clinic-based ELISA test kit with the immunofluorescence test for the assay of *Ehrlichia canis* antibodies in dogs. *Journal of veterinary diagnost and investigation*, 12(3):240-4.

Waner, T., Strenger, C., Keysary, A. & Harrus, S. (1998). Kinetics of serologic cross-reactions between *Ehrlichia canis* and the *Ehrlichia phagocytophila* genogroups in experimental *E. canis* infection in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 66(3-4):237-43.

Waner, T., S. Harrus, H. Bark, E. Bogin, Y. Avidar & A. Keysary. (1997) .Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. *Veterinary Parasitology* 69:307–317.

Wardrop, K. J. (2010). Capítulo 19: Infectious Injury to Bone Marrow. In , J.D. Weiss, K.J. Wardrop, *Veterinary Hematology*. Sexta edição, Blackwell Publishing Ltd

Wells, M.Y. & Rikihisa, Y., 1988. Lack of lysosomal fusion with phagosomes containing *Ehrlichia risticii* in P388D1 cells: abrogation of inhibition with oxytetracycline. *Infection and Immunity*, 56, 3209–3215.

Welzl, C., Leisewitz, A.L., Jacobson, L.S., Vaughan-Scott, T. & Myburgh, E. (2001). Systemic inflammatory response syndrome and multiple-organ damage/dysfunction in complicated canine babesiosis. *Journal of South Africa veterinary association*, 72(3):158-62.

Wikel, S.K. & Alarcon-Chaidez, F.J. (2001) Progress toward molecular characterization of ectoparasite modulation of host immunity. *Veterinary Parasitology* Nov, 22;101(3-4):275-87.

- World Health Organization (WHO) (2011a) Neglected tropical diseases Leishmaniasis: the global trend. Acedido a: 17/6/11, disponível em: <http://www.who.int/neglecteddiseases/integratedmedialeishmaniasis/en/index.html>
- World Health Organization (WHO) (2007) Report of the Fifth Consultative Meeting on Leishmania/HIV Coinfection Addis Ababa, Ethiopia, 20–22. Acedido a : 17/6/11, disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis_hiv_coinfection5.pdf
- World Health Organization (WHO) (2006). Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance, sixth edition.
- Woldehiwet, Z. (2010). The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Veterinary parasitology*, 167(2-4):108-22.
- Zahler, M., Schein, E., Rinder, H. & Gothe, R. (1998). Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. *Parasitology Research*, 84(7):544-8
- Zhang, J.Z., Sinha, M., Luxon, B.A. & Yu, X.J. (2004) Survival strategy of obligately intracellular *Ehrlichia chaffeensis*: novel modulation of immune response and host cell cycles. *Infection and immunity*, 72(1):498-507.
- Zhu, Y., Fournier, P.E., Ereemeeva, M. & Raoult, D. (2005) Proposal to create subspecies of *Rickettsia conorii* based on multi-locus sequence typing and an emended description of *Rickettsia conorii*. *BMC Microbiology*, 14;5:11.
- Zygner, W., Gójska, O., Rapacka, G., Jaros, D. & Wedrychowicz, H. (2007). Hematological changes during the course of canine babesiosis caused by large *Babesia* in domestic dogs in Warsaw (Poland). *Veterinary Parasitology*, 145(1-2):146-51.

Anexo 1- Características dos cães testados e títulos de anticorpos apresentados

Características do cão				Título de anticorpos				
Nº do animal	Sexo	Idade	Pêlo	<i>R. conorii</i>	<i>B. canis</i>	<i>E. canis</i>	<i>L. infantum</i>	<i>A. phagocytophilum</i>
1	mas.	3	cur.	1:128	0	0	0	0
2	mas.	3	cur.	1:64	0	0	0	0
3	mas.	4	cur.	0	0	0	1:80	0
4	fem.	3	lon.	1:128	0	0	0	0
5	fem.	3	lon.	0	1:40	0	0	0
6	fem.	3	lon.	0	0	0	0	0
7	mas.	5	cur.	0	0	0	1:80	0
8	mas.	6	lon.	0	0	0	0	0
9	mas.	4	cur.	1:64	0	0	0	0
10	mas.	10	lon.	0	1:40	1:40	0	1:50
11	fem.	4	cur.	1:64	0	0	0	0
12	mas.	3	lon.	1:64	0	0	0	0
13	fem.	8	cur.	0	0	0	0	0
14	fem.	5	cur.	0	0	0	0	0
15	mas.	2	lon.	0	0	0	0	0
16	mas.	2	cur.	1:128	0	0	0	0
17	fem.	3	cur.	0	0	0	0	0
18	fem.	5	cur.	0	0	0	0	0
19	fem.	4	cur.	1:64	1:20	0	0	0
20	fem.	4	cur.	0	0	0	0	0
21	fem.	5	cur.	0	0	0	0	0
22	fem.	7	lon.	0	0	0	0	0
23	mas.	9	cur.	0	0	0	0	0
24	fem.	7	cur.	0	0	0	0	0
25	fem.	3	lon.	0	0	1:80	0	0
26	fem.	2	cur.	0	0	0	0	1:50
27	fem.	3	lon.	0	1:40	0	1:160	0
28	mas.	4	cur.	0	0	0	0	0
29	mas.	3	cur.	0	0	0	0	0
30	mas.	3	cur.	0	1:40	1:80	0	0

Anexo 1- (continuação I) Características dos cães testados e títulos de anticorpos apresentados

Características do cão				Título de anticorpos				
Nº do animal	Sexo	Idade	Pêlo	<i>R. conorii</i>	<i>B. canis</i>	<i>E. canis</i>	<i>L. infantum</i>	<i>A. phagocytophilum</i>
31	fem.	3	cur.	1:64	0	1:80	1:160	0
32	mas.	10	cur.	0	0	0	1:80	0
33	fem.	9	cur.	0	0	1:40	0	0
34	fem.	5	cur.	0	0	0	0	0
35	fem.	4	cur.	0	0	0	0	0
36	mas.	3	lon.	1:64	0	0	0	0
37	fem.	5	cur.	0	0	0	0	0
38	mas.	4	cur.	1:64	1:40	0	1:160	0
39	fem.	7	cur.	0	0	1:40	1:80	1:50
40	mas.	7	cur.	0	0	0	0	0
41	mas.	9	cur.	0	1:80	1:40	0	1:100
42	mas.	4	lon.	1:64	1:80	0	1:160	0
43	fem.	5	cur.	1:64	0	0	0	0
44	fem.	5	cur.	1:64	0	0	1:80	0
45	fem.	5	lon.	1:64	0	0	0	0
46	mas.	8	lon.	0	0	0	1:80	0
47	mas.	4	cur.	0	0	0	1:80	0
48	fem.	2	cur.	0	1:20	0	0	0
49	fem.	4	cur.	0	0	0	0	0
50	fem.	9	cur.	0	0	0	1:80	0
51	fem.	5	lon.	0	0	0	0	0
52	fem.	12	cur.	0	1:80	0	0	1:50
53	fem.	3	cur.	0	0	0	0	0
54	fem.	3	cur.	0	0	0	0	0
55	mas.	5	lon.	0	1:20	0	0	0
56	fem.	4	cur.	0	1:40	0	0	0
57	fem.	7	cur.	0	0	0	1:80	0
58	fem.	5	cur.	0	0	1:80	0	1:50
59	fem.	6	lon.	0	0	0	0	0
60	fem.	4	cur.	0	0	0	0	0

Anexo 1- (continuação II) Características dos cães testados e títulos de anticorpos apresentados

Características do cão				Título de anticorpos				
Nº do animal	Sexo	Idade	Pêlo	<i>R. conorii</i>	<i>B. canis</i>	<i>E. canis</i>	<i>L. infantum</i>	<i>A. phagocytophilum</i>
61	fem.	10	lon.	0	0	0	0	1:50
62	fem.	3	cur.	0	0	0	0	0
63	fem.	9	lon.	0	0	1:40	0	0
64	fem.	3	cur.	0	0	0	0	0
65	mas.	10	lon.	0	1:80	0	0	0
66	fem.	8	cur.	1:128	1:80	1:80	0	0
67	mas.	6	lon.	0	0	1:40	0	1:50
68	fem.	3	lon.	0	0	1:80	0	1:50
69	fem.	4	cur.	0	0	0	0	0
70	mas.	9	cur.	0	1:20	0	0	0
71	fem.	3	lon.	0	0	0	0	0
72	fem.	4	cur.	0	0	0	0	0
73	fem.	4	lon.	0	0	0	0	0
74	mas.	6	cur.	0	0	0	0	0
75	mas.	3	cur.	0	1:20	0	0	0
76	fem.	10	lon.	0	0	1:40	0	1:50
77	fem.	3	cur.	1:128	0	0	0	0
78	fem.	3	cur.	0	0	0	0	0
79	mas.	4	lon.	0	0	0	0	0
80	fem.	12	cur.	1:64	0	0	0	0

Legenda : mas.-masculino; fem.-feminino; lon.-longo; cur.-curto.