

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO BIOLOGIA ANIMAL



Ciências
ULisboa

Ixodídeos nos Açores e Madeira: sua importância como vetores

Carla Sofia Pereira da Silva

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Dissertação orientada por:
Professora Doutora Deodália Dias
Doutora Fernanda Rosa

2022

Notas prévias:

1. Esta dissertação está integrada num projeto mais alargado sobre *A importância das carrças em saúde pública* e em colaboração com a MSD Animal Health.
2. A escrita desta dissertação seguiu os critérios da revista *Ticks and Tick-borne Diseases*.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer às minhas orientadoras, a Professora Doutora Deodália Dias e a Doutora Fernanda Rosa. Um obrigado gigante por me terem acolhido numa fase menos boa do meu percurso académico e por toda a confiança que depositaram em mim desde o início. Por todos os ensinamentos na área científica, apoio, conselhos e disponibilidade que permitiram que este trabalho corresse pelo melhor, apesar das dificuldades que foram surgindo. E acima de tudo pela motivação que me transmitiam, em cada conversa, e que me permitiu avançar em momentos de maior incerteza.

Em segundo lugar, um especial agradecimento à MSD Animal Health, em particular à Doutora Inês Barbosa pela proposta deste projeto e pela logística e organização de toda a recolha de amostras, sem as quais este trabalho não teria sido possível.

Aos colegas com quem me iniciei neste projeto, pelo apoio que demonstraram nas primeiras experiências em laboratório e pela amizade que se manteve mesmo quando não estávamos em frente à bancada. Mesmo já não estando envolvidos diretamente no projeto, estiveram sempre disponíveis para me esclarecer dúvidas ou simplesmente para ouvir as minhas frustrações.

Agradeço também às alunas e voluntárias com quem partilhei alguns momentos no laboratório e que tornaram os meus dias menos solitários. Tive muito gosto em poder passar para vocês os meus conhecimentos e espero também vos ter motivado para o trabalho em laboratório. Só tenho pena de não podermos ter estado juntas muito mais vezes.

A todo o pessoal do Laboratório de Genética, pelo auxílio e companhia, mesmo às vezes sendo só um “Bom dia”, um sorriso ou o partilhar do rádio. Igualmente, também, a todas as pessoas do Departamento de Biologia Animal que de alguma forma contribuíram para este trabalho e para o meu crescimento enquanto cientista.

Um especial agradecimento aos meus pais, que mesmo muitas vezes não percebendo nada do que eu dizia, sempre me motivaram a ir mais longe. Por todos os esforços que fizeram para que eu pudesse continuar a estudar e por todos os ensinamentos que me fizeram a pessoa que sou hoje.

À minha irmã, a minha caçula. Pelo apoio incansável, por ouvir as minhas ideias, frustrações, alegrias, medos. Por partilhar comigo tanto gargalhadas como choros e por todos os dias me inspirar a dar mais de mim.

Ao Leonardo, *my precious*. Por nunca me deixar desistir e me fazer querer ser melhor todos os dias. Pela paciência e compreensão que tem comigo, por estar sempre disponível para me ouvir, mesmo que às vezes seja entre espadas, *raids* e *bosses*. Obrigada por me fazeres rir quando eu mais preciso e por seres o meu pilar nos momentos em que vou abaixo.

Não posso deixar de agradecer também à minha restante família. Por todos os momentos que passamos juntos, todas as maluqueiras. Por sempre mostrarem interesse no meu percurso acadêmico e também porque ajudaram a moldar a pessoa que sou hoje.

Aos meus amigos do coração, que mesmo longe sempre fizeram por estar perto. Pela amizade e apoio nos mais diversos aspectos da minha vida. E por todo o amor que sinto sempre que estou com vocês.

Por fim, a todas as pessoas que, de alguma forma, se cruzaram comigo durante a realização deste trabalho e que enriqueceram o meu percurso acadêmico.

Resumo

Os ixodídeos, conhecidos por carrças, são artrópodes que se alimentam exclusivamente de sangue. Distribuem-se por todos os continentes, ocupam diversos habitats e são parasitas de hospedeiros vertebrados, entre eles os humanos. As espécies da família *Ixodidae* são as mais relevantes em saúde pública, pois atuam como vetores de bactérias, protozoários, helmintes e vírus, alguns deles com potencial zoonótico. As patologias causadas por estes agentes são responsáveis por morbidade e mortalidade em animais de estimação, gado e humanos.

Este trabalho pretende contribuir com informação atualizada sobre os ixodídeos em animais de companhia (cão e gato) e patógenos a eles associados, que circulam, atualmente, nos arquipélagos dos Açores e Madeira. Os espécimes foram identificados morfológicamente, sendo alguns confirmados molecularmente através de uma região do DNA mitocondrial (*Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I*). A presença de organismos dos grupos *Babesia/Theileria*, *Rickettsia*, *Anaplasma/Ehrlichia*, *Babesia/Hepatozoon* e *Borrelia burgdorferi* s.l. foi avaliada com recurso a marcadores moleculares específicos por qPCR.

Nos Açores, observaram-se *Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes hexagonus* e *Ixodes ventralloi*, sendo esta última, assinalada pela primeira vez neste arquipélago. Na Madeira, registaram-se *Ixodes ricinus* e *Rhipicephalus sanguineus*. Todos os patógenos pesquisados ocorreram nas duas áreas em estudo, não se tendo verificado diferenças significativas nas prevalências entre arquipélagos, com exceção de *Bo. burgdorferi* s.l., que apresentou maior prevalência na Madeira associada ao principal vetor de transmissão, *I. ricinus*.

Os nossos resultados são relevantes para apoiar as autoridades de saúde na elaboração de planos de monitorização e mitigação de eventuais surtos. Considerando que as alterações climáticas globais podem induzir a emergência de doenças transmitidas por vetores, são necessários mais estudos sobre as carrças presentes em outros hospedeiros e qual o seu papel na transmissão de patógenos.

Palavras-Chave: *Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes* spp., *mtCOI*, patógenos, Ilha da Madeira, Açores.

Abstract

Ixodids, commonly known as ticks, are arthropods that feed exclusively on blood. These parasites are found worldwide, occupying different habitats, and feeding on a large range of hosts, including humans. Ticks of the *Ixodidae* family are the most relevant regarding public health, as they can be vectors of bacteria, protozoa, helminths, and virus, some of them with zoonotic potential. The pathologies caused by these agents are responsible for morbidity and even some deaths in pets, livestock and humans.

The present study aims to contribute with updated information about ixodids on pets (dogs and cats) and their associated pathogens that are circulating in the Azores and Madeira archipelagos. The tick specimens were morphologically identified, and when in doubt, molecular identification was performed based on a specific mitochondrial DNA region (Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I). Furthermore, the presence of *Babesia/Theileria*, *Rickettsia*, *Anaplasma/Ehrlichia*, *Babesia/Hepatozoon* and *Borrelia burgdorferi* s.l. groups was obtained using specific molecular markers and qPCR.

In Azores, the presence of *Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes hexagonus* and *Ixodes ventralloi* were observed, being the latter identified for the first time in this archipelago. In Madeira Island the presence of *Ixodes ricinus* and *Rhipicephalus sanguineus* were registered. All the pathogens searched were present in the two studied areas and it was not observed any significant difference in prevalence between archipelagos, with exception of *Bo. burgdorferi* s.l., that was more prevalent in Madeira due to its main vector association, *I. ricinus*.

Our results are relevant to incentivize monitoring and mitigation plans by health authorities in order to control outbreaks. Moreover, considering that climate changes can induce the emergence of vector borne diseases, further studies on tick species in other hosts and their role on pathogens transmission are needed.

Keywords: *Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes* spp., *mtCOI*, tick pathogens, Madeira Island, Azores.

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	III
Abstract	IV
Lista de Figuras	VI
Lista de Tabelas.....	VII
Lista de Abreviaturas	VIII
1. Introdução	1
1.1. Bio-Ecologia	2
1.2. Competência e Capacidade vetorial	3
1.3. Importância em Saúde Pública.....	4
1.4. Ixodídeos associados a doenças infecciosas em Portugal	4
1.5. Ixodídeos dos Arquipélagos da Madeira e Açores	7
1.6. Influência de fatores bióticos e abióticos	9
2. Objetivos	10
3. Material e Métodos	11
3.1. Amostragem	11
3.2. Identificação de Ixodídeos	13
3.2.1. Identificação Morfológica.....	13
3.2.2. Identificação Molecular.....	15
3.3. Pesquisa de patógenos.....	16
3.4. Análise de Dados.....	17
4. Resultados	18
4.1. Identificação Morfológica	18
4.2. Análise Molecular dos Ixodídeos.....	25
4.3. Pesquisa de patógenos.....	25
5. Discussão.....	31
6. Conclusões	35
7. Perspetivas futuras	36
8. Referencias.....	37
9. Anexos.....	47

Lista de Figuras

Figura 1: Ciclo de vida dos ixodídeos.....	2
Figura 2: Caracteres morfológicos diagnosticantes das faces dorsal e ventral de machos e fêmeas de carraças.....	14
Figura 3: Distribuição geográfica das espécies de ixodídeos identificadas no Arquipélago dos Açores	19
Figura 4: Distribuição geográfica das espécies de ixodídeos identificadas no Arquipélago da Madeira	19
Figura 5: Distribuição das espécies de ixodídeos encontradas por a) estado de desenvolvimento e b) espécie de ixodídeo identificada	20
Figura 6: Espécimes colhidos nos hospedeiros considerados.....	20
Figura 7: <i>R. sanguineus</i> (s.s.), macho	21
Figura 8: <i>R. sanguineus</i> (s.s.), fêmea.....	21
Figura 9: <i>Ixodes hexagonus</i> , ninfa	22
Figura 10: <i>Ixodes ventralloi</i> , fêmea.....	22
Figura 11: <i>Ixodes ricinus</i> , macho.....	23
Figura 12: <i>Ixodes ricinus</i> , fêmea.....	24
Figura 13: Prevalência dos agentes em estudo nos arquipélagos da Madeira e Açores.....	26
Figura 14: Distribuição geográfica dos agentes detetados nos ixodídeos colhidos no Arquipélago dos Açores.....	27
Figura 15: Distribuição geográfica dos agentes detetados nos ixodídeos colhidos no Arquipélago da Madeira.....	27
Figura 16: Prevalência de cada agente nas espécies de ixodídeos coletados nos Açores.	28
Figura 17: Prevalência de cada agente nas espécies de ixodídeos coletadas na Madeira.	29
Figura 18: Prevalência de cada agente por hospedeiro.	29

Lista de Tabelas

Tabela 1: Espécies das famílias Ixodidae e Argasidae referenciadas em Portugal (Continental e Insular).	1
Tabela 2: Agentes etiológicos transmitidos por ixodídeos presentes ou em risco de emergir em Portugal.	5
Tabela 3: Informação acerca dos espécimes estudados.	11
Tabela 4: <i>Primers</i> e sequências usadas para a amplificação do gene COI.....	15
Tabela 5: <i>Primers</i> e sequências usadas para cada agente em estudo.	16
Tabela 6: Condições de reação para os <i>primers</i> usados.	17
Tabela 7: Espécimes de ixodídeos coletados em diversas localidades nos Açores e Madeira...	18
Tabela 8: Espécimes colhidos nos hospedeiros considerados.....	20
Tabela 9: Correspondência das sequências analisadas às existentes no <i>GenBank</i>	25
Tabela 10: Infecções simples e co-infecções e número de amostras onde foram detetadas.....	30

Lista de Abreviaturas

A. – *Anaplasma*

Blastn – *Basic Local Alignment Search Tool* (para nucleótidos)

COI – *Cytochrome C oxidase subunit I*

ddH₂O – água bidestilada

DNA – ácido desoxirribonucleico

EUA – Estados Unidos da América

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

H. – *Haemaphysalis*

Hy. – *Hyalomma*

He. – *Hepatozoon*

I. – *Ixodes*

R. – *Rhipicephalus*

Ri. – *Rickettsia*

B. – *Babesia*

Bo. – *Borrelia*

pb – pares de bases

qPCR – PCR quantitativo ou em tempo real

s.l. – *sensu lato*

s.s. – *sensu strito*

TBE – *Tick-borne encephalitis*

TIBOLA – *Tick-borne lymphadenopathy*

1. Introdução

As carraças são artrópodes que pertencem à classe Arachnida, superordem Parasitiformes e ordem Ixodida, distribuem-se por todo o planeta e colonizam habitats muito diversos (Nava et al., 2009; Sonenshine and Roe, 2014). Atualmente, são conhecidas cerca de 900 espécies de ixodídeos que se incluem em três famílias: *Argasidae* C. L. Koch, 1844, também conhecidas como “carraças de corpo mole” (*soft ticks*), onde se incluem 193 espécies, *Ixodidae* C. L. Koch, 1844, ou “carraças de corpo duro” (*hard ticks*), que compreende cerca de 700 espécies, e a família *Nuttalliellidae* Schulze, 1935 que tem apenas uma espécie, *Nuttalliella namaqua* (Nava et al., 2009; Estrada-Peña & de La Fuente, 2014; Boulanger et al., 2019).

Para Portugal (Continental e Insular) estão referenciadas 21 espécies de *Ixodidae* e 4 espécies de *Argasidae* (Tabela 1) (Guiguen et al., 1989; Dias, 1995; Caeiro et al., 1997; Caeiro, 1999; Estrada-Peña et al., 2014; Rosa et al., 2004). O presente trabalho incide apenas em espécies da família *Ixodidae*, por serem os exemplares disponíveis no laboratório, sendo designados por ixodídeos.

Tabela 1: Espécies das famílias Ixodidae e Argasidae referenciadas em Portugal (Continental e Insular).

Família Ixodidae				
Géneros				
<i>Rhipicephalus</i>	<i>Ixodes</i>	<i>Dermacentor</i>	<i>Hyalomma</i>	<i>Haemaphysalis</i>
Espécies				
<p><i>Rhipicephalus sanguineus</i> Latreille, 1806</p> <p><i>Rhipicephalus pusillus</i> Gil Collado, 1938</p> <p><i>Rhipicephalus bursa</i> Canestrini & Fanzago, 1878</p> <p><i>Rhipicephalus (Boophilus) annulatus</i> Say, 1821</p>	<p><i>Ixodes ricinus</i> Linnaeus, 1758</p> <p><i>Ixodes hexagonus</i> Leach, 1815</p> <p><i>Ixodes vespertilionis</i> Koch, 1844</p> <p><i>Ixodes ventralloi</i> Gil Collado, 1936</p> <p><i>Ixodes canisuga</i> Johnston, 1849</p> <p><i>Ixodes simplex</i> Neumann, 1906</p> <p><i>Ixodes acuminatus</i> Neumann, 1901</p> <p><i>Ixodes frontalis</i> Panzer, 1798</p> <p><i>Ixodes arboricola</i> Schulze & Schlotke, 1930</p> <p><i>Ixodes inopinatus</i> Estrada-Peña et al, 2014</p>	<p><i>Dermacentor marginatus</i> Sulzer, 1776</p> <p><i>Dermacentor reticulatus</i> Fabricius, 1794</p>	<p><i>Hyalomma lusitanicum</i> Koch, 1844</p> <p><i>Hyalomma marginatum</i> Koch, 1844</p>	<p><i>Haemaphysalis punctata</i> Canestrini & Fanzago, 1878</p> <p><i>Haemaphysalis inermis</i> Birula, 1895</p> <p><i>Haemaphysalis hispanica</i> Gil Collado, 1938</p>
Família Argasidae				
Géneros				
<i>Argas</i>	<i>Carios</i>		<i>Ornithodoros</i>	
Espécies				
<p><i>Argas reflexus reflexus</i> Fabricius, 1794</p>	<p><i>Carios vespertilionis</i> Latreille, 1802</p>		<p><i>Ornithodoros erraticus</i> Lucas, 1849</p> <p><i>Ornithodoros maritimus</i> Vermeil & Marguet, 1967</p>	

1.1. Bio-Ecologia

O ciclo de vida dos ixodídeos pode durar de três a seis meses até mais de três anos e consiste em quatro estados de desenvolvimento (Figura 1): ovo (único estado inativo), larva, ninfa e por fim o adulto (macho ou fêmea). Para a transição entre os diversos estados é necessário que a carraça faça uma alimentação de sangue que fornece a energia necessária para a mudança de estado e a deposição de ovos pela fêmea, quando se encontra no estado adulto (Apanaskevich & Oliver, 2014). Este processo pode durar minutos ou até dias ou semanas. É durante a alimentação que a carraça pode infectar o hospedeiro com agentes, eventualmente patogênicos ou adquirir a infecção a partir de um hospedeiro infectado (Sonenshine & Roe, 2014; Estrada-Peña, 2015; Santos et al., 2021).

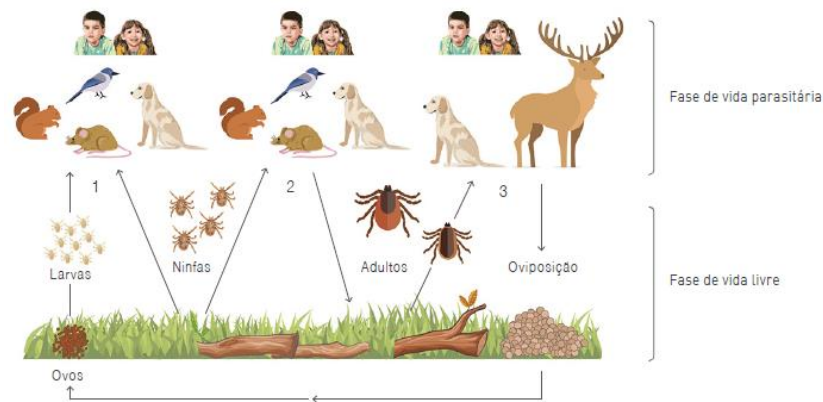


Figura 1: Ciclo de vida dos ixodídeos (Santos et al., 2021).

Algumas carraças procuram ativamente um hospedeiro enquanto outras esperam a sua passagem perto do local onde se encontram. Essa fase de procura de hospedeiro designa-se *questing* e pode variar de acordo com a sazonalidade, tendo importantes implicações na epidemiologia de agentes patogênicos transmitidos por carraças. Dependendo da espécie, os ixodídeos podem parasitar um diferente número de indivíduos durante o seu ciclo de vida, designando-se monoxenos (ou monofásicos) se tiver apenas um hospedeiro, dixenos (ou difásicos) se tiverem dois hospedeiros e trixenos (ou trifásicos) se tiverem três hospedeiros, o que ocorre na maioria das carraças (Dias, 1995; Apanaskevich & Oliver, 2014). Neste último caso, os ixodídeos mudam de hospedeiro sempre que mudam de estado de desenvolvimento. As carraças com apenas um hospedeiro, mudam de estado e alimentam-se sempre no mesmo indivíduo. Nas carraças com dois hospedeiros, tanto as larvas como as ninfas alimentam-se no mesmo hospedeiro, sem se soltarem, porém antes de mudarem para o estado adulto as ninfas soltam-se para o solo, onde sofrem a muda, e depois procuram outro hospedeiro no estado adulto (Apanaskevich & Oliver, 2014; Estrada-Peña & de La Fuente, 2014).

Depois de encontrar um hospedeiro, a carraça, procura um local seguro onde insere o hipostoma, na pele, secretando uma substância (a partir das glândulas salivares) de secagem

rápida que ajudará na fixação, denominada por cimento elementoma, cuja composição inclui proteínas, lípidos, hidratos de carbono e outros elementos, variáveis consoante a espécie de ixodídeo (Pacheco et al., 2021). Este cimento permitirá que a carraça permaneça agarrada na fase de fixação e durante o processo de alimentação, impedindo a sua fácil remoção e a intervenção do sistema imunitário do hospedeiro (Suppan et al., 2018). Depois da alimentação e do acasalamento a fêmea solta-se do hospedeiro, procura um abrigo no solo e liberta milhares de ovos, morrendo de seguida (Estrada-Peña & la Fuente, 2014; Estrada-Peña, 2015).

1.2. Competência e Capacidade vetorial

Os ixodídeos podem ser vetores mecânicos ou biológicos de diversos agentes. Mecânicos quando a sobrevivência do agente depende apenas da sua capacidade para suportar as condições do trato digestivo da carraça, neste caso o agente não se multiplica dentro do vetor e este, apenas o transmite ao próximo hospedeiro. Vetores biológicos quando o agente invade o seu corpo, multiplicando-se nos seus tecidos antes de ser transmitido a um hospedeiro, esta é a situação mais frequente (Sonenshine & Roe, 2014).

Normalmente utilizam-se os termos “capacidade vetorial” e “competência vetorial”, de forma indiferenciada, para descrever a habilidade de um artrópode de transmitir um determinado agente patogénico. Porém, a capacidade vetorial é definida quantitativamente e influenciada por determinantes comportamentais e ambientais, que afetam variáveis como a densidade, longevidade e competência do vetor. A competência vetorial é então uma componente da capacidade vetorial, dependente de determinantes genéticos que afetam a habilidade do vetor para transmitir determinado agente, as interações carraça-hospedeiro-patógeno e a suscetibilidade à infeção pelo agente (Beerntsen et al., 2000; la Fuente et al., 2017).

A infeção de uma carraça com um patógeno pode ocorrer por transmissão transtadial (de um estado de desenvolvimento para o outro) e/ou transovárica (de uma fêmea adulta para os seus ovos), por alimentação num hospedeiro infetado ou quando se alimenta na mesma área (inferior a 1cm) que uma outra carraça infetada (*cofeeding*) (Betancur et al., 2015). A transmissão do agente para o hospedeiro ocorre, normalmente, aquando da picada de um ixodídeo infetado e consequente inoculação de secreções salivares contendo o agente. Porém, dependendo da natureza do patógeno, a transmissão pode ocorrer de outras formas, tais como, quando as peças bucais da carraça se encontram contaminadas com sangue infetado de um hospedeiro ao qual se fixou anteriormente, quando a carraça liberta fezes ou é esmagada sobre lesões na pele ou mucosas, ou quando a carraça infetada é deglutida (Silva et al., 2006).

Os ixodídeos são, maioritariamente, zoofílicos, no entanto, a oportunidade de contacto com o homem faz com que este se torne um hospedeiro acidental ao qual podem ser transmitidos microrganismos, eventualmente, infecciosos. Esses contactos ocorrem através de atividades

relacionadas com a profissão (agricultura, pastorícia) ou lazer (campismo, caça, passeios pedestres), que normalmente têm lugar em focos naturais com diversas espécies de vertebrados que servem de reservatório a variados agentes patogénicos (Silva et al., 2006)

Qualquer uma das formas evolutivas do ixodídeo é capaz de transmitir um agente patogénico, no entanto, muitas das infeções decorrem de picadas de ninfas pois estas são dificilmente detetadas e podem fixar-se durante maior período de tempo, aumentando a eficácia da transmissão. Alguns dos patógenos que são transmitidos por carraças também o podem ser de outras formas, nomeadamente pelo contacto com fluídos de animais infetados ou ingestão de seus produtos, nomeadamente o leite, como é o caso do vírus TBE que provoca encefalites (Grešíková et al., 1975; Hudopisk et al., 2013). As bactérias responsáveis por doenças como Anaplasmose e Ehrliquiose também podem ser transmitidas através de transfusões de sangue e transplante de órgãos (Mowla et al., 2021).

1.3. Importância em Saúde Pública

Os ixodídeos são hematófagos estritos, isto é, alimentam-se exclusivamente de sangue, em vertebrados, atuando como vetores de agentes patogénicos tal como bactérias, vírus, protozoários e helmintos. Algumas espécies podem, também, utilizar os humanos como hospedeiros e transmitir agentes que causam patologias como a doença de Lyme ou a Febre hemorrágica Crimeia-Congo (Estrada-Peña, 2015; Boulanger et al., 2019). Isto coloca as carraças como o segundo maior vetor de agentes que causam doença em todo o mundo, sendo apenas ultrapassadas pelos mosquitos (la Fuente et al., 2008). Das espécies de carraças conhecidas, cerca de 10% têm a possibilidade de transmitir agentes patogénicos com potencial zoonótico, sendo as doenças transmitidas por carraças as mais comuns causadas por vetores na Europa (Jahfari et al., 2016; la Fuente et al., 2017).

Para além das patologias, as carraças podem, também, ser responsáveis por baixos desempenhos nas economias de países com um forte peso da indústria agropecuária pela redução na produção de carne e leite e, também, uma redução no *fitness* do gado causada pela espoliação de sangue e infeções secundárias (Jongejan & Uilenberg, 2004; Eskezia & Desta, 2016)

1.4. Ixodídeos associados a doenças infecciosas em Portugal

As doenças associadas a carraças constituem um problema de saúde pública, tanto humana como animal, não apenas pela gravidade das patologias, mas também pelo facto de poderem surgir com carácter epidémico, podendo causar surtos se não forem implementadas medidas de controlo.

Em Portugal estão identificadas algumas doenças que existem paralelamente na bacia do Mediterrâneo ou em risco de emergirem (Tabela 2).

Tabela 2: Agentes etiológicos transmitidos por ixodídeos presentes ou em risco de emergir em Portugal (adaptado de Santos et al, 2021).

Agente patogénico	Doença	Espécie de ixodídeo
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Anaplasmose humana	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. ventalloi</i>
<i>Babesia divergens</i>	Babesiose	<i>Ixodes</i> spp.
<i>Borrelia afzelii</i>	Borreliose de Lyme	<i>Ixodes ricinus</i>
<i>Bo. burgdorferi s.s</i>	Borreliose de Lyme	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. scapularis</i>
<i>Bo. bissettii</i>	Borreliose de Lyme	<i>Ixodes</i> spp.
<i>Bo. garinii</i>	Borreliose de Lyme	<i>Ixodes</i> spp.
<i>Bo. lusitaniae</i>	Borreliose de Lyme	<i>Ixodes ricinus</i>
<i>Bo. spielmanii</i>	Borreliose de Lyme	<i>Ixodes</i> spp.
<i>Bo. turdi</i>	-	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. frontalis</i>
<i>Bo. valaisiana</i>	Borreliose de Lyme	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>
<i>Coxiella burnetii</i>	Febre Q	Várias espécies
<i>Francisella tularensis</i>	Tularémia	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>Dermacentor reticulatus</i>
<i>Rickettsia aeschlimannii</i>	Sem denominação	<i>Hyalomma marginatum</i>
<i>Ri. conorii</i>	Febre escaro-nodular	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
<i>Ri. helvetica</i>	Sem denominação	<i>Ixodes ricinus</i>
<i>Ri. massiliae</i>	Sem denominação	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
<i>Ri. monacensis</i>	Sem denominação	<i>Ixodes ricinus</i>
<i>Ri. sibirica mongolitimonae</i>	LAR (lymphangitis-associated rickettsiosis)	<i>Hyalomma</i> spp. <i>Rhipicephalus pusillus</i>
<i>Ri. slovacica</i>	TIBOLA (tick-borne lymphadenopathy)	<i>Dermacentor marginatus</i> <i>D. reticulatus</i>
Vírus da febre hemorrágica Crimeia-Congo	Febre hemorrágica	<i>Hyalomma</i> spp.
Vírus Eyach	Sem denominação	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. ventalloi</i>
Vírus TBE	Encefalite	<i>Ixodes ricinus</i> <i>Haemaphysalis punctata</i>

Rhipicephalus sanguineus é a espécie mais abundante em Portugal, encontra-se distribuída de norte a sul do país (Anexo 1) e parasita diversos animais silvestres e domésticos, particularmente o cão. Estes ixodídeos são mais frequentes na primavera e verão devido a uma maior atividade tanto das fases adultas como imaturas, no entanto, devido às condições climáticas, podem ser encontradas ao longo de todo o ano. Em condições favoráveis, esta espécie pode completar até 3 ciclos de vida por ano, com posturas de cerca de 5000 ovos (Santos et al., 2021).

Rhipicephalus sanguineus é o principal vetor de bactérias do complexo *Rickettsia conorii*, agente etiológico da Febre botonosa ou Escaro-nodular, patologia endémica em Portugal, onde apresenta uma taxa de incidência de 9.8 por milhão de habitantes, sendo das mais elevadas relativamente aos países da bacia do Mediterrâneo (Bacellar et al., 1995, 2003; de Sousa et al., 2003). *Rickettsia conorii israelensis* também foi isolada em Portugal, e apresenta uma taxa de letalidade de 29% (de Sousa et al., 2007). Identicamente, outras rickettsias foram isoladas deste ixodídeo, como é o caso de *Rickettsia massiliae*, também com capacidade de provocar patologia em humanos (Vitale et al., 2006). O vírus da febre hemorrágica Crimeia-Congo foi isolado nesta

espécie (Gevorgyan et al., 2019) sem, contudo, estar confirmado o seu papel como vetor. Está também associada ao agente da Febre Q (*Coxiella brunetti*), no entanto, este agente é transmitido aos humanos, maioritariamente, através de aerossóis de produtos de animais infetados e não tanto pela picada de carraças (Silva et al., 2006)

Em termos veterinários, esta espécie transmite vários agentes como *Ehrlichia canis* (agente de Ehrlichiose monocítica canina), *Anaplasma platys* (Trombocitopénia cíclica canina), *Babesia canis* e *Babesia vogeli* (Babesiose canina) e *Hepatozoon canis* (Hepatozoonose canina), estes agentes afetam, principalmente, os canídeos (Santos et al., 2009; Cardoso et al., 2010; Baneth, 2011; Moraes-Filho et al., 2015; Bouzouraa et al., 2016).

A segunda espécie mais relevante em Portugal em termos médicos é *Ixodes ricinus*. Esta espécie ocupa, normalmente, locais com maior cobertura vegetal e elevados níveis de humidade relativa (acima de 90%) (Anexo 1) e por serem mais sensíveis às condições climáticas, adaptaram-se a diversos hospedeiros, desde mamíferos domésticos e silvestres, aves e também répteis (Santos et al., 2021). As carraças *Ixodes* são ativas durante todo o ano, porém com alguma sazonalidade. As formas adultas são mais ativas durante os meses menos quentes, enquanto as formas imaturas têm maior atividade nos meses mais quentes. Normalmente têm um ciclo de vida anual com posturas até 3000 ovos.

Ixodes ricinus é o principal vetor de *Borrelia burgdorferi* s.l., agente etiológico da Borreliose de Lyme (Schouls et al., 1999; Silva et al., 2006). Este complexo de espécies inclui a bactéria *Borrelia lusitaniae*, que foi isolada pela primeira vez em Portugal (Núncio et al., 1993). Esta espécie é a espiroqueta mais prevalente no nosso país e a mais importante em termos epidemiológicos na bacia do Mediterrâneo (Baptista et al., 2004). Ainda, deste ixodídeo, já foram isoladas estirpes de *Rickettsia helvetica* (Bacellar et al., 1995) que em algumas regiões da Europa foi associada a infeções letais em jovens adultos (Nilsson et al., 1999). *I. ricinus* também está associada a infeções com o vírus TBE, esta é a arbovirose que mais afeta os humanos na Europa, no entanto, a maioria das infeções são assintomáticas (Kunz, 1992). Estas carraças podem, ainda, transmitir protozoários do género *Babesia*. Através dos registos oficiais não foram assinalados casos de Babesiose em Portugal, contudo, devido ao número de casos crescentes na Europa, incluindo Espanha (Arsuaga et al., 2016), a probabilidade de virem a ser detetados em Portugal não deve ser negligenciada (Santos et al., 2019).

A bactéria *Anaplasma phagocytophilum* foi detetada em *Ixodes ventalloi* e *I. ricinus* (Santos et al., 2004, 2018). Este agente é responsável pela Anaplasmose granulocítica humana, que ocorre principalmente nos EUA, mas também já referenciada em algumas regiões da Europa, nomeadamente em Portugal (Santos et al., 2004). *I. ricinus* atua também como vetor de *Rickettsia monacensis*, cujo impacto em saúde ainda é desconhecido (Akl et al., 2019).

Do género *Hyalomma* destacam-se duas espécies em Portugal, *Hy. marginatum* e *Hy. lusitanicum*. *Hy. marginatum* assume maior importância e é normalmente encontrada a parasitar

bovinos e ocorre em todo o território nacional (Anexo 1) (Santos et al., 2021). As formas imaturas estão mais associadas a aves (Santos-Silva et al., 2001). Esta espécie também foi encontrada a parasitar humanos e está adaptada a climas quentes e secos, podendo realizar mais de um ciclo de vida por ano e tem posturas de cerca de 11000 ovos (Silva et al., 2006). *Hy. marginatum* está associada a *Rickettsia aeschlimanii*, porém a sua patologia não está totalmente averiguada em Portugal (Bacellar et al., 1999). Em França estão descritos alguns casos clínicos (Raoult et al., 2002). Esta carraça é o principal vetor do vírus da Febre hemorrágica Crimeia-Congo (Hoogstraal, 1979), tendo já sido isolado em Espanha por Estrada-Peña et al. (2012a) e Negrodo et al. (2017) descreveu os primeiros casos humanos mortais. Em Portugal, já foram detetados anticorpos em pacientes no Alentejo (Filipe et al., 1985), mas sem isolamento nos vetores.

As carraças *Haemaphysalis punctata* podem parasitar vários animais domésticos, animais silvestres e aves e foi encontrada recentemente a parasitar humanos (Raad et al., 2020). Estes ixodídeos preferem climas temperados a frios e têm um ciclo de vida anual com posturas de 3000 ovos. Foi detetado DNA de alguns agentes em exemplares desta espécie, entre eles, *Babesia* spp. e *Theileria* spp., *Anaplasma bovis*, vírus TBE, e o vírus da febre hemorrágica Crimeia-Congo, no entanto são necessários mais estudos que comprovem a sua capacidade de vetor competente destes (la Fuente et al., 2008; Dabaja et al., 2017; Andersson et al., 2018; Santos et al., 2021).

Dermacentor marginatus também parasita humanos, mas com pouca relevância em saúde pública, apesar de ser frequente a parasitar um grande número de hospedeiros. Esta espécie pode transmitir a bactéria *Rickettsia slovaca*, que apresenta uma elevada prevalência em Portugal (de Sousa et al., 2013). Está associada à patologia denominada TIBOLA (Linfoadenopatia causada pela picada de carraça) (Silva-Pinto et al., 2014). Foi detetado nestes ixodídeos DNA de outros patógenos, tais como, *A. phagocytophilum*, *Bo. burgdorferi* e o vírus da febre hemorrágica Crimeia-Congo, desconhecendo-se a sua competência como vetor destes agentes (Ben & Lozynskyi, 2019).

1.5. Ixodídeos dos Arquipélagos da Madeira e Açores

Os Arquipélagos da Madeira e Açores são bons modelos para o estudo da interação homem/ambiente, devido às suas fronteiras bem definidas, ao seu relativo isolamento e recente colonização humana. A biodiversidade insular é altamente ameaçada pela transformação do habitat e invasão/introdução de espécies não nativas. Além do mais, os impactos das alterações climáticas podem sentir-se com mais severidade no espaço e no tempo pelo que, é fundamental, o conhecimento da biodiversidade e dinâmica destas espécies (Russell & Kueffer, 2019; Norder et al., 2020).

Nestes arquipélagos a informação sobre ixodídeos e o seu papel como vetores na transmissão de agentes patogénicos é escassa e, em algumas situações, pouco clara. Assim, na

Ilha da Madeira há registos das espécies: *I. ricinus*, *H. punctata*, *R. bursa*, *R. sanguineus*, *R. (Boophilus) annulatus* e *Hy. lusitanicum* (Neumann, 1899; Schülze, 1939; Dias, 1953; Almeida, 1997).

O estudo realizado por Almeida (1995) assinalou que *I. ricinus* se encontra distribuída por toda a ilha, com exceção de zonas de altitude próxima ou superior a 1000m. Foram detetados nesta espécie, na Ilha da Madeira, determinados agentes com potencialidade de provocar doenças nos humanos, tais como espécies do complexo *Bo. burgdorferi* s.l (*Bo. afzelii*, *Bo. burgdorferi* s.s. e *Bo. garinii*) (Matuschka et al., 1998), *A. phagocytophilum* (Santos et al., 2004; de Carvalho et al., 2008), *Ri. monacensis*, *Ri. helvetica* e *Bo. lusitaniae* (de Carvalho et al., 2008; de Sousa et al., 2012). Também foi detetada *Bartonella henselae* em *I. ricinus*, no entanto ainda não está bem estabelecido se este ixodídeo é capaz de transmitir esta bactéria (Dietrich et al., 2010; Regier et al., 2019).

Não há nenhuma publicação, do nosso conhecimento, acerca de agentes noutras espécies de carraças na ilha da Madeira. É apenas conhecida a distribuição de algumas espécies como *H. punctata* ocorrendo principalmente em zonas altas, frias e húmidas, relacionadas com o pastoreio ovino. Não foi encontrada em zonas abaixo dos 560m, apenas alguns exemplares foram encontrados em São Vicente (vertente norte, na cota 200m). *Rhipicephalus sanguineus* parece ter uma distribuição alargada por toda a ilha. Esta espécie foi encontrada em zonas na vertente norte da parte ocidental da ilha como também na vertente sul da parte oriental da ilha. As espécies *R. bursa* e *Hy. lusitanicum* foram apenas encontradas na zona de Machico (Almeida, 1995).

No Arquipélago dos Açores estão assinaladas 9 espécies de ixodídeos: *I. hexagonus* (São Miguel), *D. marginatus* e *Hy. lusitanicum* (Terceira), *H. punctata* (Flores, Faial, Terceira, São Miguel e Santa Maria), *R. sanguineus* (Terceira, São Miguel e Santa Maria) (Dias, 1992) e também, *R. (Boophilus) annulatus* e *R. bursa* (Pico, Terceira e São Miguel), *Hy. marginatum* (Pico) e *R. turanicus* (Amaral, 2010), porém a presença destas últimas espécies nos Açores não está publicada em revistas científicas, não se sabendo de que forma os espécimes foram colhidos e identificados.

No que diz respeito a patógenos, foi identificada a bactéria *Ri. massiliae* em *R. sanguineus* colhidos de um cão na ilha Terceira (Foley and Reeves, 2014). Nas ilhas de Santa Maria e Graciosa foi identificada *Borrelia turdi* em *I. frontalis* que parasitavam aves (Literak et al., 2015). Em Portugal Continental esta bactéria foi detetada em *I. frontalis* e *I. ricinus* (Norte et al., 2013, 2012). Recentemente foram detetados *phlebovirus* em *I. hexagonus* e *R. sanguineus* da ilha de São Miguel (Pimentel et al., 2019) e protozoários do género *Hepatozoon* em répteis da ilha Graciosa (Rund et al., 2019). O protozoário *Theileria equi* foi detetado em cavalos (Baptista et al., 2013), porém, apesar de ser transmitida naturalmente por *Boophilus*, *Dermacentor*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus* (Jaffer et al., 2010), não encontraram carraças a parasitar os cavalos estudados. Este agente foi detetado apenas em cavalos importados e nos seus descendentes

(transmissão vertical), não estando presente numa população de pôneis nativos da ilha Terceira. Isto chama a atenção para um melhor controlo dos animais importados para ilhas, de forma a minimizar o risco de infeção das populações nativas.

1.6. Influência de fatores bióticos e abióticos

Os ixodídeos interagem com diversos fatores bióticos e abióticos que modulam o sucesso da sua sobrevivência e desenvolvimento (Garcia-Vozmediano et al., 2021). Fatores ambientais, como o clima, habitat e disponibilidade de hospedeiros são alguns dos fatores limitantes para as carraças, determinando a sua disseminação geográfica e abundância (Estrada-Peña & la Fuente, 2014). Para além disso, a temperatura pode modular não só a sobrevivência das carraças, mas também o desenvolvimento de patógenos (Estrada-Peña et al., 2011). Contudo, nas últimas décadas, tem-se vindo a observar uma alteração na distribuição de espécies de ixodídeos e na epidemiologia de doenças transmitidas por estes, especulando-se que em parte se deve às alterações climáticas globais (Gray et al., 2009; Andersen & Davis, 2017). Esta dispersão das várias espécies de ixodídeos, sucedida num curto período de tempo, poderá ter implicações socioeconómicas e em saúde pública (Campbell-Lendrum et al., 2015). Para além das mudanças climáticas, outros fatores como, a urbanização e demografia podem ter influência nas alterações geográficas e epidemiológicas destas espécies (Andersen & Davis, 2017).

Determinados modelos previram que as alterações climáticas podem levar à expansão de carraças *Ixodes* e seus patógenos para regiões mais a norte no Canadá (Ogden et al., 2006; Roy-Dufresne et al., 2013; Simon et al., 2014). No mediterrâneo também se considera provável que as mudanças climáticas levem à expansão para norte de *Hy. marginatus* (Estrada-Peña & Venzal, 2007). Em alguns países dessa região, correlacionou-se o aumento da incidência da Febre escararodular com o aumento de apenas 1°C da temperatura máxima anual e a menor precipitação (Arenas et al., 1986; Raoult et al., 1992; de Sousa et al., 2006; Vescio et al., 2008).

Nos últimos anos, vários estudos têm virado a sua atenção para fatores bióticos, como a microbiota das carraças, que tem um papel importante na fisiologia e ecologia das mesmas. Estas comunidades microbianas, constituídas por bactérias, vírus e protozoários, estabelecem relações comensais, simbióticas e parasitárias que modelam o *fitness* da carraça e também a transmissão de patógenos para hospedeiros vertebrados (Bonnet et al., 2017). Os patógenos/agentes transmitidos por carraças são separados dos restantes organismos que fazem parte da microbiota dos ixodídeos apenas por conveniência de classificação, sendo definidos como microrganismos transmitidos a vertebrados aos quais podem causar doença (Pollet et al., 2020). Vários trabalhos já demonstraram a influência de endosimbiontes na transmissão de patógenos (Moutailler et al., 2016), prevendo-se um aumento dos estudos realizados nesta área nos próximos anos, visto que daqui poderá surgir uma nova forma de controlo destes agentes.

2. Objetivos

Um dos principais objetivos deste trabalho foi saber que espécies de carrças, coletadas de cães e gatos, em clínicas veterinárias, circulam nos arquipélagos da Madeira e Açores. Esta informação é importante para o conhecimento da biodiversidade insular, mas também, pode contribuir para a elaboração de um futuro mapa de risco sobre eventuais surtos epidémicos que tenham estes vetores como transmissores.

Num segundo objetivo, pretendeu-se avaliar a presença de microrganismos associados à microbiota das carrças que podem provocar doenças ao ser humano e outros animais.

3. Material e Métodos

3.1. Amostragem

Para a realização deste estudo foram coletados 120 espécimes de ixodídeos, recolhidos de cães e gatos (hospedeiros) atendidos em clínicas veterinárias nos Açores (N=41) e Madeira (N=79) com a colaboração da *MSD Animal Health* entre 2018 e 2019 (Tabela 3; Anexo 2). Até ao seu processamento em laboratório, os espécimes foram armazenados em tubos (1 tubo por cada hospedeiro), mantidos em local fresco, seco e com pouca luz.

Tabela 3: Informação acerca dos espécimes estudados. NA: informação não disponível

Nº Ordem	Código Lab/Genética/DbA/FCUL	Data colheita	Origem geográfica	Hospedeiro
2635	A1a, A1b, A41	NA	São Miguel (Açores)	cão
2559	A2	nov/18	Faial (Açores)	gato
2499	A3, A36	dez/18	São Miguel (Açores)	gato
2557	A4a, A4b	nov/18	Faial (Açores)	cão
3445	A5a, A5b	NA	Terceira (Açores)	cão
2498	Aa, A6b, A34	nov/18	São Miguel (Açores)	gato
3436	A7a, A7b, A37, A38, A39	NA	Terceira (Açores)	cão
3443	A8	NA	Terceira (Açores)	cão
3444	A9a, A9b, A30, A31, A33, A43, A44, A45, A46, A53, A54	NA	Terceira (Açores)	cão
3450	A10a, A10b, A40	NA	Terceira (Açores)	cão
2633	A42	NA	Terceira (Açores)	cão
2497	A47, A48, A49, A50, A51, A52	dez/18	São Miguel (Açores)	cão
2877	M1a, M1b, M55, M58	NA	Santa Cruz (Madeira)	cão
2819	M2, M52	mar/19	Ribeira Brava (Madeira)	gato
2779	M3, M57	jan/19	Ribeira Brava (Madeira)	cão
2503	M4, M49	nov/18	Funchal (Madeira)	cão
2455	M5, M50	NA	Santa Cruz (Madeira)	gato
2466	M6a, M6b, M54, M56	NA	Machico (Madeira)	cão
2468	M7, M53	nov/18	Machico (Madeira)	gato
2477	M8a, M8b, M51	nov/18	Calheta (Madeira)	gato
2438	M9a, M9b	NA	Funchal (Madeira)	gato
2465	M10a, M10b	nov/18	Santa Cruz (Madeira)	gato
2829	M11a, M11b	nov/18	Calheta (Madeira)	gato
2865	M12a, M12b	fev/19	Calheta (Madeira)	gato
2871	M13a, M13b	NA	Santa Cruz (Madeira)	cão
2681	M14a, M14b	NA	Santa Cruz (Madeira)	gato

Tabela 3 (continuação): Informação acerca dos espécimes estudados. **NA:** informação não disponível

Nº Ordem	Código Lab/Genética/Db/FCUL	Data colheita	Origem geográfica	Hospedeiro
2447	M15a, M15b	NA	Funchal (Madeira)	cão
2955	M16	NA	Santa Cruz (Madeira)	cão
2608	M17	NA	Santa Cruz (Madeira)	cão
2678	M18	NA	Santa Cruz (Madeira)	cão
2958	M19	NA	Santa Cruz (Madeira)	cão
2478	M20	NA	Ribeira Brava (Madeira)	gato
2439	M21	jan/19	Funchal (Madeira)	gato
2837	M22a, M22b	jan/19	Calheta (Madeira)	cão
2880	M23	NA	Santa Cruz (Madeira)	cão
2726	M24	NA	Santa Cruz (Madeira)	cão
2502	M25a, M26b	nov/18	Funchal (Madeira)	gato
2783	M26a, M26b	NA	Santa Cruz (Madeira)	gato
2934	M27a, M27b	NA	Santa Cruz (Madeira)	gato
2790	M28a, M28b	NA	Santa Cruz (Madeira)	cão
2940	M29	NA	Santa Cruz (Madeira)	gato
2464	M30a	nov/18	Santa Cruz (Madeira)	cão
2922	M30	NA	Santa Cruz (Madeira)	cão
2728	M31	jan/19	Santa Cruz (Madeira)	gato
2874	M32	NA	Santa Cruz (Madeira)	cão
2711	M33	jan/19	Santa Cruz (Madeira)	cão
2937	M34	NA	Santa Cruz (Madeira)	cão
2763	M35	jan/19	Calheta (Madeira)	cão
2469	M36	nov/18	Machico (Madeira)	cão
2856	M31	NA	Santa Cruz (Madeira)	cão
2859	M38	NA	Santa Cruz (Madeira)	cão
2931	M39	NA	Santa Cruz (Madeira)	cão
2760	M41	jan/19	Calheta (Madeira)	cão
2456	M43, M59, M60, M61, M62, M63, M64, M65	nov/18	Santa Cruz (Madeira)	cão
2467	M44	NA	Machico (Madeira)	cão
2454	M45	NA	Santa Cruz (Madeira)	gato
2826	M46	nov/18	Santa Cruz (Madeira)	cão
2834	M47	jan/19	Calheta (Madeira)	cão
2862	M48	fev/19	Ribeira Brava (Madeira)	gato

3.2. Identificação de Ixodídeos

3.2.1. Identificação Morfológica

A identificação morfológica das carraças em estudo realizou-se com suporte em chaves dicotômicas ou bibliografia específica (Dias, 1995; Heylen et al., 2014; Estrada-Peña et al., 2017; Hornok et al., 2017, 2021) que têm por base a observação dos principais caracteres diagnosticantes, tais como, *capitulum*, face dorsal e ventral, escudo dorsal, espiráculo, terminação do sulco anal, terminação do tarso após o órgão de Haller no 1º par de patas, coxa do 1º par de patas, placas adanais e acessórias no macho e abertura genital nas fêmeas (Figura 2; Anexo 3). A análise morfológica realizou-se com auxílio de um microscópio estereoscópico Leica M165C. Para uma identificação mais robusta de alguns exemplares, foi necessário remover algumas das estruturas diagnosticantes, nomeadamente a genitália nas fêmeas (Walker et al., 2000) e espiráculos nos machos de *Rhipicephalus* (Dantas-Torres et al., 2013) e o capítulo e coxa do 1º par de patas em *Ixodes* (Heylen et al., 2014; Hornok et al., 2017, 2021). Estas estruturas foram montadas entre lâmina e lamela, utilizando o Líquido Tendeiro (Pagès & Monteys, 2005) para as clarificar. Todos os exemplares foram registados numa base de dados digital de imagens (Software Leica Microsystems, LAS V4.7, 2016).

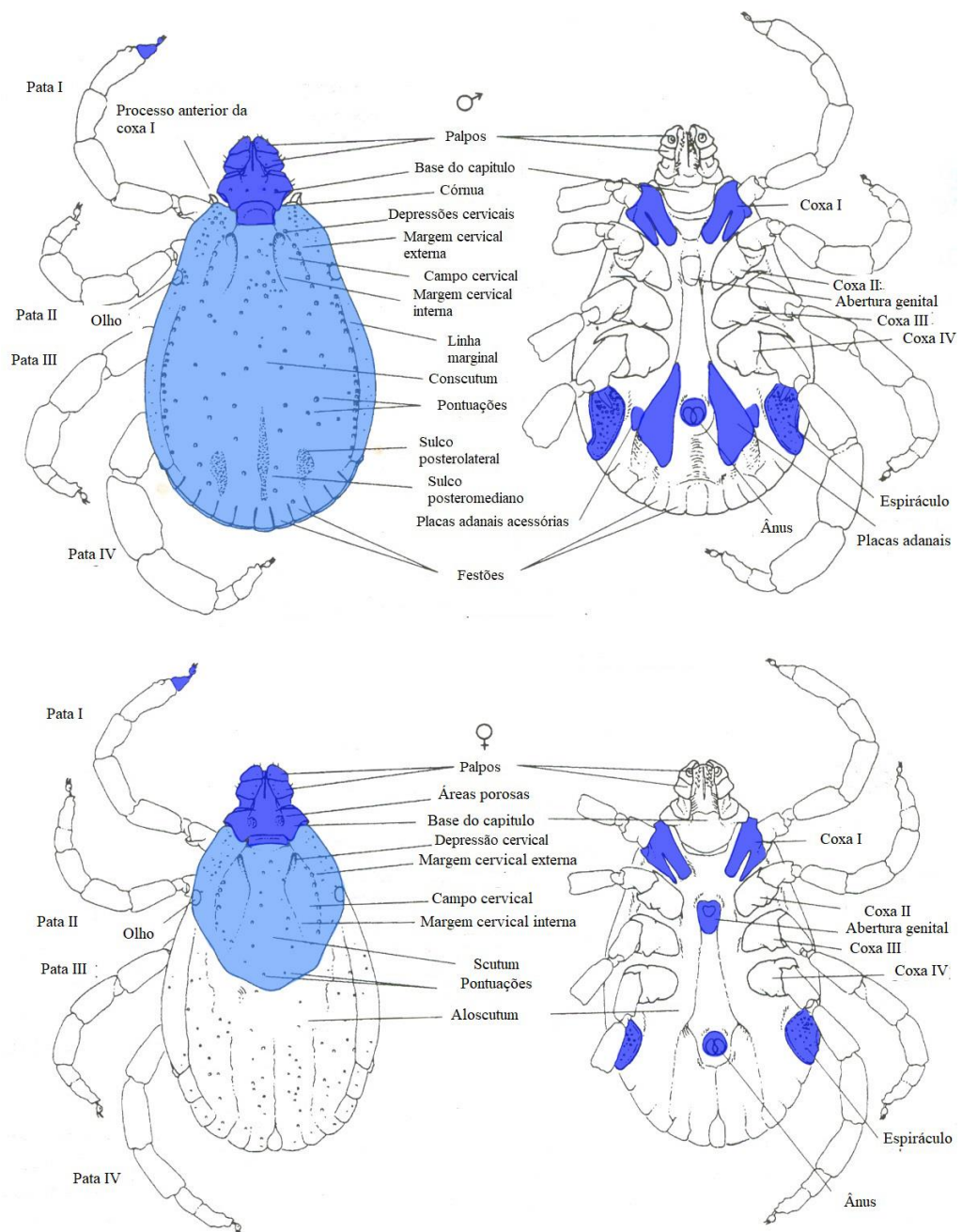


Figura 2: Caracteres morfológicos diagnosticantes das faces dorsal e ventral de machos e fêmeas de carraças (adaptado de Walker et al 2000).

3.2.2. Identificação Molecular

Em laboratório os espécimes foram lavados com etanol 70%, para retirar restos de sangue dos hospedeiros e deixados a secar à temperatura ambiente. Posteriormente, foram macerados e colocados numa solução de Proteinase K (2mg/μL – NZYTech), *overnight*, para facilitar a digestão dos tecidos. De seguida, o DNA foi extraído com recurso a um Kit comercial (E.Z.N.A. Tissue DNA Isolation Kit - Omega Bio-tek) seguindo as orientações do fabricante. Após a extração as amostras foram testadas num espectrofotómetro (NanoDrop 1000 spectrophotometer, Thermo Fisher) de forma a determinar a concentração de DNA e avaliar o grau de pureza em relação a proteínas e fenóis. Todas as alíquotas foram armazenadas à temperatura de 4°C até ao seu processamento. Para a caracterização molecular das carraças recorreu-se ao PCR convencional para amplificação do gene mitocondrial COI (*Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I*). Os *primers* utilizados e respetivas sequências estão representadas na Tabela 4.

Tabela 4: *Primers* e sequências usadas para a amplificação do gene COI.

Marcador	<i>Primers</i>	Sequências	Ref.
COI	LCO1490_F/ HCO2198_R	5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3' 5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'	(Folmer et al., 1994)

As reações de PCR foram preparadas num volume total de 25 μL, incluindo, 12.5 μL de Dreamtaq Green PCR Master Mix (2x) (Thermo scientific), 0.4 μM de cada *primer* (1μL) e 3 μL de DNA genómico, perfazendo com ddH₂O. O perfil de temperatura utilizado incluiu uma desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C durante 20 segundos (desnaturação), 45°C durante 45 segundos (*annealing*) e 72°C durante 45 segundos, por fim realizou-se um ciclo de extensão a 72°C durante 7 minutos. Os resultados do PCR foram verificados através de eletroforese em gel de agarose (2%) (Anexo 4).

Para esclarecer dúvidas acerca da identificação morfológica de alguns espécimes, os seus produtos de PCR foram purificados com o kit comercial SureClean Plus (Bioline) e enviados para sequenciação (STABVIDA, Lda – Portugal).

3.3. Pesquisa de patógenos

Para a pesquisa de patógenos dos seguintes grupos de protozoários e bactérias, *Babesia*, *Theileria* e *Hepatozoon*, *Rickettsia*, *Anaplasma* e *Ehrlichia* e *Borrelia burgdorferi* s.l foram utilizados *primers* específicos para cada um deles. Os *primers* e respectivas sequências utilizadas encontram-se na tabela abaixo (Tabela 5).

Tabela 5: *Primers* e sequências usadas para cada agente em estudo.

Agente	<i>Primers</i>	Sequências	Ref.
<i>Babesia/ Theileria</i>	18SbathF/ 18SbathR	5' ACACAGGGAGGTAGTGACAAG 3' 5' TAAGAATTTACCTCTGACAGTTA 3'	(Wielinga et al., 2009)
<i>Rickettsia</i>	gltACS409F/ gltARp1258R	5' CCTATGGCTATTATGCTTGC 3' 5' ATTGCAAAAAGTACAGTCAACA 3'	(Roux et al., 1997)
<i>Anaplasma/ Ehrlichia</i>	Ehr-f/ Ehr-R	5' GGAATTCAGAGTTGGATCMTGGYTCAAG 3' 5' CGGGATCCCGAGTTTGCCGGGACTTYTTCT 3'	(Chaisi et al., 2017)
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	23SN1/ 23SC1	5' ACCATAGACTCTTATTACTTTGAC 3' 5' TAAGCTGACTAATACTAATTACCC 3'	(Rijpkema et al., 1995)
	23SN2/ 5SCB	5' ACCATAGACTCTTATTACTTTGACCA 3' 5' GAGAGTAGGTTATTGCCAGGG 3'	
<i>Babesia/ Hepatozoon</i>	PP18S_F/ PP18S_R	5' CCAGCAGCCGCGGTAATTC 3' 5' CTTTCGCAGTAGTTYGTCTTTAACAAATCT 3'	(Tabar et al., 2008)

A detecção de agentes foi realizada através de *real-time* PCR num termociclador *MyGo Pro* (Anexo 5). As reações ocorreram num volume total de 20 µL, contendo, 10 µL de PerfeCta SYBR Green Supermix, Rox (Quanta bio), 2,8 µL de amostra de DNA e 0,3 µM de cada *primer* (0,6 µL), com exceção das reações com o *primer* para *Borrelia burgdorferi* s.l. que se usou 0,2 µM de cada *primer* (0,4 µL), perfazendo sempre o volume total com ddH₂O. Os ciclos de temperatura para cada *primer* encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6: Condições de reação para os *primers* usados.

Babesia/Theileria	Desnaturação inicial	95°C (5min)	Rickettsia	Desnaturação inicial	95°C (5min)	Anaplasma/Ehrlichia	Desnaturação inicial	95°C (5min)
	Amplificação (45 ciclos)	95°C (15seg)		Amplificação (45 ciclos)	95°C (15seg)		Amplificação (35 ciclos)	95°C (15seg)
		57°C (30seg) (annealing)			51,6°C (30seg) (annealing)			57°C (45seg) (annealing)
65°C (45seg)	65°C (45seg)	65°C (45seg)						
Borrelia burgdorferi s.l.	Desnaturação inicial	95°C (5min)		Desnaturação inicial	95°C (5min)	Babesia/Hepatozoon	Desnaturação inicial	95°C (5min)
	Amplificação 1 (25 ciclos)	95°C (15seg)		Amplificação 2 (40 ciclos)	95°C (15seg)		Amplificação (35 ciclos)	95°C (15seg)
		52°C (30seg) (annealing)			55°C (30seg) (annealing)			64°C (30seg) (annealing)
65°C (40seg)	65°C (40seg)	65°C (40seg)						

3.4. Análise de Dados

Os dados morfológicos e moleculares obtidos foram compilados num ficheiro *Microsoft Excel*, onde foram elaborados gráficos e tabelas para uma melhor apresentação e compreensão dos resultados. Para comparar variáveis qualitativas realizou-se o teste do Qui-quadrado (χ^2) no programa de análise estatística *SPSS statistics* (IBM Corporation), adotando-se um nível de significância de 0,05 ($p < 0,05$).

As sequências obtidas da análise molecular foram tratadas no *BioEdit* versão 7.2.5 e posteriormente comparadas com amostras da base de dados online do *GenBank*, utilizando a ferramenta *Blastn*.

4. Resultados

4.1. Identificação Morfológica

Num total de 120 ixodídeos em estudo foram identificados 6 *Ixodes hexagonus*, 78 *Ixodes ricinus*, 4 *Ixodes ventalloi*, 30 *Rhipicephalus sanguineus* e 2 foram apenas identificados até ao género *Ixodes* (Figuras 7 a 12).

Na Ilha da Madeira identificaram-se as espécies *I. ricinus* (98,7%) e *R. sanguineus* (1,3%). No Arquipélago dos Açores, as espécies identificadas foram *I. hexagonus* (14,6%), *I. ventalloi* (9,8%) e *R. sanguineus* (70,7%) (Tabela 7). Os mapas representados nas Figuras 3 e 4 mostram a distribuição geográfica das espécies coletadas em cada arquipélago.

Relativamente ao estado de desenvolvimento dos ixodídeos (ninfa, fêmea e macho) foram identificadas 85 (70,8%) fêmeas, 29 (24,2%) machos e 6 ninfas (5%). Do total de fêmeas analisadas nos dois arquipélagos, 71,8% eram *I. ricinus*, 3,4% *I. ventalloi*, 23,5% *R. sanguineus* e 1,18% foram identificadas apenas até ao género *Ixodes*. No que diz respeito aos machos, 58,6% eram *I. ricinus*, 3,4% *I. ventalloi*, 34,5% *R. sanguineus* e 3,4% foram identificadas até ao género *Ixodes*, representando apenas uma carraça. As ninfas identificadas neste estudo eram todas da espécie *I. hexagonus* (Figura 5).

Através do cálculo de percentagens entende-se que, na Ilha da Madeira, a espécie que apresentou maior abundância foi *I. ricinus*, enquanto no Arquipélago dos Açores *R. sanguineus* mostrou-se mais abundante. No conjunto dos dois arquipélagos, observou-se uma clara maioria de fêmeas relativamente a machos. Contudo, esta observação deve estar sob reserva dado que as colheitas foram feitas apenas nos hospedeiros (cão e gato) e não na vegetação.

Tabela 7: Espécimes de ixodídeos coletados em diversas localidades nos Açores e Madeira.

	Localidade	<i>I. hexagonus</i>	<i>I. ricinus</i>	<i>I. ventalloi</i>	<i>R. sanguineus</i>	<i>Ixodes sp</i>	TOTAL
Açores	Faial	0	0	0	1	2	3 (2,5%)
	São Miguel	6	0	4	4	0	14 (11,7%)
	Terceira	0	0	0	24	0	24 (20%)
Madeira	Calheta	0	12	0	0	0	12 (10%)
	Funchal	0	9	0	0	0	9 (7,5%)
	Machico	0	8	0	0	0	8 (6,7%)
	Ribeira Brava	0	6	0	0	0	6 (5%)
	Santa Cruz	0	43	0	1	0	44 (36,7%)
	TOTAL	6 (5%)	78 (65%)	4 (3,3%)	30 (25%)	2 (1,7%)	120

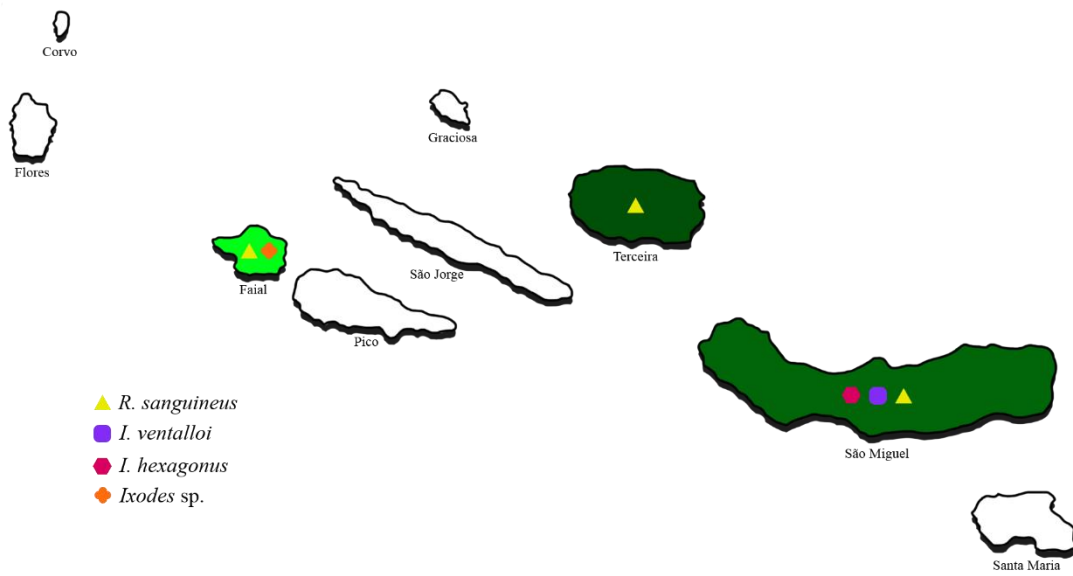


Figura 3: Distribuição geográfica das espécies de ixodídeos identificadas no Arquipélago dos Açores.

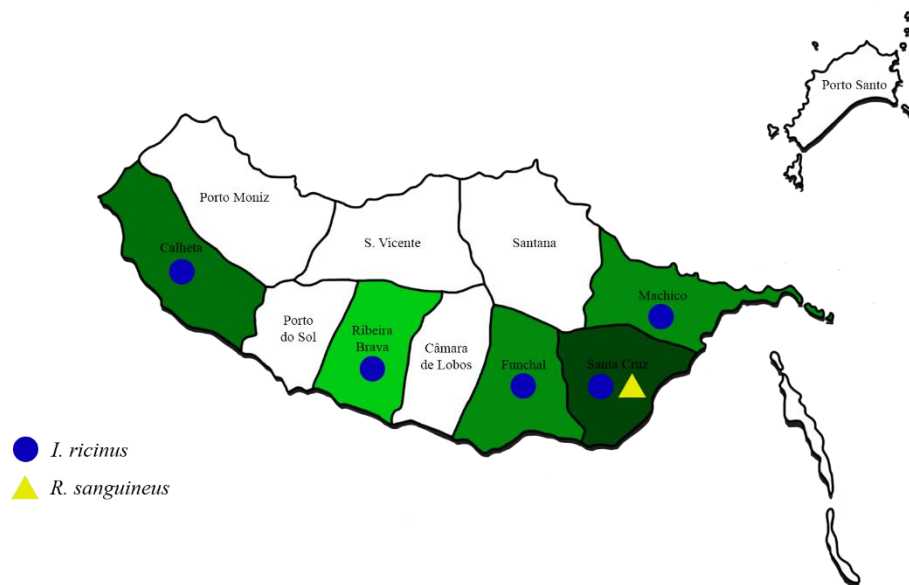


Figura 4: Distribuição geográfica das espécies de ixodídeos identificadas no Arquipélago da Madeira.

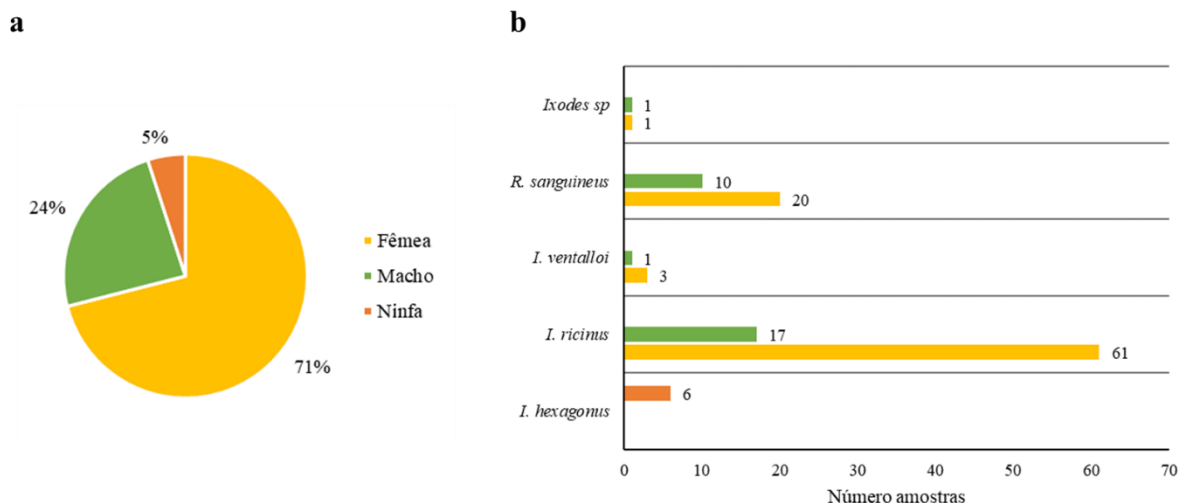


Figura 5: Distribuição das espécies de ixodídeos encontradas por a) estado de desenvolvimento e b) espécie de ixodídeo identificada.

No que diz respeito aos hospedeiros, 81 (65,5%) carraças foram recolhidas de 36 cães e 39 (32,5%) foram recolhidas de 22 gatos (Tabela 8). As seis carraças *I. hexagonus* foram retiradas do mesmo cão e as quatro carraças *I. ventalloi* foram coletadas no mesmo gato. Tanto em cão (58%) como em gato (79,5%) o ixodídeo mais frequente foi *I. ricinus* sendo *R. sanguineus* mais frequente em cão (34,6%) que em gato (5,1%) (Figura 6).

Tabela 8: Espécimes colhidos nos hospedeiros considerados.

	<i>I. hexagonus</i>	<i>I. ricinus</i>	<i>I. ventalloi</i>	<i>R. sanguineus</i>	<i>Ixodes sp</i>	TOTAL
Cão	6	47	0	28	0	81
Gato	0	31	4	2	2	39

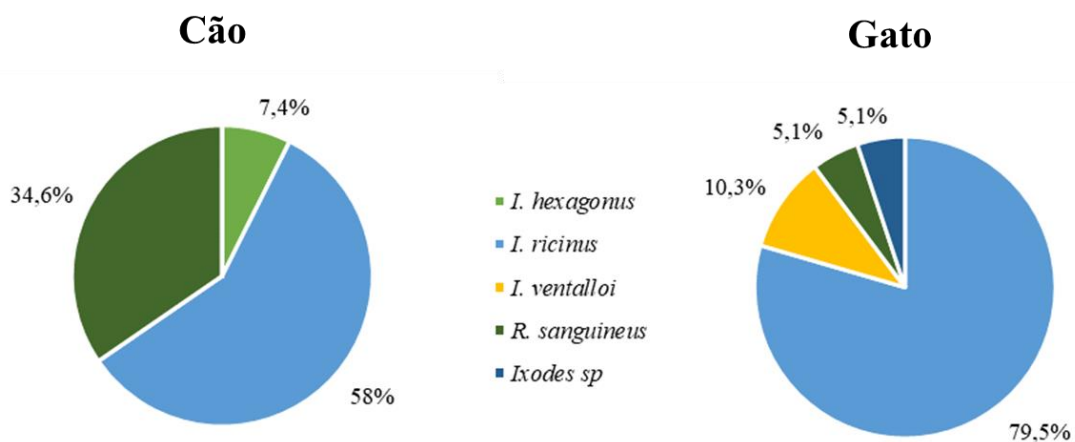


Figura 6: Espécimes colhidos nos hospedeiros considerados.

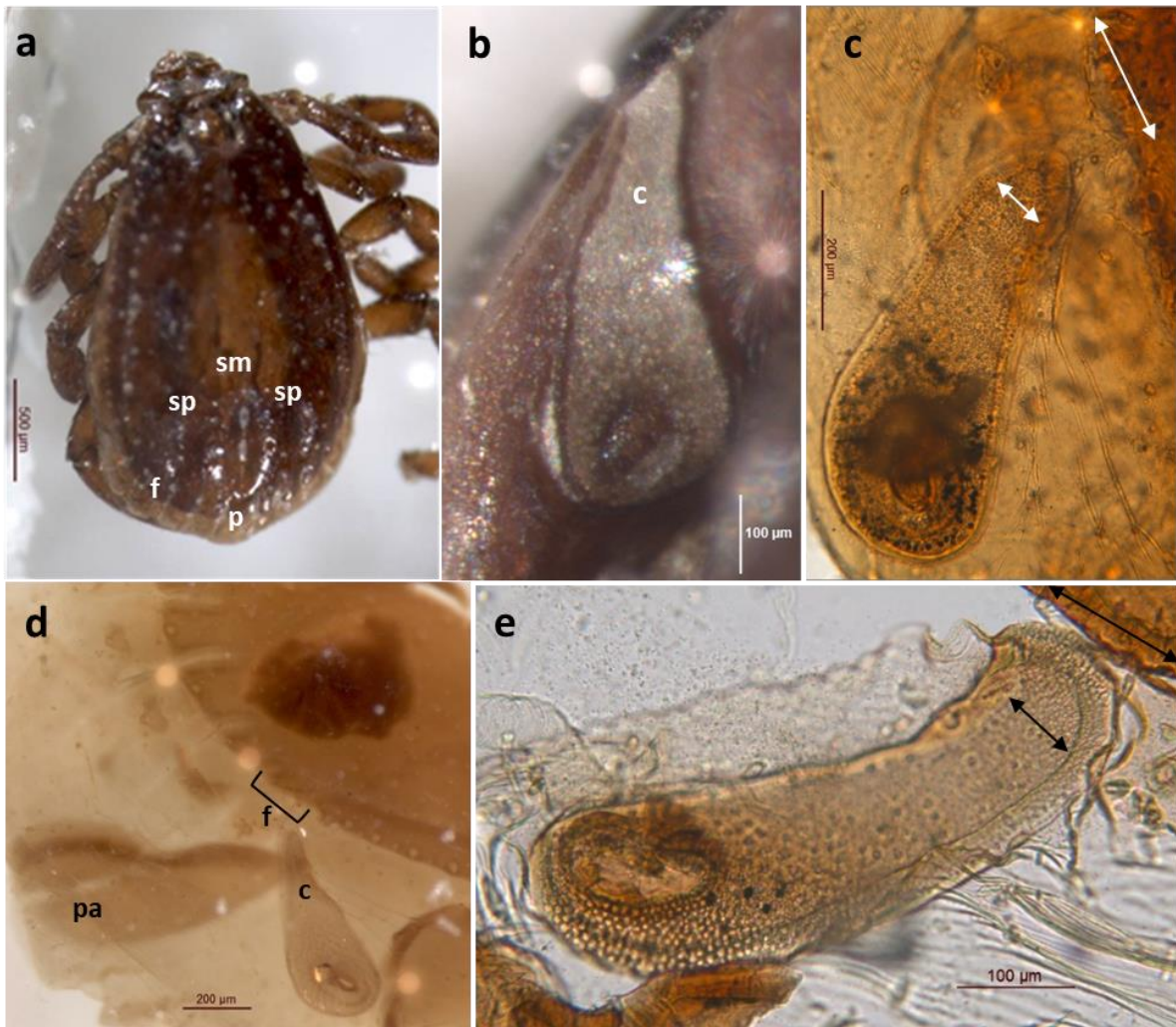


Figura 7: *R. sanguineus* (s.s.), macho: **a)** escudo dorsal com pontuações médias e grandes de distribuição uniforme; sulcos medianos (sm) e paramedianos (sp) em forma de fenda alongada; festões (f) presentes e parma (p) evidente; **b)** espiráculo com um corpo largo, cauda (c) afinando dorsalmente; **c)** espiráculo com a terminação da cauda inferior a metade do festão adjacente; **d)** placa adanal (pa) e espiráculo com a terminação da cauda (c) inferior a metade do festão adjacente (linha preta); **e)** espiráculo.

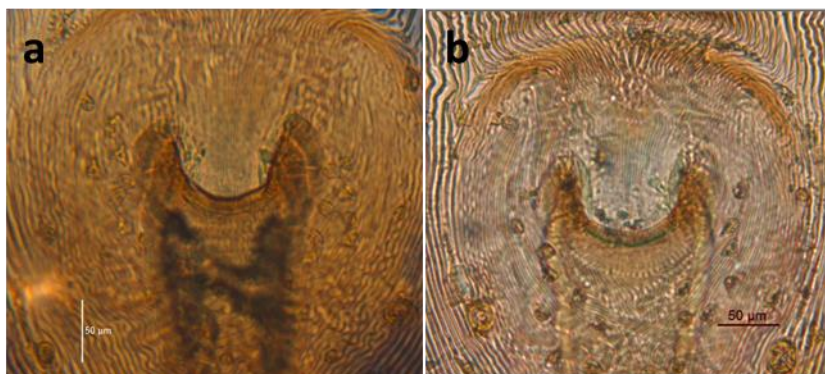


Figura 8: *R. sanguineus* (s.s.), fêmea: **a)** e **b)** abertura genital em U aberto, com os escleritos laterais em forma de meia lua



Figura 9: *Ixodes hexagonus*, ninfa: **a)** face dorsal; **b)** face ventral da ninfa; **c)** terminação do tarso do 1º par de patas da ninfa.

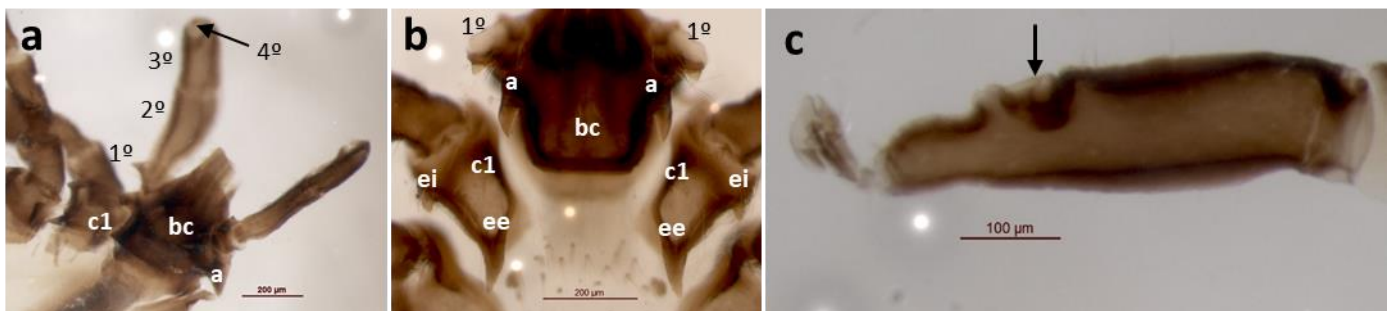


Figura 10: *Ixodes ventalloi*, fêmea: **a)** face ventral da base do capítulo (bc) e coxa do 1º par de patas (c1), artículos do palpo (1º, 2º 3º e 4º), sendo o segundo o mais longo e o primeiro apresenta um esporão ventral pontiagudo, triangular; **b)** pormenor da face ventral da base do capítulo com aurículas em forma de cornos de touro projetadas para trás e para dentro (a); 1º artícolo dos palpos com um esporão curto e cónico bem evidente (1º). Coxa do 1º par de patas (c1) com esporão interno (ei) forte, ligeiramente encurvado para fora, de terminação pontiaguda e esporão externo (ee) bem evidente, encurvado para dentro e de menores dimensões que o anterior; **c)** terminação do tarso do 1º par de patas, após o órgão de Haller (seta).

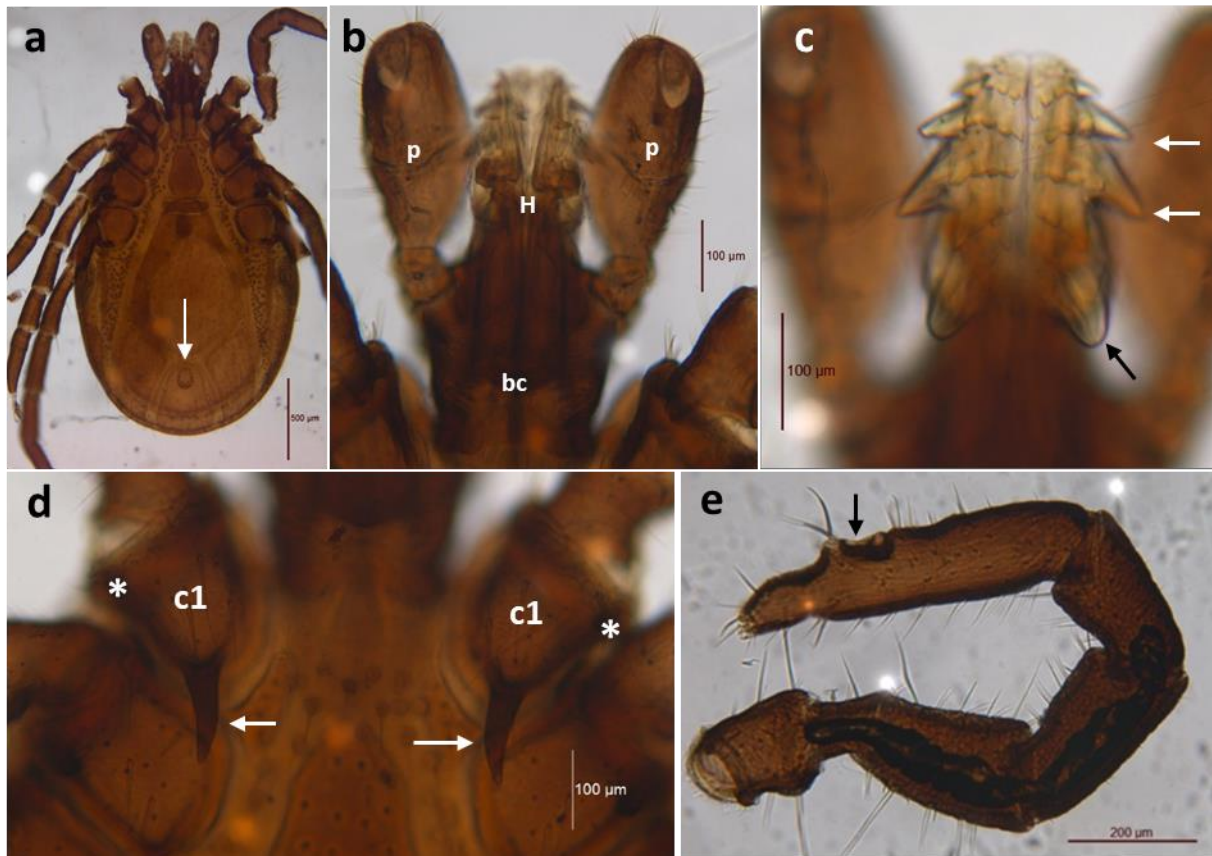


Figura 11: *Ixodes ricinus*, macho: **a)** face ventral, sulco anal rodeando o ânus anteriormente (seta); **b)** face ventral do capitulum, salientando-se os dois palpos (p), o hipostoma (H) e a base do capitulum (bc); **c)** hipostoma com dois dentes posteriores retroprojectados (seta preta) para fora bem desenvolvidos e com bordos arredondados; dentes laterais de perfil ponteagudo (setas brancas); **d)** coxa I (c1) com um esporão interno aguçado e longo sobrepondo-se à coxa II (setas) e esporão externo rombo e triangular (asterisco); **e)** terminação do tarso do 1º par de patas, após o órgão de Haller (seta).

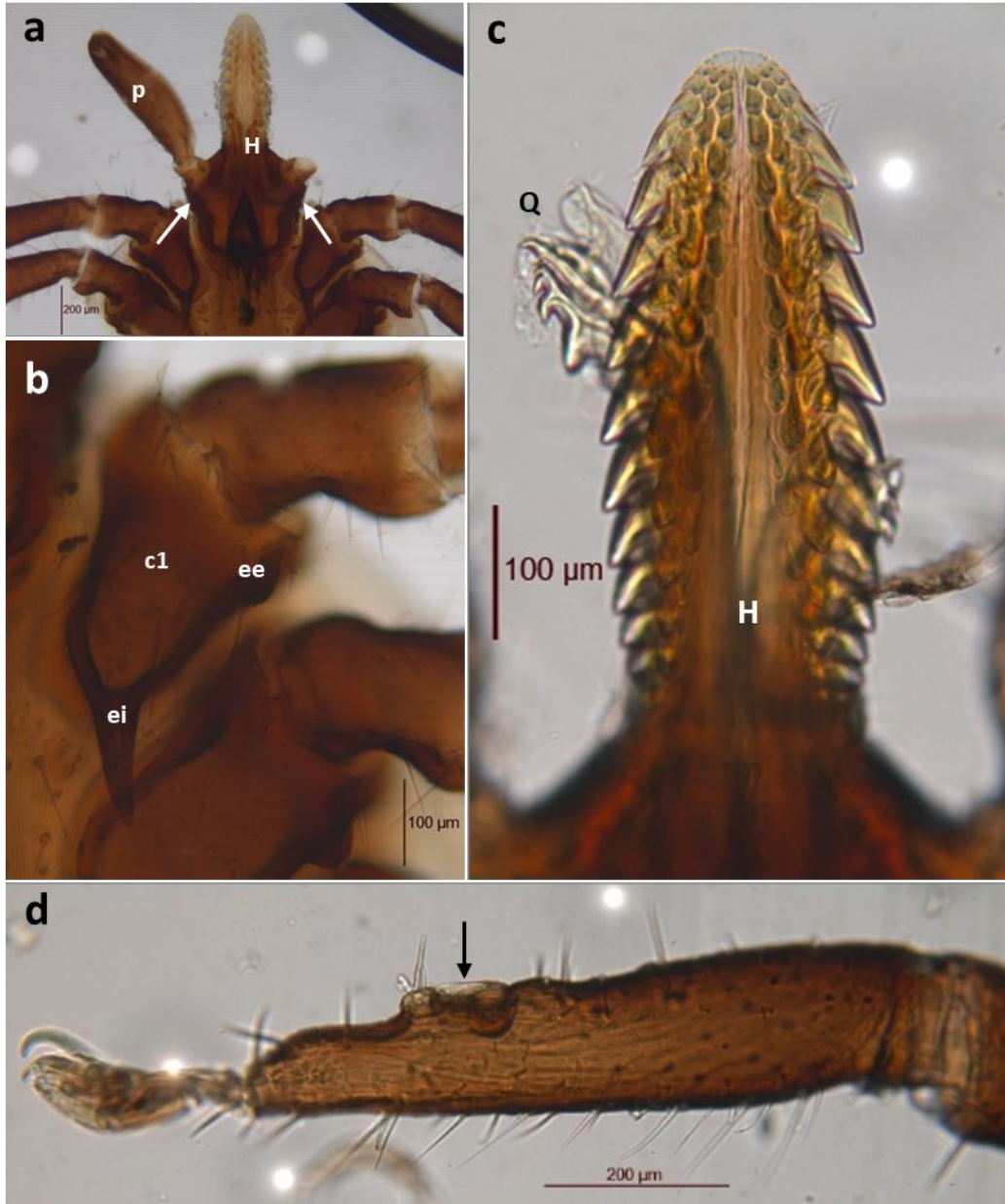


Figura 12: *Ixodes ricinus*, fêmea: **a)** face ventral com base do capítulo com aurículas vestigiais (setas), palpo (p) (esquerdo) com o 2º articulo ligeiramente maior que o 3º; hipostoma (H) afilado gradualmente com os dentes retroprojectados maiores em posição lateral; **b)** coxa I com um esporão interno (ei) aguçado sobrepondo-se à coxa II e esporão externo (ee) rombo e de pequena dimensão; **c)** hipostoma (H) alongado, com bordo apical arredondado, dentes laterais retroprojectados, de perfil pontiagudo; vista ventral de uma das quelíceras dorsais (Q); **d)** terminação do tarso do 1º par de patas, após o órgão de Haller.

4.2. Análise Molecular dos Ixodídeos

Do total de amostras (N=120), foram enviadas para sequenciação 14 amostras (A31, A32, A33, A34, A40, A43, A44, A45, A46, A47, A52, A53, A54 e M38), por apresentarem mais dúvidas na identificação morfológica. As sequências de qualidade razoável (tamanho e cromatograma adequados) (A33, A34, A47 e A52) foram comparadas com as da base de dados online do *GenBank* utilizando a ferramenta *Blastn*. Os resultados da pesquisa indicaram que a amostra A33 corresponde a *R. sanguineus* (linhagem temperada), a amostra A34 a *I. ventalloi* e as amostras A47 e A52 a *I. hexagonus* (Tabela 9).

Tabela 9: Correspondência das sequências analisadas às existentes no *GenBank*.

Código Lab	pb	Código acesso	Query Cover	E-value	Percent identity	Gene/Espécie	Ref.
A33	656	MF426019.1	96%	0	97.94%	gene COI <i>R. sanguineus</i>	(Coimbra-Dores et al., 2018)
A34	652	MN308058.1	89%	0	98.98%	gene COI <i>I. ventalloi</i>	(Boyer et al., 2019)
A47	649	MG432679.1	99%	0	99.53%	gene COX1 <i>I. hexagonus</i>	(Pistone et al., 2017)
A52	253	MG432679.1	85%	3,00E-99	97.71%	gene COX1 <i>I. hexagonus</i>	(Pistone et al., 2017)

4.3. Pesquisa de patógenos

Das 120 amostras utilizadas para a pesquisa de patógenos 91.7% apresentaram resultado positivo para pelo menos um dos *primers* utilizados (Figura 13). Apenas 10 amostras (8.3%) não apresentaram resultados positivos para nenhum dos *primers* utilizados. Essas amostras foram as seguintes: A2, A7b, A30, A45, A46 (Ilhas dos Açores) e M5, M13b, M54, M55, M57 (Ilha da Madeira). A distribuição geográfica dos microrganismos pesquisados está representada nas Figuras 14 e 15.

Na amplificação com o par de *primers* 18SbathF/18SbathR, que serviu para a pesquisa de protozoários pertencentes aos gêneros *Babesia* e *Theileria*, 37.5% das amostras tiveram uma amplificação positiva. A percentagem de fêmeas onde se detetou a presença destes protozoários foi de 35.4% e de machos foi 37.9%. Das 6 ninfas em estudo, observou-se a presença destes agentes em metade (50%). Amplificação com os *primers* PP18S_F/PP18S_R, que detetam *Babesia* e *Hepatozoon*, apresentou uma percentagem de amplificação de 9.3%. Estes agentes foram detetados numa igual percentagem de fêmeas e machos (10.3%) e não foram detetados em nenhuma das ninfas.

Os resultados com os *primers* gltACS409F/gltARp1258 mostraram que 85% das amostras continham bactérias pertencentes ao género *Rickettsia*. Este género de bactérias foi detetado em 83.5% das fêmeas e 89.7% dos machos, e apenas 1 ninfa não obteve amplificação positiva para este agente.

A amplificação com o par de *primers* Ehr-F/Ehr-R, que detetam organismos dos géneros *Anaplasma* e *Ehrlichia*, revelou uma percentagem de positivos de aproximadamente 77%. Em relação ao estado de desenvolvimento, a amplificação foi positiva em 73.1% das fêmeas e 86.2% dos machos. Todas as ninfas em estudo (N=6) apresentaram resultado positivo para estes organismos.

Os resultados dos *primers* 23SN1/23CN1 e 23SN2/5SCB apresentaram uma percentagem de amplificação de 13.4%. Estes *primers* foram utilizados para detetar organismos do grupo *Borrelia burgdorferi* sl. Este agente foi detetado em 16.7% das fêmeas e 10.3% dos machos, porém não foi detetado em nenhuma ninfa.

A amostra A1b não foi amplificada com os *primers* usados para a amplificação de *Anaplasma/Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sl e *Babesia/Hepatozoon* pois o DNA se esgotou em procedimentos anteriores. A amostra A9a não foi amplificada com os *primers* para *Babesia/Theileria* pelo mesmo motivo.

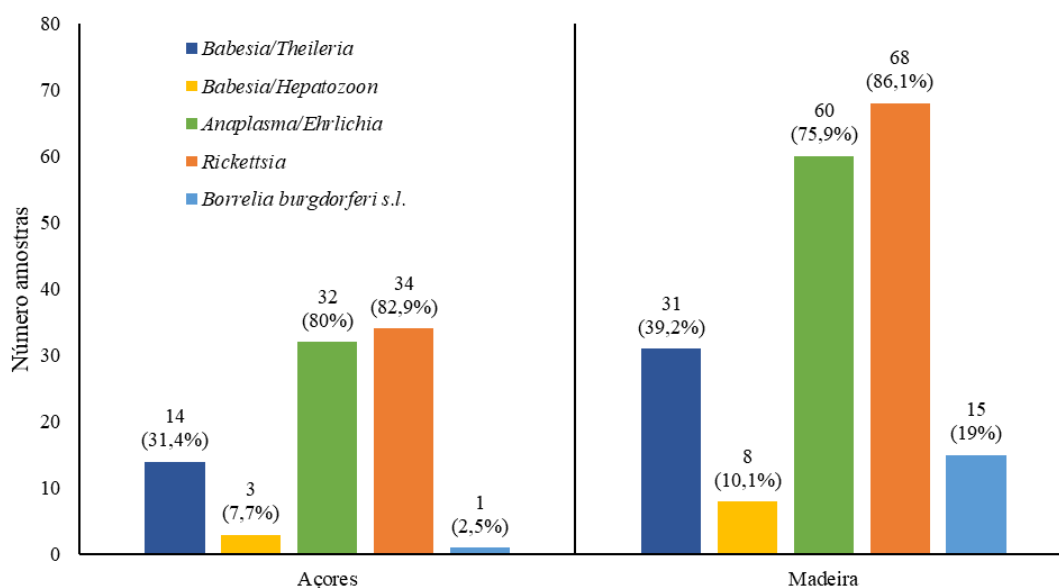


Figura 13: Prevalência dos agentes em estudo nos arquipélagos da Madeira (n=79) e Açores (n=41).

Foram realizados testes de Qui-quadrado para avaliar estatisticamente as diferenças na prevalência dos agentes pesquisados. Não se observou diferenças significativas na prevalência de agentes entre as carraças macho e fêmea. No entanto, as diferenças na prevalência de *Borrelia burgdorferi* s.l. (p -value=0.013) nos Açores e na Madeira demonstraram ser estatisticamente significativas, sendo esta mais prevalente na Madeira (Anexo 6).

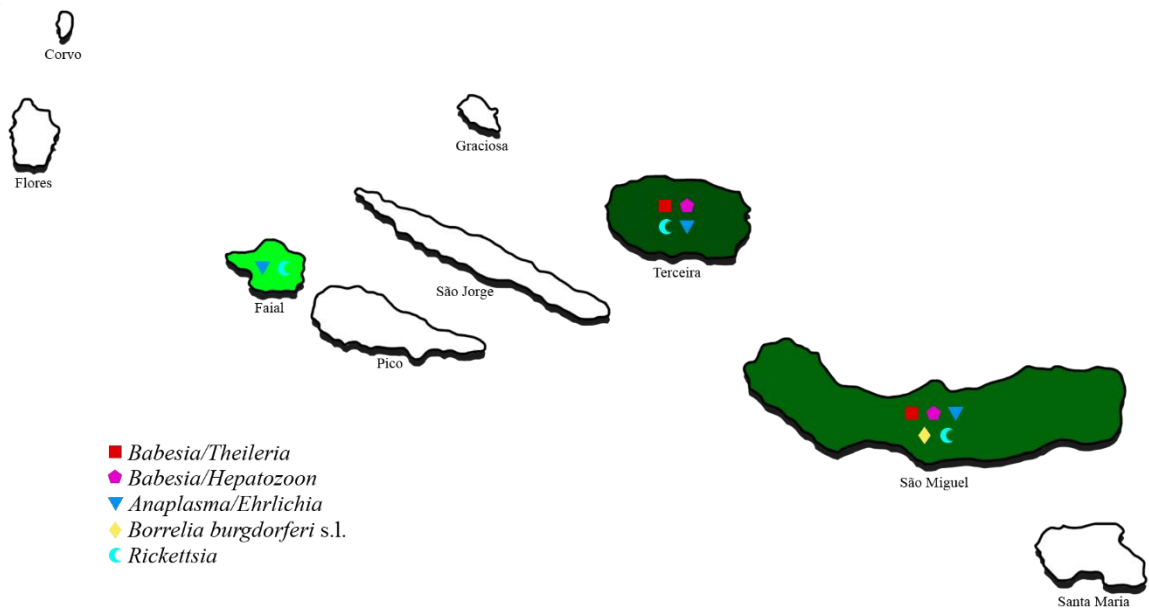


Figura 14: Distribuição geográfica dos agentes detetados nos ixodídeos colhidos no Arquipélago dos Açores

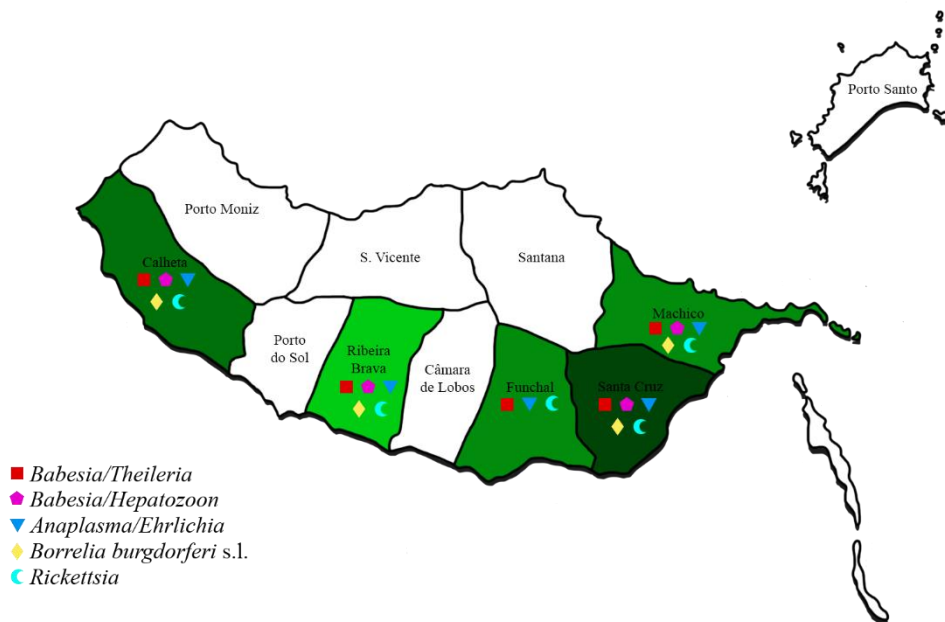


Figura 15: Distribuição geográfica dos agentes detetados nos ixodídeos colhidos no Arquipélago da Madeira.

Os resultados relativos à prevalência de cada um dos agentes em cada uma das espécies identificadas encontra-se nas Figuras 16 e 17. Nas seis ninfas de *I. hexagonus* em estudo, observou-se uma prevalência de 100% de organismos do género *Anaplasma/Ehrlichia*. Nas restantes espécies, *I. ricinus*, *I. ventalloi* e *R. sanguineus*, detetou-se uma maior prevalência de bactérias do género *Rickettsia* em relação aos outros agentes estudados, sendo *Anaplasma/Ehrlichia* os segundos agentes que mais se detetou.

Bactérias do género *Rickettsia* continuam a ser o agente mais prevalente se observarmos numa perspetiva do hospedeiro. Das carraças recolhidas de cães, detetou-se *Rickettsia* em 81%, e dos gatos detetou-se em 92%. Os resultados da prevalência dos outros agentes em estudo, relativamente a cada hospedeiro estão representados na Figura 18. Não se observou nenhuma diferença significativa na prevalência de cada agente nos hospedeiros em estudo (cão e gato) através do teste do Qui-quadrado (Anexo 7).

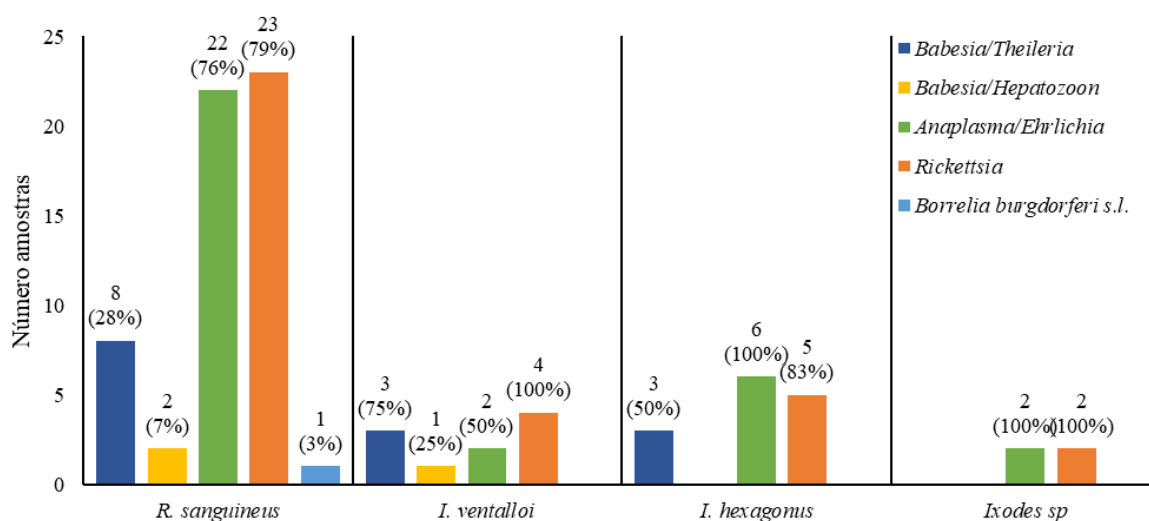


Figura 16: Prevalência de cada agente nas espécies de ixodídeos coletados nos Açores.

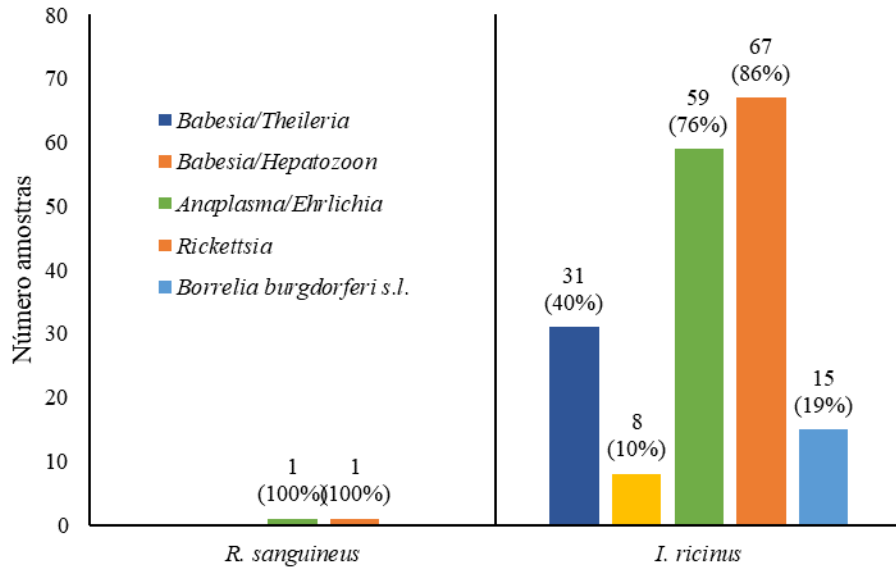


Figura 17: Prevalência de cada agente nas espécies de ixodídeos coletadas na Madeira.

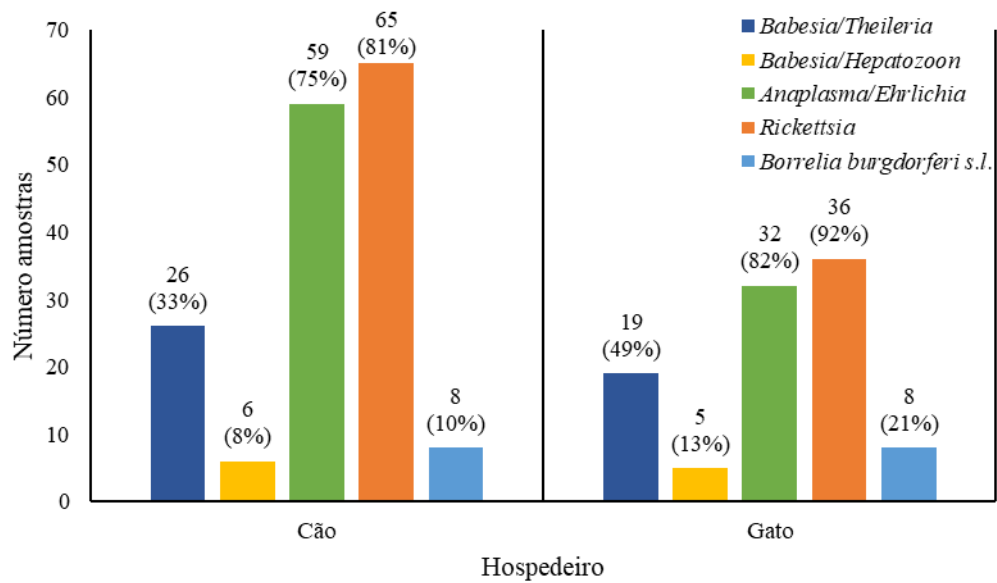


Figura 18: Prevalência de cada agente por hospedeiro.

Nas amostras em estudo foi detetada a presença de infeções simples e mistas (Tabela 10). A infeção detetada mais comum foi a co-infeção de bactérias *Rickettsia* e *Anaplasma/Ehrlichia* (33,3%), seguida da tripla infeção *Babesia/Theileria*, *Rickettsia* e *Anaplasma/Ehrlichia* (20,8%).

Foram detetadas infeções simples dos géneros *Rickettsia* (8 amostras), *Anaplasma/Ehrlichia* (6 amostras) e *Babesia/Theileria* (1 amostra). Em apenas 1 amostra se detetou todos os agentes em estudo (M2).

Tabela 10: Infeções simples e co-infeções e número de amostras onde foram detetadas.

Agentes	Nº amostras
Infeção simples	15
<i>Rickettsia</i>	8
<i>Anaplasma/Ehrlichia</i>	6
<i>Babesia/Theileria</i>	1
Co-infeção	95
<i>Rickettsia</i> + <i>Anaplasma/Ehrlichia</i>	40
<i>Babesia/Theileria</i> + <i>Rickettsia</i> + <i>Anaplasma/Ehrlichia</i>	25
<i>Rickettsia</i> + <i>Anaplasma/Ehrlichia</i> + <i>Bo. burgdorferi</i> s.l.	6
<i>Babesia/Theileria</i> + <i>Rickettsia</i>	5
<i>Babesia/Theileria</i> + <i>Rickettsia</i> + <i>Anaplasma/Ehrlichia</i> + <i>Bo. burgdorferi</i> s.l.	5
<i>Babesia/Theileria</i> + <i>Rickettsia</i> + <i>Anaplasma/Ehrlichia</i> + <i>Babesia/Hepatozoon</i>	5
<i>Rickettsia</i> + <i>Anaplasma/Ehrlichia</i> + <i>Babesia/Hepatozoon</i>	2
<i>Rickettsia</i> + <i>Bo. burgdorferi</i> s.l.	2
<i>Babesia/Theileria</i> + <i>Anaplasma/Ehrlichia</i> + <i>Babesia/Hepatozoon</i>	1
<i>Babesia/Theileria</i> + <i>Rickettsia</i> + <i>Anaplasma/Ehrlichia</i> + <i>Babesia/Hepatozoon</i> + <i>Bo. burgdorferi</i> s.l.	1
<i>Babesia/Theileria</i> + <i>Rickettsia</i> + <i>Bo. burgdorferi</i> s.l.	1
<i>Babesia/Theileria</i> + <i>Rickettsia</i> + <i>Babesia/Hepatozoon</i>	1
<i>Rickettsia</i> + <i>Anaplasma/Ehrlichia</i> + <i>Babesia/Hepatozoon</i> + <i>Bo. burgdorferi</i> s.l.	1

5. Discussão

Ixodes ventalloi foi, pela primeira vez, citada para o Arquipélago dos Açores neste trabalho, o que vem valorizar a biodiversidade insular, mas também, acrescentar um vetor que deve ser monitorizado relativamente a eventuais agentes com potencial zoonótico. Esta espécie faz parte da fauna ixodológica do sul da Europa (Espanha, França, Itália e Portugal) e do norte de África (Marrocos e Tunísia) (Estrada-Peña et al., 2017) tendo sido ainda referida a sua expansão geográfica (Alemanha e Reino Unido) (Petney et al., 1996; Jameson & Medlock, 2011). A introdução desta espécie na Ilha de São Miguel poderá ter ocorrido por aves migradoras ou mesmo por mamíferos domésticos transportados do continente europeu, onde esta ocorre, tendo encontrado condições bioclimáticas favoráveis à sua fixação.

Embora a sua eficácia na transmissão de agentes patogénicos ainda precise de ser esclarecida, *I. ventalloi* tem sido referida como potencial vetor de várias bactérias, nomeadamente, *A. phagocytophilum*, *Ri. helvetica*, *Ri. monacensis*, *Bartonella* sp., a protozoários do género *Theileria* e do vírus Eyach (Chastel et al., 1984; Santos-Silva et al., 2006; Otranto et al., 2014; Díaz-Sánchez et al., 2019; Santos & Santos-Silva, 2019). O presente estudo confirma a presença de agentes dos grupos *Babesia/Theileria*, *Rickettsia* e *Anaplasma/Ehrlichia* em *I. ventalloi*, e acrescenta protozoários do grupo *Babesia/Hepatozoon*, identificados pela primeira vez neste ixodídeo, desconhecendo-se a sua competência como vetor destes agentes. Contudo, a interpretação deste resultado deve estar sob reserva, dado que não foram molecularmente confirmadas estas espécies (*Babesia* e/ou *Hepatozoon*).

Outra das novidades faunísticas encontrada neste estudo, foi a identificação de *R. sanguineus* na Ilha do Faial. Já conhecida noutras ilhas deste arquipélago, a introdução desta espécie terá sido facilitada pela sua proximidade a outras ilhas, através da movimentação de humanos e animais, incluindo aves. Neste estudo, *R. sanguineus* foi também identificada nas ilhas de São Miguel e Terceira, corroborando estudos anteriores (Dias, 1992; Amaral, 2010). Apesar de não ser a mais prevalente, esta espécie apresentou uma diferença significativa nos hospedeiros estudados. *R. sanguineus* foi encontrada maioritariamente em cães (34,6%) quando comparados com os gatos (5,1%), resultado este que era esperado pois o hospedeiro preferencial destes ixodídeos é o cão (Almeida et al., 2017).

Rhipicephalus sanguineus s.l. é um grupo que ainda se encontra em estudo, existindo algumas controvérsias. Porém, atualmente, considera-se que este grupo se encontra dividido em duas linhagens, temperada e tropical. Neste trabalho, confirmamos molecularmente que os espécimes coletados nos Açores, fazem parte da linhagem temperada, apresentando uma predominância considerável (70.7%) neste arquipélago. A sequência analisada neste trabalho apresentou uma grande homologia a uma sequência de *R. sanguineus* pertencente à linhagem temperada identificada no continente (Coimbra-Dores et al., 2018). Isto sugere que a introdução

desta espécie nos Açores se deveu à movimentação de animais do continente Europeu, especialmente Portugal pois é de onde ocorrem a maioria das importações. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados previamente, que indicam que *R. sanguineus* de linhagem temperada, predomina em latitudes 30°N e 43°N, onde se inclui o Arquipélago dos Açores (36°N a 43°N) (Zemtsova et al., 2016).

No que diz respeito aos agentes detetados neste vetor, *Rickettsia* foi o mais prevalente (79%). Tal era esperado, visto que, *R. sanguineus* é o principal vetor de *Ri. conorii conorii* na bacia do mediterrâneo e tem também competência para transmitir *Ri. conorii israelensis* e *Ri. massiliae* (Levin et al., 2009). Neste trabalho também se identificou organismos dos grupos *Babesia/Theileria*, *Babesia/Hepatozoon* e *Anaplasma/Ehrlichia*, já se sabendo de trabalhos anteriores que podem ser transmitidos por *R. sanguineus* (Giannelli et al., 2013; Sainz et al., 2015; Solano-Gallego et al., 2016). As bactérias *Borrelia burgdorferi* s.l. apesar de terem sido detetadas em *R. sanguineus*, tanto neste trabalho como noutros, ainda não existe informação relativa à transmissão desta bactéria por este ixodídeo (Dantas-Torres & Otranto, 2015; Elhelw et al., 2021).

A identificação de *I. hexagonus* na Ilha de São Miguel está de acordo com o mencionado na literatura (Amaral, 2010; Dias, 1992). Esta espécie está associada a carnívoros, incluindo os domésticos, sendo, também, comum no ouriço cacheiro (*Eridinaceus europaeus*) e em raposas (*Vulpes vulpes*) (Estrada-Peña et al., 2017). Ocorre na maior parte dos países europeus, com os seus limites definidos pelas fronteiras do continente entre 31,3°N a 65,8°N e 9,3°E a 36,4°E e também a norte de África (Marrocos e Argélia) (Petney et al., 2012). A capacidade vetorial desta espécie é pouco conhecida. Neste trabalho identificou-se em *I. hexagonus* os grupos *Anaplasma/Ehrlichia*, *Rickettsia* e *Babesia/Theileria*. Outros autores também identificaram organismos destes grupos, como *Theileria annae*, *Ri. helvetica*, *A. phagocytophilum* (Estrada-Peña et al., 2017), porém não há confirmação experimental de que este ixodídeo seja um vetor competente para os mesmos. Apenas há confirmação de que *I. hexagonus* consegue transmitir algumas espécies do grupo *Bo. burgdorferi* s.l (Petney et al., 2012), no entanto, neste trabalho, não se detetou a presença deste agente nestas carraças.

Na ilha da Madeira *I. ricinus* mostra uma clara predominância (98.7%). A atividade desta espécie é favorecida por temperaturas entre 7°C e 24°C e humidade relativa de 45-100% (Schwarz et al., 2012), condições verificadas nesta ilha. Outros autores entre os quais Almeida (1997) já tinham mencionado a presença desta espécie na ilha da Madeira (Neumann, 1899; Schulze, 1939; Dias, 1953) referindo a sua distribuição por toda a ilha com exceção das zonas mais altas (acima 1000m), o que está de acordo com os resultados por nós obtidos dado que as nossas observações se situaram todas no litoral da ilha (menor altitude). Contudo, esta distribuição geográfica deve ser feita sob reserva pelo facto das nossas colheitas terem sido feitas só em clínicas veterinárias que se situam no litoral e em zonas urbanas ou periurbanas, desconhecendo-se a proveniência dos hospedeiros vertebrados.

Acresce ainda mencionar que esta espécie foi a mais prevalente neste estudo, tanto em cães (58%) como em gatos (79.5%), mostrando que está bem-adaptada a estes dois hospedeiros. Porém, o facto de também estar referenciada em aves e répteis, deve ser objeto de atenção das autoridades de Saúde Pública regionais porque são vetores de agentes também identificados neste trabalho, tais como, *Bo. burgdorferi* s.l., *A. phagocitophylum*, rickettsias que podem provocar a Febre escaro-nodular, e protozoários do género *Babesia* (Rizzoli et al., 2014).

Relativamente a *R. sanguineus* na Ilha da Madeira, apenas identificámos um espécime na localidade de Santa Cruz contudo, Almeida (1997) refere-a para a vertente sul da ponta oriental da ilha (Funchal e Machico) e também para a vertente norte da parte ocidental (Porto Moniz) sugerindo ter esta espécie, uma distribuição alargada por toda a ilha, no entanto, em nossa opinião e dado que o estudo não incluiu resultados estivais, o que influencia muito a sua distribuição, devemos acautelar esta generalização. No exemplar estudado detetou-se organismos pertencentes a *Rickettsia* e *Anaplasma/Ehrlichia*.

Embora, neste estudo, a diversidade de ixodídeos seja maior nas ilhas dos Açores (quatro espécies) do que na Ilha da Madeira (duas espécies), todos os agentes pesquisados ocorreram nas duas áreas geográficas. Os valores de prevalência dos diferentes agentes apresentaram um padrão idêntico nos dois arquipélagos, destacando-se os grupos *Anaplasma/Ehrlichia* e *Babesia/Theileria* com valores mais elevados relativamente aos outros agentes em estudo. No entanto, salienta-se uma prevalência de *Bo. burgdorferi* s.l. significativamente superior na Ilha da Madeira (19%) em relação aos Açores (2.5%). Isto está, possivelmente, associado ao facto de, *I. ricinus*, o principal vetor destes patógenos ser predominante nesta ilha.

Outras espécies de *Borrelia* como, *Bo. afzelii*, *Bo. valaisiana* e *Bo. burgdorferi* s.s já foram detetadas em carraças da Madeira (Matuschka et al., 1998; Nuncio et al., 2001). A taxa de infeção vetorial encontrada no nosso estudo (19%) é superior à referida por Lopes de Carvalho (2008) (2.7%) mas bastante inferior aos 31.2% referenciados por Nuncio et al. (2002). Deste nosso resultado não podemos tirar conclusões porque o esforço de colheita não é semelhante entre os diferentes trabalhos, mas, sabendo que nas últimas décadas, no continente Europeu, se tem registado um aumento da prevalência de *Bo. burgdorferi* s.l. associado a uma maior abundância do vetor *I. ricinus*, podemos estar perante um aumento considerável de transmissão destas espiroquetas (Schwarz et al., 2012).

Neste trabalho, mostramos, claramente, uma maior prevalência de co-infeções em detrimento das infeções simples. As co-infeções podem levar a uma co-transmissão de patógenos que poderá agravar a severidade da doença em humanos e restantes vertebrados, tornando mais difícil tanto o diagnóstico como a aplicação de tratamento (Moutailler et al., 2016). A presença de diferentes patógenos na mesma carraça mostra que estes se conseguem multiplicar, dentro do mesmo organismo, sem que um impeça completamente o desenvolvimento do outro. A associação observada mais frequentemente foi de organismos *Rickettsia* e *Anaplasma/Ehrlichia* (40/95)

enquanto, co-infecções de três ou mais patógenos apresentaram uma prevalência relativamente baixa. Isto poderá indicar que, apesar de possível, é mais difícil o estabelecimento de grande número de patógenos na microbiota de um único indivíduo. No entanto, como não foi realizada análise estatística de associação, não nos é possível perceber se ocorre alguma associação significativa entre os microrganismos estudados.

6. Conclusões

As carraças são vetores de diversos agentes patogénicos, muitos deles com capacidade de provocar graves problemas de saúde pública, sendo por isso de extrema importância saber que ixodídeos e patógenos associados circulam nestas áreas geográficas. Tendo por base os nossos resultados temos, como mais relevantes, as seguintes conclusões:

- a) Contribuição para um maior e mais atual conhecimento das espécies de carraças da família *Ixodidae* e patógenos associados que circulam em algumas ilhas do Arquipélago dos Açores e da Madeira.
- b) Referenciada, pela primeira vez *Ixodes ventalloi* para os Açores bem como evidências da possível presença de organismos do género *Hepatozoon* nesta espécie de ixodídeos que, também, ainda não tinha sido referido.
- c) *Rhipicephalus sanguineus* foi, também, referenciado pela primeira vez na ilha do Faial e ainda confirmada, molecularmente, que estas populações de carraças se incluem na linhagem temperada.
- d) Todos os agentes pesquisados ocorreram nas duas áreas geográficas em estudo, sem diferenças significativas entre os dois arquipélagos, exceto *Bo. burgdorferi* s.l. A prevalência destas bactérias revelou-se mais elevada na Ilha da Madeira, observando-se um aumento em relação a estudos anteriores. Podemos, assim, estar perante um aumento considerável na transmissão destes organismos nesta ilha, padrão semelhante ao que ocorre atualmente, no continente Europeu.

7. Perspetivas futuras

Para estudos futuros propõe-se um processo de amostragem sistematizado, com colheitas ao longo de uma sequência temporal definida, abrangendo todas as áreas geográficas dos arquipélagos. Isto será importante para garantir, não só um número de amostras representativo, como também uma cobertura dos territórios mais abrangente. Chamamos a atenção para a falta de estudos/informação sobre o Arquipélago da Madeira pois, sendo um território com um fluxo turístico importante e intenso, é fundamental saber-se que vetores e agentes circulam.

Sempre que se justifique, deve recorrer-se à análise molecular das carraças para dar robustez à identificação morfológica, é também crucial para esclarecer certas ambiguidades nas formas muito semelhantes.

Em relação aos agentes, será imprescindível a utilização de marcadores mais específicos que nos permitam identificar que espécies de patógenos estão presentes, pois dentro de cada grupo estudado, estão incluídos um vasto leque de organismos com patogenidades bastante distintas.

Tendo em conta que nos últimos anos se tem vindo a perceber que a microbiota das carraças pode influenciar a transmissão de patógenos, será relevante estudar as associações simbiotes/patógenos de forma a perceber o que leve ao desenvolvimento de uns em detrimento de outros.

Concluindo, é necessário continuar os estudos relativos à distribuição e dinâmica quer de ixodídeos quer de patógenos, abrangendo o maior número de zonas possível, de modo a permitir delimitar zonas de risco. Sendo também de extrema importância, programas de informação à população em geral sobre a desparasitação dos seus animais de companhia, mas também às autoridades de saúde (animal e humana) para eventuais surtos de doenças emergentes.

8. Referencias

- Akl, T., Bourgoïn, G., Souq, M.L., Appolinaire, J., Poirel, M.T., Gibert, P., Abi Rizk, G., Garel, M., Zenner, L., 2019. Detection of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* in the French Pyrenees and first identification of *Rickettsia monacensis* in France. *Parasite* 26, 20. <https://doi.org/10.1051/parasite/2019019>
- Almeida, V.C.T., 1995. Sobre as Áreas de Ocorrência das Espécies da Família *Ixodidae* conhecidas na Ilha da Madeira. *Veterinária Técnica* 36–40.
- Almeida, V.C.T., 1997. Ixodídeos da ilha da Madeira, contribuição ao seu estudo. Tese de doutoramento, Universidade de Évora.
- Almeida, C., Simões, R., Coimbra-Dores, M.J., Rosa, F., Dias, D., 2017. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus* s.l. from the western Iberian peninsula. *Med Vet Entomol* 31, 167–177. <https://doi.org/10.1111/mve.12222>
- Amaral, J., 2010. Lista dos Artrópodes (Arthropoda): Acari (Ixodida), in: Borges, P.A. v., Costa, A., Cunha, R., Gabriel, R., Gonçalves, V., Martins, A.F., Melo, I., Parente, M., Raposeiro, P., Rodrigues, P., Santos, R.S., Silva, L., Vieira, P., Vieira, V. (Eds.), *Listagem Dos Organismos Terrestres e Marinhos Dos Açores*. Príncipe Editora, Cascais, p. 202.
- Andersen, L.K., Davis, M.D.P., 2017. Climate change and the epidemiology of selected tick-borne and mosquito-borne diseases: update from the International Society of Dermatology Climate Change Task Force. *Int J Dermatol* 56, 252–259. <https://doi.org/10.1111/ijd.13438>
- Andersson, M.O., Marga, G., Banu, T., Dobler, G., Chitimia-Dobler, L., 2018. Tick-borne pathogens in tick species infesting humans in Sibiu County, central Romania. *Parasitol Res* 117, 1591–1597. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5848-0>
- Apanaskevich, D.A., Oliver, J.H., 2014. Life Cycles and Natural History of Ticks, in: Sonenshine, D.E., Roe, R.M. (Eds.), *Biology of Ticks*. Oxford University Press, New York, pp. 59–73.
- Arenas, E.E., Creus, B.F., Cueto, F.B., Porta, F.S., 1986. Climatic factors in resurgence of Mediterranean spotted-fever. *Lancet* 327, 1333. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(86\)91259-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(86)91259-6)
- Arsuaga, M., Gonzalez, L.M., Lobo, C.A., de La Calle, F., Bautista, J.M., Azcárate, I.G., Puente, S., Montero, E., 2016. First Report of *Babesia microti*-Caused Babesiosis in Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis* 16, 677–679. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1946>
- Bacellar, F., Regnery, R.L., Nuncio, M.S., Filipe, A.R., 1995. Genotypic evaluation of rickettsial isolates recovered from various species of ticks in Portugal. *Epidemiol Infect* 114, 169–178. <https://doi.org/10.1017/S095026880005202X>
- Bacellar, F., Beati, L., França, A., Poças, J., Regnery, R., Filipe, A., 1999. Israeli Spotted Fever *Rickettsia (Rickettsia conorii Complex)* Associated with Human Disease in Portugal. *Emerg Infect Dis* 5, 835–836. <https://doi.org/10.3201/eid0506.990620>
- Bacellar, F., Sousa, R., Santos, A., Santos-Silva, M., Parola, P., 2003. Boutonneuse fever in Portugal: 1995-2000. Data of a state laboratory. *Eur J Epidemiol* 18, 275–277. <https://doi.org/10.1023/A:1023391212354>
- Baneth, G., 2011. Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. *Vet Parasitol* 181, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.015>
- Baptista, C., Lopes, M.S., Tavares, A.C., Rojer, H., Kappmeyer, L., Mendonça, D., da Câmara Machado, A., 2013. Diagnosis of *Theileria equi* infections in horses in the Azores using cELISA and nested PCR. *Ticks Tick Borne Dis* 4, 242–245. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.11.008>

- Baptista, S., Quaresma, A., Aires, T., Kurtenbach, K., Santos-Reis, M., Nicholson, M., Collares-Pereira, M., 2004. Lyme borreliosis spirochetes in questing ticks from mainland Portugal. *Int J Med Microbiol* 293, 109–116. [https://doi.org/10.1016/S1433-1128\(04\)80016-0](https://doi.org/10.1016/S1433-1128(04)80016-0)
- Beerntsen, B.T., James, A.A., Christensen, B.M., 2000. Genetics of Mosquito Vector Competence. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 115–137. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.1.115-137.2000>
- Ben, I., Lozynskiy, I., 2019. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* and Coinfection with *Borrelia burgdorferi* and Tick-Borne Encephalitis Virus in Western Ukraine. *Vector Borne Zoonotic Dis* 19, 793–801. <https://doi.org/10.1089/vbz.2019.2450>
- Betancur, O.H., Betancourt, A.E., Giraldo, C.R., 2015. Importance of ticks in the transmission of zoonotic agents. *Rev MVZ Córdoba* 20, 5053–5067. <https://doi.org/10.21897/rmvz.19>
- Bonnet, S.I., Binetruy, F., Hernández-Jarguín, A.M., Duron, O., 2017. The tick microbiome: Why non-pathogenic microorganisms matter in tick biology and pathogen transmission. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 236. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00236>
- Boulanger, N., Boyer, P., Talagrand-Reboul, E., Hansmann, Y., 2019. Ticks and tick-borne diseases. *Med Mal Infect* 49, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.01.007>
- Bouzouraa, T., René-Martellet, M., Chêne, J., Attipa, C., Lebert, I., Chalvet-Monfray, K., Cadore, J.L., Halos, L., Chabanne, L., 2016. Clinical and laboratory features of canine *Anaplasma platys* infection in 32 naturally infected dogs in the Mediterranean basin. *Ticks Tick Borne Dis* 7, 1256–1264. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.07.004>
- Boyer, P.H., Almeras, L., Plantard, O., Grillon, A., Talagrand-Reboul, É., McCoy, K., Jaulhac, B., Boulanger, N., 2019. Identification of closely related *Ixodes* species by protein profiling with MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS ONE* 14, e0223735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223735>
- Cairo, V., Santos-Silva, M.M., Landerset Simões, A.J., Nuncio, M.S., 1997. *Ixodes* (Pholeoixodes) *canisuga* Johnston 1949 uma espécie nova para a ixodofauna em Portugal. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 82, 275–290.
- Cairo, V., 1999. General review of ticks species present in Portugal. *Parassitologia* 41, 11–15.
- Campbell-Lendrum, D., Manga, L., Bagayoko, M., Sommerfeld, J., 2015. Climate change and vector-borne diseases: What are the implications for public health research and policy? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370, 1–8. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0552>
- Cardoso, L., Tuna, J., Vieira, L., Yisaschar-Mekuzas, Y., Baneth, G., 2010. Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal. *Vet J* 183, 232–233. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.10.009>
- Chaisi, M.E., Baxter, J.R., Hove, P., Choopa, C.N., Oosthuizen, M.C., Brayton, K.A., Khumalo, Z.T.H., Mutshembele, A.M., Mtshali, M.S., Collins, N.E., 2017. Comparison of three nucleic acid-based tests for detecting *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* in cattle. *Onderstepoort J Vet Res* 84, a1262. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v84i1.1262>
- Chastel, C., Main, A.J., Couatarmanac'h, A., le Lay, G., Knudson, D.L., Quillien, M.C., Beaucournu, J.C., 1984. Isolation of Eyach virus (Reoviridae, Colorado tick fever group) from *Ixodes ricinus* and *I. ventraloi* ticks in France. *Arch Virol* 82, 167–171. <https://doi.org/10.1007/BF01311160>
- Coimbra-Dores, M.J., Maia-Silva, M., Marques, W., Oliveira, A.C., Rosa, F., Dias, D., 2018. Phylogenetic insights on Mediterranean and Afrotropical *Rhipicephalus* species (Acari: Ixodida) based on mitochondrial DNA. *Exp Appl Acarol* 75, 107–128. <https://doi.org/10.1007/s10493-018-0254-y>

- Dabaja, M.F., Tempesta, M., Bayan, A., Vesco, G., Greco, G., Torina, A., Blanda, V., la Russa, F., Scimeca, S., Lelli, R., Ezzedine, M., Mortada, H., Raoult, D., Fournier, P.E., Mortada, M., 2017. Diversity and distribution of ticks from domestic ruminants in Lebanon. *Vet Ital* 53, 147–155. <https://doi.org/10.12834/VetIt.1171.6503.2>
- Dantas-Torres, F., Latrofa, M.S., Annoscia, G., Giannelli, A., Parisi, A., Otranto, D., 2013. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. *Parasit Vectors* 6, 213. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-213>
- Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2015. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. *Vet Parasitol* 208, 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.014>
- de Carvalho, I.L., Milhano, N., Santos, A.S., Almeida, V., Barros, S.C., Sousa, R. de, Nuncio, M.S., 2008. Detection of *Borrelia lusitaniae*, *Rickettsia* sp. IRS3, *Rickettsia monacensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* collected in Madeira Island, Portugal. *Vector Borne Zoonotic Dis* 8, 575–579. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0245>
- de Sousa, R., Nóbrega, D., Bacellar, F., Torgal, J., 2003. Sobre a Realidade da Febre Escaro-Nodular em Portugal. *Acta Médica Portuguesa* 16, 429–436.
- de Sousa, R., Luz, T., Parreira, P., Santos-Silva, M., Bacellar, F., 2006. Boutonneuse fever and climate variability. *Ann N Y Acad Sci* 1078, 162–169. <https://doi.org/10.1196/annals.1374.029>
- de 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. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7, 444–447. <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0628>
- de Sousa, R., de Carvalho, I.L., Santos, A.S., Bernardes, C., Milhano, N., Jesus, J., Menezes, D., Nuncio, M.S., 2012. Role of the lizard *Teira dugesii* as a potential host for *Ixodes ricinus* tick-borne pathogens. *Appl Environ Microbiol* 78, 3767–3769. <https://doi.org/10.1128/AEM.07945-11>
- de Sousa, R., Pereira, B.I., Nazareth, C., Cabral, S., Ventura, C., Crespo, P., Marques, N., da Cunha, S., 2013. *Rickettsia slovaca* infection in humans, Portugal. *Emerg Infect Dis* 19, 1627–1629. <https://doi.org/10.3201/eid1910.130376>
- Dias, J.A.T., 1953. Subsídios para o estudo da ixodofauna da Ilha da Madeira. *Ann Inst Med Trop* 10, 271–280.
- Dias, J.A.T., 1992. Subsídios para o conhecimento da fauna ixodideológica dos Açores. *O médico veterinário* 7, 17–23.
- Dias, J.A.T., 1995. As carraças (Acarina-Ixodoidea) da Península Ibérica: algumas considerações sobre a sua biogeografia e relacionamento com ixodofauna afropaleártica e afrotropical. *Estudos, Ensaios e Documentos* 158, 1–163.
- Díaz-Sánchez, S., Hernández-Jarguín, A., Torina, A., García Fernández de Mera, I., Blanda, V., Caracappa, S., Gortazar, C., la Fuente, J., 2019. Characterization of the bacterial microbiota in wild-caught *Ixodes ventalloi*. *Ticks Tick Borne Dis* 10, 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.11.014>
- Dietrich, F., Schmidgen, T., Maggi, R.G., Richter, D., Matuschka, F.R., Vonthein, R., Breitschwerdt, E.B., Kempf, V.A.J., 2010. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Appl Environ Microbiol* 76, 1395–1398. <https://doi.org/10.1128/AEM.02788-09>
- Elhelw, R., Elhariri, M., Hamza, D., Abuowarda, M., Ismael, E., Farag, H., 2021. Evidence of the presence of *Borrelia burgdorferi* in dogs and associated ticks in Egypt. *BMC Veterinary Research* 17, 49. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02733-5>

- Eskezia, B.G., Desta, A.H., 2016. Review on the Impact of Ticks on Livestock Health and Productivity. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* 6, 1–7.
- Estrada-Peña, A., Venzal, J.M., 2007. Climate Niches of Tick Species in the Mediterranean Region: Modeling of Occurrence Data, Distributional Constraints, and Impact of Climate Change. *J Med Entomol* 44, 1130–1138. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2007\)44\[1130:CNOTSI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2007)44[1130:CNOTSI]2.0.CO;2)
- Estrada-Peña, A., Ortega, C., Sánchez, N., DeSimone, L., Sudre, B., Suk, J.E., Semenza, J.C., 2011. Correlation of *Borrelia burgdorferi* Sensu lato prevalence in questing *Ixodes ricinus* ticks with specific abiotic traits in the Western Palearctic. *Appl Environ Microbiol* 77, 3838–3845. <https://doi.org/10.1128/AEM.00067-11>
- Estrada-Peña, A., Palomar, A.M., Santibáñez, P., Sánchez, N., Habela, M.A., Portillo, A., Romero, L., Oteo, J.A., 2012. Crimean-congo hemorrhagic fever virus in ticks, Southwestern Europe, 2010. *Emerg Infect Dis* 18, 179–180. <https://doi.org/10.3201/eid1801.111040>
- Estrada-Peña, A., Nava, S., Petney, T., 2014. Description of all the stages of *Ixodes inopinatus* n. sp. (Acari: Ixodidae). *Ticks Tick Borne Dis* 5, 734–743. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.05.003>
- Estrada-Peña, A., la Fuente, J., 2014. The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. *Antiviral Res* 108, 104–128. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.05.016>
- Estrada-Peña, A., 2015. Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. *Rev Sci Tech* 34, 53–65. <https://doi.org/10.20506/rst.34.1.2345>
- Estrada-Peña, A., Mihalca, A.D., Petney, T.N., 2017. Ticks of Europe and North Africa: A guide to species identification, 1^a. ed. Springer International Publishing, Cham, Suíça.
- Filipe, A.R., Calisher, C.H., Lazuick, J., 1985. Antibodies to Congo-Crimean haemorrhagic fever, Dhori, Thogoto and Bhanja viruses in southern Portugal. *Acta Vir* 29, 324–328.
- Foley, E.H., Reeves, W.K., 2014. *Rickettsia massiliae* (Latreille) from the Azores. *J Agric Urban Entomol* 30, 25–27. <https://doi.org/10.3954/JAUE14-04.1>
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3, 294–299.
- García-Vozmediano, A., Tomassone, L., Fonville, M., Bertolotti, L., Heylen, D., Fabri, N.D., Medlock, J.M., Nijhof, A.M., Hansford, K.M., Sprong, H., Krawczyk, A.I., 2021. The Genetic Diversity of Rickettsiella Symbionts in *Ixodes ricinus* Throughout Europe. *Microb Ecol*. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01869-7>
- Gevorgyan, H., Grigoryan, G.G., Atoyán, H.A., Rukhkyan, M., Hakobyan, A., Zakaryan, H., Aghayan, S.A., 2019. Evidence of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Virus Occurrence in *Ixodidae* Ticks of Armenia. *J Arthropod Borne Dis* 13, 9–16.
- Giannelli, A., Ramos, R.A.N., di Paola, G., Mencke, N., Dantas-Torres, F., Baneth, G., Otranto, D., 2013. Transstadial transmission of *Hepatozoon canis* from larvae to nymphs of *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet Parasitol* 196, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.02.017>
- Gray, J.S., Dautel, H., Estrada-Peña, A., Kahl, O., Lindgren, E., 2009. Effects of Climate Change on Ticks and Tick-Borne Diseases in Europe. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2009/593232>
- Grešíková, M., Sekeyová, M., Stúpalová, S., Nečas, S., 1975. Sheep Milk-Borne Epidemic of Tick-Borne Encephalitis in Slovakia. *Intervirol* 5, 57–61. <https://doi.org/10.1159/000149880>

- Guiguen, C., Teixeira, A.M., Monnat, J.Y., 1989. *Xenopsylla gratioosa* (Siphonaptera, Pulicidae) y *Ornithodoros maritimus* (Acarina, Ixodoidea, Argasidae), ectoparásitos hematófagos de aves marinas, nuevos para Portugal. *Rev Ibér Parasitol* 49, 177–182.
- Heylen, D., de Coninck, E., Jansen, F., Madder, M., 2014. Differential diagnosis of three common *Ixodes* spp. ticks infesting songbirds of Western Europe: *Ixodes arboricola*, *I. frontalis* and *I. ricinus*. *Ticks Tick Borne Dis* 5, 693–700. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.05.006>
- Hoogstraal, H., 1979. The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa. *J Med Entomol* 15, 307–417. <https://doi.org/10.1093/jmedent/15.4.307>.
- Hornok, S., Sándor, A.D., Beck, R., Farkas, R., Beati, L., Kontschán, J., Takács, N., Földvári, G., Silaghi, C., Meyer-Kayser, E., Hodžić, A., Tomanović, S., Abdullah, S., Wall, R., Estrada-Peña, A., Duscher, G.G., Plantard, O., 2017. Contributions to the phylogeny of *Ixodes* (Phlebotominae) *canisuga*, *I. (Ph.) kaiseri*, *I. (Ph.) hexagonus* and a simple pictorial key for the identification of their females. *Parasit Vectors* 10, 545. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2424-x>
- Hornok, S., Meyer-Kayser, E., Kontschán, J., Takács, N., Plantard, O., Cullen, S., Gaughran, A., Szekeres, S., Majoros, G., Beck, R., Boldogh, S.A., Horváth, G., Kutasi, C., Sándor, A.D., 2021. Morphology of Phlebotominae species associated with carnivores in the western Palearctic: Pictorial key based on molecularly identified *Ixodes* (Ph.) *canisuga*, *I. (Ph.) hexagonus* and *I. (Ph.) kaiseri* males, nymphs and larvae. *Ticks Tick Borne Dis* 12, 101715. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101715>
- Hudopisk, N., Korva, M., Janet, E., Simetinger, M., Grgič-Vitek, M., Gubenšek, J., Natek, V., Kraigher, A., Strle, F., Avšič-Županc, T., 2013. Tick-borne encephalitis associated with consumption of raw goat milk, Slovenia, 2012. *Emerg Infect Dis* 19, 806–808. <https://doi.org/10.3201/eid1905.121442>
- Jaffer, O., Abdishakur, F., Hakimuddin, F., Riya, A., Wernery, U., Schuster, R.K., 2010. A comparative study of serological tests and PCR for the diagnosis of equine piroplasmiasis. *Parasitol Res* 106, 709–713. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1669-5>
- Jahfari, S., Hofhuis, A., Fonville, M., van der Giessen, J., van Pelt, W., Sprong, H., 2016. Molecular Detection of Tick-Borne Pathogens in Humans with Tick Bites and Erythema Migrans, in the Netherlands. *PLoS Negl Trop Dis* 10, e0005042. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005042>
- Jameson, L.J., Medlock, J.M., 2011. Tick Surveillance in Great Britain. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11, 403–412. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0079>
- Jongejan, F., Uilenberg, G., 2004. The global importance of ticks. *Parasitology* 129, S3–S14. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005967>
- Kunz, C., 1992. Tick-borne Encephalitis in Europe. *Acta Leiden* 60, 1–14.
- la Fuente, J. de, Antunes, S., Bonnet, S., Cabezas-Cruz, A., Domingos, A.G., Estrada-Peña, A., Johnson, N., Kocan, K.M., Mansfield, K.L., Nijhof, A.M., Papa, A., Rudenko, N., Villar, M., Alberdi, P., Torina, A., Ayllón, N., Vancova, M., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., Caracappa, S., Fooks, A.R., Gortazar, C., Rego, R.O.M., 2017. Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases. *Front in Cell Infect Microbiol* 7, 114. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00114>
- la Fuente, J., Estrada-Peña, A., Venzal, J.M., Kocan, K.M., Sonenshine, D.E., 2008. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front Biosci* 13, 6938–6946. <https://doi.org/10.2741/3200>
- Levin, M.L., Killmaster, L., Ereemeeva, M.E., Dasch, G.A., 2009. Effects of *Rickettsia conorii* infection on the survival of *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Clinical Microbiology Infection* 15, 277–278. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02234.x>

- Literak, I., Norte, A.C., Nuncio, M.S., de Carvalho, I.L., Ogrzewalska, M., Nováková, M., Martins, T.F., Sychra, O., Resendes, R., Rodrigues, P., 2015. Ticks on passerines from the Archipelago of the Azores as hosts of borreliae and rickettsiae. *Ticks Tick Borne Dis* 6, 607–610. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.05.003>
- Matuschka, F.-R., Klug, B., Schinkel, T.W., Spielman, A., Richter, D., 1998. Diversity of European Lyme Disease Spirochetes at the Southern Margin of Their Range. *Appl Environ Microbiol* 64, 1980–1982. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.5.1980-1982.1998>
- Moraes-Filho, J., Krawczak, F.S., Costa, F.B., Soares, J.F., Labruna, M.B., 2015. Comparative evaluation of the vector competence of four South American populations of the *Rhipicephalus sanguineus* group for the bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of canine monocytic ehrlichiosis. *PLoS ONE* 10, e0139386. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139386>
- Moutailler, S., Valiente Moro, C., Vaumourin, E., Michelet, L., Tran, F.H., Devillers, E., Cosson, J.F., Gasqui, P., Van, V.T., Mavingui, P., Voure'h, G., Vayssier-Taussat, M., 2016. Co-infection of Ticks: The Rule Rather Than the Exception. *PLoS Negl Trop Dis* 10, e0004539. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004539>
- Mowla, S.J., Drexler, N.A., Cherry, C.C., Annambholta, P.D., Kracalik, I.T., Basavaraju, S. v., 2021. Ehrlichiosis and Anaplasmosis among Transfusion and Transplant Recipients in the United States. *Emerg Infect Dis* 27, 2768–2775. <https://doi.org/10.3201/eid2711.211127>
- Nava, S., Guglielmone, A.A., Mangold, A.J., 2009. An overview of systematics and evolution of ticks. *Front Biosci* 14, 2857–2877. <https://doi.org/10.2741/3418>
- Negredo, A., de la Calle-Prieto, F., Palencia-Herrejón, E., Mora-Rillo, M., Astray-Mochales, J., Sánchez-Seco, M.P., Bermejo Lopez, E., Menárguez, J., Fernández-Cruz, A., Sánchez-Artola, B., Keough-Delgado, E., Ramírez de Arellano, E., Lasala, F., Milla, J., Fraile, J.L., Ordobás Gavín, M., Martínez de la Gándara, A., López Perez, L., Diaz-Diaz, D., López-García, M.A., Delgado-Jimenez, P., Martín-Quirós, A., Trigo, E., Figueira, J.C., Manzanares, J., Rodríguez-Baena, E., Garcia-Comas, L., Rodríguez-Fraga, O., García-Arenzana, N., Fernández-Díaz, M. v., Cornejo, V.M., Emmerich, P., Schmidt-Chanasit, J., Arribas, J.R., 2017. Autochthonous Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Spain. *New England Journal of Medicine* 377, 154–161. <https://doi.org/10.1056/nejmoal1615162>
- Neumann, G., 1899. Revision de la famille des Ixodidés. *Mémoires de la Société Zoologique de France* 12, 107–294.
- Nilsson, M.K., Lindquist, M.O., Pahlson, C., 1999. Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. *The Lancet* 354, 1169–1173. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)04093-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)04093-3)
- Norder, S.J., de Lima, R.F., de Nascimento, L., Lim, J.Y., Fernández-Palacios, J.M., Romeiras, M.M., Elias, R.B., Cabezas, F.J., Catarino, L., Ceríaco, L.M.P., Castilla-Beltrán, A., Gabriel, R., de Sequeira, M.M., Rijdsdijk, K.F., Nogueé, S., Kissling, W.D., van Loon, E.E., Hall, M., Matos, M., Borges, P.A.V., 2020. Global change in microcosms: Environmental and societal predictors of land cover change on the Atlantic Ocean Islands. *Anthropocene* 30, 100242. <https://doi.org/10.1016/j.ancene.2020.100242>
- Norte, A.C., de Carvalho, I.L., Ramos, J.A., Gonçalves, M., Gern, L., Nuncio, M.S., 2012. Diversity and seasonal patterns of ticks parasitizing wild birds in western Portugal. *Exp Appl Acarol* 58, 327–339. <https://doi.org/10.1007/s10493-012-9583-4>
- Norte, A.C., Ramos, J.A., Gern, L., Nuncio, M.S., de Carvalho, I.L., 2013. Birds as reservoirs for *Borrelia burgdorferi* s.l. in Western Europe: Circulation of *B.turdi* and other genospecies in bird-tick cycles in Portugal. *Environ Microbiol* 15, 386–397. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02834.x>

- Núncio, M., Péter, O., Alves, M., Bacellar, F., Filipe, A., 1993. Isolamento e caracterização de borrelíias de *Ixodes ricinus* L. em Portugal. *Rev Portug Doenças Infec* 16, 175–9.
- Núncio, M., Schouls, L., van de Pool, I., Almeida, V., 2001. Ecoepidemiology of *Borrelia* spp. in Madeira Island, Portugal, in: *Proceeding of the VIth International Potsdam Symposium on Tick-Borne Diseases*. Berlin.
- Núncio, M.S., Schouls, L.M., van de Pool, I., Almeida, V., Filipe, A.R., 2002. Ecoepidemiology of *Borrelia* spp. on Madeira Island, Portugal. *Int J Med Microbiol* 291, 212. [https://doi.org/10.1016/s1438-4221\(02\)80053-4](https://doi.org/10.1016/s1438-4221(02)80053-4)
- Ogden, N.H., Maarouf, A., Barker, I.K., Bigras-Poulin, M., Lindsay, L.R., Morshed, M.G., O’Callaghan, C.J., Ramay, F., Waltner-Toews, D., Charron, D.F., 2006. Climate change and the potential for range expansion of the Lyme disease vector *Ixodes scapularis* in Canada. *Int J Parasitol* 36, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.08.016>
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Giannelli, A., Latrofa, M.S., Cascio, A., Cazzin, S., Ravagnan, S., Montarsi, F., Zanzani, S.A., Manfredi, M.T., Capelli, G., 2014. Ticks infesting humans in Italy and associated pathogens. *Parasit Vectors* 7, 328. <https://doi.org/10.1186/2046-1682-4-13>
- Pacheco, I., Prado, E., Artigas-Jerónimo, S., Lima-Barbero, J.F., de la Fuente, G., Antunes, S., Couto, J., Domingos, A., Villar, M., de la Fuente, J., 2021. Comparative analysis of *Rhipicephalus* tick salivary gland and cement elementome. *Heliyon* 7, e06721. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06721>
- Pagès, N., Monteys, V.S., 2005. Differentiation of *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus* (Diptera: Ceratopogonidae) Based on Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit I. *J Med Entomol* 42, 1026–1034. <https://doi.org/10.1093/jmedent/42.6.1026>
- Petney, T.N., Beichel, E., Maiwald, M., Hassler, D., 1996. *Ixodes ventalloi*: a new tick record for Germany. *Appl Parasitol* 37, 96–98.
- Petney, T.N., Pfäffle, M.P., Skuballa, J.D., 2012. An annotated checklist of the ticks (Acari: Ixodida) of Germany. *Syst Appl Acarol* 17, 115–170. <https://doi.org/10.11158/saa.17.2.2>
- Pimentel, V., Afonso, R., Nunes, M., Vieira, M.L., Bravo-Barriga, D., Frontera, E., Martinez, M., Pereira, A., Maia, C., Paiva-Cardoso, M. das N., Freitas, F.B., Abecasis, A.B., Parreira, R., 2019. Geographic dispersal and genetic diversity of tick-borne phleboviruses (Phenuiviridae, Phlebovirus) as revealed by the analysis of L segment sequences. *Ticks Tick Borne Dis* 10, 942–948. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.05.001>
- Pistone, D., Pajoro, M., Novakova, E., Vicari, N., Gaiardelli, • Cesare, Viganò, R., Luzzago, C., Montagna, M., Lanfranchi, P., 2017. Ticks and bacterial tick-borne pathogens in Piemonte region, Northwest Italy. *Exp Appl Acarol* 73, 477–491. <https://doi.org/10.1007/s10493-017>
- Pollet, T., Sprong, H., Lejal, E., Krawczyk, A.I., Moutailler, S., Cosson, J.F., Vayssier-Taussat, M., Estrada-Peña, A., 2020. The scale affects our view on the identification and distribution of microbial communities in ticks. *Parasit Vectors* 13, 36. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3908-7>
- Raad, M., Azar, D., Perotti, M.A., 2020. First Report of the Ticks *Haemaphysalis punctata* Canestrini et Fanzago, 1878, *Haemaphysalis parva* (Neumann, 1897) and *Dermacentor marginatus* (Sulzer, 1776) (Acari, Amblyommidae) from Humans in Lebanon. *Acta Parasitol* 65, 541–545. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00160-7>
- Raoult, D., Dupont, H., Caraco, P., Brouqui, P., Drancourt, M., Charrel, C., 1992. Mediterranean Spotted-fever in Marseilles - Descriptive Epidemiology and the Influence of Climatic Factors. *Eur J Epidemiol* 8, 192–197. <https://doi.org/10.1007/BF00144799>
- Raoult, D., Fournier, P.-E., Abboud, P., Caron, F., 2002. First documented human *Rickettsia aeschlimannii* infection. *Emerg Infect Dis* 8, 748–749. <https://doi.org/10.3201/eid0807.010480>

- Regier, Y., Komma, K., Weigel, M., Kraiczky, P., Laisi, A., Pulliainen, A.T., Hain, T., Kempf, V.A.J., 2019. Combination of microbiome analysis and serodiagnostics to assess the risk of pathogen transmission by ticks to humans and animals in central Germany. *Parasit Vectors* 12, 11. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3240-7>
- Rijpkema, S.G.T., Molkenboer, M.J.C.H., Schouls, L.M., Jongejan, F., Schellekens, J.F.P., 1995. Simultaneous Detection and Genotyping of Three Genomic Groups of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in Dutch *Ixodes ricinus* Ticks by Characterization of the Amplified Intergenic Spacer Region between 5S and 23S rRNA Genes. *J Clin Microbiol* 33, 3091–3095. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.12.3091-3095.1995>
- Rizzoli, A., Silaghi, C., Obiegala, A., Rudolf, I., Hubálek, Z., Földvári, G., Plantard, O., Vayssier-Taussat, M., Bonnet, S., Špitalská, E., Kazimirová, M., 2014. *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: New hazards and relevance for public health. *Front Public Health* 2, 251. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00251>
- Rosa, F., Crespo, M.V., Esteves, L., Mendes, L., 2004. Distribuição de *Argas (Argas reflexus reflexus* (Fabricios, 1794) no Norte e Centro de Portugal. *Acta Parasitológica Portuguesa* 11, 33–35.
- Roux, V., Rydkina, E., Eremeeva, M., Raoult, D., 1997. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int J Syst Bacteriol* 47, 252–261. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-252>
- Roy-Dufresne, E., Logan, T., Simon, J.A., Chmura, G.L., Millien, V., 2013. Poleward expansion of the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*) under climate change: Implications for the spread of lyme disease. *PLoS ONE* 8, e80724. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080724>
- Rund, D., Neves, V., Quillfeldt, P., 2019. Molecular survey of *Hepatozoon* infection of *Teira dugesii* in the Azores. *Anim Biodivers Conserv* 42, 19–29. <https://doi.org/10.32800/ABC.2019.42.0019>
- Russell, J.C., Kueffer, C., 2019. Island Biodiversity in the Anthropocene. *Annu Rev Environ Resour* 44, 31–60. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-101718>
- Sainz, Á., Roura, X., Guadalupe, M., Estrada-Peña, A., Kohn, B., Harrus, S., Solano-Gallego, L., 2015. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasit Vectors* 8, 75. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0649-0>
- Santos, A.S., Santos-Silva, M.M., 2019. *Ixodes ventralloii* Gil Collado, 1936: A Vector Role to be Explored, in: S. Savic (Ed.), *Vectors and Vector-Borne Zoonotic Diseases*. IntechOpen, London. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81615>
- 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 Setúbal District, Mainland Portugal. *Emerg Infect Dis* 10, 1643–1648. <https://doi.org/10.3201/eid1009.040276>
- Santos, A.S., Santos-Silva, M.M., Sousa, R. de, Bacellar, F., Dumler, J.S., 2009. PCR-based survey of *Anaplasma phagocytophilum* in Portuguese ticks (Acari: Ixodidae). *Vector Borne Zoonotic Dis* 9, 33–40. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0051>
- Santos, A.S., de Bruin, A., Veloso, A.R., Marques, C., Pereira da Fonseca, I., de Sousa, R., Sprong, H., Santos-Silva, M.M., 2018. Detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Candidatus Neoehrlichia* sp., *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp. in questing ticks from a recreational park, Portugal. *Ticks Tick Borne Dis* 9, 1555–1564. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.07.010>
- Santos, A.S., Nunes, C., Amaro, F., Osório, H., Lopes de Carvalho, I., Zé-Zé, L., Santos-Silva, M., Alves, M.J., Nuncio, M.S., de Sousa, R., Velez, R., 2019. Doenças associadas a carraças, in: Nuncio, M.S., Alves, M.J. (Eds.), *Doenças Associadas a Artrópodes Vetores e Roedores*. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA, IP), Lisboa, pp. 89–162.

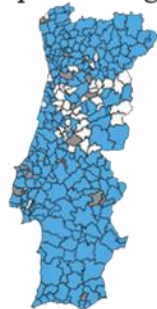
- Santos, A.S., de Sousa, R., Lopes de Carvalho, I., Osório, H., Alves, M.J., Nuncio, M.S., 2021. Ixodídeos, in: Centro de Estudos de Vetores e doenças Infeciosas Doutor Francisco Cambournac (Ed.), REVIVE 2020 - Culicídeos e Ixodídeos: Rede de Vigilância de Vetores. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA, IP), Lisboa, pp. 33–54.
- Santos-Silva, M.M., Formisinho, P., Melo, P., Santos, A.S., AR, F., 2001. Ixodídeos (Acari: Ixodidae) parasitas de aves em Portugal. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 96, 11–13.
- Santos-Silva, M.M., Sousa, R., Santos, A.S., Melo, P., Encarnação, V., Bacellar, F., 2006. Ticks parasitizing wild birds in Portugal: Detection of *Rickettsia aeschlimannii*, *R. helvetica* and *R. massiliae*. *Exp Appl Acarol* 39, 331–338. <https://doi.org/10.1007/s10493-006-9008-3>
- Schouls, L.M., van de Pol, I., Rijpkema, S.G.T., Schot, C.S., 1999. Detection and Identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato, and *Bartonella Species* in Dutch *Ixodes ricinus* Ticks. *J Clin Microbiol* 37, 2215–2222. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.7.2215-2222.1999>
- Schülze, P., 1939. Die Arthropodenfauna von Madeira nach den Ergebnissen der Reise von Prof. Dr. O. Lundblad, Juli-August, 1935. XV - Ixodoidea. *Arkiv für Zoologie* 31A, 1–3.
- Schwarz, A., Hönig, V., Vavruková, Z., Grubhoffer, L., Balczun, C., Albring, A., Schaub, G.A., 2012. Abundance of *Ixodes ricinus* and prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in the nature reserve Siebengebirge, Germany, in comparison to three former studies from 1978 onwards. *Parasit Vectors* 5, 268. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-268>
- Silva, M.M., Santos, A.S., Formisinho, P., Bacellar, F., 2006. Carraças Associadas a Patologias Infeciosas em Portugal. *Acta Médica Portuguesa* 19, 39–48.
- Silva-Pinto, A., Santos, M. de L., Sarmiento, A., 2014. Tick-borne lymphadenopathy, an emerging disease. *Ticks Tick Borne Dis* 5, 656–659. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.016>
- Simon, J.A., Marrotte, R.R., Desrosiers, N., Fiset, J., Gaitan, J., Gonzalez, A., Koffi, J.K., Lapointe, F.J., Leighton, P.A., Lindsay, L.R., Logan, T., Milord, F., Ogden, N.H., Rogic, A., Roy-Dufresne, E., Suter, D., Tessier, N., Millien, V., 2014. Climate change and habitat fragmentation drive the occurrence of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease, at the northeastern limit of its distribution. *Evol Appl* 7, 750–764. <https://doi.org/10.1111/eva.12165>
- Solano-Gallego, L., Sainz, Á., Roura, X., Estrada-Peña, A., Miró, G., 2016. A review of canine babesiosis: the European perspective. *Parasites & Vectors* 9, 336. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1596-0>
- Sonenshine, D.E., Roe, R.M., 2014. Overview: Ticks, People, and Animals, in: Sonenshine, D.E., Roe, R.M. (Eds.), *Biology of Ticks*. Oxford University Press, New York, pp. 3–16.
- Suppan, J., Engel, B., Marchetti-Deschmann, M., Nürnberger, S., 2018. Tick attachment cement – reviewing the mysteries of a biological skin plug system. *Biol Rev* 93, 1056–1076. <https://doi.org/10.1111/brv.12384>
- Tabar, M.D., Altet, L., Francino, O., Sánchez, A., Ferrer, L., Roura, X., 2008. Vector-borne infections in cats: Molecular study in Barcelona area (Spain). *Vet Parasitol* 151, 332–336. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.10.019>
- Vescio, M.F., Piras, M.A., Ciccozzi, M., Carai, A., Farchi, F., Maroli, M., Mura, M.S., Rezza, G., Study Group, M., 2008. Socio-demographic and Climatic Factors as Correlates of Mediterranean Spotted Fever (MSF) in Northern Sardinia. *Am J Trop Med Hyg* 78, 318–320.
- Vitale, G., Mansueto, S., Rolain, J.-M., Raoult, D., 2006. *Rickettsia massiliae* Human isolation. *Emerg Infect Dis* 12, 174–175. <https://doi.org/10.3201/eid1201.050850>

- Walker, J.B., Keirans, J.E., Horak, I.G., 2000. The Genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae): A guide to the Brown Ticks of the World. Cambridge University Press, Cambridge.
<https://doi.org/10.1017/CBO9780511661754>
- Wielinga, P.R., Fonville, M., Sprong, H., Gaasenbeek, C., Borgsteede, F., Giessen, J.W.B.V. der, 2009. Persistent detection of *Babesia* EU1 and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* in the Netherlands during a 5-year surveillance: 2003-2007. *Vector Borne Zoonotic Dis* 9, 119–121.
<https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0047>
- Zemtsova, G.E., Apanaskevich, D.A., Reeves, W.K., Hahn, M., Snellgrove, A., Levin, M.L., 2016. Phylogeography of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato and its relationships with climatic factors. *Exp App Acarol* 69, 191–203. <https://doi.org/10.1007/s10493-016-0035-4>

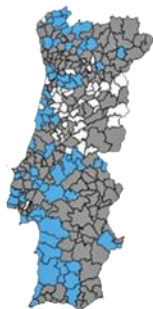
9. Anexos

Anexo 1: Distribuição dos ixodídeos mais relevantes em saúde pública, em Portugal continental. Dados baseados em colheitas realizadas entre 2011 e 2019. **Azul:** concelhos onde se identificou o ixodídeo; **cinzento:** concelhos amostrados, mas onde não se identificou o ixodídeo; **branco:** concelhos não amostrados. (Santos et al, 2021)

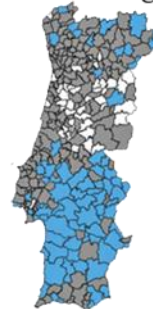
Rhipicephalus sanguineus



Ixodes ricinus



Hyalomma marginatum



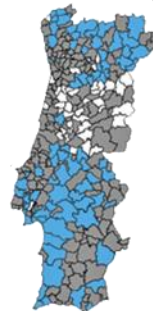
Hyalomma lusitanicum



Dermacentor reticulatus

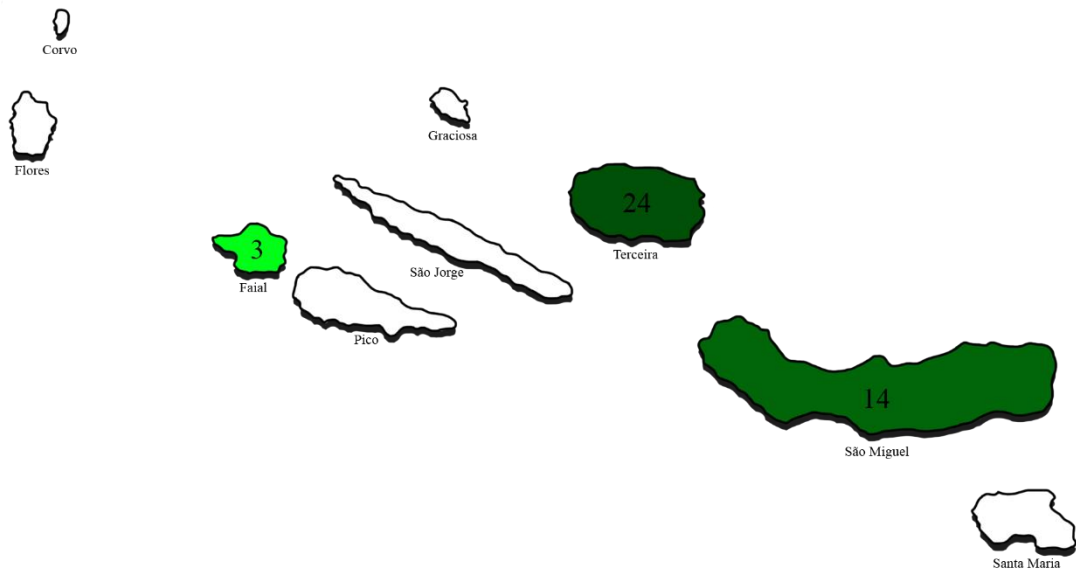


Dermacentor marginatus

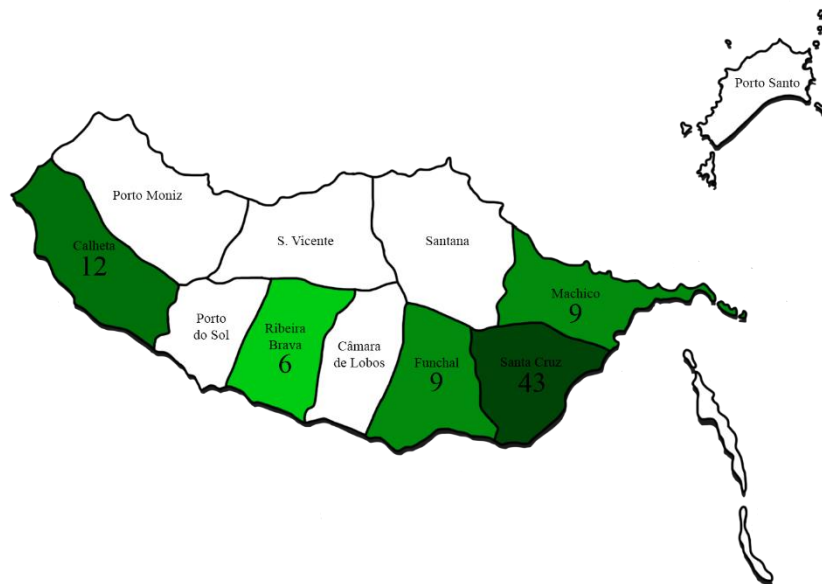


Anexo 2: Representação geográfica dos locais de amostragem e número de amostras coletadas em cada um. **A)** Arquipélago dos Açores; **B)** Arquipélago da Madeira.

A)



B)



Anexo 3: Glossário dos caracteres diagnosticantes para a identificação morfológica de ixodídeos.

Ânus: abertura exterior do intestino, localizada na parte posterior da face ventral.

Áreas cervicais ou depressões cervicais: são áreas no escudo dorsal por baixo e lateralmente ao cérvix (pescoço). Podem apresentar-se como áreas deprimidas, mais ou menos aparente.

Áreas porosas: São constituídas por aberturas de numerosos poros, envolvidas na proteção dos ovos. Localizam-se na face dorsal da base do capítulo das fêmeas de ixodídeos. Variam em forma, distância de separação entre elas e diâmetro.

Aurículas: estruturas pares localizadas ventralmente na base do capítulo. No género *Ixodes* são importantes estruturas de diagnóstico.

Base do capítulo (= Basis Capituli): é uma estrutura única na qual se fixam as peças bucais palpos, quelíceras e hipostoma. Em *Rhipicephalus* assume uma forma hexagonal, com um ângulo lateral bem evidente.

Basis Capituli: ver **Base do capítulo**.

Capítulo (=capitulum; = gnatosoma): os ixodídeos têm o corpo dividido em duas partes. A parte anterior, a mais pequena, é o capítulo, que consiste na base do capítulo e nas peças bucais. A parte posterior do corpo que contém os órgãos internos denomina-se opistossoma

Capitulum: ver **Capítulo**.

Cérvix (=pescoço): zona de inserção do capítulo ao escudo dorsal

Conscutum: ver **Escudo dorsal**.

Córnea: par de projeções formadas nas margens externas da face dorsal posterior da base do capítulo. Podem ser curtas ou longas.

Escápula: pontas anteriores do escudo dorsal que estão mais próximas da base do capítulo.

Escleritos: estruturas pares esclerotizadas localizadas interna e lateralmente abertura genital das fêmeas, de forma e dimensões variáveis. São importantes no diagnóstico de algumas espécies, em particular nas do género *Rhipicephalus*.

Escudos adanais: par de placas ventrais presentes nos machos de alguns géneros (ausentes em *Ixodes spp.*). Ocorrem na metade posterior, lateralmente ao ânus. Podem ser estreitas ou largas e apresentar formas diversas (quadrangulares, triangulares, trapezoidais, curvilíneas). Estrutura importante na identificação das espécies de *Rhipicephalus*.

Escudos adanais acessórios: par de placas ventrais presentes em machos de alguns géneros. Ocorrem lateralmente aos escudos adanais. No género *Rhipicephalus* podem ser pequenas (*R. bursa*) ou grandes (outras espécies).

Escudo dorsal: placa esclerotizada que cobre a maior parte da superfície dorsal nos machos (também denominada, *conscutum*) e a parte anterior nas larvas, ninfas e fêmeas (*scutum*).

Espaço interfestonal: espaço entre dois festões adjacentes.

Espiráculos: aberturas dos tubos respiratórios (traqueias) à superfície da carraça; nos espécimes da família Ixodidae têm uma forma de placas esclerotizadas mais ou menos largas, posteriores ao 4º par de patas; nos exemplares da Argasidae apresentam com menores dimensões, abrindo-se entre o 3º e o 4º par de patas. Estrutura importante na identificação das espécies de *Rhipicephalus*, apresentando uma forma geral de vírgula.

Esporões: projeções pontiagudas localizadas em quaisquer partes esclerotizadas da superfície do ixodídeo. Na coxa podem ser internos e externos. Os primeiros significam que se encontram mais próximos da linha média do corpo da carraça e os segundos, que se encontram mais perto da margem externa. A sua forma e dimensões poderão ser utilizadas como caracteres de diagnóstico (exemplo, género *Ixodes*).

Festões: são proeminências regulares localizadas na margem posterior nas fêmeas e nos machos, que podem desaparecer após uma refeição de sangue. Inexistentes em alguns géneros.

Hipostoma: estrutura central das peças bucais sob a forma de um tubo único que penetra a pele do hospedeiro, através do qual o sangue é sugado e a saliva excretada. A face ventral do hipostoma tem denticulos para permitir uma melhor fixação ao hospedeiro.

Gnatossoma: ver Capítulo

Opistossoma: denominação da parte posterior do corpo dos ixodídeos que contém os órgãos internos.

Órgão de Haller: órgão sensorial localizado numa depressão na parte terminal do tarso do 1º par de patas. Associado à busca de hospedeiro quando as carraças se encontram no meio ambiente.

Palpos: estruturas pares das peças bucais localizados dorsalmente no capítulo. São constituídos por quatro segmentos, denominados artículos. Frequentemente os artículos 2º e 3º são os que mais facilmente se observam. O 4º artículo, com funções sensoriais, encontra-se alojado numa depressão ao nível do 3º artículo.

Parma: denominação do festão central quando se encontra mais desenvolvido, separando-se dos festões envolventes por sulcos.

Pescoço: ver Cérvix

Pontuações: são depressões na superfície do escudo dorsal. Apresentam um padrão de distribuição, esparso a denso; e dimensões distintas, de pequenas, médias ou grandes.

Porro ou abertura genital: orifício externo do aparelho reprodutor em ambos os sexos, localizado ventralmente entre as coxas das patas. Estrutura importante na identificação das fêmeas espécies de *Rhipicephalus*.

Patas: em número de três nas larvas e em número de quatro nas ninfas e adultos (machos e fêmeas). Da frente para trás, denominam-se por 1º par, 2º par, 3º par e 4º par. São constituídas pela coxa, trocânter, fêmur tíbia, pré-tarso e tarso.

Quelíceras: par de estruturas que fazem parte das peças bucais localizadas no capítulo. Possuem dentes que cortam a pele do hospedeiro, de modo a que o hipostoma a penetre e o ixodídeo se fixe para proceder à refeição de sangue.

Scutum: ver Escudo dorsal.

Sulco anal: pequena depressão no tegumento que contorna o ânus, podendo estar ausente ou indistinto. No género *Ixodes* rodeia-o pela frente, nos restantes contorna-o pela parte posterior.

Sulcos cervicais: par de depressões que limitam internamente as áreas cervicais, em ambos os sexos.

Sulco lateral: depressão lateral no conscutum dos machos, que começa junto aos espiráculos e que se estende para a frente até junto dos olhos. Estes sulcos podem ser longos ou curtos, apresentar texturas ou pontuações no seu fundo.

Sulco posteromediano: localizado centralmente na parte posterior do conscutum dos machos. Podem estar presentes ou não; assumir diversas formas (alongado, oval, circular).

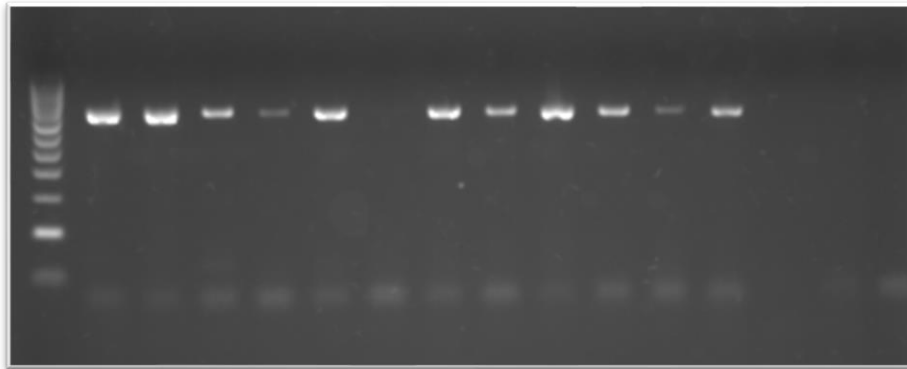
Sulco paramediano: par de sulcos laterais ao sulco posteromediano. Podem estar ou não presentes e assumir diversas formas (alongado, oval, circular ou em forma de vírgula).

Tarso (=tarsus): último segmento das patas, onde se encontra o órgão de Haller e se inserem as garras.

Tarsus: ver Tarso.

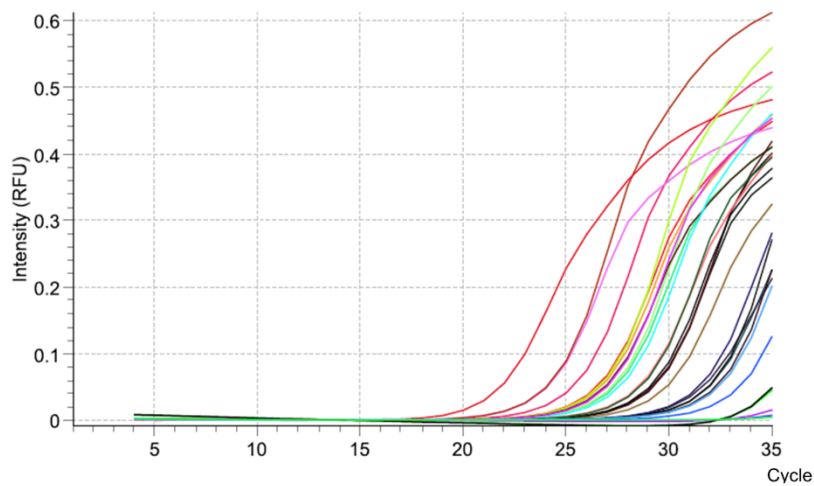
Tegumento: é a parte externa da parede do corpo. Nos ixodídeos as áreas moles do tegumento são estriadas, enquanto nos argasídeos são mamilonadas ou com pequenos discos.

Anexo 4: Eletroforese em gel de agarose (2%) de produtos de PCR (~700 pb) executado para o marcador COI.

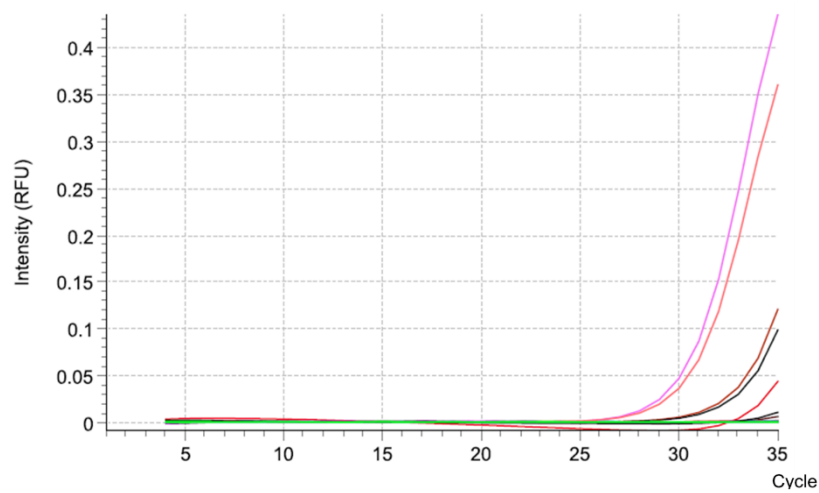


Anexo 5: Algumas curvas de amplificação de qPCR para os grupos de agentes pesquisados.

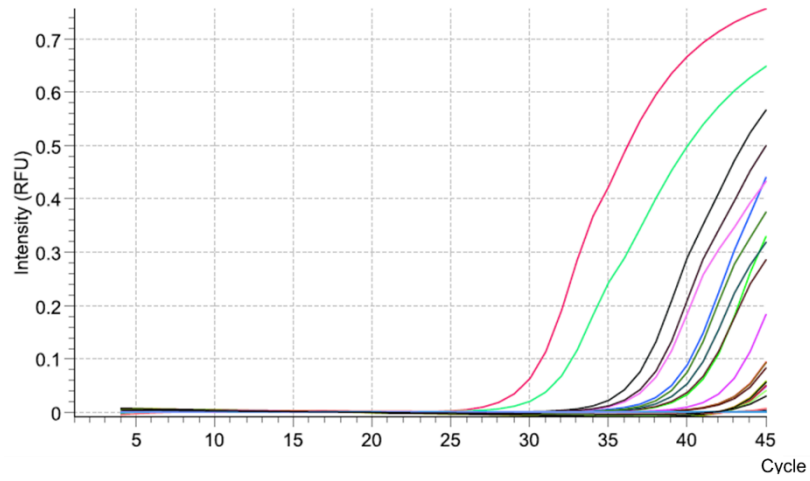
Anaplasma/Ehrlichia



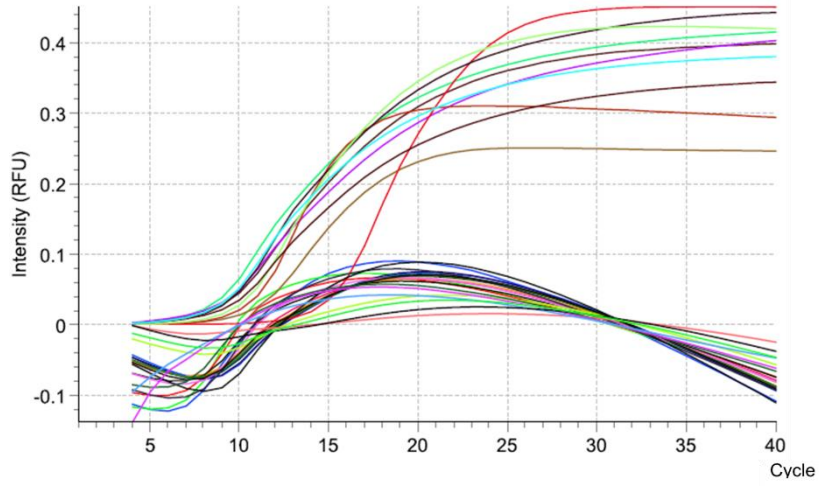
Babesia/Hepatozoon



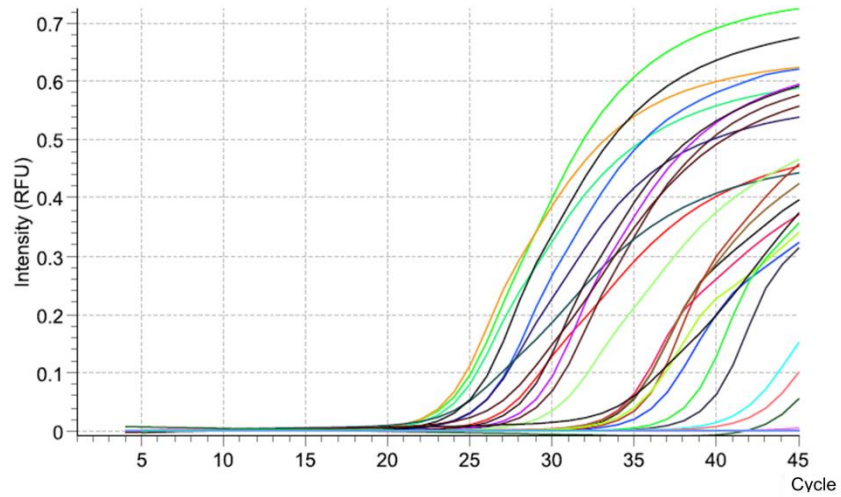
Babesia/Theileria



Borrelia burgdorferi s.l.



Rickettsia



Anexo 6: Resultados dos testes de Qui-quadrado para avaliar diferenças na prevalência de cada agente entre os arquipélagos.

Babesia/Theileria
Teste qui-quadrado

	Valor	df	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Qui-quadrado de Pearson	,299 ^a	1	,585		
Correção de continuidade ^b	,121	1	,728		
Razão de verossimilhança	,301	1	,583		
Teste Exato de Fisher				,692	,366
N de Casos Válidos	120				

a. 0 células (0,0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 15,38.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Borrelia burgdorferi s.l.
Teste qui-quadrado

	Valor	df	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Qui-quadrado de Pearson	6,203 ^a	1	,013		
Correção de continuidade ^b	4,867	1	,027		
Razão de verossimilhança	7,808	1	,005		
Teste Exato de Fisher				,011	,009
N de Casos Válidos	119				

a. 0 células (0,0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 5,38.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Rickettsia
Teste qui-quadrado

	Valor	df	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Qui-quadrado de Pearson	,210 ^a	1	,647		
Correção de continuidade ^b	,036	1	,850		
Razão de verossimilhança	,207	1	,650		
Teste Exato de Fisher				,788	,418
N de Casos Válidos	120				

a. 0 células (0,0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 6,15.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Anaplasma/Ehrlichia
Teste qui-quadrado

	Valor	df	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Qui-quadrado de Pearson	,248 ^a	1	,618		
Correção de continuidade ^b	,071	1	,790		
Razão de verossimilhança	,252	1	,616		
Teste Exato de Fisher				,817	,400
N de Casos Válidos	119				

a. 0 células (0,0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 9,08.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Babesia/Hepatozoon
Teste qui-quadrado

	Valor	df	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Qui-quadrado de Pearson	,183 ^a	1	,669		
Correção de continuidade ^b	,008	1	,927		
Razão de verossimilhança	,189	1	,664		
Teste Exato de Fisher				1,000	,477
N de Casos Válidos	118				

a. 1 células (25,0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 3,64.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Anexo 7: Resultados dos testes de Qui-quadrado para avaliar diferenças na prevalência de cada agente entre os hospedeiros estudados (cão e gato).

Babesia/Theileria
Teste qui-quadrado

	Valor	df	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Qui-quadrado de Pearson	2,933 ^a	1	,087		
Correção de continuidade ^b	2,283	1	,131		
Razão de verossimilhança	2,897	1	,089		
Teste Exato de Fisher				,108	,066
N de Casos Válidos	119				

a. 0 células (0,0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 14,75.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Borrelia burgdorferi s.l.
Teste qui-quadrado

	Valor	df	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Qui-quadrado de Pearson	2,403 ^a	1	,121		
Correção de continuidade ^b	1,599	1	,206		
Razão de verossimilhança	2,284	1	,131		
Teste Exato de Fisher				,154	,105
N de Casos Válidos	118				

a. 0 células (0,0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 5,29.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Rickettsia
Teste qui-quadrado

	Valor	df	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Qui-quadrado de Pearson	2,497 ^a	1	,114		
Correção de continuidade ^b	1,710	1	,191		
Razão de verossimilhança	2,758	1	,097		
Teste Exato de Fisher				,172	,092
N de Casos Válidos	119				

a. 0 células (0,0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 5,90.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Anaplasma/Ehrlichia
Teste qui-quadrado

	Valor	df	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Qui-quadrado de Pearson	,803 ^a	1	,370		
Correção de continuidade ^b	,440	1	,507		
Razão de verossimilhança	,828	1	,363		
Teste Exato de Fisher				,486	,257
N de Casos Válidos	118				

a. 0 células (0,0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 8,92.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Babesia/Hepatozoon
Teste qui-quadrado

	Valor	df	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Qui-quadrado de Pearson	,803 ^a	1	,370		
Correção de continuidade ^b	,314	1	,575		
Razão de verossimilhança	,769	1	,380		
Teste Exato de Fisher				,503	,281
N de Casos Válidos	117				

a. 1 células (25,0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 3,67.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2