



**UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA**  
**Faculdade de Medicina Veterinária**

**DETECÇÃO DE *BABESIA* SPP. E DE OUTROS HEMOPARASITAS EM CÃES, POR  
TÉCNICAS MORFOLÓGICAS, SEROLÓGICAS E MOLECULARES, NO DISTRITO DE  
LISBOA, PORTUGAL**

**ANA PATRÍCIA DA SILVA CAEIROS**

**CONSTITUIÇÃO DO JÚRI**

Doutor Luís Madeira de Carvalho  
Doutora Isabel Maria Soares Pereira da  
Fonseca de Sampaio

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte  
Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

**ORIENTADOR**

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da  
Fonseca de Sampaio

**CO-ORIENTADOR**

Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

2012  
LISBOA

---





**UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA**  
**Faculdade de Medicina Veterinária**

**DETECÇÃO DE *BABESIA* SPP. E DE OUTROS HEMOPARASITAS EM CÃES, POR  
TÉCNICAS MORFOLÓGICAS, SEROLÓGICAS E MOLECULARES, NO DISTRITO  
DE LISBOA, PORTUGAL**

**ANA PATRÍCIA DA SILVA CAEIROS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**CONSTITUIÇÃO DO JÚRI**

Doutor Luís Madeira de Carvalho  
Doutora Isabel Maria Soares Pereira da  
Fonseca de Sampaio  
Doutora Ana Isabel Simões Pereira  
Duarte  
Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

**ORIENTADOR**

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da  
Fonseca de Sampaio

**CO-ORIENTADOR**

Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

2012  
LISBOA

---

*À minha avó Augusta*



## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Doutora Isabel Pereira da Fonseca, pelos conhecimentos e ensinamentos, pela força e simpatia e pelo incentivo e orientação imprescindíveis à realização desta dissertação de mestrado.

Ao meu co-orientador, Dr. Gonçalo Vicente, pelos ensinamentos, paciência e acompanhamento. Por ensinar-me a crescer profissionalmente e pessoalmente. Nunca irei esquecer o meu primeiro dia de internamento. Ali, mostrou ser um mentor e companheiro incansável e admirável, características, essas, que se mantiveram constantes ao longo do estágio.

Ao Professor Doutor Abel Oliva, pela pronta aceitação e orientação, indispensáveis à execução desta dissertação de mestrado.

À Professora Doutora Ana Duarte, pela ajuda fundamental, pela paciência e simpatia e pela rápida disponibilidade com que colaborou neste projecto.

À Joana Campos, por ter sido insubstituível. Sem ti, este trabalho não teria sido possível.

À Dr<sup>a</sup>. Patrícia Cabral, por acolher-me tão prontamente e de braços abertos, pela amizade, ensinamentos e dedicação. À Carolina e à Ana, por fazerem-me sentir em casa e pela sempre boa disposição.

À Dr<sup>a</sup>. Lídia Gomes, pelos ensinamentos, ajuda e conversas da hora de almoço. À Cátia, pela simpatia que parece nunca esgotar.

Ao Dr. Telmo Nunes, pela disponibilidade e pela ajuda no tratamento dos dados.

À bibliotecária Dr<sup>a</sup>. Elisa Luz, sempre pronta em procurar mais um artigo.

Aos meus pais, porque sem eles, eu não era a pessoa que sou hoje. Pelo amor, pelo carinho, pelo respeito, pelos ensinamentos, pelo entendimento, pelo apoio, pelas conversas, pelos conselhos, pelo exemplo que são. Por tudo.

À minha avó Maria, por embalar-me o sono desde pequenina, e pela simplicidade que me ensina todos os dias. Ao meu avô Belmiro, por todo o amor. À minha avó Augusta, pela

pessoa que é. Para mim, és O exemplo de força e união, e a minha vida não faz sentido sem a tua presença, porque a família, a família é feita de muito mais do que só o sangue.

Ao meu irmão, por tudo o que significa para mim, pelo amparo ao longo da vida, pela paciência, por todos os risos, por todo o amor, e por ser um exemplo de excelência a seguir. Ao João Tiago, o irmão que eu tenho o prazer de ter encontrado pelos caminhos da vida, por toda a cumplicidade, por ser único e um amigo sem igual e por tudo o que já ultrapassámos juntos.

Aos amigos, que sinto a serem de sempre, e com quem sou exactamente quem devo ser. Ao João Martins, pelo entendimento num só olhar e por uma amizade incondicional e intemporal. À Ana Paula e à Marta Faria, porque a nossa compreensão e união ultrapassam tudo e todos. À Joana Nabais, Sara Nabais, Tiago Gonçalves, Joana Pita, Fabiana Couto, Sílvia Cruz e Juliana Carreira, pelos anos de faculdade, que, em conjunto, vivemos de forma inesquecível, e pela amizade, carinho, apoio, cumplicidade e companheirismo que ainda hoje nos caracterizam. Ao João, por ser a amizade mais distante em quilómetros, mas ainda assim, por ser a pessoa que é.

A todos.

*E naquele tempo vivido e perdido no tempo, aprendemos. Aprendemos, que no seu devido tempo, tudo é perfeito.*

## RESUMO

### DETECÇÃO DE *BABESIA* SPP. E DE OUTROS HEMOPARASITAS EM CÃES, POR TÉCNICAS MORFOLÓGICAS, SEROLÓGICAS E MOLECULARES, NO DISTRITO DE LISBOA, PORTUGAL

As doenças caninas transmitidas por vectores (DCTV), pela sua enorme proliferação, são um problema de importância crescente no mundo nos últimos anos. A babesiose canina é uma das doenças com consequências clínicas mais graves, pelo que tem uma relevância acrescida nas diversas áreas geográficas por onde está distribuída. A informação sobre a babesiose em Portugal é escassa, em particular as espécies de *Babesia* causadoras de doença, assim como a prevalência molecular destes parasitas. A detecção de outros hemoparasitas que causam as DCTV é também importante, pois é comum a ocorrência de co-infecções, já que alguns desses agentes são transmitidos pelo mesmo vector, ou por diferentes vectores infectados com um único agente.

Este trabalho foi elaborado com o intuito de detectar em duas populações caninas, cães residentes em canis e cães que se apresentaram à consulta num hospital veterinário, diferentes hemoparasitas, em particular *Babesia canis*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Rickettsia conorii*, através de esfregaços sanguíneos, imunofluorescência indirecta (IFI), PCR quantitativa em tempo real (qPCR) e PCR convencional (cPCR) das amostras positivas a qPCR. A pesquisa por esfregaço sanguíneo revelou uma prevalência de 0% para *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp.. Contudo, foi possível detectar a presença de *Hepatozoon* spp. em 2 cães (prevalência de 2,5%), morfologicamente semelhante a *Hepatozoon canis*. Relativamente à detecção por IFI, as seroprevalências para *B. canis/B. vogeli/B. rossi*, *E. canis*, *A. phagocytophilum* e *R. conorii* foram 17,5%, 4,8%, 18,7% e 55%, respectivamente. A técnica de qPCR permitiu a detecção de *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp. e *Rickettsia* spp., com prevalências de 42,5%, 20% e 0%, respectivamente. Por fim, a técnica de cPCR foi realizada apenas para as amostras positivas a *Babesia* spp., de modo a identificar as espécies de *Babesia* que, em Lisboa, infectam o cão. Porém, foram apenas obtidas bandas positivas para 8,8% dessas amostras que, por sequenciação, revelaram ser a espécie *Hepatozoon canis*. Uma dessas amostras sequenciadas pertencia a um dos animais que tinha sido positivo a *Hepatozoon* spp. por esfregaço sanguíneo, pelo que se submeteu também a amostra do outro animal positivo a *Hepatozoon* spp. por esfregaço sanguíneo ao método de cPCR, seguido de sequenciação. A análise BLAST dessa sequência revelou igualmente a presença de *H. canis*.

Palavras-chave: Cães, DCTV, *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., esfregaços sanguíneos, IFI, qPCR, cPCR.



## ABSTRACT

### DETECTION OF *BABESIA* SPP. AND OTHER HEMOPARASITES IN DOGS, USING MORPHOLOGICAL, SEROLOGICAL AND MOLECULAR TECHNIQUES, IN THE DISTRICT OF LISBON, PORTUGAL

In recent years canine vector-borne diseases (CVBD) are an issue of growing importance due to its enormous proliferation in the world. Canine babesiosis is a CVBD with severe clinical consequences, and as so, it is more relevant in the various geographic areas in which it is distributed. Information on babesiosis in Portugal is scarce, especially the *Babesia* species causing disease, as well as the molecular prevalence of these parasites. Detection of other hemoparasites causing CVBD is also important, since it is common the occurrences of co-infections as some of these pathogens are transmitted by the same vector, or by different vectors infected with a single agent.

This work aimed to detect various hemoparasites, particularly *Babesia canis*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia conorii* via blood smears, indirect fluorescent antibody test (IFAT), quantitative real-time PCR (qPCR) and conventional PCR (cPCR) of the positive samples to qPCR, in two dog populations: dogs living in kennels and dogs who were presented to a consultation in a veterinary hospital. Research by blood smear revealed a prevalence of 0% for *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. However, it was possible to detect *Hepatozoon* spp. morphologically similar to *Hepatozoon canis* in 2 dogs (prevalence of 2,5%). Regarding IFAT, *B. canis*/*B. vogeli*/*B. rossi*, *E. canis*, *A. phagocytophilum* and *R. conorii* seroprevalences were 17,5%, 4,8%, 18,7% and 55%, respectively. qPCR allowed the detection of *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp. and *Rickettsia* spp., with prevalences of 42,5%, 20% and 0%, respectively. Finally, cPCR was performed merely for positive samples to *Babesia* spp. in order to identify which *Babesia* species infect dogs in Lisbon. However, positive bands were only obtained for 8,8% of those samples and by sequencing, the species identified was *Hepatozoon canis*. Because one of these sequenced samples belonged to an animal that was positive to *Hepatozoon* spp. by blood smear, the sample of the other positive animal to *Hepatozoon* spp. by blood smear was also submitted to cPCR, followed by sequencing. BLAST analysis of this sequence also revealed the presence of *H. canis*.

Keywords: Dogs, CVBD, *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., blood smears, IFAT, qPCR, cPCR.



## Índice Geral

AGRADECIMENTOS.....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
Índice Geral.....	xiii
Lista de Figuras.....	xvi
Lista de Tabelas.....	xvii
Lista de Gráficos.....	xviii
Lista de Abreviaturas.....	xix
Capítulo I. Actividades desenvolvidas durante o estágio curricular.....	1
Capítulo II. Introdução.....	4
Capítulo III. Revisão bibliográfica.....	6
1. Babesiose canina.....	6
1.1 Etiologia.....	6
1.2 Ciclo Biológico.....	8
1.3 Distribuição geográfica e epidemiologia.....	10
1.4 Fisiopatologia.....	14
1.5 Sinais clínicos e alterações hematológicas e bioquímicas.....	18
1.6 Diagnóstico.....	21
1.6.1 Esfregaços sanguíneos.....	21
1.6.2 Testes serológicos.....	22
1.6.3 Métodos moleculares.....	23
1.7 Tratamento.....	25
1.8 Prevenção.....	27
1.9 Importância em Saúde Pública.....	29
1.10 Agentes de co-infecção com <i>Babesia</i> spp.....	30
1.10.1 <i>Ehrlichia canis</i> .....	30
1.10.2 <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	32
1.10.3 <i>Rickettsia conorii</i> .....	34

1.10.4 <i>Hepatozoon canis</i> .....	36
Capítulo IV. Estudo – Detecção de <i>Babesia</i> spp. e de outros hemoparasitas em cães, por técnicas morfológicas, serológicas e moleculares, no distrito de Lisboa, Portugal .....	39
1 Objectivos .....	39
2 Materiais e métodos .....	39
2.1 Caracterização da população em estudo .....	39
2.2 Colheita de amostras e processamento .....	42
2.3 Esfregaços sanguíneos.....	43
2.4 Testes serológicos .....	43
2.5 Extracção de DNA .....	44
2.6 Métodos moleculares .....	44
2.7 Purificação e sequenciação dos fragmentos de DNA amplificados por PCR convencional.....	47
2.8 Análise estatística .....	47
3 Resultados .....	48
3.1 Detecção de hemoparasitas por esfregaço sanguíneo.....	48
3.2 Detecção de anticorpos por imunofluorescência indirecta.....	49
3.3 Detecção de DNA pela técnica PCR quantitativa em tempo real .....	53
3.4 Comparação da detecção de anticorpos por imunofluorescência indirecta com a detecção de DNA pela técnica PCR quantitativa em tempo real.....	55
3.4.1 Comparação da detecção de anticorpos anti- <i>B. canis</i> por IFI com a detecção de DNA de <i>Babesia</i> spp. por qPCR .....	55
3.4.2 Comparação da detecção de anticorpos anti- <i>E. canis</i> e anti- <i>A. phagocytophilum</i> por IFI com a detecção de DNA de <i>Ehrlichia</i> spp./ <i>Anaplasma</i> spp. por qPCR .....	56
3.4.3 Comparação da detecção de anticorpos anti- <i>R. conorii</i> por IFI com a detecção de DNA de <i>Rickettsia</i> spp. por qPCR.....	57
3.5 Detecção de DNA por PCR convencional e sequenciação nucleotídica.....	57
3.6 Influência de factores .....	58
3.6.1 Variáveis globais.....	59
3.6.2 Variáveis discriminadas .....	61
4 Discussão.....	62

4.1 Detecção de hemoparasitas por esfregaço sanguíneo .....	63
4.2 Detecção de anticorpos por imunofluorescência indirecta.....	64
4.3 Detecção de DNA pela técnica PCR quantitativa em tempo real .....	68
4.4 Comparação da detecção de anticorpos por imunofluorescência indirecta com a detecção de DNA pela técnica PCR quantitativa em tempo real.....	71
4.5 Detecção de DNA por PCR convencional e sequenciação nucleotídica.....	74
4.6 Influência de factores.....	74
5 Considerações finais .....	76
Bibliografia .....	78
ANEXOS.....	100

## Lista de Figuras

Figura 1: <i>Hepatozoon</i> spp. em neutrófilo de cão, obj. x100, oc. x10; cão que foi levado à consulta (original).....	48
Figura 2: <i>Hepatozoon</i> spp. em neutrófilo de cão, obj. x100, oc. x10; cão de canil (original). 48	48
Figura 3: Resultados de <i>B. canis</i> obtidos por IFI, evidenciando o aspecto do controlo positivo (A), de uma amostra positiva (B), do controlo negativo (C) e de uma amostra negativa (D). Obj. x100, oc. x10 (original). .....	50
Figura 4: Resultados de <i>E. canis</i> obtidos por IFI, evidenciando o aspecto do controlo positivo (A), de uma amostra positiva (B), do controlo negativo (C) e de uma amostra negativa (D). Obj. x100, oc. x10 (original). .....	51
Figura 5: Resultados de <i>A. phagocytophilum</i> obtidos por IFI, evidenciando o aspecto do controlo positivo (A), de uma amostra positiva (B), do controlo negativo (C) e de uma amostra negativa (D). Obj. x100, oc. x10 (original). .....	51
Figura 6: Resultados de <i>R. conorii</i> obtidos por IFI, evidenciando o aspecto do controlo positivo (A), de uma amostra positiva (B), do controlo negativo (C) e de uma amostra negativa (D). Obj. x100, oc. x10 (original). .....	52
Figura 7: Resultados de <i>Babesia</i> spp. obtidos por qPCR, evidenciando as curvas de amplificação dos controlos positivos (A) e de amostras positivas (B) e a ausência de amplificação dos controlos negativos e de amostras negativas (C) (original). .....	54
Figura 8: Resultados de <i>Ehrlichia</i> spp./ <i>Anaplasma</i> spp. obtidos por qPCR, evidenciando as curvas de amplificação dos controlos positivos (A) e de amostras positivas (B) e a ausência de amplificação dos controlos negativos e de amostras negativas (C) (original). .....	55

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Espécies de <i>Babesia</i> e <i>Theileria</i> que já foram encontradas a infectar o cão. ....	8
Tabela 2: Frequência absoluta e frequência relativa (%) da distribuição dos animais da amostra por idades. ....	41
Tabela 3: Frequência absoluta e frequência relativa (%) da distribuição dos animais da amostra por raça. ....	41
Tabela 4: Sequência nucleotídica dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação de <i>Babesia</i> spp./ <i>Theileria</i> spp. por cPCR (Gubbels <i>et al.</i> 1999). ....	45
Tabela 5: Frequência absoluta, prevalência aparente, prevalência real e respectivos intervalos de confiança de 95%, dos diferentes hemoparasitas testados por IFI na amostra populacional. ....	49
Tabela 6: Tipos de co-infecções observadas e frequência absoluta de animais co-infectados. ....	53
Tabela 7: Frequência absoluta, prevalência aparente e intervalo de confiança de 95% dos diferentes hemoparasitas testados por qPCR na amostra populacional. ....	53
Tabela 8: Comparação dos resultados obtidos por IFI para <i>B. canis</i> com os obtidos por qPCR para <i>Babesia</i> spp. (frequência absoluta) ( <i>n</i> representa o número de animais). ....	56
Tabela 9: Comparação dos resultados obtidos por IFI para <i>E. canis</i> e <i>A. phagocytophilum</i> com os obtidos por qPCR para <i>Ehrlichia</i> spp./ <i>Anaplasma</i> spp. (frequência absoluta) ( <i>n</i> representa o número de animais). ....	57
Tabela 10: Comparação dos resultados obtidos por IFI para <i>R. conorii</i> com os obtidos por qPCR para <i>Rickettsia</i> spp. (frequência absoluta) ( <i>n</i> representa o número de animais). ....	57
Tabela 11: Associação estatística entre a infecção por <i>Babesia</i> spp., <i>Ehrlichia</i> spp./ <i>Anaplasma</i> spp., <i>B. canis</i> , <i>E. canis</i> , <i>A. phagocytophilum</i> e <i>R. conorii</i> e a idade, o sexo, a raça e o concelho de residência. ....	59
Tabela 12: Associação entre infecção por <i>Babesia</i> spp. e os vários concelhos abrangidos neste estudo (frequência absoluta e frequência relativa %) ( <i>n</i> representa o número de animais). ....	60
Tabela 13: Associação entre infecção por <i>R. conorii</i> e os vários concelhos abrangidos neste estudo (frequência absoluta e frequência relativa %) ( <i>n</i> representa o número de animais). ....	60
Tabela 14: Associação entre infecção por <i>R. conorii</i> e a idade (frequência absoluta e frequência relativa %). ....	61
Tabela 15: Associação estatística entre a infecção por <i>Babesia</i> spp., <i>Ehrlichia</i> spp./ <i>Anaplasma</i> spp., <i>B. canis</i> , <i>E. canis</i> , <i>A. phagocytophilum</i> e <i>R. conorii</i> e a presença de carrças, o acesso ao exterior e a eficiência da profilaxia ectoparasiticida, na população de 40 cães que se apresentou à consulta num hospital veterinário. ....	62
Tabela 16: Princípios activos existentes em Portugal, utilizados no controlo de ixodídeos no cão (Simposium Veterinário, 2011). ....	100
Tabela 17: Programa de amplificação dos géneros <i>Babesia</i> e <i>Theileria</i> por cPCR. ....	111
Tabela 18: Reagentes e respectivas concentrações utilizadas na reacção de cPCR para amplificação dos géneros <i>Babesia</i> e <i>Theileria</i> . ....	111

## Lista de Gráficos

Gráfico 1: Frequência relativa (%) da distribuição dos 80 animais da população pelos concelhos de Lisboa. ....	40
Gráfico 2: Frequência relativa (%) da distribuição dos animais da amostra por sexo. ....	40
Gráfico 3: Distribuição da percentagem de animais positivos por IFI a <i>B. canis</i> , <i>E. canis</i> , <i>A. phagocytophilum</i> e <i>R. conorii</i> , pelas populações de cães de canil e cães que se apresentaram à consulta num hospital veterinário. ....	50
Gráfico 4: Distribuição da percentagem de animais positivos por qPCR para <i>Babesia</i> spp., <i>Ehrlichia</i> spp./ <i>Anaplasma</i> spp. e <i>Rickettsia</i> spp. pelas populações de cães de canil e cães que se apresentaram à consulta num hospital veterinário.....	54

## Lista de Abreviaturas

°C – Graus Celcius  
µL – Microlitro  
µm – Micrometro  
µM – Micromolar  
AGC – Anaplasrose granulocítica canina  
AHIM – Anemia hemolítica imunomediada  
ALT – Alanina amino transferase  
APBT – American pit bull terrier  
BID – A cada doze horas  
cPCR – PCR convencional (do inglês *conventional PCR*)  
DCTV – Doenças caninas transmitidas por vectores  
DGS – Direcção Geral da Saúde  
DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic acid*)  
dNTP – Desoxirribonucleótido trifosfatado (do inglês *Deoxyribonucleotide triphosphate*)  
EDTA – Ácido etilendiamino tetra-acético (do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*)  
ELISA – Ensaio imunoenzimático (do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay*)  
EMC – Eriiquiose monocítica canina  
ESCCAP – do inglês *European Scientific Counsel Companion Animal Parasites*  
ESCMDI – do inglês *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*  
EUA – Estados Unidos da América  
FAS – Fosfatase alcalina sérica  
FITC – Conjugado isotiocianato de fluoresceína (do inglês *Fluorescein isothiocyanate conjugate*)  
FMV – Faculdade de Medicina Veterinária  
FRET – Transferência de energia de ressonância de fluorescência (do inglês *Fluorescence Resonance Energy Transfer*)  
GGT – Gama-glutamyl transpeptidase  
h - Horas  
HCT – Hematócrito  
IC – Intervalo de confiança  
IFI – Imunofluorescência indirecta  
IgG – Imunoglobulinas G  
ITQB – Instituto de Tecnologia Química e Biológica  
IM – Via intramuscular  
Kg – Quilograma  
MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio  
ml – Mililitros  
mM – Milimolar  
MO – Microscópio óptico  
n – Número de animais  
pb – Pares de base  
PBS - Tampão fosfato salino (do inglês *Phosphate buffered saline*)  
PCR – Reacção em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase chain reaction*)  
PDF - Produtos de degradação do fibrinogénio  
PI – Período de incubação  
PO – Por via oral (*Per os*)  
qPCR – PCR quantitativa em tempo real (do inglês *quantitative real-time PCR*)  
rpm – Rotações por minuto  
rRNA – Ácido ribonucleico ribossómico (do inglês *Ribosomal ribonucleic acid*)  
SC – Via subcutânea  
SID – A cada vinte e quatro horas  
SNC – Sistema nervoso central  
sp. – Espécie  
spp. – Espécies  
SRD – Sem raça determinada

SRIS – Síndrome de resposta inflamatória sistémica  
TBE – Tampão Tris-borato-EDTA (do inglês *Tris-borate-EDTA buffer*)  
Técnica de RLB – Técnica de hibridação reversa em membrana (do inglês *Reverse Line Blotting*)  
TID – A cada oito horas  
TP – Tempo de protrombina  
TT – Tempo de trombina  
TTPA – Tempo de tromboplastina parcial activada  
U – Unidade enzimática  
UTL – Universidade Técnica de Lisboa  
UV – Ultravioleta

## **Capítulo I. Actividades desenvolvidas durante o estágio curricular**

O estágio curricular desenvolvido durante o Mestrado Integrado em Medicina Veterinária teve lugar no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) da Universidade Técnica de Lisboa (UTL), durante um período de quatro meses, decorrido entre 7 de Fevereiro e 31 de Maio de 2011, sob a orientação do Dr. Gonçalo Vicente.

As actividades realizadas, em turnos rotativos, incluíram a participação e observação dos vários serviços de medicina interna, internamento, urgência, imagiologia e cirurgia durante os dias de semana e fins-de-semana.

Em medicina interna foi possível dar início às consultas, colhendo a história clínica do animal, seguida do exame físico e, discutir posteriormente com o médico veterinário assistente quais os diagnósticos diferenciais para a apresentação clínica do paciente, os exames complementares a realizar e qual o tratamento mais adequado. De um modo geral, assistiu-se a consultas de primeira opinião, onde os principais motivos foram vacinações e/ou desparasitações, insuficiências renais, cistites, gastroenterites, insuficiências cardíacas, dermatites, otites, conjuntivites, parasitoses causadas por ixodídeos, leishmaniose, hérnias discais, displasia coxofemoral, fracturas ósseas e neoplasias. Também foi possível assistir e intervir em consultas de referência, incluindo cardiologia, dermatologia, neurologia, ortopedia, oftalmologia e oncologia. A participação activa nas consultas permitiu o desenvolvimento de um discurso adequado às várias situações como médica veterinária, assim como o acompanhamento e aprofundamento do conhecimento relativo à evolução dos casos ao longo do período de estágio.

No internamento foram feitos turnos de vinte e quatro horas, onde as competências como estagiária incluíram a monitorização regular dos animais, a administração da medicação pelas diversas vias de administração, a prestação de cuidados básicos de higiene e a alimentação dos vários pacientes. As actividades desenvolvidas neste serviço permitiram desenvolver competências mais práticas, essenciais na actividade clínica.

O serviço de urgência permitiu desenvolver uma atitude rápida e consciente à abordagem do paciente crítico e adquirir conhecimentos práticos na execução de técnicas de acesso vascular e às vias aéreas, ressuscitação cardiopulmonar, técnicas de analgesia em urgência, suporte nutricional e monitorização cardíaca, respiratória e hemodinâmica. Os casos mais frequentes de atendimento urgente foram vítimas de acidentes automobilísticos, rupturas esplénicas, convulsões e crises de epilepsia.

Em imagiologia foi facultada a oportunidade de intervir em diversos métodos de diagnóstico imagiológico, como radiografia, ecografia, endoscopia e tomografia computadorizada. Aprendeu-se sobretudo o posicionamento mais adequado dos animais, de acordo com o exame complementar a realizar, e a interpretar os resultados dos diferentes métodos. Foi

também fundamental para o aprofundamento do conhecimento diagnóstico a discussão de vários casos clínicos, com diferentes apresentações imagiológicas.

Em cirurgia foi possível acompanhar o paciente, desde a sua entrada, até ao seu recobro pós-cirúrgico no internamento. Auxiliou-se na preparação pré-cirúrgica do doente (colocação de cateteres, administração da medicação pré-cirúrgica e anestésica, entubação e desinfecção do campo cirúrgico), na monitorização anestésica durante a cirurgia e na monitorização pós-cirúrgica dos sinais vitais durante o recobro. No serviço de cirurgia assistiu-se sobretudo a orquiectomias, ovariohisterectomias, mastectomias, remoção de corpos estranhos por gastrotomia e/ou enterotomia, extracções dentárias, esplenectomias e laparotomias exploratórias. Nas diversas cirurgias foi possível participar como ajudante de cirurgião, auxiliando em todas as etapas do processo cirúrgico. Sob a supervisão do médico cirurgião assistente, foi possível realizar a orquiectomia completa em cinco gatos. Durante este período foram desenvolvidos e aprofundados conhecimentos adquiridos durante o percurso enquanto estudante na FMV, UTL.

Seria impossível deixar de mencionar que, para a elaboração desta dissertação de mestrado, assim como para a formação como médica veterinária, foi fundamental também o exercício como aluna estagiária num estágio extracurricular, realizado no Hospital Veterinário da Estefânia, durante um período que decorreu desde o dia 4 de Outubro até ao dia 17 de Dezembro de 2010. Esta etapa permitiu dar os primeiros passos na aprendizagem prática clínica e cirúrgica. Ainda, durante o ano do estágio curricular, para o aprofundamento dos conhecimentos teóricos e práticos, foi importante a participação em mini estágios extracurriculares em Newcastle (PDSA PetAid Hospital) e Londres (The Blue Cross Victoria Animal Hospital), durante o mês de Janeiro. Em todos estes estágios extracurriculares, e sempre sob a supervisão de um médico cirurgião, foi possível a participação em consultas de primeira opinião, consultas de referência e consultas de urgência, monitorização de animais internados, realização de cirurgias (como ajudante de cirurgião e como cirurgiã principal), interpretação de diferentes meios de diagnóstico imagiológicos (radiografia e ecografia) e o desenvolvimento e aprofundamento do conhecimento da linguagem médica em inglês.

A parte laboratorial desenvolvida para a realização desta dissertação de mestrado foi cumprida no Laboratório de Doenças Parasitárias, da FMV, UTL, onde foi possível efectuar e observar esfregaços sanguíneos e testes de imunofluorescência indirecta, no Laboratório de Virologia, da FMV, UTL, onde foi possível realizar as técnicas de PCR quantitativa em tempo real, e no Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB), da Universidade Nova de Lisboa, no Laboratório de Diagnóstico Biomolecular, onde foi possível aprender e realizar técnicas de biologia molecular, em particular reacções em cadeia de polimerase. Esta fase do estágio, ainda que não incluída no estágio curricular, foi imprescindível para o desenvolvimento das competências técnicas essenciais à elaboração desta dissertação de

mestrado, para além de ter permitido o aprofundamento do conhecimento de métodos aprendidos durante o curso.

No início de todo este percurso como estagiária foi desenvolvido um artigo de revisão bibliográfica, subordinado ao tema Doenças Caninas Transmitidas por Vectores e submetido em Dezembro de 2010 ao Prémio Bayer Saúde Animal – Animais de Companhia 2010, em conjunto com dois colegas de faculdade (Silvia Cruz e Tiago Gonçalves) e a Professora Doutora Isabel Pereira da Fonseca, que garantiu uma Menção Honrosa.

## Capítulo II. Introdução

As doenças caninas transmitidas por vectores (DCTV) constituem um problema de importância crescente a nível mundial e apresentam-se como um grande desafio para os médicos veterinários. Tem sido observado uma maior proliferação destas doenças nos últimos tempos, devido à maior dispersão dos vectores e respectivos agentes, em consequência das alterações climáticas, do aumento das viagens dos animais de companhia de zonas endémicas para zonas não endémicas, associado a um progresso na facilidade e rapidez dos transportes, do aumento do comércio internacional e do desenvolvimento de resistência a diversos fármacos por parte dos vectores e agentes. Além disso, o rápido crescimento da população canina, aliado ao actual papel social atribuído aos cães, que contribui para que se estabeleça uma relação mais profunda entre homem e animal, e ao facto deles serem hospedeiros reservatórios competentes de vários agentes zoonóticos, contribui para que as preocupações relativas à saúde pública sejam cada vez maiores (Shaw, Day, Birtles, & Breitschwerdt, 2001; Irwin, 2002; Otranto, Dantas-Torres & Breitschwerdt, 2009a; Caprariis, Dantas-Torres, Capelli, Mencke, Stanneck, Breitschwerdt & Otranto, 2011).

A distribuição de muitas DCTV resulta da emergência de novas doenças causadas por novos agentes patogénicos, da introdução de uma doença numa nova área geográfica, ou da re-emergência de doenças previamente controladas. Adicionalmente, a evolução das técnicas de diagnóstico molecular permitem identificar agentes causadores de doença que, apesar de presentes, anteriormente não eram detectáveis pelos métodos de diagnóstico existentes (Shaw & Day, 2005).

As DCTV são causadas por parasitas como bactérias e protozoários, que são transmitidos por diversos ixodídeos, estando a distribuição geográfica dos vectores intimamente relacionada com a dos parasitas (Shaw *et al.*, 2001; Otranto & Dantas-Torres, 2010; Caprariis *et al.*, 2011).

De entre as DCTV, a babesiose canina é uma das doenças mais importante a nível mundial e com emergência em diversas partes do mundo. Assim, é essencial determinar e isolar as espécies de *Babesia* causadoras de doença clínica nas diversas áreas geográficas, uma vez que o sucesso do tratamento depende dessa mesma informação, e os fármacos utilizados poderão ter eficácia limitada contra as diferentes espécies de *Babesia* (Boozer & Macintire, 2003; Irwin, 2005; Dantas-Torres & Figueiredo, 2006; Taboada & Lobetti, 2006). Em Portugal, a informação sobre a babesiose canina é escassa, sobretudo a detecção e a identificação das espécies envolvidas na infecção, pelo que surgiu um interesse acrescido em compreender melhor a situação epidemiológica destes parasitas no país. Os estudos publicados que identificam as espécies de *Babesia* presentes em Portugal foram realizados unicamente no Norte do país e, deste modo, pareceu apropriado e entusiasmante alargar os estudos a outras regiões, neste caso, ao distrito de Lisboa, porque foi a área onde decorreu

o maior período de estágio. Para isso, foi proposto para este trabalho realizar a detecção de *Babesia* spp. através de esfregaços sanguíneos e métodos moleculares (seguida da identificação das espécies por sequenciação nucleotídica) e de *Babesia canis/Babesia vogeli/Babesia rossi* por métodos serológicos. Pareceu também interessante a detecção de co-infecções por outros hemoparasitas como *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. através de esfregaços sanguíneos e de técnicas moleculares, *Rickettsia* spp. através de métodos moleculares e *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Rickettsia conorii* através de métodos serológicos, uma vez que, nas áreas onde as DCTV são endémicas, como Lisboa, é comum a ocorrência de co-infecções, já que alguns desses agentes são transmitidos pelo mesmo vector, ou por diferentes vectores infectados com um único agente (Otranto *et al.*, 2009a; Otranto, Dantas-Torres & Breitschwerdt, 2009b; Caprariis *et al.*, 2011).

## Capítulo III. Revisão bibliográfica

### 1. Babesiose canina

A primeira descrição de parasitas intra-eritrocitários foi feita por Victor Babes em 1888, na Roménia, ao relatar a presença destes protozoários no sangue de bovinos e ovinos (Mahoney, 1977). Porém, só em 1893, é que Smith e Kilborne associaram estes parasitas à doença designada por Febre do Texas, caracterizada por uma condição febril aguda e hemoglobinúria. Estes dois investigadores descobriram ainda que estes parasitas eram transportados por ixodídeos (Mahoney, 1977), originando o primeiro relato da transmissão de um parasita protozoário por um artrópode (Uilenberg, 2006). Posteriormente, o género destes organismos foi intitulado de *Babesia*, em honra de Victor Babes, e os agentes denominados como *Babesia bovis* (bovinos) e *Babesia ovis* (ovinos) (Uilenberg, 2006). O primeiro relato de babesiose canina na Europa foi feito em Itália, em 1895 (Amici, 2001).

A babesiose canina é uma doença transmitida por ixodídeos, clinicamente significativa e com uma distribuição mundial (Taboada & Lobetti, 2006; Irwin, 2009). Esta doença é causada por hemoparasitas do género *Babesia*, que infectam os eritrócitos do hospedeiro vertebrado e que são denominados piroplasmas (Uilenberg, 2006). A infecção por *Babesia* spp. origina anemia hemolítica de diversos graus e a gravidade da doença pode variar desde ligeira a fatal, com envolvimento e complicações multissistémicas diversas (Lobetti, 1998; Taboada & Lobetti, 2006).

#### 1.1 Etiologia

Os organismos do género *Babesia* pertencem ao filo Apicomplexa, ordem Piroplasmida e família Babesiidae (Homer, Aguilar-Delfin, Telford III, Krause & Persing, 2000; Gorenflot & Vial, 2006). A taxonomia das espécies de *Babesia*, que se baseava inicialmente apenas na morfologia dos parasitas, tem sido substituída por métodos moleculares, que permitem não só definir as relações entre diferentes espécies de *Babesia*, como também elucidar as relações próximas entre estas espécies e parasitas de outro género, *Theileria* (filo Apicomplexa, ordem Piroplasmida, família Theileriidae), o qual difere de *Babesia* por os parasitas exibirem uma fase do ciclo de vida extraeritrocitário e por não apresentarem transmissão transovárica (Homer *et al.*, 2000; Irwin 2005, Uilenberg, 2006; Gorenflot & Vial, 2006). Ainda que de modo informal, as espécies de *Babesia* são geralmente agrupadas em piroplasmas ou espécies de *Babesia* de grandes dimensões e de pequenas dimensões (Irwin, 2005), e para uniformização e melhor compreensão, estes termos serão também utilizados para agrupar as espécies de *Theileria* que infectam o cão.

Tradicionalmente, a infecção de cães por *Babesia* spp. era diagnosticada através da observação microscópica dos parasitas no interior dos eritrócitos, sendo classificados como piroplasmas de grandes dimensões (2,5-5µm) e designados por *Babesia canis*, e

piroplasmas de pequenas dimensões (0,5-3µm) e designados por *Babesia gibsoni* (Boozer & Macintire, 2003; Irwin, 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011). *B. canis* apresenta geralmente uma forma piriforme (mas também em anel) no interior do eritrócito; esta espécie encontra-se habitualmente aos pares no interior destas células sanguíneas, podendo, contudo, ocorrer isoladamente. *B. gibsoni* surge geralmente sob a forma pleomórfica, mas pode também exibir uma forma oval, circular ou em anel; além disso, este protozoário ocorre isoladamente dentro dos eritrócitos do hospedeiro vertebrado (Boozer & Macintire, 2003; Taboada & Lobetti, 2006; Ayoob, Hackner & Prittie, 2010). Estas duas espécies eram até há pouco tempo as únicas espécies de *Babesia* reconhecidas como causadoras de doença nos canídeos. Porém, os avanços da biologia molecular têm possibilitado a identificação e diferenciação de vários organismos que são morfológicamente semelhantes, mas com genótipos diferentes (Irwin, 2009; Solano-Gallego & Baneth 2011). Desde o final dos anos 80 que a espécie de grandes dimensões *Babesia canis* foi reclassificada em três novas espécies, *Babesia canis*, *Babesia vogeli* e *Babesia rossi*, com base nas diferenças encontradas na sua patogenicidade, imunidade cruzada, diagnóstico serológico, especificidade de vectores e filogenia molecular (Uilenberg, Franssen, Perie & Spanjer, 1989; Zahler, Schein, Rinder & Gothe, 1998; Carret, Walas, Carcy, Grande, Precigout, Moubri, Schetters & Gorenflot, 1999; Uilenberg, 2006). No entanto, é recorrente encontrar na literatura a referência a estas espécies como subespécies distintas de *B. canis* (Uilenberg, 2006).

Adicionalmente, foi descrita uma quarta nova espécie de *Babesia* de grandes dimensões (*Babesia* sp.), inicialmente detectada num cão imunodeprimido, com alterações clínicas e hematológicas compatíveis com babesiose, e posteriormente em mais sete cães. Existem também relatos (não publicados) de cinco cães infectados com esta nova espécie. Todavia, permanece ainda desconhecido se o cão doméstico actua como hospedeiro reservatório primário desta nova espécie de *Babesia* e o ciclo biológico não está inteiramente esclarecido (Birkenheuer, Neel, Ruslander, Levy & Breitschwerdt, 2004b; Lehtinen, Birkenheuer, Droleskey, Holman, 2008; Sikorski, Birkenheuer, Holowaychuk, McCleary-Wheeler, Davis & Littman, 2010).

O protozoário *B. gibsoni* foi reconhecido pela primeira vez na Índia, em 1910, e desde então que se assumia que todos os cães infectados com *Babesia* de pequenas dimensões estavam parasitados pela espécie *B. gibsoni* (Macintire, Boudreaux, West, Bourne, Wright & Conrad, 2002). No entanto, segundo estudos moleculares e análises filogenéticas, demonstrou-se a existência de pelo menos três espécies distintas de piroplasmas pequenos capazes de infectar e de causar doença no cão, mas que são morfológicamente iguais (Kjemtrup, Kocan, Whitworth, Meinkoth, Birkenheuer, Cummings, Boudreaux, Stockham, Irizarry-Rovira, Conrad, 2000): uma da Ásia, outra da Califórnia e uma terceira da Europa. O isolado asiático (que também é encontrado nos EUA) corresponde ao protozoário

inicialmente descoberto na Índia no princípio do século XX e ao qual foi atribuída a designação de *B. gibsoni* (Boozer & Macintire, 2003). O isolado californiano, que antigamente era conhecido por *B. gibsoni* “estirpe californiana”, está relacionado filogeneticamente com espécies de piroplasmas de ungulados e do ser humano (Kjemtrup *et al.*, 2000; Kjemtrup & Conrad, 2006; Kjemtrup, Wainwright, Miller, Penzhorn & Carreno 2006) e foi-lhe proposto a denominação de *Babesia conradae* (Kjemtrup *et al.*, 2006). Por fim, o isolado europeu corresponde a uma espécie relacionada com o género *Theileria*, e está filogeneticamente relacionada com a espécie *Babesia microti*, tendo sido nomeada de *Theileria annae* (também designada por *B. microti*-like) (Kjemtrup *et al.*, 2000; Zahler, Rinder, Schein & Gothe, 2000). A morfologia destas últimas duas espécies pode diferir das restantes, uma vez que os parasitas podem ser encontrados agrupados em tétradas no interior dos eritrócitos, formando a designada “cruz de Malta” (Kjemtrup *et al.*, 2000; García, 2006; Kjemtrup *et al.*, 2006).

Actualmente, conhece-se ainda a existência de três espécies do género *Theileria* (*Theileria equi*, *Theileria annulata*, *Theileria* sp.) e uma espécie do género *Babesia* (*Babesia caballi*) capazes de infectar o cão. Todavia, desconhece-se ainda o significado epidemiológico destas infecções nos cães (Irwin, 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011).

A Tabela 1 permite, em resumo, a identificação de todas as espécies de *Babesia* e *Theileria* que já foram encontradas a infectar o cão.

Tabela 1: Espécies de *Babesia* e *Theileria* que já foram encontradas a infectar o cão.

Espécies específicas do cão	Espécies com origem noutros hospedeiros
<i>Babesia canis</i> *	<i>Theileria equi</i>
<i>Babesia vogeli</i> *	<i>Theileria annulata</i>
<i>Babesia rossi</i> *	<i>Theileria</i> sp.
<i>Babesia</i> sp.*	<i>Babesia caballi</i>
<i>Babesia gibsoni</i> **	
<i>Babesia conradae</i> **	
<i>Theileria annae</i> ( <i>B. microti</i> -like)**	

(\*) Espécies de *Babesia* de grandes dimensões

(\*\*) Espécies de *Babesia* de pequenas dimensões

## 1.2 Ciclo Biológico

A transmissão de *Babesia* ao cão ocorre frequentemente durante a alimentação de um vector ixodídeo infectado com o agente. A existência da transmissão transovárica (não documentada na espécie *B. gibsoni*, e não ocorrendo no género *Theileria*) e transtadial, torna a fêmea adulta a mais importante na transmissão, mas outros estádios evolutivos, como as ninfas e as larvas, são também passíveis de infecção (Taboada & Lobetti, 2006).

Algumas espécies de *Babesia*, incluindo *B. canis*, são transmitidas ao hospedeiro dois ou três dias após a fixação do vector, uma vez que é necessária a maturação dos esporozoítos antes de se tornarem infectantes para o hospedeiro vertebrado (Uilenberg, 2006; Taboada & Lobetti, 2006; Chauvin, Moreau, Bonnet, Plantard & Malandrin, 2009). Presume-se que a mudança de temperatura ou a presença de uma refeição de sangue no intestino do ixodídeo constitua um estímulo a essa maturação (Chauvin *et al.*, 2009). Enquanto o vector se alimenta de uma refeição de sangue sobre o cão, os esporozoítos são inoculados na corrente sanguínea, juntamente com a saliva do ixodídeo, fixam-se directamente à membrana dos eritrócitos e penetram no citoplasma por endocitose (Taboada & Lobetti, 2006). No interior dos glóbulos vermelhos, a membrana que envolve o parasita desintegra-se, ficando em contacto directo com o citoplasma celular, onde se multiplica por merogonia, dando origem a merozoítos. Estes observam-se geralmente aos pares no interior das células, mas podem surgir individualmente, ou multiplicarem-se e darem origem até 16 merozoítos por eritrócito. Podem ainda formar tétradas ou a cruz de Malta, característica de *B. conradae* ou *T. annae* (Taboada & Lobetti, 2006; García, 2006). A multiplicação assexuada repetida acaba por danificar e provocar a lise da célula hospedeira e os merozoítos são libertados na corrente sanguínea, ficando livres para infectarem novas células (Chauvin *et al.*, 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011).

Nas infecções crónicas os parasitas ficam sequestrados nas redes capilares do baço, fígado e outros órgãos, de onde são libertados periodicamente para a circulação sanguínea (Irwin, 2005).

O ixodídeo infecta-se quando se alimenta em animais com parasitemia e é no interior do artrópode que vai ocorrer a reprodução sexuada (gametogonia). Ao atingirem o intestino do vector, os parasitas diferenciam-se em gametócitos (gâmetas femininos e masculinos) e fundem-se no lúmen intestinal para darem origem ao zigoto, que penetra nas células epiteliais do intestino e evolui para uma forma móvel, o ooquineto (Uilenberg, 2006; Chauvin *et al.*, 2009). Posteriormente, o parasita migra para os diversos tecidos do ixodídeo, onde vai ocorrer a reprodução assexuada (esporogonia). Quando atinge os ovários, a ocorrência de esporogonia garante a infecção de vários ovos e das gerações seguintes (transmissão transovárica). Nas glândulas salivares, a esporogonia assegura a transmissão dos esporozoítos ao hospedeiro vertebrado, sendo inoculados com saliva, aquando da picada pelo vector (Uilenberg, 2006). A esporogonia ocorre em cada fase evolutiva do ciclo biológico do ixodídeo, e a infecção por *Babesia*, adquirida num dos estádios do ciclo, é transmitida para a fase seguinte (transmissão transtadial) (Chauvin *et al.*, 2009). Esta capacidade, conjuntamente com a transmissão transovárica, revela uma grande habilidade adaptativa do parasita ao vector, uma vez que os protozoários *Babesia* podem ser perpetuados entre as várias gerações do artrópode, sem que haja necessidade de uma

nova alimentação num hospedeiro infectado (Uilenberg, 2006; Chauvin *et al.*, 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011).

O período de incubação (PI) para *B. gibsoni* está documentado em 7 a 21 dias, enquanto para *B. canis* está relatado um PI de 10 a 21 dias (Boozer & Macintire, 2003).

O ciclo biológico de *Babesia* spp. no hospedeiro vertebrado ocorre exclusivamente no interior dos eritrócitos, enquanto os protozoários do género *Theileria* apresentam no seu ciclo biológico uma fase pré-eritrocitária no interior de leucócitos, seguida de uma fase nos glóbulos vermelhos (Uilenberg, 2006; Chauvin *et al.*, 2009).

### 1.3 Distribuição geográfica e epidemiologia

A distribuição geográfica dos agentes causadores de babesiose canina e consequentemente a ocorrência da doença, estão dependentes do habitat dos vectores ixodídeos responsáveis pela sua transmissão. Assim, o conhecimento da prevalência e das alterações clínicas e patológicas causadas pelas diferentes espécies de *Babesia* que infectam o cão, tem interesse médico e epidemiológico (Solano-Gallego & Baneth, 2011).

*B. canis* é um hemoparasita transmitido por *Dermacentor reticulatus* e encontra-se amplamente distribuído pela Europa, incluindo Portugal (Cardoso, Costa, Tuna, Vieira, Osnat, Yisaschar-Mekuzas & Baneth, 2008; Cardoso, Yisaschar-Mekuzas, Rodrigues, Costa, Machado, Diz-Lopes & Baneth, 2010b; Yisaschar-Mekuzas, Jaffe, Pastor, Cardoso, Baneth, 2012), Itália (Solano-Gallego, Trotta, Carli, Carcy, Caldin & Furlanello, 2008b), França (Bourdoiseau, 2006), Hungria (Foldvári, Hell, & Farkas, 2005), Espanha (Criado-Fornelio, Martinez-Marcos, Buling-Saraña & Barba-Carretero, 2003b), Polónia (Cacciò, Antunovic, Moretti, Mangili, Marinculic, Baric, Slemenda, & Pieniazek, 2002), Rússia (Rar, Maksimova, Zakharenko, Bolykhina, Dobrotvorsky & Morozova, 2005), Suíça (Porchet, Sager, Muggli, Oppliger, Muller, Frey & Gottstein, 2007), Alemanha (Zahler *et al.*, 1998), Eslovénia (Duh, Tozon, Petrovec, Strasek & Avsic-Zupanc, 2004), Albânia (Hamel, Silaghi, Knaus, Visser, Kusi, Rapti, Rehbein & Pfister, 2009), Croácia (Cacciò *et al.*, 2002), Holanda (Matjila, Nijhof, Taoufik, Houwers, Teske, Penzhorn, de Lange & Jongejan, 2005) e Noruega (Oines, Storli & Brun-Hansen, 2010).

*B. vogeli* é uma espécie transmitida por *Rhipicephalus sanguineus* (ixodídeo cosmopolita) e é aquela que se encontra mais amplamente distribuída pelo mundo, incluindo regiões tropicais e subtropicais (Irwin, 2009). De entre as várias áreas geográficas, a sua presença foi por exemplo relatada em Portugal (Cardoso *et al.*, 2008; Cardoso *et al.*, 2010b; Yisaschar-Mekuzas *et al.*, 2012), Espanha (Criado-Fornelio, Rey-Valeiron, Buling, Barba-Carretero, Jefferies & Irwin, 2007b), Eslovénia (Duh *et al.*, 2004), Itália (Solano-Gallego *et al.*, 2008b), França (Cacciò *et al.*, 2002), Turquia (Gulanber, Gorenflot, Schetters, & Carcy, 2006), Brasil (Passos, Geiger, Ribeiro, Pfister & Zahler-Rinder, 2005), Tunísia (M'ghirbi & Bouattour, 2008), Austrália (Jefferies, Ryan, Muhlnickel & Irwin, 2003),

Sudão (Oyamada, Davoust, Boni, Dereure, Bucheton, Hammad, Itamoto, Okuda & Inokuma, 2005), Nigéria (Sasaki, Omobowale, Tozuka, Ohta, Matsuu, Nottidge, Hirata, Ikadai & Oyamada, 2007), África do Sul (Matjila, Leisewitz, Jongejan & Penzhorn, 2008a) e Japão (Inokuma, Yoshizaki, Matsumoto, Okuda, Onishi, Nakagome, Kosugi & Hirakawa, 2004).

*B. rossi* é um protozoário transmitido por *Haemaphysalis elliptica* e a sua distribuição encontra-se limitada ao continente africano; já foi relatado na África do Sul (Matjila *et al.*, 2008a; Jacobson, 2006), Nigéria (Sasaki *et al.*, 2007) e Sudão (Oyamada *et al.*, 2005). Contudo, em França, um relato inesperado demonstrou a presença de *B. rossi* num cão desse país. Esta identificação continua sem explicação, uma vez que o cão que se descobriu infectado não tinha viajado para fora de França e também porque se acreditava que este parasita estava confinado ao país africano (Fritz, 2010).

A quarta nova espécie de grandes dimensões, *Babesia* sp., foi descrita na Carolina do Norte, EUA (Birkenheuer *et al.*, 2004b), mas relatos de Sikorski *et al.* (2010) situam algumas infecções fora dessa zona e admitem que o limite geográfico deveria ser aumentado até à região médio-atlântica dos EUA.

*B. gibsoni* é endémica na Ásia (Boozer & Macintire, 2003) e é a espécie que, de entre os piroplasmas de pequenas dimensões, apresenta a maior distribuição geográfica (Irwin, 2009). Existem relatos esporádicos da sua presença na Europa (Criado-Fornelio, González-del-Río, Buling-Saraña & Barba-Carretero, 2003a; Hartelt, Rieker, Oehme, Brockmann, Müller & Dorn, 2007; Beck, Vojta, Mrljak, Marinculic, Beck, Zivicnjak & Cacciò, 2009) e na Austrália (Irwin & Hutchinson, 1991), e foi identificada como a espécie de *Babesia* com maior prevalência nos EUA, depois de ter sido realizado um estudo para averiguar qual a distribuição geográfica da babesiose canina nesse país (Birkenheuer, Correa, Levy & Breitschwerdt, 2005). A partir dessa investigação verificou-se que, com base na reacção em cadeia da polimerase (PCR), 91% dos cães seropositivos a *Babesia* spp., eram positivos para *B. gibsoni*. Adicionalmente, esta espécie de *Babesia* é transmitida por *Haemaphysalis longicornis* e *Haemaphysalis bispinosa* (Birkenheuer *et al.*, 2005; Miyama, Sakata, Shimada, Ogino, Watanabe, Itamoto, Okuda, Verdida, Xuan, Nagasawa & Inokuma, 2005). Contudo, estes vectores ainda não foram identificados nos EUA, pelo que ainda não foi determinado o modo de transmissão de *B. gibsoni* nesse país (Birkenheuer *et al.*, 2005). Apesar de ter sido sugerido que o ixodídeo *R. sanguineus* seria um vector competente para este protozoário, e que se tenha demonstrado o desenvolvimento de *B. gibsoni* no intestino e nas glândulas salivares de *R. sanguineus*, ainda não existem estudos que demonstrem a transmissão definitiva do parasita por este artrópode (Higuchi, Kuroda, Hoshi, Kawamura & Yasuda, 1991; Higuchi, Fujimori, Hoshi, Kawamura & Yasuda, 1995; Higuchi, Izumitani, Hoshi, Kawamura & Yasuda, 1999; Birkenheuer *et al.*, 2005). Mais, pensa-se que *B. gibsoni* seja transmitida através do contacto directo de feridas com sangue infectado por este protozoário. Esta teoria é suportada pelo facto das raças American Pit Bull Terrier (APBT),

Staffordshire Terriers e Tosa apresentarem uma maior prevalência de infecção por *B. gibsoni*, comparativamente com outras raças, e por serem aquelas que são mais utilizadas nas lutas de cães nos EUA e Japão (Macintire *et al.*, 2002; Birkenheuer, Levy, Stebbins, Poore & Breitschwerdt, 2003b; Birkenheuer *et al.*, 2005; Miyama *et al.*, 2005; Jefferies, Ryan, Jardine, Broughton, Robertson & Irwin, 2007b; Yeagley, Reichard, Hempstead, Allen, Parsons, White, Little & Meinkoth, 2009). Segundo Yeagley *et al.* (2009), os cães com história ou evidências de mordeduras são mais prováveis de estarem infectados com *B. gibsoni*. Nesse estudo, 157 cães da raça tipo Pit Bull foram confiscados de lutas de cães nos EUA e a prevalência de *B. gibsoni* nessa raça foi comparada com 218 cães sem história de lutas provenientes de canis. Os resultados da PCR indicaram que 34% dos cães confiscados foram positivos para *B. gibsoni*, enquanto apenas um cão de canil (0,5%) foi positivo para essa espécie. Nenhum dos cães positivos para *B. gibsoni* foi positivo para qualquer outro agente transmitido por ixodídeos, o que seria expectável caso esta infecção fosse principalmente transmitida por esses vectores. Ainda, os cães que apresentavam lacerações na cabeça ou nos membros anteriores, resultantes de lutas de cães, tinham cinco vezes mais probabilidade de estarem infectados com *B. gibsoni*. A rápida dispersão global de *B. gibsoni* poderá então dever-se a este modo de transmissão proposto, o qual consiste no contacto sanguíneo directo durante as lutas entre cães (Irwin, 2009).

Recentemente foi descoberto o primeiro caso de transmissão transplacentária de *B. gibsoni* no cão (Fukumoto, Suzuki, Igarashi & Xuan, 2005), para além de que a transmissão deste hemoparasita também pode ser feita por transfusão sanguínea (Stegeman, Birkenheuer, Kruger & Breitschwerdt, 2003).

Em 2006, *B. conradae* foi descrita como uma espécie de piroplasma capaz de infectar os cães e distinta de *B. gibsoni*, *B. canis* e *T. annae* (Kjemtrup *et al.*, 2006). A sua distribuição geográfica encontra-se limitada ao Estado da Califórnia e, apesar de já se ter verificado a transmissão transtadial por *R. sanguineus*, o seu vector é ainda desconhecido (Kjemtrup & Conrad, 2006).

*T. annae* é uma espécie endémica no noroeste de Espanha (García, 2006); este protozoário também já foi relatado em Portugal (Simões, Cardoso, Araújo, Yisaschar-Mekuzas & Baneth, 2011), na Croácia (Beck *et al.*, 2009) e nos EUA (Yeagley *et al.*, 2009). A sua identificação em raposas na Europa (Criado-Fornelio *et al.*, 2003b) e nos EUA (Birkenheuer, Horney, Bailey, Scott, Sherbert, Catto, Marr, Camacho & Ballman, 2010) pode significar que estes mamíferos sejam hospedeiros reservatórios de *T. annae* para os cães, dado que este parasita é pouco virulento para as raposas (Birkenheuer *et al.*, 2010). *Ixodes hexagonus* foi o vector proposto para a transmissão de *T. annae* no noroeste de Espanha (Camacho, Pallas, Gestal, Guitián, Olmeda, Telford III & Spielman, 2003). No entanto, o estudo responsável por esta afirmação é apenas sugestivo, uma vez que ainda não se demonstrou a transmissão efectiva deste parasita por aquele ixodídeo, nem este vector foi ainda relatado

na Croácia onde ocorreram casos de babesiose canina por *T. annae* (Birkenheuer *et al.*, 2010; Dixit, Dixit, Varshney, 2010).

A espécie *T. equi* foi detectada em quatro cães em diferentes províncias de Espanha, por reacção de PCR e sequenciação nucleotídica, mas apenas um deles apresentava sintomatologia. Como a maioria dos positivos eram assintomáticos, suspeita-se de baixa patogenicidade desta espécie neste hospedeiro (Criado-Fornelio *et al.*, 2003b). Em 2009 este hemoparasita foi identificado num cão na Croácia (Beck *et al.*, 2009) e em 2010 em trinta e um cães em França (Fritz, 2010).

Outra espécie dos piroplasmas pequenos, *T. annulata*, foi descoberta recentemente num cão sintomático suspeito de babesiose canina, em Sevilha (região endémica de Espanha para este protozoário, mas geralmente detectado em bovinos), e que, apesar de ter ocorrido infecção, não se pode afirmar com certeza de que os canídeos são hospedeiros daquela espécie, uma vez que o número de animais estudado foi muito baixo (Criado, Martinez, Buling, Barba, Merino, Jefferies & Irwin, 2006; Irwin, 2009).

Os resultados de dois estudos recentes (Matjila *et al.*, 2008a; Matjila, Leisewitz, Oosthuizen, Jongejan & Penzhorn, 2008b) relataram uma outra espécie de piroplasmas que infecta o cão, *Theileria* sp., na África do Sul. A análise filogenética desta nova espécie indicou a ausência de similaridade com *T. annae* e uma elevada homologia com uma espécie pertencente a *Theileria* spp. que infecta antílopes na África do Sul. Estes mamíferos, quando infectados, apresentaram elevadas taxas mortalidade, porém, esta nova infecção nos cães, parece ser menos patogénica (ainda que associada a uma síndrome hemolítica), indicando possivelmente uma relação adaptativa crónica entre parasita e hospedeiro (Matjila *et al.*, 2008b).

A espécie *B. caballi* foi identificada num cão, na Croácia (Beck *et al.*, 2009) e num cão em França (Fritz, 2010). É de notar que, tal como acontece com *T. equi*, *T. annulata* e *Theileria* sp., *B. caballi* também necessita de mais estudos, de modo a poder afirmar-se com certeza de que os canídeos são hospedeiros habituais destes protozoários (Matjila *et al.*, 2008b; Irwin, 2009). Ainda, actualmente sabe-se que parasitas que sejam muito patogénicos para os seus hospedeiros vertebrados, poderão infectar hospedeiros acidentais, nos quais podem não provocar o desenvolvimento de doença clínica e que, os piroplasmas não são tão hospedeiro-específicos como inicialmente se pensava e como tem sido demonstrado nos últimos tempos (Criado-Fornelio *et al.*, 2003b; Matjila *et al.*, 2008b; Beck *et al.*, 2009; Fritz, 2010).

Cardoso *et al.* (2008, 2010b) e Yisaschar-Mekuzas *et al.* (2012) demonstraram que a babesiose canina é endémica no Norte de Portugal, sendo as espécies *B. canis* e *B. vogeli*, os agentes responsáveis pela doença, e que a espécie *T. annae* foi relatada até hoje, apenas em três animais no Norte do país (Simões *et al.*, 2011).

Estudos realizados em Portugal mostraram dados de seroprevalência de *B. canis* que podem variar entre 58,3% (Ferreira, 2008) e 20% (Silva, 2011), tendo os estudos incidido sobre uma população de cães que se apresentou à consulta no Hospital Escolar da FMV, UTL, e que revelaram positividade a um ou mais agentes transmitidos por ixodídeos e sobre uma população de cães de um canil de Setúbal, respectivamente.

*R. sanguineus* apresenta maior actividade nos meses mais quentes, todavia, as formas adultas são encontradas quase todos os meses do ano (Silva, Santos, Formosinho & Bacellar, 2006). *D. reticulatus* é uma espécie de ixodídeo que apresenta um aumento progressivo da sua actividade de Novembro a Março (Santos-Silva, Santos, Sousa, Casimiro, Estrada-Peña, Lopes, Queijo, Doreta & Bacellar, 2009). Apesar de se esperar que os números de casos de babesiose canina acompanhassem o período de maior actividade dos vectores que transmitem o agente, a verdade é que Cardoso *et al.* (2010b) e Ferreira (2008) demonstraram que os casos ocorrem ao longo de todo o ano, o que provavelmente se relacionará com as alterações das condições ambientais, que actualmente permitem a actividade dos ixodídeos durante o ano inteiro. A distribuição geográfica de *R. sanguineus* por todos os distritos portugueses e de *D. reticulatus* em Aveiro, Bragança, Castelo Branco, Leiria, Lisboa, Porto, Vila Real e Viseu (Santos-Silva, Beati, Santos, De Sousa, Núncio, Melo, Santos-Reis, Fonseca, Formosinho, Vilela & Bacellar, 2011), permite afirmar que é possível encontrar babesiose canina em qualquer ponto do país. Ainda, é importante referir que é comum encontrar infestações por *R. sanguineus* em canis (Wall & Shearer, 2001; Silva *et al.*, 2006), pelo que será provável uma incidência mais elevada de babesiose canina nestes animais.

#### **1.4 Fisiopatologia**

A gravidade da babesiose canina pode variar desde infecção subclínica, ao desenvolvimento de falência multiorgânica e morte. O determinante crítico para esta variabilidade patogénica, relaciona-se com a estirpe e espécie de piroplasma que causa a infecção. No entanto, factores como a idade do hospedeiro, a presença de co-infecções, o estado imunitário do cão e o grau de resposta imunológica desenvolvida face ao hemoparasita ou ao vector, também influenciam a patogenicidade (Boozer & Macintire, 2003; Irwin, 2005; Taboada & Lobetti, 2006; Irwin, 2009).

Os eritrócitos infectados exibem os antígenos parasitários à superfície da membrana celular, induzindo a produção de anticorpos, opsonização e remoção dos eritrócitos infectados pelo sistema mononuclear fagocitário (Taboada & Lobetti, 2006).

Os principais sinais clínicos observados nesta doença são causados grandemente por dois processos desencadeados em paralelo: anemia hemolítica e síndrome de resposta inflamatória sistémica (SRIS), com desenvolvimento subsequente de síndrome de disfunção multi-orgânica (Boozer & Macintire, 2003; Taboada & Lobetti, 2006).

As diversas espécies de *Babesia* causam vulgarmente anemia hemolítica, a qual é multifactorial e pode resultar da lesão directa e lise dos glóbulos vermelhos, devido à replicação intra-eritrocitária dos parasitas (Taboada & Lobetti, 2006; Ayoob *et al.*, 2010). A patogenia da anemia também é devida à ligação de anticorpos à membrana dos eritrócitos (descritos nas infecções por *B. gibsoni* e *B. vogeli*), que quando produzidos exageradamente podem desencadear anemia hemolítica imunomediada (AHIM), à activação do complemento, à produção de um factor hemolítico no soro descrito nas infecções por *B. gibsoni*, à inibição da enzima pirimidina 5'-nucleotidase, à lesão oxidativa das hemácias e ao aumento da fagocitose dos eritrócitos (Onishi, Ueda, Horie, Kajikawa & Ohishi, 1990; Adachi, Tateishi, Horii, Nagamoto, Shimizu & Makimura, 1994; Murase, Ueda, Yamato, Tajima & Maede, 1996; Hossain, Yamato, Yamasaki & Maede, 2004; Irwin, 2005; Taboada & Lobetti, 2006; Carli, Tasca, Trotta, Furlanello, Caldin & Solano-Gallego, 2009; Ayoob *et al.*, 2010). A ocorrência de uma hemólise exagerada resulta em hemoglobinémia, hemoglobinúria, bilirrubinémia e bilirrubinúria (Solano-Gallego & Baneth, 2011).

Nas infecções por *B. gibsoni* observa-se a produção de superóxido, que conduz à peroxidação lipídica. Esta, por sua vez, aumenta a rigidez dos eritrócitos parasitados e não parasitados, diminuindo a velocidade dos glóbulos vermelhos ao passarem nos capilares sanguíneos. Esta passagem lenta nos capilares, em associação com proteases parasitárias solúveis, induz a activação do sistema inflamatório, com produção de proteínas tipo fibrinogénio. Estas proteínas promovem a agregação eritrocitária, que agrava a estase vascular, provocando o desenvolvimento de isquémia e trombose; os órgãos mais afectados por esta estase vascular são o sistema nervoso central (SNC), rins e músculos. Ainda, pensa-se que esta estase vascular contribui para um agravamento da anemia (Taboada & Lobetti, 2006; Ayoob *et al.*, 2010).

A trombocitopenia observada na babesiose canina pode ser devida a mecanismos de destruição imunomediados, ao sequestro esplénico, ao consumo de plaquetas resultante de lesões hemolíticas e vasculares (Taboada & Lobetti, 2006) e à libertação de mediadores inflamatórios no decurso da lise eritrocitária (Jefferies, Ryan, Jardine, Robertson & Irwin, 2007c). Os resultados de um estudo recente verificaram alterações na hemostase, que poderiam dever-se a uma resposta de fase aguda à infecção e à lesão endotelial induzida pela hemólise, e a uma interacção dos eritrócitos infectados com as células endoteliais (Gopegui, Peñalba, Goicoa, Espada, Fidalgo & Espino, 2007). Ainda, as proteases parasitárias provocam a activação do sistema de coagulação intrínseco, que resulta no consumo de plaquetas (Taboada & Lobetti, 2006; Gopegui *et al.*, 2007; Ayoob *et al.*, 2010).

A hipóxia tecidual contribui grandemente para muitos dos sinais clínicos observados na babesiose canina, sendo causada por diversos factores: anemia, choque hipotensivo, estase vascular, produção excessiva de monóxido de carbono e lesão parasitária da hemoglobina, com conseqüente diminuição da sua capacidade para o transporte de oxigénio (Taboada &

Lobetti, 2006; Ayoob *et al.*, 2010). A formação de ácido láctico, resultante da hipóxia tecidual, é considerada uma das principais causas de acidose metabólica que ocorre nos cães com babesiose, com desenvolvimento subsequente de alcalose respiratória compensatória. Todavia, esta alcalose é principalmente gerada pela hiperventilação resultante da hipoxémia (Taboada & Lobetti, 2006).

A lesão renal, apesar de pouco comum, tem consequências graves na infecção por *Babesia* spp., manifestando particular importância nas infecções por *T. annae*. Nestas, Gracia (2006) demonstrou uma elevada prevalência de azotémia, a qual pode ser causada por anemia hemolítica, provocando potencialmente lesão tubular, nefrite intersticial e glomerulopatia, e por um mecanismo auto-imune, que pode resultar na deposição de imunocomplexos no glomérulo, com subsequente glomerulonefrite. Lobetti, Reyers e Nesbit (1996) relataram acerca dos papéis da hipóxia renal e hemoglobinúria, no desenvolvimento da lesão renal tubular. A hipóxia renal resultou num maior grau de necrose tubular, com diminuição da filtração glomerular, do que a hemoglobinúria, sugerindo-se assim, que aquela terá um papel mais patogénico sobre os nefrónios.

Apesar de não ser frequente, Lobetti (2005) relatou que a babesiose canina provocava lesões cardíacas nos animais, em particular a necrose do miocárdio e com principal incidência no ventrículo esquerdo. Defendeu ainda, que as alterações renais que eram observadas por vezes na babesiose canina, podiam ser secundárias à disfunção cardíaca e que, por isso, as complicações cardíacas seriam de elevada importância, agravando sempre o estado de hipóxia.

A babesiose canina é frequentemente acompanhada de choque hipotensivo. Os mecanismos propostos para o desenvolvimento de hipotensão incluem a activação do sistema caliceína com consequente vasodilatação (hipovolémia relativa), produção de proteínas vasoactivas, aumento da permeabilidade capilar com diminuição do volume intravascular e disfunção do miocárdio (Lobetti, 2005; Ayoob *et al.*, 2010). A hipotensão agrava a hipóxia tecidual, assim como contribui para o sequestro dos parasitas nos capilares sanguíneos, originando um ciclo vicioso de agravamento da doença, ao perpetuar a inflamação e hipotensão (Ayoob *et al.*, 2010).

A hipoglicémia está relatada na babesiose canina, e é particularmente importante nas infecções causadas por *B. rossi* (Keller, Jacobson, Nel, Clerq, Thompson & Schoeman, 2004; Jacobson & Lobetti, 2005; Jacobson, 2006). As explicações possíveis para o desenvolvimento de hipoglicémia na babesiose canina são: consumo elevado de glicose secundário à glicólise anaeróbia, hipermetabolismo e aumento da entrada celular de glicose, depleção das reservas de glicogénio hepático e disfunção hepática associada a uma glicogenólise ineficiente (Ayoob *et al.*, 2010). Ainda, parece existir uma correlação negativa significativa entre a concentração de glicose e de lactato (hipoglicémia e hiperlactatémia, respectivamente) e, quando associados, são um indicador de prognóstico reservado

(Jacobson & Lobetti, 2005). Por outro lado, em alguns casos pode ser observado hiperglicémia, devido provavelmente ao facto de que numa doença hipermetabólica como a babesiose canina, seja produzido em excesso cortisol, conduzindo a um aumento de mobilização de glicose (Gopegui *et al.*, 2007).

A lesão inflamatória tecidual desencadeia uma reacção de fase aguda, que é considerada parte integrante da imunidade inata de um organismo, e que é caracterizada por alterações profundas na concentração plasmática de proteínas de fase aguda. A concentração circulante destas proteínas está directamente relacionada com a gravidade da infecção, para além de que permite avaliar a presença e extensão da infecção e a eficácia do tratamento (Matijakto, Mrljak, Kis, Kucer, Forsek, Zivicnjak, Romic, Simec & Ceron, 2007). Na babesiose canina, a existência de uma resposta inflamatória de fase aguda, com produção e aumento da concentração daquelas proteínas, foi comprovada por Matijakto *et al.* (2007) em cães naturalmente infectados por *B. canis*. Muitos dos sinais atípicos e complicações observadas na babesiose canina, particularmente nas infecções por *B. rossi*, parecem ter origem na libertação de mediadores inflamatórios sistémicos, como as citocinas inflamatórias e os radicais livres, resultantes do stress oxidativo celular, que originam vasculite, aumento da permeabilidade capilar e extravasamento dos fluidos intravasculares. A hipoalbuminémia que se desenvolve subsequentemente contribui para o aparecimento de hemoconcentração. Esta inflamação sistémica provoca lesões adicionais, conduzindo ao aparecimento da síndrome de disfunção multi-orgânica, caracterizada por insuficiência renal aguda, hepatopatia, AHIM, edema pulmonar, rabdomiólise e disfunção cerebral. As complicações pulmonares, renais e do SNC estão associadas a uma elevada taxa de mortalidade (Taboada & Lobetti, 2006; Ayoob *et al.*, 2010).

Animais que sobrevivam à infecção por *Babesia* spp. mas que não eliminem o parasita, já que na maioria das vezes o sistema imunitário é incapaz de resolver por completo a infecção, tornam-se portadores crónicos e podem não exibir sinais clínicos (Wlosniewski, Leriche, Chavigny, Ulmer, Donnay, Boulouis, Mahl & Druilhe, 1997; Ayoob *et al.*, 2010). Os cães parecem tolerar este estado de premunidade na babesiose crónica, durante a qual a exposição periódica ao antigénio conduz ao desenvolvimento de anticorpos e à maior resistência a infecções futuras por *Babesia* spp.. Neste caso, e em particular nos cães que vivam em regiões endémicas, a infecção crónica pode ser benéfica ao conferir protecção contra doença futura (Brandão, Hagiwara & Myiashiro, 2003; Irwin, 2009). Porém, estes cães mantêm o risco de desenvolver complicações imunomediadas e de reincidência da doença clínica e parasitémia, caso ocorra posteriormente algum comprometimento imunológico.

A resposta imunitária parece ser espécie-específica, não ocorrendo imunidade cruzada entre espécies (Ayoob *et al.*, 2010).

Os cães que tenham sido submetidos a esplenectomia, apresentam anemia e parasitemia mais graves (Camacho, Pallas, Gestal, Guitián & Olmeda, 2002; Taboada & Lobetti, 2006; Ayoob *et al.*, 2010).

### **1.5 Sinais clínicos e alterações hematológicas e bioquímicas**

A infecção por *Babesia* spp. nos cães pode evoluir de forma hiperaguda, aguda ou crónica, ou ter ainda um carácter subclínico (Taboada & Lobetti, 2006).

A infecção hiperaguda é rara e é caracterizada por uma taxa de mortalidade elevada, associada a uma lesão tecidual extensa. A doença aguda é expressa por anemia hemolítica, febre, letargia, anorexia, vômito, trombocitopenia, esplenomegalia e linfadenomegalia. Estes sinais de infecção aguda são típicos da infecção por *B. gibsoni* e *B. canis* e, apesar da maioria dos cães adultos sobreviverem com a terapêutica adequada, é possível observar algumas mortes entre cachorros com este tipo de evolução clínica. É importante fazer a diferenciação entre esta forma de babesiose canina e outras causas de AHIM e lúpus eritematoso sistémico, de modo a instituir o tratamento mais adequado (Irwin & Hutchinson, 1991; Taboada & Lobetti, 2006; Ayoob *et al.*, 2010).

A evolução crónica da infecção por *Babesia* spp. está pouco caracterizada, mas é possível encontrar sinais clínicos como piroxia intermitente, anorexia parcial, perda da condição corporal e linfadenopatia. As infecções subclínicas não manifestam sinais clínicos, contudo, stress e terapêutica com glucocorticoides podem desencadear a doença (Taboada & Lobetti, 2006; Ayoob *et al.*, 2010).

A babesiose canina pode ser clinicamente classificada em forma não complicada, na qual a evolução e a gravidade da doença dependem da virulência do organismo infectante e da imunocompetência do hospedeiro. Os sinais clínicos desta forma estão sobretudo relacionados com hemólise aguda: febre, depressão, letargia, anorexia, membranas mucosas pálidas, esplenomegalia, taquicardia e taquipneia (Irwin, 2005; Gopegui *et al.*, 2007). Esta forma pode ainda ser classificada como ligeira, moderada ou grave, de acordo com a gravidade da anemia; os casos ligeiros podem progredir para graves, nos quais a anemia é tão grave, que o hematócrito pode ter valores inferiores a 15% (Lobetti, 1998; Taboada & Lobetti, 2006).

A classificação clínica da babesiose canina inclui ainda a forma complicada, a qual está relacionada com manifestações clínicas não associadas directamente à anemia hemolítica e envolve o desenvolvimento de insuficiência renal aguda, babesiose cerebral, coagulopatia, icterícia e hepatopatia, pancreatite aguda, AHIM, edema pulmonar, hemoconcentração e choque hipotensivo (Lobetti, 1998; Jacobson, 2006; Taboada & Lobetti, 2006; Ayoob *et al.*, 2010). Complicações mais raras envolvem alterações gastrointestinais, rabdomiólise e mialgias, alterações oculares, sinais do tracto respiratório superior, alterações cardíacas,

necrose das extremidades e acumulação de fluidos. É possível que mais do que uma complicação se manifeste ao mesmo tempo (Jacobson & Lobetti, 1996; Lobetti, 1998).

As alterações hematológicas que ocorrem na babesiose canina não são específicas. No entanto, é possível observar variações nos parâmetros do hemograma que se repetem na maioria das infecções por *Babesia* spp.. Aquelas que são mais frequentemente encontradas nos cães são a trombocitopenia (Taboada & Lobetti, 2006), a qual está muitas vezes associada a um aumento do volume plaquetário médio, sugerindo uma produção de plaquetas imaturas pela medula óssea (Furlanello, Fiorio, Caldin, Lubas & Solano-Gallego, 2005; Zygmier, Gójska, Rapacka, Jaros & Wedrychowicz, 2007) e a anemia, a qual numa fase aguda de infecção é não regenerativa (normocítica e normocrômica), já que a regeneração eritrocitária torna-se aparente cerca de seis dias pós-infecção (Furlanello *et al.*, 2005; Taboada & Lobetti, 2006). Posteriormente, esta anemia evolui para macrocítica, hipocrômica e regenerativa à medida que existe progressão da doença (Taboada & Lobetti, 2006). É de notar que a gravidade da anemia não se correlaciona com a gravidade dos sinais clínicos, uma vez que a maioria dos mecanismos patogénicos é devida à resposta imunitária do indivíduo face ao parasita, e não apenas resultantes da destruição directa dos eritrócitos (Furlanello *et al.*, 2005). Ainda, ocasionalmente a anemia pode surgir como uma alteração hematológica pouco comum nos casos de babesiose canina, como foi demonstrado no estudo de Zygmier *et al.* (2007). Relativamente aos parâmetros eritrócitários, aqueles que são mais frequentemente encontrados são anisocitose, poiquilocitose e policromasia (Zygmier *et al.*, 2007).

As alterações no leucograma são menos consistentes do que as encontradas no hemograma, mas podem incluir leucocitose, neutrofilia, neutropenia, linfocitose e eosinofilia (Taboada & Lobetti, 2006). Em relação aos estudos de Furlanello *et al.* (2005) e de Zygmier *et al.* (2007), as alterações mais frequentes foram leucopenia e neutropenia, e neutropenia, respectivamente.

O perfil bioquímico encontra-se geralmente normal (Taboada & Lobetti, 2006), contudo, por vezes é possível verificar alterações sobretudo relacionadas com a gravidade da doença e com o grau de hipoxia tecidual (Furlanello *et al.*, 2005). As alterações mais observadas são: aumento das transaminases hepáticas, da fosfatase alcalina sérica (FAS), da creatinina cinase e da ureia (sem aumento da creatinina), hipocalcemia ou hipercalcemia, hiperclorémia, hipoglicémia ou hiperglicémia, hiperbilirrubinémia, hipoproteinémia, hipoalbuminémia, hiperglobulinémia, diminuição do ferro total e da capacidade de fixação do ferro total (Taboada & Lobetti, 2006; Furlanello *et al.*, 2005; Gopegui *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2008b).

Animais com hemólise intravascular grave costumam apresentar acidose metabólica, a qual parece contribuir para um aumento da morbidade e mortalidade (Taboada & Lobetti, 2006).

Alguns estudos demonstraram ainda a existência de alterações hemostáticas nas infecções por *Babesia* spp., e que incluíram um prolongamento do tempo de tromboplastina parcial activada (TPPA), do tempo de protrombina (TP) e do tempo de trombina (TT) e aumento dos produtos de degradação do fibrinogénio (PDF) e do dímero-D. É de notar que a hiperfibrinogénemia é uma das alterações mais constantes nas infecções por *Babesia* spp. (Furlanello *et al.*, 2005; Gopegui *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2008b).

A lesão renal pode ser identificada na urianálise, ao ser revelada a presença de bilirrubinúria, hemoglobinúria, proteinúria e células do epitélio tubular renal (Taboada & Lobetti, 2006).

A gravidade dos sinais clínicos apresentados pelos pacientes com babesiose canina varia geralmente com a patogenicidade da espécie de *Babesia* envolvida (Taboada & Lobetti, 2006). De uma maneira geral é aceite que *B. vogeli* é a espécie que infecta o cão que é menos patogénica, estando frequentemente associada a infecção subclínica. Todavia, existem relatos de anemia hemolítica grave e mesmo morte em infecções causadas por esta espécie em cachorros com menos de três meses de idade (Irwin, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2008b). As infecções por *B. vogeli* também são mais graves em adultos, quando acompanhadas de doenças infecciosas concomitantes (por exemplo, leishmaniose), condições de imunossupressão (tratamentos com doses imunossupressoras de corticosteroides) ou em animais que tenham sido submetidos a esplenectomia, pois o baço é um órgão fundamental para controlar o desenvolvimento da babesiose canina (Solano-Gallego *et al.*, 2008b; Irwin, 2009). Pelo contrário, a espécie mais virulenta corresponde a *B. rossi*, estando a infecção associada, na maioria das vezes, à forma complicada da doença e a gravidade dos sinais clínicos relacionada com o grau de parasitemia. Além disso, a taxa de mortalidade associada a *B. rossi* é bastante elevada (Jacobson, 2006; Taboada & Lobetti, 2006; Ayoob *et al.*, 2010).

A patogenicidade de *B. canis*, *B. gibsoni*, *T. annae* e *B. conradae* é moderada a grave (Irwin, 2009). A infecção por *B. canis* é frequentemente caracterizada por uma parasitemia baixa, combinada com a congestão dos órgãos do sistema mononuclear fagocitário (Taboada & Lobetti, 2006; Ayoob *et al.*, 2010). *B. conradae* é considerada uma espécie mais patogénica que *B. gibsoni*, resultando numa infecção caracterizada por uma parasitemia mais elevada e uma anemia mais grave (Irwin, 2009; Kjemtrup & Conrad, 2006). Na maior parte das infecções por aquela espécie, foi relatada anemia hemolítica aguda grave, acompanhada de trombocitopenia (Taboada & Lobetti, 2006). Ainda, nas infecções por *B. gibsoni* é comum encontrar uma evolução para a forma crónica da doença e existem portadores assintomáticos (Macintire *et al.*, 2002; Birkenheuer *et al.*, 2005; Taboada & Lobetti, 2006). Nas infecções por *T. annae*, as alterações mais marcantes são o desenvolvimento de anemia grave e de azotémia (García, 2006; Taboada & Lobetti, 2006). A infecção pela

quarta e nova espécie de *Babesia* spp. de grandes dimensões parece estar associada a condições imunossupressoras subjacentes (Birkenheuer *et al.*, 2004b; Sikorski *et al.*, 2010).

## **1.6 Diagnóstico**

O diagnóstico de babesiose canina deve ser o mais específico possível, uma vez que a resposta ao tratamento e o prognóstico dependem grandemente dele. Para isso, o diagnóstico deve ser feito de forma integrada, e para que a sensibilidade e especificidade do diagnóstico sejam maximizadas, é ideal combinar os diversos testes de diagnóstico existentes (Boozer & Macintire, 2003; Birkenheuer *et al.*, 2005). A primeira abordagem para a identificação da doença, consiste na recolha da história clínica, onde a exposição prévia ao vector, a mordedura por outro cão nas últimas 4 a 8 semanas e a presença de sinais clínicos indicativos da doença são fundamentais. As alterações hematológicas e bioquímicas são também úteis ao diagnóstico. A confirmação laboratorial da doença assenta na observação microscópica do parasita em esfregaços sanguíneos, na serologia positiva e na amplificação do DNA (do inglês *deoxyribonucleic acid*) do protozoário, extraído de sangue ou de tecidos, através de métodos moleculares (Boozer & Macintire, 2003; Taboada & Lobetti, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2008b; Irwin, 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011).

### **1.6.1 Esfregaços sanguíneos**

A identificação dos parasitas no interior dos eritrócitos através da observação microscópica de esfregaços sanguíneos corados com derivados de Romanowsky, como o corante Giemsa, é o método de diagnóstico mais simples e de mais fácil acesso para a maioria dos médicos veterinários (Harvey, 2001; Irwin, 2009).

Durante as infecções agudas, a identificação microscópica dos parasitas é relativamente sensível, devido a uma parasitemia moderada a elevada. No entanto, nas infecções por espécies de *Babesia* de grandes dimensões e nas infecções subclínicas e crónicas, a parasitemia é maioritariamente baixa e intermitente. O mesmo acontece na avaliação de esfregaços sanguíneos de animais que apresentem alterações sanguíneas, como anemia hemolítica e trombocitopenia, sendo por isso difíceis de interpretar e originando falsos negativos (Taboada & Lobetti, 2006; Irwin, 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011). Numa infecção natural a detecção da parasitemia ocorre geralmente entre o sexto e o vigésimo dia pós-infecção (Brandão *et al.*, 2003).

Os esfregaços sanguíneos feitos a partir de amostras de sangue recolhidas dos capilares sanguíneos da extremidade do pavilhão auricular ou da matriz ungueal (esta última em desuso), podem exibir um maior número de eritrócitos infectados, uma vez que nos capilares os glóbulos vermelhos apresentam um aumento da rigidez da sua membrana, o que causa um abrandamento da sua passagem. Além disso, os eritrócitos também exibem uma tendência para acumularem-se nos leitos capilares (Irwin & Hutchinson, 1991; Bohm,

Leisewitz, Thompson & Schoeman, 2006). A observação de esfregaços sanguíneos preparados a partir da camada imediatamente abaixo do *buffy coat* permite também a observação de um maior número de eritrócitos infectados (Irwin & Hutchinson, 1991).

A diferenciação entre espécies de piroplasmas de pequenas e grandes dimensões é relativamente fácil, porém a diferenciação entre as pequenas babesias ou entre as grandes babesias não é possível e por isso é necessário recorrer a análise molecular (Solano-Gallego & Baneth, 2011).

### 1.6.2 Testes serológicos

Os testes serológicos são úteis para a detecção de portadores assintomáticos e para o diagnóstico de infecções crônicas, nas quais a parasitemia é bastante baixa, tornando difícil a sua detecção nos esfregaços sanguíneos (Dantas-Torres & Figueredo, 2006).

Os testes serológicos indicam a presença de infecção, antiga ou recente, não conseguindo, no entanto, diferenciar infecção aguda de infecção crônica, para além de que pode ser difícil a interpretação de um título positivo em áreas endêmicas (Irwin, 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011).

A imunofluorescência indirecta (IFI) para a detecção de anticorpos tem sido o meio de diagnóstico serológico mais utilizado na babesiose canina, mas permite apenas a evidência indirecta da infecção, e os resultados podem ser difíceis de interpretar devido à existência de reactividade cruzada entre as diferentes espécies de *Babesia* spp. e à variação interlaboratorial relativa à utilização de técnicas e antigénios diferentes. Ainda, a utilização de títulos mínimos para o diagnóstico de doença clínica, pode originar um diagnóstico incorrecto, uma vez que os anticorpos anti-*Babesia* spp. detectáveis nem sempre estão presentes em animais infectados, confirmados positivos para *Babesia* spp. por microscopia, PCR ou ambos (Birkenheuer, Levy & Breitschwerdt, 2003a; Birkenheuer *et al.*, 2003b; Boozer & Macintire, 2003; Taboada & Lobetti, 2006; Irwin 2009; Solano-Gallego & Baneth 2011).

Nos animais muito jovens ou nos casos em que o diagnóstico é feito logo no início da doença, os resultados poderão ser serologicamente negativos, pelo que é necessário repetir este exame no período de convalescência (Taboada & Lobetti, 2006; Solano-Gallego & Baneth, 2011). A seroconversão ocorre sete dias pós-infecção experimental com *B. canis*, com um aumento gradual até 14 a 21 dias pós-infecção (Brandão *et al.*, 2003).

Os resultados positivos à serologia devem ser interpretados com precaução, uma vez que os animais que são infectados mas que eliminam o parasita naturalmente ou através de tratamento esterilizante, mantêm-se seropositivos durante vários meses e, por isso, o valor diagnóstico destes testes é baixo na ausência de sinais clínicos e alterações hematológicas e bioquímicas (Brandão *et al.*, 2003; Dantas-Torres & Figueredo, 2006). No entanto, em regiões onde a doença não é endémica e onde ocorrem casos esporádicos de doença, a

utilização de IFI torna-se um método bastante fiável para a detecção de cães infectados, especialmente se for associada a reacção de PCR (Irwin, 2009).

O método de ELISA (do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay*) é um teste serológico alternativo, mas é normalmente utilizado para estudos epidemiológicos e não como teste de diagnóstico. Apresenta maior sensibilidade que a IFI, mas menor especificidade (Taboada & Lobetti, 2006).

### 1.6.3 Métodos moleculares

Os meios de diagnóstico mais sensíveis e específicos para a detecção de infecção são os métodos moleculares, nomeadamente a reacção em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction* - PCR) (Taboada & Lobetti, 2006). Esta é uma técnica que permite a amplificação exponencial de uma região específica do DNA, que se encontra definida por dois oligonucleótidos sintéticos, também designados *primers*, e consiste em três fases que se repetem durante 25 a 40 ciclos: a) fase de desnaturação, na qual o aumento da temperatura provoca a separação da cadeia dupla do DNA em duas cadeias simples, b) fase de *annealing*, durante a qual ocorre a diminuição da temperatura e a ligação dos *primers* à sequência complementar da região do DNA que se pretende amplificar e, por fim, c) fase de extensão, na qual a temperatura é aumentada, de modo a atingir a temperatura óptima à qual uma DNA polimerase (termorresistente) sintetizará novas cadeias de DNA complementares à cadeia inicial, a partir de cada *primer* (Nicholas, 2003).

A reacção de PCR tem como objectivo a detecção do DNA parasitário e, como tal, é bastante fiável nas infecções hiperagudas, agudas e crónicas (Fukumoto, Xuan, Shigeno, Kimbita, Igarashi, Nagasawa, Fujisaki & Mikami, 2001). Contudo, a reacção de PCR pode originar falsos negativos, como aqueles relatados por Jefferies *et al.* (2007c) na fase crónica da doença causada por *B. gibsoni*, que poderá dever-se ao facto do nível de parasitémia ser inferior ao limiar de detecção da reacção de PCR, ou porque a parasitémia é intermitente. De modo a ultrapassar esta limitação, poderá testar-se o animal em dois ou mais períodos no tempo (Jefferies *et al.*, 2007c).

A reacção de PCR, para além de poder ser utilizada no diagnóstico clínico, é útil para avaliar o sucesso clínico do tratamento, detectar e diferenciar as espécies de *Babesia* envolvidas, assim como para a descoberta de novas espécies que infectem o cão, em associação com a sequenciação nucleotídica (Taboada & Lobetti, 2006). Com esses objectivos em vista, ao longo do tempo têm sido desenvolvidas diferentes reacções de PCR, assim como variações da PCR convencional (cPCR) (Zahler *et al.*, 2000; Fukumoto *et al.*, 2001; Birkenheuer *et al.*, 2003a; Birkenheuer *et al.*, 2004b; Kjemtrup *et al.*, 2006; Trapp, Messik, Vidotto, Jojima & Morais, 2006; Jefferies, Ryan & Irwin, 2007a; Duarte, Linhares, Romanowsky, Neto & Borges, 2008; Simões *et al.*, 2011).

A técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é uma metodologia que evoluiu da técnica de cPCR, e baseia-se na detecção e quantificação simultânea, e em tempo real, de um composto fluorescente, que é emitido à medida que os produtos de amplificação vão sendo gerados, em cada ciclo de amplificação. Esta técnica assenta no princípio básico de que a quantidade de produto da reacção de PCR detectado e quantificado correlaciona-se com a quantidade inicial de DNA alvo. Os sistemas de detecção utilizados na técnica de qPCR, e que permitem a quantificação do DNA, podem ser divididos em dois grupos: a) compostos intercalantes, como o SYBR® Green, que são compostos corantes não específicos para uma sequência em particular do DNA, e que se intercalam na cadeia dupla do DNA de qualquer produto da reacção de PCR; para manter a elevada especificidade da técnica de qPCR com este sistema de detecção, é necessário o correcto desenho dos *primers*, com elevada especificidade e realizar a curva de dissociação dos primers; b) sondas de sequência específica, que são oligonucleótidos que hibridizam especificamente com uma determinada sequência do DNA e aos quais são adicionados um fluorocromo. Estas sondas são sintetizadas por meio da técnica de FRET (do inglês *Fluorescence resonance energy transfer*), a qual é uma propriedade em que ocorre a transferência de energia de um marcador fluorescente (*reporter*) para um receptor (*quencher*) que absorve essa energia, e que está dependente da distância física entre essas duas moléculas. Quando a distância crítica entre as duas é excedida, a fluorescência da molécula *reporter* deixa de ser absorvida e é emitida, sendo esse sinal detectado e quantificado. Como a sequência da sonda é exactamente complementar à sequência da região do DNA que se pretende amplificar, este modo de detecção, ao contrário dos compostos intercalantes, permite detectar exclusivamente a sequência complementar à sonda em todos os produtos de PCR. Um exemplo das sondas de sequência específica que é amplamente utilizado na técnica de qPCR, são as sondas TaqMan®. Estas sondas são oligonucleótidos com fluoróforo e *quencher* incorporados covalentemente às extremidades 5' e 3', respectivamente, e que fazem uso da actividade 5' exonuclease da DNA polimerase, pois a fluorescência é emitida quando esta enzima cliva a sonda durante a extensão e adição dos nucleótidos para a formação da cadeia complementar, e provoca um distanciamento entre as moléculas *reporter* e *quencher*. Cada vez mais se utiliza a técnica de qPCR como tecnologia de referência para a detecção do DNA, em detrimento do método de cPCR, ainda que o custo do equipamento e as exigências técnicas e científicas para o correcto manuseamento desse equipamento sejam superiores, uma vez que aquela é uma análise mais rápida e simples e que apresenta uma elevada sensibilidade e especificidade, um baixo risco de contaminação, porque é feito em sistema fechado, não necessitando de processamento pós-PCR dos produtos resultantes, e pela facilidade de quantificação do produto da reacção de PCR (Bell & Ranford-Cartwright, 2002; Matsuu, Ono, Ikadai, Uchide, Imamura, Onuma, Okano & Higuchi, 2005; Valasek & Repa, 2005; Espy, Uhl, Sloan,

Buckwalter, Jones, Vetter, Yao, Wengenack, Rosenblatt, Cockerill III & Smith, 2006; Buling, Criado-Fornelio, Asenzo, Benitez, Barba-Carretero & Florin-Christensen, 2007; Kim, Iseki, Herbas, Yokoyama, Suzuki, Xuan, Fujisaki & Igarashi, 2007; Mackay, Mackay, Nissen & Sloots, 2007; Peleg, Baneth, Eyal, Inbar & Harrus, 2010; Wang, Ahluwalia, Li, Gao, Poudel, Chowdhury, Boudreaux & Kaltenboeck, 2010).

### 1.7 Tratamento

Os principais pilares da terapia na babesiose canina incluem os fármacos antiprotozoários, os fármacos antimicrobianos e a terapêutica de suporte (Ayoob *et al.*, 2010). A maioria dos animais apresenta melhorias clínicas ao fim de vinte e quatro horas de terapêutica com fármacos anti-*Babesia* (Taboada & Lobetti, 2006; Ayoob *et al.*, 2010). No entanto, a susceptibilidade das diferentes espécies de *Babesia* aos fármacos utilizados no tratamento da babesiose canina varia e é comum que não ocorra a esterilização parasitária, em particular nas infecções por espécies de *Babesia* de pequenas dimensões (Boozer & Macintire, 2003).

O aceturato de diminazeno (3,5-5mg/kg, administração por via intramuscular (IM); dose única) e o dipropionato de imidocarb (5-6,6mg/kg, administração por via IM ou subcutânea (SC), repetido com um intervalo de 14 dias, ou numa dose única de 7,5mg/kg) são os fármacos mais frequentemente usados e aqueles que apresentam uma maior eficácia contra as espécies de *Babesia* de grandes dimensões (Taboada & Lobetti, 2006; Irwin, 2009; Ayoob *et al.*, 2010).

O aceturato de diminazeno apresenta um intervalo de segurança estreito, uma vez que é eliminado de forma inconsistente, podendo resultar em níveis elevados de toxicidade, traduzindo-se depois em efeitos secundários como inflamação e dor no local de injeção, irritação gastrointestinal e alterações neurológicas (Taboada & Lobetti, 2006). Além disso, o seu efeito é cumulativo e a dose administrada não pode ser repetida, nem ser administrada em conjunto com outro derivado das diamidinas num período de seis semanas (Ayoob *et al.*, 2010). Este fármaco apresenta também alguma eficácia contra *B. conradae* (Kjemtrup & Conrad, 2006) e contra *B. gibsoni*, ainda que menos que contra *B. canis* (Boozer & Macintire, 2003; Irwin, 2005; Taboada & Lobetti, 2006). No entanto, o aceturato de diminazeno foi retirado do mercado europeu por razões de marketing (Vial & Gorenflot, 2006).

O dipropionato de imidocarb é altamente eficaz contra *B. canis*, eliminando os sinais clínicos (Taboada & Lobetti, 2006). Os efeitos secundários não são comuns, mas podem incluir dor no local de injeção e estarem também associados ao efeito anti-colinesterásico do fármaco: salivação transitória, vômito, diarreia, tremores musculares, agitação, taquicardia e dispneia. A pré-medicação com atropina pode reduzir a gravidade dos efeitos secundários (Boozer & Macintire, 2003; Irwin, 2005; Taboada & Lobetti, 2006). As infecções por *B. gibsoni* podem

ser tratadas com duas administrações de dipropionato de imidocarb, separadas por um intervalo de duas semanas (Boozer & Macintire, 2003). A resposta ao tratamento por este fármaco é fraca nas infecções por *B. conradae* e por *T. annae* (Kjemtrup & Conrad, 2006; García, 2006; Solano-Gallego & Baneth, 2011).

Outro fármaco eficaz contra *B. canis* e *B. gibsoni* é o isotionato de fenamidina (15-20mg/kg, administração por via SC, a cada vinte e quatro horas [SID], durante dois dias), cujos efeitos secundários incluem dor no local de injeção, hipotensão, taquicardia e vômito (Taboada & Lobetti, 2006).

O tratamento eficaz contra as infecções por espécies de *Babesia* de pequenas dimensões tem sido difícil de alcançar. Contudo, recentemente foi descrito o uso combinado de azitromicina (10mg/kg, administração por via oral [PO], SID, durante dez dias) com atovaquona (13,3mg/kg, administração PO, a cada oito horas [TID], durante dez dias) contra a infecção por *B. gibsoni*, que tem mostrado eficácia clínica e grande segurança (Jefferies *et al.*, 2007c; Birkenheuer, Levy & Breitschwerdt, 2004a). Esta combinação parece promissora, todavia já foi descrita o desenvolvimento de resistência à atovaquona e um ressurgimento da doença trinta dias após a terapêutica. Além disso, trata-se de um fármaco muito dispendioso (Taboada & Lobetti, 2006; Jefferies *et al.*, 2007c; Matsu, Miyamoto, Ikada, Okano & Higuchi, 2006).

O azul tripano a 1% foi dos primeiros fármacos a ser usado contra a babesiose canina e normalmente o seu uso está limitado ao tratamento de infecções por *B. rossi*, sendo moderadamente eficaz contra infecções por *B. canis*. Está também recomendado para pacientes que apresentem infecções graves, uma vez que não manifesta os efeitos anticolinérgicos do imidocarb, nem se desenvolvem alterações tóxicas do SNC (comuns nos derivados das diamidinas). No entanto, não elimina a infecção por completo e provoca uma coloração azulada do plasma e tecidos (Irwin, 2005; Taboada & Lobetti, 2006; Vial & Gorenflot, 2006; Ayoob *et al.*, 2010).

Em situações onde não haja acesso a fármacos anti-babésia, o recurso à clindamicina ou a uma combinação de doxiciclina, clindamicina e metronidazole mostrou alguma eficácia na resolução de sinais clínicos (Wulansari, Wijaya, Ano, Horii, Nasu, Yamane & Makimura, 2003; Suzuki, Wakabayashi, Takahashi, Fukushima, Yabuki & Endo, 2007).

A terapêutica de suporte é especialmente importante na forma complicada da doença. A fluidoterapia é essencial para a manutenção do volume sanguíneo, correção das alterações electrolíticas e do equilíbrio ácido-base e diurese (Ayoob *et al.*, 2010). A decisão para realização de transfusão sanguínea relaciona-se com os sinais clínicos associados à anemia, ao carácter agudo da doença, à capacidade de regeneração eritrocitária e aos valores do hematócrito (HCT: valores  $\leq 15\%$  são indicativos de necessidade transfusional). O produto de eleição para transfusão é o concentrado de eritrócitos (Taboada & Lobetti, 2006). A utilização de glucocorticóides na terapia de babesiose canina é controversa,

contudo, nos casos em que a terapia etiológica não obtém resultados, poderá ser necessário recorrer a doses imunossupressoras de corticosteróides (Taboada & Lobetti, 2006).

A eliminação completa dos parasitas dos animais infectados pode ser desvantajosa em áreas endémicas, porque para além do estado de premunição poder permitir que nessas zonas os sinais clínicos da doença estejam controlados, a re-infecção de animais cujo tratamento foi esterilizante pode causar uma doença mais grave (Penzhorn, Lewis, de Waal & López Rebolgar, 1995; Lobetti, 1998; Brandão *et al.*, 2003; Taboada & Lobetti, 2006).

Os protozoários causadores de babesiose canina também podem ser transmitidos a partir de transfusões de sangue infectado, sendo, por isso, importantíssimo testar os cães dadores que possam ser portadores do agente, através de métodos serológicos, ou, sobretudo, da técnica de PCR (Taboada & Lobetti, 2006).

### **1.8 Prevenção**

O princípio da prevenção está firmemente estabelecido em Medicina Veterinária e, actualmente, a protecção dos cães e o controlo dos vectores transmissores dos agentes causadores das DCTV, são as estratégias de prevenção mais eficazes contra a babesiose canina, assim como para qualquer outra DCTV (Stanneck, 2006; Taboada & Lobetti, 2006; Irwin, 2009; Ayoob *et al.*, 2010; Solano-Gallego & Baneth, 2011). Na maioria das situações é impossível a erradicação desses vectores, sobretudo nas zonas endémicas, devido à participação de hospedeiros reservatórios no seu ciclo de vida (Shaw *et al.*, 2001). A prevenção é particularmente importante para os cães não expostos, que se movimentam para áreas endémicas, ou para aqueles que estão envolvidos em actividades que os expõem em demasia aos vectores (Shaw *et al.*, 2001).

A inspecção visual frequente da pele e do pelo é importante para a detecção de ixodídeos, sobretudo nos períodos de maior actividade destes vectores (Wall & Pitts, 2005; Taboada & Lobetti, 2006). Quando as carraças estão fixadas ao animal, devem ser utilizadas luvas e pinças próprias para a sua remoção (Wall & Pitts, 2005; ESCCAP, 2012). O controlo mecânico deve ser associado à utilização assídua de terapêutica acaricida tópica e ambiental, de modo a impedir a exposição ao vector e a transmissão do agente causador de doença (Ayoob *et al.*, 2010; Solano-Gallego & Baneth, 2011). O controlo químico ambiental pode ser dispendioso e causar o aparecimento de resistências em organismos para os quais o controlo não era dirigido, para além de que as fases do ciclo de vida fora do hospedeiro ocorrem muitas vezes em locais de difícil acesso. Assim, tem sido encorajado o desenvolvimento de produtos profilácticos tópicos e sistémicos direccionados para os animais de companhia. Todavia, o uso de organofosforados ou piretróides para o tratamento ambiental pode ser útil em determinadas circunstâncias, como por exemplo em situações em que se instala uma infestação domiciliária de *R. sanguineus*, uma vez que este ixodídeo

apresenta um comportamento endofílico (Wall & Pitts, 2005; World Health Organization [WHO], 2006).

Hoje em dia existem no mercado diferentes fármacos com espectros de acção amplos que abrangem diversos vectores, sendo particularmente valiosos, aqueles que apresentam eficácia acaricida e repelente (Wall & Pitts, 2005). Os ectoparasiticidas comercialmente disponíveis para uso nos cães apresentam um efeito prolongado e, para além de serem seguros para o animal, são-no também para os donos e ambiente (Otranto & Dantas-Torres, 2010). As terapias tópicas aparecem sob diferentes formulações, em que as mais comuns são coleiras, champôs, *sprays*, pós e fórmulas *spot-on* e *pour-on* (Wall & Pitts, 2005; Stanneck, 2006; WHO 2006; Dantas-Torres, 2008). Os acaricidas mais frequentemente utilizados são: fipronil, amitraz, carbaril e piretróides (deltametrina, permetrina e cipermetrina) (Stanneck, 2006; WHO, 2006; Dantas-Torres, 2008). Os ectoparasiticidas tópicos repelem e impedem a fixação dos ixodídeos, ou mata-os em 24-48 horas após a sua aplicação (Solano-Gallego & Baneth, 2011). A frequência da sua aplicação depende do grau de infestação pelos ixodídeos e da duração dos efeitos residuais do acaricida, devendo sempre ser respeitado as indicações do fabricante (Dantas-Torres, 2008). No Anexo I encontram-se os ectoparasiticidas existentes em Portugal, para o controlo de ixodídeos no cão (Simposium Veterinário, 2011).

A quimioprofilaxia tem sido objecto de estudo nos últimos anos, e diferentes fármacos têm sido testados quanto à sua capacidade de actuação como profilácticos. Contudo, ainda não foram obtidos resultados satisfatórios: 5mg/kg/dia de doxiciclina não previne a doença clínica e na dose 20mg/kg/dia, é obtida alguma protecção clínica, mas não impede a infecção por *B. canis*. Uma única dose 6mg/kg de dipropionato de imidocarb parece proteger os cães contra a infecção por *B. canis* até duas semanas após injeção (Vercammen, De Deken & Maes, 1996a; Vercammen, De Deken & Maes, 1996b), no entanto, estes resultados são contraditórios com os obtidos por Uilenberg, Verdiesen e Zwart (1981).

A profilaxia da babesiose canina inclui, para além do controlo dos vectores, o controlo do agente através da vacinação. Em alguns países da Europa, incluindo Portugal, estão disponíveis duas vacinas licenciadas – Pirodog<sup>®</sup> e Novibac<sup>®</sup> Piro – que podem prevenir a doença grave, ou pelo menos diminuir a gravidade dos sinais clínicos, a parasitémia e a duração clínica da doença, mas não impedem a infecção. Estas vacinas são constituídas por antigénios parasitários solúveis produzidos pelos parasitas, derivados de culturas *in vitro* de uma única estirpe de *B. canis*, no caso da Pirodog<sup>®</sup>, e de uma estirpe de *B. canis* e outra de *B. rossi*, no caso da Novibac<sup>®</sup> Piro. O nível de protecção imunitária deste tipo de vacinas é sempre parcial, uma vez que elas não permitem protecção cruzada, devido às diferenças antigénicas verificadas entre as diferentes espécies e estirpes (Moreau, Vidor, Bissuel & Dubreuil, 1989; Schetters, Kleuskens, Scholtes & Bos, 1992; Schetters, Kleuskens, Scholtes, Pasman & Bos, 1994; Schetters, Kleuskens, Scholtes & Bos, 1995; Uilenberg, 2006;

Schettters, Kleuskens, Carcy, Gorenflot & Vermeulen, 2007; Solano-Gallego & Baneth, 2011; ESCCAP, 2012). No entanto, a vacina bivalente permite uma protecção imunitária, ainda que limitada, contra estirpes heterólogas de *B. canis* e de *B. rossii*, enquanto a vacina que contém apenas antigénios solúveis de *B. canis* confere unicamente protecção contra estirpes homólogas (Schettters *et al.*, 1992; Schettters, Scholtes, Kleuskens & Bos, 1996; Schettters, Kleuskens, Scholtes, Gorenflot, Moubri & Vermeulen, 2001; Schettters, 2005; Schettters, Kleuskens, Scholtes, van de Crommert, Krijen, Moubri, Gorenflot & Vermeulen, 2006; Schettters *et al.*, 2007; Schettters, Moubri & Cooke, 2009).

A primovacção (duas administrações subcutâneas, com 3 a 6 semanas de intervalo; idade mínima para administração das vacinas: 5 meses de idade com a Pirodog<sup>®</sup> e 6 meses de idade com a Novibac<sup>®</sup> Piro) e a revacinação anual, ou de seis em seis meses em áreas endémicas, devem ser feitas, de preferência, antes da época de maior actividade dos ixodídeos, uma vez que o desenvolvimento de anticorpos a partir da segunda administração ocorre apenas passados alguns dias com a Pirodog<sup>®</sup> e três semanas com a Novibac<sup>®</sup> Piro (Moreau *et al.*, 1989; Schettters *et al.*, 1996; Schettters *et al.*, 2006; ESCCAP, 2012). Ainda relativamente à vacina bivalente, existem estudos que demonstram a persistência da imunidade protectora até seis meses após a segunda dose da primovacinação, e que a revacinação semestral é suficiente para manter essa imunidade por mais seis meses (Schettters *et al.*, 2006).

### **1.9 Importância em Saúde Pública**

A babesiose humana é uma doença zoonótica emergente em várias partes do mundo (Taboada & Lobetti, 2006; Ayoob *et al.*, 2010). A infecção é geralmente assintomática, contudo, estão descritos casos de doença grave (e fatal), sendo a gravidade da infecção maior nos idosos, nos pacientes imunodeprimidos, ou nos pacientes submetidos a esplenectomia (Taboada & Lobetti, 2006; Vial & Gorenflot, 2006; Ayoob *et al.*, 2010). O ser humano é apenas hospedeiro acidental de diferentes espécies de *Babesia*, caso seja exposto ao ciclo enzoótico do agente (Vial & Gorenflot, 2006). Existem diversas espécies de *Babesia* que infectam o homem e que têm vindo a ser caracterizadas molecularmente, mas os agentes mais implicados na babesiose humana são: 1) *Babesia microti*, espécie cujos hospedeiros reservatórios são os roedores e que é mais frequentemente relatada como a espécie implicada na babesiose humana nos EUA; 2) *Babesia divergens*, principal agente etiológico da babesiose humana descrito na Europa (Homer *et al.*, 2000; Taboada & Lobetti, 2006; Vial & Gorenflot, 2006). Os bovinos são os hospedeiros reservatórios desta espécie, a qual foi responsável pelo primeiro caso fatal de babesiose humana em Portugal num indivíduo esplenectomizado (Centeno-Lima, Rosário, Parreira, Maia, Freudenthal, Nijhof & Jongejan, 2003; Vial & Gorenflot, 2006).

### 1.10 Agentes de co-infecção com *Babesia* spp.

A babesiose canina pode ser complicada por outras DCTV, uma vez que em zonas endémicas é comum a ocorrência de infecções simultâneas, ou sequenciais, de agentes transmitidos por vectores, dependendo da presença e abundância dos artrópodes. É importante ter em conta que o mesmo vector pode ser competente para mais do que um agente patogénico, como é o caso de *B. vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Rickettsia conorii*, transmitidos por *R. sanguineus*. Assim, o cão pode ser exposto a diferentes vectores infectados com um único agente, ou a vectores simultaneamente infectados com mais do que um agente. Quando um animal apresenta co-infecção, os vários agentes patogénicos podem causar um exacerbamento dos sintomas, para além de que o sucesso do tratamento depende sempre da detecção correcta dos organismos infectantes, uma vez que se usam diferentes fármacos consoante o agente em causa (Boozer and Macintire, 2003; Otranto *et al.*, 2009a; Otranto *et al.*, 2009b).

#### 1.10.1 *Ehrlichia canis*

**Etiologia:** A espécie *Ehrlichia canis*, pertencente ao género *Ehrlichia* (Rickettsiales, Anaplasmataceae) e causa a erliquiose monocítica canina (EMC). *E. canis* é uma bactéria Gram (-), pleomórfica, intracelular obrigatória em monócitos e macrófagos, onde surge em forma de mórula (Dumler, Barbet, Bekker, Dasch, Palmer, Ray, Rikihisa & Rurangirwa, 2001; Harrus, Waner, Bjoersdorff & Shaw, 2005; Neer & Harrus, 2006). O ixodídeo *R. sanguineus* é seu principal vector (Harrus *et al.*, 2005).

**Ciclo Biológico:** A transmissão no ixodídeo é do tipo transtadial, mas não ocorre infecção transovárica (Varela, 2003; Harrus *et al.*, 2005). As larvas e ninfas infectam-se durante a refeição sanguínea num animal parasitémico; após a sua evolução para ninfas e adultos, respectivamente, transmitem a outro hospedeiro formas veiculadas com a saliva (Harrus *et al.*, 2005; Neer & Harrus, 2006).

**Distribuição geográfica e Epidemiologia:** *E. canis* é cosmopolita, excepto na Austrália e os casos agudos da doença ocorrem nos meses mais quentes do ano. Todavia, Alexandre (2005) demonstrou em Portugal a inexistência de sazonalidade na seroprevalência de *E. canis*. Os cães de regiões endémicas, ou que viajem para elas, são potenciais candidatos para a infecção (Harrus *et al.*, 2005; Neer & Harrus, 2006). Em Portugal a seroprevalência de *E. canis* apresentou resultados que podem variar entre 5,25% (Alexandre, 2005) e 50% (Bacellar, Dawson, Silveira & Filipe, 1995).

A transmissão de *E. canis* também pode ocorrer através de transfusões de sanguíneas a partir de dadores infectados (Neer & Harrus, 2006).

**Patogenia e Sinais clínicos:** O PI é 8-20 dias, seguindo-se três fases: aguda (2-4 semanas), subclínica (meses a anos) e crónica; nem todos os animais desenvolvem o último estágio. Os sinais clínicos são idênticos na fase aguda e crónica, contudo, são mais

graves na última e incluem: anorexia, perda de peso, febre, letargia, depressão, taquipneia, linfadenomegália, esplenomegália, hemorragias e epistáxis. Podem ainda ocorrer sinais oculares e nervosos, mas que são mais frequentes na fase aguda (Varela, 2003; Harrus *et al.*, 2005; Baneth, 2010).

A patogenia da EMC está associada à desregulação do sistema imunitário e à capacidade de evasão das erliquias à resposta imune do hospedeiro, causando infecções persistentes (Neer & Harrus, 2006). A produção de uma grande quantidade de anticorpos específicos tem um papel mínimo na eliminação do agente e contribui para a progressão da doença, devido a mecanismos hiperimunes (Neer & Harrus, 2006; Irwin, 2007; Baneth, 2010). Em todas as fases da doença a alteração hematológica mais frequente é a trombocitopenia, que resulta do aumento do consumo devido a alterações endoteliais vasculares, do sequestro de plaquetas pelo baço, da destruição imunomediada, da presença de anticorpos anti-plaquetários e da presença do factor de inibição da migração plaquetária, e, por fim, numa fase crónica, a trombocitopenia é devida a hipoplasia medular (Neer & Harrus, 2006; Harrus & Waner, 2011).

**Diagnóstico:** Baseado na história clínica, sintomatologia, alterações hematológicas e bioquímicas e em testes específicos. Trombocitopenia e anemia não regenerativa normocítica normocrómica são frequentes e é possível encontrar leucopenia ligeira a moderada; em alguns casos agudos ocorre o desenvolvimento de linfocitose. Outras alterações incluem hipoalbuminemia, hiperproteinemia, hiperglobulinemia (hipergamaglobulinemia), aumento da FAS e da alanina aminotransferase (ALT), proteinúria e hematúria (Varela, 2003; Neer & Harrus, 2006; Baneth, 2010). Em casos crónicos graves pode ocorrer pancitopenia à medida que a medula óssea se torna hipocelular (Harrus *et al.*, 2006; Neer & Harrus, 2006; Baneth, 2010).

A identificação microscópica da mórula em esfregaços de sangue periférico, ainda que comprove a presença do agente, é um meio de diagnóstico limitado pela sua baixa sensibilidade, uma vez que as parasitemias são transitórias e as mórulas, quando presentes, existem em pequeno número (Neer & Harrus, 2006; Baneth, 2010; Harrus & Waner, 2011; ESCCAP, 2012). A IFI é o método de eleição, sendo recomendado dois testes consecutivos com quinze dias de intervalo, demonstrando-se infecção activa se houver um aumento igual ou superior a quatro vezes o valor do primeiro título de anticorpos (Harrus *et al.*, 2005; Harrus & Waner, 2011). Na fase aguda os resultados podem ser negativos. Os resultados serológicos positivos não determinam necessariamente infecção activa, pois podem ocorrer por reactividade cruzada com *Ehrlichia chaffeensis* ou com *Anaplasma phagocytophilum*, ou por recuperação da infecção com persistência dos Ac anti-*E. canis* (especialmente importante nas zonas endémicas) (Waner, Strenger, Keysary & Harrus, 1998; Harrus *et al.*, 2005; Harrus & Waner, 2011). Outros métodos incluem ELISA, PCR (o teste mais útil para a confirmação do agente, detectando-o 4 a 10 dias pós-infecção

e o teste mais sensível e específico), culturas em células macrofágicas e *Western immunoblot* (Harrus *et al.*, 2005; Neer & Harrus, 2006; Cárdenas, Doyle, Zhang, Nethery, Corstvet, Walker & McBride, 2007; Gal, Loeb, Yisaschar-Mekuzas & Baneth, 2007; Baneth, 2010; Harrus & Waner, 2011).

**Tratamento e Profilaxia:** Doxiciclina (10 mg/kg, PO, SID, 28 dias) é o fármaco de eleição, principalmente na fase aguda da doença, com recuperação clínica em 24-72h (Neer & Harrus, 2006; Harrus *et al.*, 2005; Baneth, 2010). A minociclina (10 mg/kg, PO, a cada doze horas [BID], 28 dias) também tem sido utilizada com grande frequência. A administração de glucocorticóides, como a prednisolona (2 mg/kg, 2-7 dias), pode ser benéfica no início do tratamento, aquando de trombocitopenia grave (Neer & Harrus, 2006). A profilaxia é baseada no controlo dos ixodídeos no cão e no ambiente (já referido nas infecções por *Babesia* spp.), não existindo qualquer vacina preventiva contra a erliquiose canina (Neer & Harrus, 2006; Baneth, 2010; ESCCAP, 2012).

**Importância em Saúde Pública:** *E. canis* é um agente que não é considerado zoonótico, contudo, em 1996 foi isolado um agente semelhante a *E. canis* num homem na Venezuela, devendo, por isso, o carácter zoonótico desta espécie ser melhor elucidado. A espécie com maior interesse zoonótico é *E. chaffensis*, sendo o cão o hospedeiro reservatório para o homem (Perez, Rikihisa & Wen, 1996; WHO 2004; Neer & Harrus, 2006).

### 1.10.2 *Anaplasma phagocytophilum*

**Etiologia:** A espécie *Anaplasma phagocytophilum*, pertencente ao género *Anaplasma* (Rickettsiales, Anaplasmataceae), bactéria Gram (-), intracelular obrigatória em forma de mórula, infecta granulócitos (neutrófilos/eosinófilos) e causa anaplasmoose granulocítica canina (AGC) (Dumler *et al.*, 2001; Greig & Armstrong, 2006). Os seus vectores pertencem ao género *Ixodes*, e na Europa o ixodídeo transmissor é *Ixodes ricinus* (Santos, Santos-Silva, Almeida, Bacellar & Dumler, 2004; Greig & Armstrong, 2006).

**Ciclo Biológico:** As formas de *A. phagocytophilum* são ingeridas pelo ixodídeo durante uma refeição sanguínea num animal com parasitemia, decorrendo a maior parte do seu ciclo no interior do vector onde são transmitidas de forma transtadial. A espécie *I. ricinus* parasita diversos mamíferos e, no decurso da refeição sanguínea, inocula o parasita com a saliva (Harrus *et al.*, 2005). Para que ocorra infecção é necessário que a carraça permaneça fixa no hospedeiro pelo menos 24-48 horas (Greig & Armstrong, 2006). Ainda, a transmissão nos ixodídeos pode também ocorrer por *cofeeding* (Woldehiwet, 2010).

**Distribuição geográfica e Epidemiologia:** A distribuição de *A. phagocytophilum* acompanha a do vector, e a sua presença já foi demonstrada na América, África, Europa e Ásia (Greig & Armstrong, 2006). Em Portugal, *I. ricinus* encontra-se distribuído de Norte a Sul (Silva *et al.*, 2006). A infecção é sazonal pois os ixodídeos são mais activos em Setembro/Março (Silva *et al.*, 2006). Estudos realizados em Portugal revelaram dados de

seroprevalência que variaram entre 12,5% (Silva, 2011) e 54,5% (Santos, Alexandre, Sousa, Nuncio, Bacellar & Dumler, 2009).

**Patogenia e Sinais clínicos:** Desconhece-se o mecanismo exacto pelo qual *A. phagocytophilum* provoca doença, mas sabe-se que a sua capacidade em impedir a fusão entre fagossomas e lisossomas, assim como a inibição da apoptose celular, evita a sua degradação e permite que se multiplique no interior dos granulócitos. Além disso, a produção de citocinas parece ter algum papel na ocorrência da mielossupressão, e a trombocitopenia observada nestas infecções parece resultar de um aumento do consumo plaquetário (Greig & Armstrong, 2006). A AGC manifesta-se após um PI de 1-2 semanas e está associada a febre, anorexia, letargia e depressão; outros sinais incluem dor muscular, artrite e por vezes podem surgir sinais respiratórios, gastrointestinais e do SNC. Também pode estar presente esplenomegália, linfadenomegália e hepatomegália (Greig & Armstrong, 2006; Carrade, Foley, Borjesson & Sykes, 2009). A AGC é uma doença auto-limitante em cães e, até à data, com excepção de um cão na Suécia, não foram relatadas infecções crónicas naturais em cães (Greig & Armstrong, 2006; Carrade *et al.*, 2009).

**Diagnóstico:** As alterações hematológicas mais comuns compreendem trombocitopenia, neutropenia, linfopenia e anemia não regenerativa ligeira (Greig & Armstrong, 2006; Carrade *et al.*, 2009). Linfocitose (rara), neutrofilia, monocitose e monocitopenia também podem ser encontradas (Carrade *et al.*, 2009). As alterações bioquímicas são hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, aumento da FAS e hiperbilirrubinemia (Carrade *et al.*, 2009). O teste de ELISA e *Western immunoblot* são úteis para a detecção de anticorpos, mas rotineiramente o método de eleição é a IFI (Greig & Armstrong, 2006; Carrade *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2009). No entanto, este teste apresenta limitações devido a reacções cruzadas (principalmente entre espécies do mesmo género, mas também entre *A. phagocytophilum* e *E. canis* ou *E. chaffeensis*) (Greig & Armstrong, 2006). A IFI associada a PCR ultrapassa essa limitação e demonstra a presença de infecção activa (Santos *et al.*, 2009). As técnicas serológicas detectam imunoglobulinas G (IgG) 8 dias após a exposição inicial e 2-5 dias após o aparecimento das mórulas nos granulócitos (Carrade *et al.*, 2009). Contudo, os resultados serológicos positivos podem reflectir apenas exposição prévia ao agente, uma vez que o título de anticorpos se mantém por alguns meses. Assim, é importante a demonstração de um aumento de 4 vezes no título de anticorpos, num espaço de 4 semanas (Harrus *et al.*, 2005; Carrade *et al.*, 2009). A reacção de PCR é um método muito sensível e específico e permite o diagnóstico na fase aguda, quando ainda não são visíveis mórulas microscopicamente (Carrade *et al.*, 2009). O esfregaço sanguíneo também é importante, permitindo observar microscopicamente as mórulas no interior dos neutrófilos (raramente visível nos eosinófilos), no entanto, é um método que apresenta uma sensibilidade bastante baixa, uma vez que a parasitemia é transitória e as mórulas, quando presentes, existem em pequeno número (Greig & Armstrong, 2006; Carrade *et al.*, 2009).

**Tratamento e Profilaxia:** Os fármacos de eleição para o tratamento da AGC são a doxiciclina (5-10 mg/kg, PO, SID/BID, 10 dias) ou tetraciclina (22 mg/kg, PO, TID, 14-21 dias), geralmente com melhorias clínicas ao fim de 24-48 horas (Greig & Armstrong, 2006). A profilaxia é baseada no controlo dos ixodídeos no cão e no ambiente (já referido nas infecções por *Babesia* spp.), não existindo qualquer vacina preventiva contra a AGC (Greig & Armstrong, 2006; ESCCAP, 2012).

**Importância em Saúde Pública:** *A. phagocytophilum* é responsável pela anaplasose granulocítica nos humanos que, em casos graves, pode conduzir à morte (Greig & Armstrong, 2006; Silva *et al.*, 2006).

### 1.10.3 *Rickettsia conorii*

**Etiologia:** Os organismos da espécie *Rickettsia conorii*, pertencentes ao género *Rickettsia* (Rickettsiales, Rickettsiaceae), são bactérias Gram (-) intracelulares obrigatórias das células endoteliais (Dumler *et al.*, 2001; Greene & Breitschwerdt, 2006; Walker, 2007). Apesar desta espécie não ser considerada uma entidade clínica no cão doméstico, ela é endémica na Europa e em Portugal, e já foram realizados estudos que demonstraram a exposição do cão a este agente (Bacellar *et al.*, 1995; WHO, 2004; Alexandre, 2005; Figueiredo, 2008; Silva, 2010; Silva, 2011). O ixodídeo *R. sanguineus* é o seu principal vector e hospedeiro reservatório (Sousa, Nóbrega, Bacellar & Torgal, 2003; WHO, 2004), tendo, no entanto, sido demonstrado em 2012 que o cão é também hospedeiro reservatório deste hemoparasita (Levin, Killmaster & Zemtsova, 2012). A maioria das espécies do género *Rickettsia* está dividida em dois grupos: o da febre exantemática, no qual *R. conorii* está incluída, e o grupo do tifo (Greene & Breitschwerdt, 2006).

**Ciclo Biológico:** O ixodídeo infecta-se durante uma refeição sanguínea realizada num hospedeiro em fase de riquetsiémia; os parasitas são depois transmitidos aos estádios evolutivos subsequentes ou à descendência (Greene, 2006). Ainda, a transmissão nos ixodídeos pode também ocorrer por *cofeeding* (Levin *et al.*, 2012). A transmissão de *R. conorii* ao cão ocorre enquanto o vector infectado se alimenta neste. Todavia, para que ocorra infecção é necessário que haja fixação do ixodídeo durante, no mínimo, 5-20 horas (Greene & Breitschwerdt, 2006).

**Distribuição geográfica e Epidemiologia:** A riquetsiose por *R. conorii* é endémica na região do Mediterrâneo (WHO, 2004). *R. sanguineus* manifesta maior actividade e prevalência na Primavera/Verão, apesar das formas adultas serem encontradas durante todo o ano (Silva *et al.*, 2006), e como tal, é de esperar uma maior frequência da doença nos meses mais quentes (WHO, 2004). Contudo, no estudo de Alexandre (2005) foi demonstrado a inexistência de sazonalidade na seroprevalência de *R. conorii*. Estudos realizados em Portugal revelaram valores de seroprevalência para *R. conorii* que variaram entre 23,75% (Silva, 2011) e 85,6% (Bacellar *et al.*, 1995).

**Patogenia e Sinais clínicos:** Apesar de ser pouco conhecida a patogenicidade das infecções por *R. conorii* nos cães, é importante conhecer a patogenia da infecção. As riquetsias, após inoculadas, entram na circulação sanguínea e infectam as células endoteliais das arteríolas e vénulas lesionando-as, com consequente activação plaquetária e do sistema de coagulação e fibrinolítico. Segue-se o desenvolvimento de vasculite necrotizante, o aumento da permeabilidade vascular e a acumulação de fluidos nos tecidos (Greene & Breitschwerdt, 2006). No caso de *Rickettsia rickettsii* (espécie também pertencente ao grupo exantemático) todo este processo leva ao desenvolvimento de edema (pulmonar/cerebral), hemorragia, hipotensão e choque (Varela, 2003). Apesar da seroprevalência da infecção ser elevada, é incomum encontrar animais positivos para *R. conorii* com sinais clínicos. No entanto, numa infecção experimental surgiram alterações no local da injeção, como dor, eritema, edema e linfadenopatia regional (Kelly, Matthewman, Mason, Courtney, Katsande & Rukwava, 1992) e noutra infecção experimental os cães desenvolveram febre, anorexia e letargia (Levin *et al.*, 2012). Ainda, na Sicília surgiram três cães com história recente de infestação por carraças, apresentando febre, anorexia, letargia, claudicação e vômito intermitentes (Solano-Gallego, Kidd, Trotta, Marco, Caldin, Furlanello & Breitschwerdt, 2006a).

**Diagnóstico:** É baseado nos sinais clínicos e para o diagnóstico laboratorial é importante a informação sobre a existência de um contexto epidemiológico compatível. Alterações hematológicas e bioquímicas descritas para esta espécie incluem: trombocitopenia, anemia, neutrofilia, linfocitose, aumento da ALT, da gama glutamil transpeptidase (GGT), da ureia e da proteína C reactiva, hipoproteinémia, hipoalbuminémia, hiperglobulinémia (Solano-Gallego *et al.*, 2006a). A IFI é o primeiro teste de diagnóstico utilizado na prática clínica para a detecção da riquetsiose nos cães, apesar de ocorrerem reacções cruzadas entre espécies do mesmo género. A técnica de PCR é específica e sensível para a detecção de *R. conorii* (Greene & Breitschwerdt, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2006a). As infecções por *R. rickettsii* no cão e no ser humano podem também ser diagnosticadas por ELISA e *Western immunoblot*, imunodeteção em biópsias e culturas celulares (Parola, Paddock & Raoult, 2005; Greene & Breitschwerdt, 2006).

**Tratamento e Profilaxia:** Apesar da riquetsiose canina causada por *R. conorii* não ser ainda considerada uma entidade clínica e por isso não existir um tratamento padrão, relatos associados à doença em dois dos canídeos na Sicília documentaram o tratamento com doxiciclina, com resolução dos sinais clínicos em dois dias. No outro caso foi utilizada a ceftriaxona, sem actividade anti-riquetsia conhecida, mas com resolução dos sinais clínicos em quatro dias, o que leva a supor uma recuperação imunitária espontânea (Solano-Gallego *et al.*, 2006a). A profilaxia é baseada no controlo dos vectores no cão e no ambiente, não existindo ainda vacinas disponíveis no mercado (Greene & Breitschwerdt, 2006)

**Importância em Saúde Pública:** *R. conorii* é o agente da febre escaro-nodular nos humanos, doença de declaração obrigatória em Portugal (Sousa *et al.*, 2003; WHO, 2004). Em 2008 verificou-se no país uma maior prevalência da doença nas regiões do Centro e Lisboa e Vale do Tejo (Direcção Geral da Saúde [DGS], 2010).

#### **1.10.4 Hepatozoon canis**

**Etiologia:** A espécie *Hepatozoon canis*, protozoário do género *Hepatozoon* (Apicomplexa, Hepatozoidae), é transmitida pelo vector *R. sanguineus* e causa a hepatozoonose canina (Baneth, 2006; Baneth, Samish & Shkap, 2007; Baneth 2011). Para além desta espécie de ixodídeo, outras espécies têm sido implicadas, ou suspeitas, de serem vectores de *H. canis* (Baneth, 2011). Através de estudos realizados no Brasil, foi demonstrado experimentalmente que *Amblyomma ovale* é também vector deste protozoário (Forlano, Scofield, Elisei, Fernandes, Ewing & Massard, 2005; Rubini, Paduan, Martins, Labruna & O'Dwyer, 2009). Murata, Inoue, Taura, Nakama, Abe e Fujisaki (1995) propõem *Haemophysalis longicornus* e *Haemophysalis flava* como potenciais espécies de vectores de *H. canis*, mas sem demonstrarem a transmissão efectiva (Baneth, 2011).

**Ciclo biológico:** Na hepatozoonose canina, ao contrário da maior parte das doenças transmitidas por carraças, os cães infectam-se através da ingestão das mesmas. Os ixodídeos contêm esporozoítos infectantes de *Hepatozoon*, que são libertados no intestino e penetram na parede intestinal do cão. Depois, invadem as células mononucleares, e atingem, por via hemática ou linfática, os tecidos linfáticos e hematopoiéticos (medula óssea, linfonodos e baço, e ainda outros como os pulmões, o fígado e os rins), onde formam merontes, que contêm no seu interior merozoítos, divididos assexualmente por merogonia. Posteriormente, alguns dos merozoítos invadem neutrófilos e monócitos circulantes e diferenciam-se em gamontes. A carraça infecta-se ao ingerir os leucócitos contendo os gamontes, durante a alimentação num cão com parasitemia. No intestino do vector, os gamontes diferenciam-se em gâmetas feminino e masculino. Após fertilização e a esporogonia, ocorre a formação de oocistos no hemocelo, que consistem em membranas que envolvem centenas de esporocistos, no interior dos quais se encontram os esporozoítos infectantes (Baneth, Samish, Alekseev, Aroch & Shkap, 2001; Baneth *et al.*, 2007; Baneth 2011).

A transmissão transtadial foi documentada em *R. sanguineus* por Baneth *et al.* (2001) e a transmissão transuterina foi demonstrada por Murata, Inoue, Tateyama, Taura e Nakama (1993) em infecções verticais experimentais de cachorros com *H. canis* de 1990 a 1992 (Baneth, 2011).

**Distribuição geográfica e Epidemiologia:** A infecção autóctona por *H. canis* está documentada principalmente em regiões de clima temperado, tropical e subtropical, uma vez que é nesses locais que se encontra em maior abundância o seu vector ixodídeo, estando a

infecção sempre dependente da actividade dos vectores (Baneth, 2007; Baneth 2011). A presença de *H. canis* foi primeiramente descrita na Índia (Baneth, 2011); depois foi relatada em cães de países da Europa (incluindo Portugal), Ásia, África, América do Sul, América do Norte e Médio Oriente (Oyamada *et al.*, 2005; Jittapalapong, Rungphisutthipongse, Maruyama, Schaefer & Stich, 2006; Allen, Li, Kaltenboeck, Johnson, Reichard, Panciera & Little, 2008; Vojta, Mrljak, Curkovic, Zivicnjak, Marinculic & Beck, 2009; Cardoso *et al.*, 2010b; Baneth, 2011; Yisaschar-Mekuzas *et al.*, 2012).

**Patogenia e Sinais clínicos:** As infecções são geralmente assintomáticas em cães saudáveis (baixos níveis de parasitémia – 1-5%), mas podem ser graves e até mesmo pôr em risco a vida do animal (parasitémias elevadas – próximo de 100%). *H. canis* é geralmente considerado um agente oportunista, sendo a patogenia da doença influenciada por situações de imunossupressão, induzida por doença concomitante ou por tratamentos imunossupressores, e em situações em que os sistemas imunitários são imaturos (animais jovens). A anemia é a alteração hematológica mais frequente; em casos de elevada parasitémia, é geralmente acompanhada por uma intensa neutrofilia. Também é comum encontrar hipertermia, letargia, perda de peso, hiperproteinémia, hiperglobulinémia, hipoalbuminémia, aumento da creatinina cinase e da FAS, esplenomegália, hepatomegália, linfadenomegália, hepatite, pneumonia intersticial e glomerulonefrite. Ainda que raro, já foram documentadas periostite e dor muscular (Baneth, Harmelin & Presentey, 1995; Baneth & Weigler, 1997; Baneth, 2006; Marchetti, Lubas, Baneth, Modenato & Mancianti, 2009; Baneth, 2011).

Num estudo realizado na Turquia, foi possível relacionar o grau de gravidade dos sinais clínicos, com o nível de parasitémia: cães com doença grave apresentaram maiores níveis de parasitémia, em comparação com cães com sinais clínicos ligeiros a moderados (Karagenc, Pasa, Kirli, Hosgor, Bilgic, Ozon, Atasoy & Eren, 2006).

A ocorrência de co-infecções de *H. canis* com outros agentes é habitual, como com *E. canis*, *B. vogeli*, *B. canis* e *A. phagocytophilum* (Baneth, 2011).

**Diagnóstico:** Sendo frequentemente uma infecção sub-clínica, o diagnóstico clínico de hepatozoonose canina é pouco evidente. Assim, a infecção por *H. canis* é usualmente diagnosticada por microscopia, ao serem detectados os gamontes intracelulares em neutrófilos e monócitos em esfregaços sanguíneos; também é possível a detecção de merontes na observação de citologias realizadas a partir de tecidos infectados, como medula óssea ou linfonodos. Outros métodos incluem a detecção de anticorpos anti-*H. canis* por IFI ou ELISA e a detecção do DNA do parasita recorrendo à técnica de PCR (Baneth, Shkap, Presentey & Pipano, 1996; Mylonakis, Leontides, Gonen, Billinis, Koutinas & Baneth, 2005; Karagenc *et al.*, 2006; Baneth *et al.*, 2007; Criado-Fornelio, Buling, Cunha-Filho, Ruas, Farias, Rey-Valeiron, Pingret, Etievant & Barba-Carretero, 2007a; Li, Wang, Allen, Little, Ahluwalia, Gao, Macintire, Blagburn & Kaltenboeck, 2008; Baneth, 2011).

**Tratamento e Profilaxia:** O tratamento é realizado com dipropionato de imidocarb (5-6mg/kg, SC/IM, 2-2 semanas até desaparecimento dos gamontes no esfregaço sanguíneo) (Baneth & Weigler, 1997; Baneth, 2006; Baneth, 2011). Contudo, Sasanelli, Paradies, Greco, Eyal, Zaza e Baneth (2010) demonstraram que o imidocarb não é completamente eficaz a eliminar o parasita em cães tratados repetidamente com esse fármaco durante oito meses. A associação de doxiciclina (10mg/kg/dia, 28 dias) é recomendada para combater possíveis agentes transmitidos pelo mesmo vector, como é o caso de *E. canis*. A profilaxia é baseada no controlo dos vectores no cão e no ambiente, não existindo vacinas preventivas da doença disponíveis no mercado (Baneth, 2006).

## **Capítulo IV. Estudo – Detecção de *Babesia* spp. e de outros hemoparasitas em cães, por técnicas morfológicas, serológicas e moleculares, no distrito de Lisboa, Portugal**

### **1 Objectivos**

O trabalho experimental realizado nesta dissertação de mestrado teve como objectivos: a) a detecção de *Babesia* spp. por esfregaço sanguíneo e qPCR e de *Babesia canis/Babesia vogeli/B. rossi* por imunofluorescência indirecta, no distrito de Lisboa; b) a identificação das espécies de *Babesia*, uma vez que são desconhecidos quais os agentes responsáveis pela infecção nesta área geográfica; c) identificar a presença, nos animais estudados, de co-infecções com *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. através de esfregaços sanguíneos e qPCR, com *Rickettsia* spp. através de qPCR e com *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Rickettsia conorii* por imunofluorescência indirecta, considerando que nas zonas endémicas de doenças transmitidas por ixodídeos, como Lisboa, é frequente encontrar cães co-infectados com mais do que um agente causador dessas doenças.

### **2 Materiais e métodos**

#### **2.1 Caracterização da população em estudo**

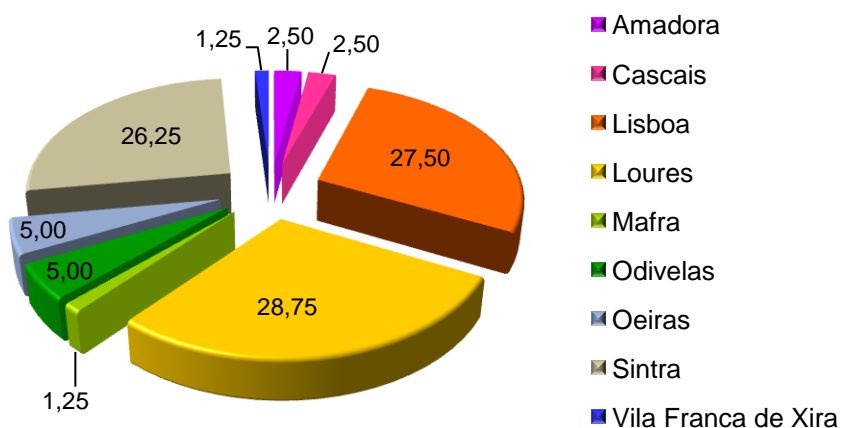
A população em estudo consistiu numa amostra total de 80 cães, que foram sub-divididos em dois grupos: cães residentes em canis e cães que se apresentaram à consulta num hospital veterinário. A colheita de amostras a estes animais decorreu entre os meses de Setembro a Novembro de 2011.

Relativamente aos cães de canil, foram incluídos no estudo 20 cães do canil municipal de Sintra (concelho de Sintra, distrito de Lisboa) e 20 cães do canil do Hotel Quinta do Sol, em Bucelas (concelho de Loures, distrito de Lisboa). Quanto aos cães que se apresentaram à consulta, o rastreio incluiu 20 cães que foram levados à consulta ao Hospital Escolar da FMV, em Lisboa (concelho e distrito de Lisboa), e 20 cães que foram levados à consulta ao Hospital Veterinário da Estefânia, em Lisboa (concelho e distrito de Lisboa).

A distribuição do número de animais (n) por freguesia foi a seguinte: Alfragide (n=1), Algés (n=1), Algueirão-Mem Martins (n=20), Alvalade (n=1), Benfica (n=2), Bobadela (n=1), Bucelas (n=20), Campolide (n=1), Carnaxide (n=1), Cascais (n=1), Coração de Jesus (n=1), Graça (n=1), Lumiar (n=2), Marvila (n=2), Massamá (n=1), Mercês (n=1), Nossa Senhora de Fátima (n=4), Odivelas (n=4), Oeiras (n=1), Portela da Azóia (n=1), Póvoa de Santa Iria (n=1), Reboleira (n=1), Santo Amaro de Oeiras (n=1), São Domingos de Benfica (n=1), São Domingos de Rana (n=1), São João da Talha (n=1), São Jorge de Arroios (n=4), São Sebastião (n=1), São Vicente de Fora (n=1) e Venda do Pinheiro (n=1). Estas freguesias estão distribuídas por vários concelhos do distrito de Lisboa, de entre os quais, Amadora

(n=2), Cascais (n=2), Lisboa (n=22), Loures (n=23), Mafra (n=1), Odivelas (n=4), Oeiras (n=4), Sintra (n=21) e Vila Franca de Xira (n=1) (Gráfico 1).

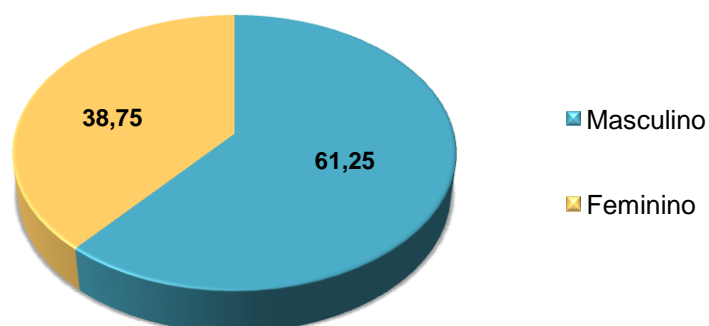
Gráfico 1: Frequência relativa (%) da distribuição dos 80 animais da população pelos concelhos de Lisboa.



A escolha dos cães foi efectuada aleatoriamente, independentemente do sexo, idade, raça e estado clínico do animal. No entanto, os cães de canil deveriam estar alojados nos canis há mais de seis meses, de modo a garantir um período razoável de exposição aos vectores ixodídeos, e os cães apresentados à consulta deveriam viver no distrito de Lisboa, visto que o estudo incidiu apenas nesta área.

Da totalidade dos 80 animais testados, 49 (61,25%) eram do sexo masculino e 31 (38,75%) do sexo feminino (Gráfico 2).

Gráfico 2: Frequência relativa (%) da distribuição dos animais da amostra por sexo.



No que diz respeito à idade, para facilitar o tratamento dos dados, os cães foram agrupados por classes de idades, consoante a Tabela 2.

Tabela 2: Frequência absoluta e frequência relativa (%) da distribuição dos animais da amostra por idades.

<b>Idade (anos)</b>	<b>Frequência Absoluta</b>	<b>Frequência Relativa (%)</b>
<b>≤ 1</b>	15	18,75
<b>2-5</b>	22	27,5
<b>6-9</b>	25	31,25
<b>≥ 10</b>	18	22,5

Quanto à raça dos cães incluídos neste estudo, a maioria era sem raça determinada (SRD), representando 66,25% da amostra (Tabela 3).

Tabela 3: Frequência absoluta e frequência relativa (%) da distribuição dos animais da amostra por raça.

<b>Raças</b>	<b>Frequência Absoluta</b>	<b>Frequência Relativa (%)</b>
<b>American Staffordshire Bull Terrier</b>	1	1,25
<b>Bouvier Bernois</b>	1	1,25
<b>Doberman</b>	1	1,25
<b>Golden Retriever</b>	1	1,25
<b>Husky</b>	2	2,5
<b>Labrador</b>	8	10
<b>Pastor Alemão</b>	2	2,5
<b>Pastor Belga</b>	1	1,25
<b>Perdigueiro português</b>	2	2,5
<b>Pit Bull</b>	3	3,75
<b>Pointer</b>	1	1,25
<b>Rottweiler</b>	2	2,5
<b>Serra da Estrela</b>	2	2,5
<b>SRD*</b>	53	66,25

(\*) SRD: Sem raça determinada.

Desconhecia-se o estado de vacinação e desparasitação dos animais de canil, aquando da sua entrada. Porém, desde a sua admissão no canil municipal de Sintra, foi efectuada a desparasitação externa mensal em todos os animais e realizada anualmente a vacina da raiva. Nos cães de canil do Hotel Quinta do Sol, desde a sua entrada naquelas instalações, foram realizadas mensalmente a desparasitação externa, de três em três meses a desparasitação interna e anualmente vacinação contra a raiva.

Todos os animais foram sujeitos a um exame de estado geral, acompanhado do preenchimento de um inquérito (Anexo II e Anexo III) onde foram recolhidos dados sobre cada animal. No caso dos cães residentes em canis, os inquéritos incluíram informações sobre história pregressa, características físicas, tempo de permanência no canil, acesso ao exterior, contacto com outros cães e com ixodídeos, história de febre da carraça, profilaxia ectoparasiticida, vacina contra a babesiose, doenças concomitantes e terapêutica actual. Em relação aos animais que se apresentaram à consulta num hospital, os questionários incluíram ainda informação sobre aptidão, proveniência, acesso ao exterior, viagens e tipo de alojamento. Cada animal que se apresentou à consulta em ambos os hospitais veterinários teve um acompanhamento clínico mais pormenorizado, contudo, tal situação não apresentou relevância para o desenvolvimento deste estudo, uma vez que o que foi pretendido foi sobretudo a detecção e a identificação de espécies de *Babesia* nos animais que fossem positivos a este agente e, portanto, essa informação pormenorizada não será incluída nesta dissertação de mestrado.

De referir ainda, que nenhum dos 80 cães era suspeito de doença transmitida por vectores.

## **2.2 Colheita de amostras e processamento**

A cada animal foram colhidos 8ml de sangue de uma veia periférica (veia safena, cefálica ou jugular) e depois distribuídos 5ml por dois tubos com EDTA (do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*) de 2,5ml e 3 ml para um tubo seco, sendo mantidos em refrigeração até serem transportados para o laboratório. A partir do sangue contido nos tubos com EDTA foram realizados dois esfregaços sanguíneos por animal e os tubos depois armazenados a -80°C para posterior extracção de DNA, de acordo com as instruções do fabricante (ArchivePure DNA Blood Kit – 30 ml<sup>®</sup> [5 PRIME]). A colheita e armazenamento de soro foram realizados de acordo com o protocolo implementado no Laboratório de Doenças Parasitárias, da FVM, UTL. Deste modo, os tubos secos foram centrifugados a 1500 rpm durante 10 minutos para a colheita de soro, o qual foi colocado em tubos *ependorf* e armazenado a -20°C para posterior realização da técnica de imunofluorescência indirecta, para pesquisa de anticorpos.

### 2.3 Esfregaços sanguíneos

Os esfregaços de sangue foram corados segundo a coloração rápida de Giemsa. Assim, depois de realizar o esfregaço sanguíneo numa lâmina de vidro identificada com o nome do respectivo animal, a lâmina ficava a secar ao ar durante cerca de 10 minutos, seguindo-se a fixação com metanol durante um minuto e coloração com corante Giemsa puro durante mais um minuto. Seguidamente as lâminas foram passadas em água corrente para remover o excesso de corante, secas ao ar e armazenadas à temperatura ambiente para posterior observação em microscópio óptico (objectiva x40 e x100 e ocular x10), no Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV, UTL.

A observação microscópica de cada esfregaço sanguíneo foi realizada com as ampliações de 400x e 1000x, sempre com início na periferia do esfregaço. Em cada lâmina foram observados 100 campos aleatórios para a pesquisa dos agentes em estudo, de modo a garantir que apesar das diferenças nas áreas dos esfregaços, todos foram observados com o mesmo rigor e segundo a mesma área.

### 2.4 Testes serológicos

A pesquisa de anticorpos contra *B. canis*/*B. vogeli*/*B. rossi*, *E. canis*, *A. phagocytophilum* e *R. conorii* foi realizada por IFI no Laboratório de Doenças Parasitárias, da FMV, UTL, utilizando testes comerciais fabricados pelo laboratório Megacor® e segundo as instruções do fabricante (Anexo IV). De notar que o teste comercial da Megacor® que indica a detecção de anticorpos contra *B. canis*, detecta na realidade e simultaneamente *B. canis*, *B. vogeli* e *B. rossi*, não fazendo diferenciação entre as três espécies, uma vez que a empresa considera ainda a existência de uma única espécie de *Babesia* que infecta o cão, *B. canis*, a qual inclui as três subespécies: *B. canis canis*, *B. canis vogeli* e *B. canis rossi* (comunicação pessoal Angela Kern, *product manager*, Outubro 30, 2012). Para melhor compreensão e uniformização, na dissertação de mestrado utilizar-se-á a designação *B. canis* para a indicar a detecção simultânea de *B. canis*/*B. vogeli*/*B. rossi* por IFI.

Em resumo, as lâminas de substracto dos diferentes testes consistiam, para *B. canis*, em poços contendo eritrócitos caninos infectados com o parasita fixados, na forma dos característicos merozoítos citoplasmáticos, para *E. canis*, em poços contendo macrófagos caninos em que 20-30% estavam infectados com a bactéria, contendo as características mórulas citoplasmáticas, para *A. phagocytophilum*, em poços contendo neutrófilos caninos em que aproximadamente 20-30% estavam infectados com a bactéria, contendo as típicas mórulas citoplasmáticas e, finalmente, para *R. conorii*, em poços contendo células infectadas com a bactéria. As amostras de soro canino foram diluídas em tampão e incubadas nos poços individuais para permitir a reacção dos anticorpos do animal com os antígenos de *B. canis*, *E. canis*, *A. phagocytophilum* e *R. conorii*, respectivamente. As lâminas foram então lavadas com PBS (do inglês *phosphate buffered saline*) para remover

as proteínas séricas não reactivas, adicionando-se posteriormente o conjugado respectivo (anticorpo imunoglobulina G anti-canino ligado ao corante fluorescente). Após 30 minutos de contacto entre conjugado e complexo antígeno-anticorpo, as lâminas foram novamente lavadas com PBS para remover o conjugado não reactivo. As reacções resultantes puderam ser visualizadas utilizando a microscopia de fluorescência convencional, em que uma reacção positiva foi visualizada, no caso de *B. canis*, como um merozoíto de fluorescência verde-maçã bem definida, dentro do citoplasma dos eritrócitos infectados, em cada campo, no caso de *E. canis* e *A. phagocytophilum*, como uma mórula com fluorescência verde-maçã bem definida dentro das células infectadas, em cada campo e, no caso de *R. conorii*, como estruturas em forma de cocobacilo, com fluorescência verde-maçã bem definida, dentro do citoplasma das células infectadas, em cada campo. Uma reacção negativa era visualizada em todos os testes, ou como células coradas de vermelho, ou por fluorescência diferente daquela observada no poço do controlo positivo.

Os resultados positivos indicaram a presença de anticorpos como reflexo da infecção num dado período. Os limiares de positividade foram determinados pela diluição limite em que existia positividade, e foram utilizados aqueles recomendados pelo laboratório Megacor®, variando consoante o teste: *B. canis* 1:32, *E. canis* 1:40, *A. phagocytophilum* 1:50 e *R. conorii* 1:64.

Para reduzir o erro que poderia surgir da interpretação do operador, todas as lâminas de IFI foram observadas pela mesma pessoa, e o resultado positivo ou negativo de cada amostra foi emitido em comparação com os controlos positivo e negativo da respectiva lâmina.

## 2.5 Extração de DNA

A extração do DNA das amostras de sangue armazenadas em tubos com EDTA congeladas a -80°C foi feita no Laboratório de Diagnóstico Biomolecular, do ITQB, da Universidade Nova de Lisboa, em Oeiras, em 300µL de sangue, utilizando o ArchivePure DNA Blood Kit – 30 ml<sup>®</sup> (5 PRIME) segundo as indicações do fabricante, mas com algumas modificações (Anexo V). Após a extração, o DNA foi quantificado no Nanodrop 2000c Spectrophotometer<sup>®</sup> (Thermo Scientific) e as amostras armazenadas a -20°C para posterior amplificação por reacção de PCR.

## 2.6 Métodos moleculares

A amplificação dos segmentos do DNA de *Babesia* spp. foi efectuada pela técnica de qPCR, recorrendo às sondas Taqman<sup>®</sup>, segundo um protocolo implementado no Laboratório de Virologia, FMV, UTL, utilizando *primers* e sonda cujas sequências nucleotídicas foram escolhidas pelo laboratório através do programa Primer 3 e BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Marques, Duarte, Leal, Santos, Veloso, Meireles, Santos-Silva, Tavares & da Fonseca, 2012). Os *primers* e a sonda permitem a

detecção de hemoparasitas pertencentes ao género *Babesia*. Seguidamente, de modo a obter um fragmento de DNA de maior tamanho que pudesse ser sequenciado e que permitisse a identificação da espécie envolvida na infecção, as amostras positivas à reacção de qPCR foram submetidas a um protocolo de cPCR que identifica em simultâneo os géneros *Babesia* e *Theileria*, não fazendo, no entanto, distinção entre ambos. Este protocolo estava previamente estabelecido no Laboratório de Diagnóstico Biomolecular do ITQB, tendo como referência o protocolo descrito por Gubbles, De Vos, Van Der Weide, Viseras, Schouls, De Vries e Jongejan (1999). Este método de amplificação foi descrito para a detecção e amplificação do gene 18S rRNA (do inglês *Ribosomal ribonucleic acid*) de todas as espécies pertencentes aos géneros *Babesia* e *Theileria* que infectam os bovinos (Gubbles *et al.*, 1999). Contudo, Aktas, Altay e Dumanh (2005) descreveram a amplificação de *B. canis* com a utilização destes *primers*, cuja sequência nucleotídica pode ser consultada na Tabela 4. Ainda, esses *primers* foram alinhados com sequências previamente descritas e disponíveis no GenBank, através de uma análise BLAST (do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*), disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Esta análise permitiu verificar que esses *primers* emparelhavam com sequências correspondentes às espécies de *Babesia* que infectam o cão e que se sabem existir em Portugal: *B. canis*, *B. vogeli* e *T. annae* (*B. microti*-like) (Cardoso *et al.*, 2008; Simões *et al.*, 2011), mas também que apresentavam igual homologia e emparelhavam com outros agentes infectantes do cão, como *H. canis*.

Tabela 4: Sequência nucleotídica dos *primers* utilizados para a amplificação de *Babesia* spp./*Theileria* spp. por cPCR (Gubbels *et al.* 1999).

Agente a pesquisar	Gene alvo	Primer e Sequência nucleotídica (5' – 3')	Tamanho do fragmento (pb)
<i>Babesia</i> spp./ <i>Theileria</i> spp.	18S rRNA	RLB F: GAGGTAGTGACAAGAAATAACAATA RLB R: TCTTCGATCCCCTAACTTTC	460-520

As condições de amplificação do DNA por cPCR para os géneros *Babesia* e *Theileria* e as concentrações dos diversos reagentes utilizados, podem ser consultados no Anexo VI.

A detecção do DNA de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. e *Rickettsia* spp. foi efectuada através do método de qPCR (Taqman®), segundo protocolos implementados no Laboratório de Virologia, FMV-UTL, utilizando *primers* e sondas cujas sequências nucleotídicas foram escolhidas pelo laboratório através do programa Primer 3 e BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Marques, Duarte, Leal, Santos, Veloso, Meireles, Santos-Silva, Tavares & da Fonseca, 2012). Das reacções de qPCR realizadas,

uma permitiu a detecção simultânea dos géneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* (mas não fazendo a sua distinção), enquanto a outra possibilitou a detecção do género *Rickettsia* isoladamente. Em todas as reacções de qPCR foram utilizados controlos positivos para as reacções de amplificação de *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp. e *Rickettsia* spp., específicos para o agente a pesquisar, previamente sequenciados pela empresa StabVida, Portugal e cedidos pelo Laboratório de Virologia, FMV, UTL. Na reacção de cPCR para a detecção de *Babesia* spp./*Theileria* spp. foram utilizados controlos positivos de *Babesia ovis* sequenciados pela empresa StabVida, Portugal, e cedidos pelo Laboratório de Diagnóstico Biomolecular do ITQB.

Em todas as reacções foram também utilizados controlos negativos, que se obtiveram substituindo o volume do DNA a adicionar em cada reacção, por um volume igual de água estéril, e a ausência da sua amplificação permitiu excluir contaminações e validar as reacções de PCR efectuadas.

Na reacção de qPCR, a amplificação e a detecção simultânea do sinal de fluorescência, foram efectuadas através do modelo ABI 7300 da *Applied Biosystems* (ABI).

Após cada reacção de cPCR, os produtos amplificados foram submetidos a electroforese, a qual permite separar os fragmentos do DNA com base na sua carga eléctrica e de acordo com o seu tamanho (Brown, 2006). A electroforese foi realizada em gel de agarose a 2%, ao qual foi adicionado SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) (1,5µL/50ml de gel), que corresponde a um corante com capacidade de ligação aos ácidos nucleicos e, quando excitado por radiação ultravioleta (UV), emite fluorescência, permitindo, assim, a detecção das bandas do DNA no gel. O gel foi imerso em tampão TBE 1X, também utilizado como tampão de corrida, num aparelho de electroforese horizontal (BIO-RAD, MINI-SUB®). Cada ensaio de electroforese durou 40 minutos e foi utilizada uma tensão de 80V. A cada produto de reacção de PCR foi adicionado uma substância corante (Blue/Orange 6X Loading Dye® - Promega, numa diluição de 1:5) que permitiu observar a migração das bandas no gel e que confere uma maior densidade à amostra, permitindo que ela permaneça no respectivo poço no gel de agarose. De modo a verificar qual o tamanho dos fragmentos amplificados, por comparação, foi utilizado um marcador de peso molecular (100bp DNA ladder® - Promega) com uma gradação de 100 pares de bases. Após a electroforese, os produtos amplificados foram visualizados num aparelho transiluminador (UV Transilluminator® - UVP) e a existência de DNA foi verificada pela presença de bandas com peso molecular específico que emitiam fluorescência, quando excitadas por radiação UV. A impressão de fotografias reveladoras dessa positividade foi feita através do software Video Graphic Printer UP 897MD® (Sony).

## 2.7 Purificação e sequenciação dos fragmentos de DNA amplificados por PCR convencional

A purificação dos fragmentos de DNA foi realizada utilizando o Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), segundo as instruções do fabricante, de modo a recuperar o DNA pretendido a partir dos produtos amplificados por cPCR. Primeiramente, adicionou-se ao produto de amplificação um volume igual de *Membrane Binding Solution*. Em seguida, para cada produto resultante da amplificação por PCR, colocou-se um *SV Minicolumn* num tubo colector, para o qual foi transferido o produto de PCR amplificado, ficando a incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente. Depois, centrifugou-se o *SV Minicolumn* e o tubo colector montados, a 14000rpm durante 1 minuto, e no final o líquido do tubo colector foi descartado. Lavou-se então a coluna através da adição de 700 µL de *Membrane Wash Solution* (previamente diluída com 95% de etanol) ao *SV Minicolumn* e centrifugou-se o *SV Minicolumn* durante 1 minuto a 14000rpm. No final da centrifugação, esvaziou-se novamente o tubo colector, repetiu-se a lavagem com 500 µL de *Membrane Wash Solution*, centrifugou-se o *SV Minicolumn* durante 5 minutos a 14000rpm, esvaziou-se o tubo colector e centrifugou-se *SV Minicolumn* e o tubo colector montados durante 1 minuto e com a tampa da centrifugadora aberta, para permitir a evaporação do etanol residual. Seguidamente, transferiu-se cuidadosamente o *SV Minicolumn* para um tubo novo de 1,5 ml, aplicou-se 50 µL de *Nuclease-Free Water* directamente no centro da coluna, incubou-se a temperatura ambiente durante 1 minuto e centrifugou-se uma última vez durante 1 minuto a 14000rpm. Finalmente, o *SV Minicolumn* foi descartado e o tubo de 1,5 ml contendo o DNA diluído foi armazenado a 4°C. A sequenciação dos fragmentos amplificados e assim purificados foi realizada na empresa StabVida, Portugal.

## 2.8 Análise estatística

Os dados obtidos foram armazenados através do programa *Microsoft Office Excel 2007* e a sua análise estatística foi realizada recorrendo às plataformas de cálculo *Epitools* e *R* (versão 2.15.1; R Core Team, 2012). Em relação à primeira, esta permitiu calcular as prevalências dos hemoparasitas em estudo, com intervalos de confiança (IC) de 95%, segundo os limites de Blaker (Reiczigel, Földi & Ózsvári, 2010). Neste método, a sensibilidade e especificidade dos diferentes meios de diagnóstico permitem ajustar as prevalências calculadas. Em relação à IFI, a sensibilidade e especificidade dos testes do laboratório Megacor® para *E. canis* é de 95,5% e 94,3%, respectivamente, e para *A. phagocytophilum* de 94,3% e 95,5%, respectivamente. Contudo, este laboratório não possuía estudos de sensibilidade e especificidade para *B. canis* e *R. conorii* (comunicação pessoal Angela Kern, *product manager*, Setembro 17, 2012), pelo que, para a determinação da prevalência para estes dois agentes, foram assumidos valores de 100% para ambas as

variáveis. Para os testes de qPCR foram consideradas sensibilidades e especificidades de 100%.

A determinação de eventuais associações estatísticas foi possível recorrendo ao *software R Commander*. Para esta avaliação foram elaboradas tabelas de contingência e empregue o Teste Exacto de Fisher, sendo o nível de significância assumido  $p < 0,05$ , para um intervalo de confiança de 95%. Foi avaliada a influência de factores como a idade, o sexo, a raça, o concelho de residência, a presença de carraças (classificada em positiva ou negativa, se os donos tivessem observado ou não carraças no animal), o acesso ao exterior (classificado em permanente ou intermitente, se o animal estivesse ou não permanentemente no exterior) e a eficiência da profilaxia ectoparasiticida (classificada em eficiente ou ineficiente, quando foi respeitado ou não as instruções do fabricante, no que diz respeito à frequência e forma de aplicação) sobre a positividade a *Babesia* spp. e *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp. determinada por qPCR e a positividade a *B. canis*, *E. canis*, *A. phagocytophilum* e *R. conorii* determinada por IFI.

### 3 Resultados

#### 3.1 Detecção de hemoparasitas por esfregaço sanguíneo

A pesquisa por esfregaço sanguíneo não evidenciou em nenhum dos 80 animais a presença dos hemoparasitas visados inicialmente neste estudo. Contudo, foi detectada a presença de *Hepatozoon* spp. em dois cães (prevalência de 2,5%), ambos os parasitas com forma elíptica e dimensões  $11\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ , sendo morfologicamente semelhantes a *H. canis* (Baneth, Mathew, Shkap, Macintire, Barta & Ewing, 2003) (Figura 1 e Figura 2).

Figura 1: *Hepatozoon* spp. em neutrófilo de cão, obj. x100, oc. x10; cão que foi levado à consulta (original).

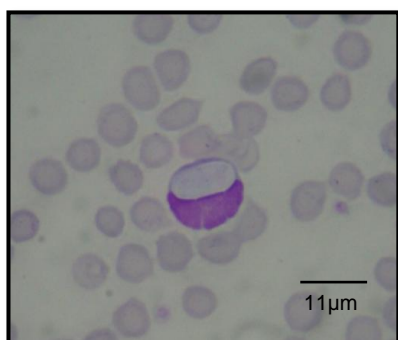


Figura 2: *Hepatozoon* spp. em neutrófilo de cão, obj. x100, oc. x10; cão de canil (original).



Os dois animais positivos a *Hepatozoon* spp. provinham de origens diferentes: um foi levado à consulta num hospital veterinário, e cuja freguesia e concelho de residência eram Portela

da Azóia e Loures, respectivamente, e o outro era um cão de canil da freguesia Algueirão-Mem Martins do concelho de Sintra. Ambos eram machos de raça indefinida, pertencentes à classe de idade 6-9 anos e com acesso permanente ao exterior. Ao contrário do animal que se apresentou a consulta, o qual já tinha sido visto com carraças e era-lhe realizada uma profilaxia ineficiente, ao cão de canil era aplicada uma profilaxia ectoparasiticida eficiente. Todavia, não foi possível obter informação sobre se tinham sido observadas carraças no animal de canil.

### 3.2 Detecção de anticorpos por imunofluorescência indirecta

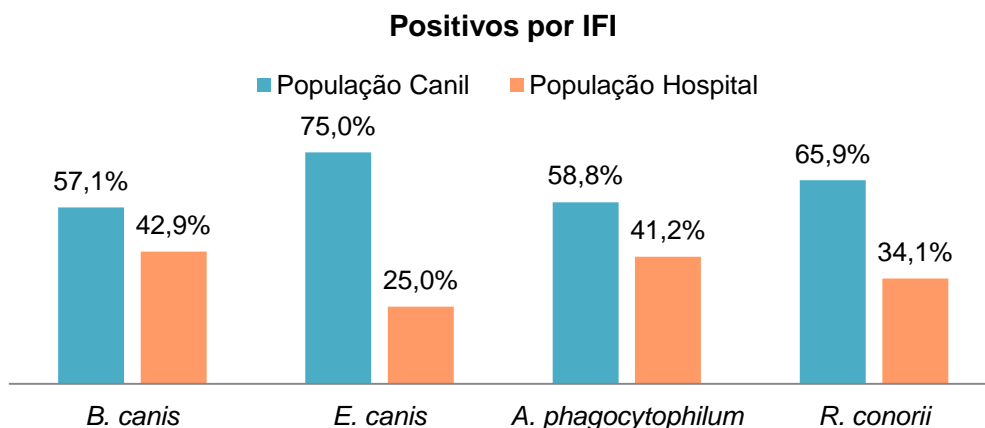
Relativamente aos métodos indirectos e à detecção de anticorpos anti-agentes causadores de doença, a IFI permitiu o cálculo da seroprevalência nos 80 cães amostrados. Assim, o estudo revelou uma maior seroprevalência de *R. conorii* (55%), seguida de *A. phagocytophilum* (18,7%), *B. canis* (17,5%) e finalmente de *E. canis* (4,8%) (Tabela 5).

Tabela 5: Frequência absoluta, prevalência aparente, prevalência real e respectivos intervalos de confiança de 95%, dos diferentes hemoparasitas testados por IFI na amostra populacional.

Agente	Frequência Absoluta	Prevalência Aparente (%)	IC de 95%	Prevalência Real (%)	IC de 95%
<i>B. canis</i>	14	17,5	10,5-27,3	17,5	10,5-27,3
<i>E. canis</i>	8	10	4,4-18,4	4,8	0-14,2
<i>A. phagocytophilum</i>	17	21,2	13,4-31,8	18,7	9,9-30,3
<i>R. conorii</i>	44	55	43,7-65,8	55	43,7-65,8

Dos 14 animais positivos por IFI a *B. canis*, 8 eram cães de canil (57,1%) e 6 eram cães que foram levados à consulta a um hospital veterinário (42,9%). Dos 8 animais positivos por IFI a *E. canis*, 6 eram provenientes de canil (75%) e 2 de hospital veterinário (25%). Dos 17 animais positivos por IFI a *A. phagocytophilum*, 10 eram cães de canil (58,8%) e os restantes 7 foram levados à consulta (41,2%). Por fim, dos 44 animais positivos por IFI a *R. conorii*, 29 eram de canil (65,9%) e 15 da consulta veterinária (34,1%) (Gráfico 3).

Gráfico 3: Distribuição da percentagem de animais positivos por IFI a *B. canis*, *E. canis*, *A. phagocytophilum* e *R. conorii*, pelas populações de cães de canil e cães que se apresentaram à consulta num hospital veterinário.



O aspecto das amostras positivas e negativas pela técnica de IFI pode ser observado na Figura 3, Figura 4, Figura 5 e na Figura 6.

Figura 3: Resultados de *B. canis* obtidos por IFI, evidenciando o aspecto do controlo positivo (A), de uma amostra positiva (B), do controlo negativo (C) e de uma amostra negativa (D). Obj. x100, oc. x10 (original).

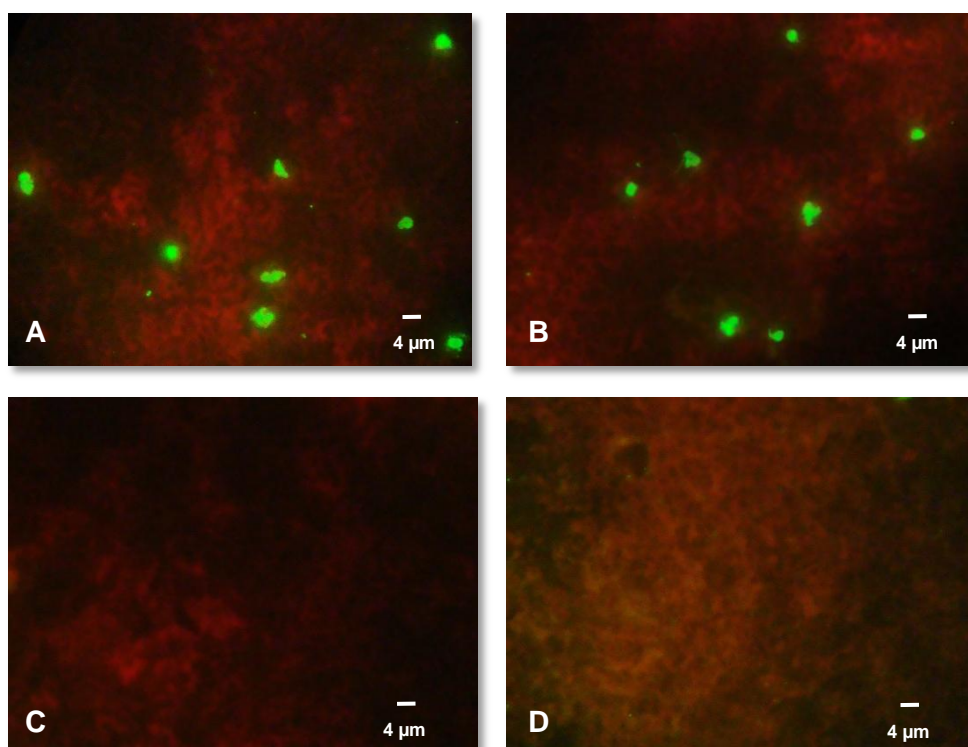


Figura 4: Resultados de *E. canis* obtidos por IFI, evidenciando o aspecto do controlo positivo (A), de uma amostra positiva (B), do controlo negativo (C) e de uma amostra negativa (D). Obj. x100, oc. x10 (original).

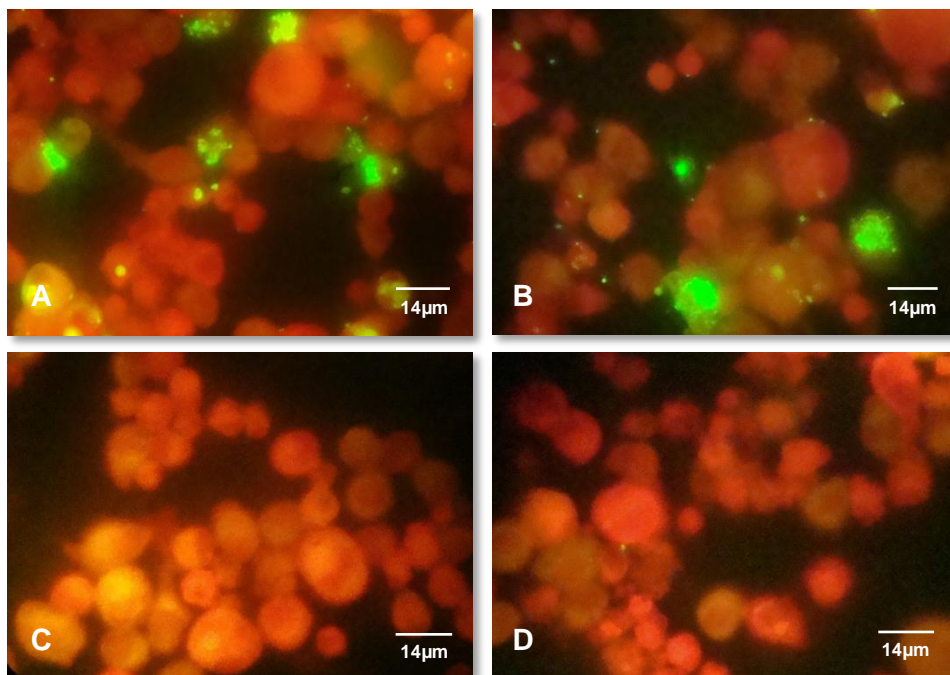


Figura 5: Resultados de *A. phagocytophilum* obtidos por IFI, evidenciando o aspecto do controlo positivo (A), de uma amostra positiva (B), do controlo negativo (C) e de uma amostra negativa (D). Obj. x100, oc. x10 (original).

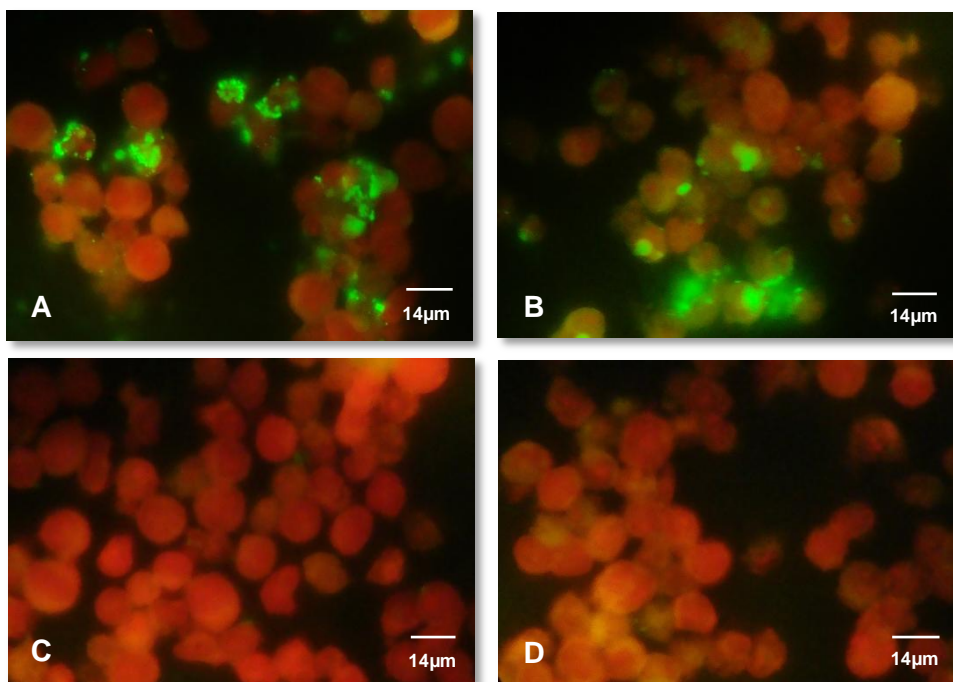
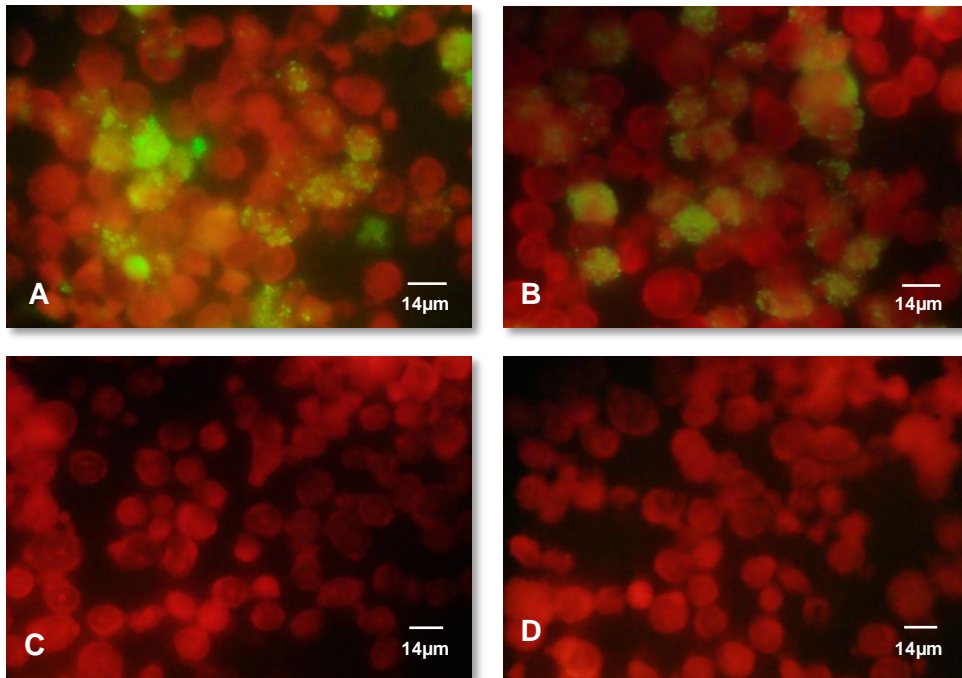


Figura 6: Resultados de *R. conorii* obtidos por IFI, evidenciando o aspecto do controlo positivo (A), de uma amostra positiva (B), do controlo negativo (C) e de uma amostra negativa (D). Obj. x100, oc. x10 (original).



Em relação aos 14 animais seropositivos a *B. canis*, verificou-se que 8 estavam co-infectados com um ou mais agentes, o que corresponde a 57,1% de co-infecção nos animais infectados com *B. canis*.

Foi possível constatar ainda, que 2 animais seronegativos a *B. canis*, estavam co-infectados com *E. canis*, *A. phagocytophilum* e *R. conorii*, e 7 cães seronegativos a *B. canis* estavam co-infectados com *A. phagocytophilum* e *R. conorii* (Tabela 6).

Tabela 6: Tipos de co-infecções observadas e frequência absoluta de animais co-infectados.

Co-infecções	Frequência Absoluta
<i>B. canis</i> + <i>E. canis</i>	1
<i>B. canis</i> + <i>R. conorii</i>	3
<i>B. canis</i> + <i>A. phagocytophilum</i> + <i>R. conorii</i>	1
<i>B. canis</i> + <i>E. canis</i> + <i>A. phagocytophilum</i> + <i>R. conorii</i>	3
<i>E. canis</i> + <i>A. phagocytophilum</i> + <i>R. conorii</i>	2
<i>A. phagocytophilum</i> + <i>R. conorii</i>	7

### 3.3 Detecção de DNA pela técnica PCR quantitativa em tempo real

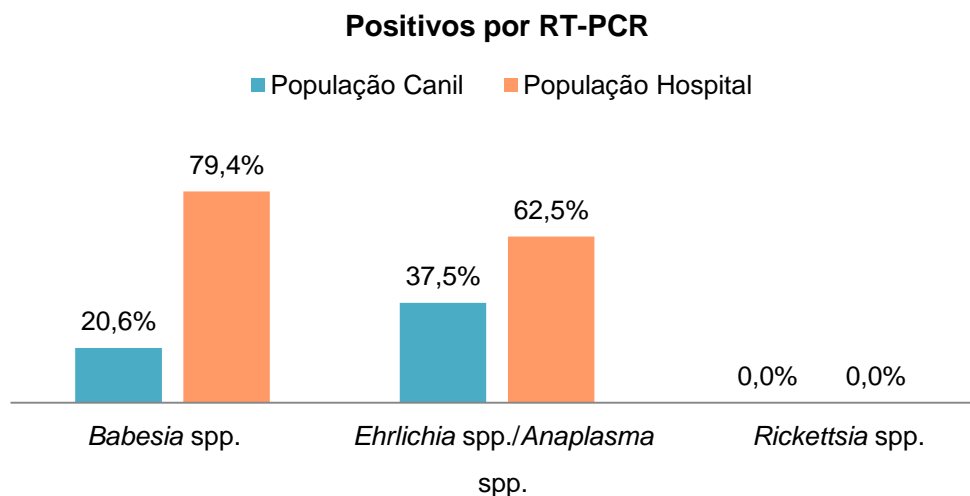
Em relação à detecção por qPCR, verificou-se que a infecção por *Babesia* spp. era aquela que apresentava a maior prevalência (42,5%), seguida de *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp. (20%). No caso de *Rickettsia* spp. todos os resultados foram negativos (Tabela 7).

Tabela 7: Frequência absoluta, prevalência aparente e intervalo de confiança de 95% dos diferentes hemoparasitas testados por qPCR na amostra populacional.

Agente	Frequência Absoluta	Prevalência Aparente (%)	IC de 95%
<i>Babesia</i> spp.	34	42,5	31,7-53,8
<i>Ehrlichia</i> spp./ <i>Anaplasma</i> spp.	16	20	12,1-30,4
<i>Rickettsia</i> spp.	0	0	0-4,5

Dos 34 animais positivos por qPCR a *Babesia* spp. 27 cães foram levados à consulta (79,4%) e os restantes 7 eram de canil (20,6%). Dos 16 animais positivos por qPCR para *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp. 10 eram animais que foram a um hospital veterinário (62,5%), enquanto os restantes 6 cães eram provenientes de canil (37,5%) (Gráfico 4).

Gráfico 4: Distribuição da percentagem de animais positivos por qPCR para *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp. e *Rickettsia* spp. pelas populações de cães de canil e cães que se apresentaram à consulta num hospital veterinário.



O aspecto das curvas de amplificação das amostras positivas e negativas obtidas pela técnica de qPCR em relação aos agentes pertencentes a *Babesia* spp. e *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp., pode ser observado na Figura 7 e na Figura 8.

Figura 7: Resultados de *Babesia* spp. obtidos por qPCR, evidenciando as curvas de amplificação dos controlos positivos (A) e de amostras positivas (B) e a ausência de amplificação dos controlos negativos e de amostras negativas (C) (original).

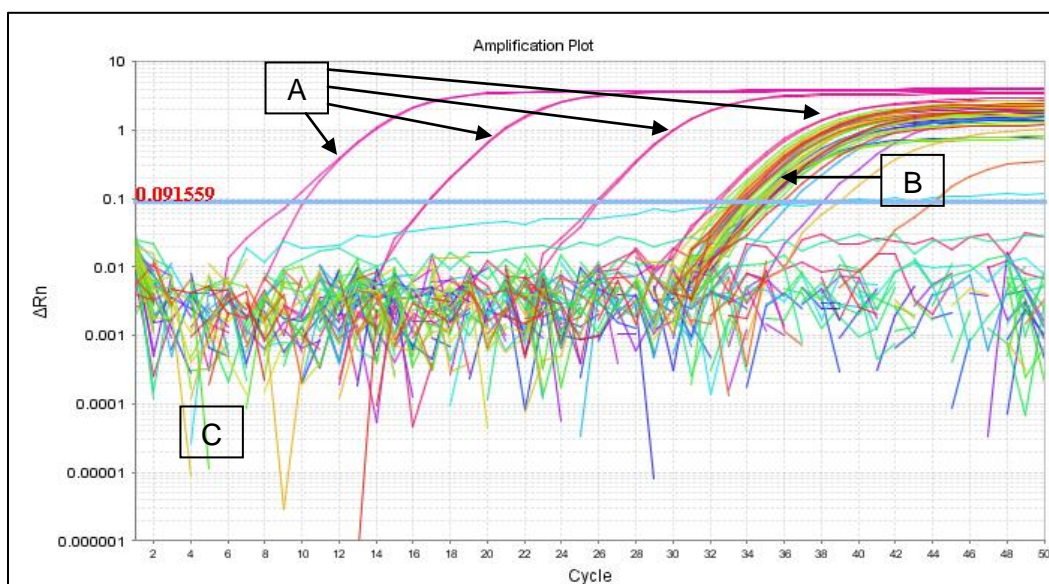
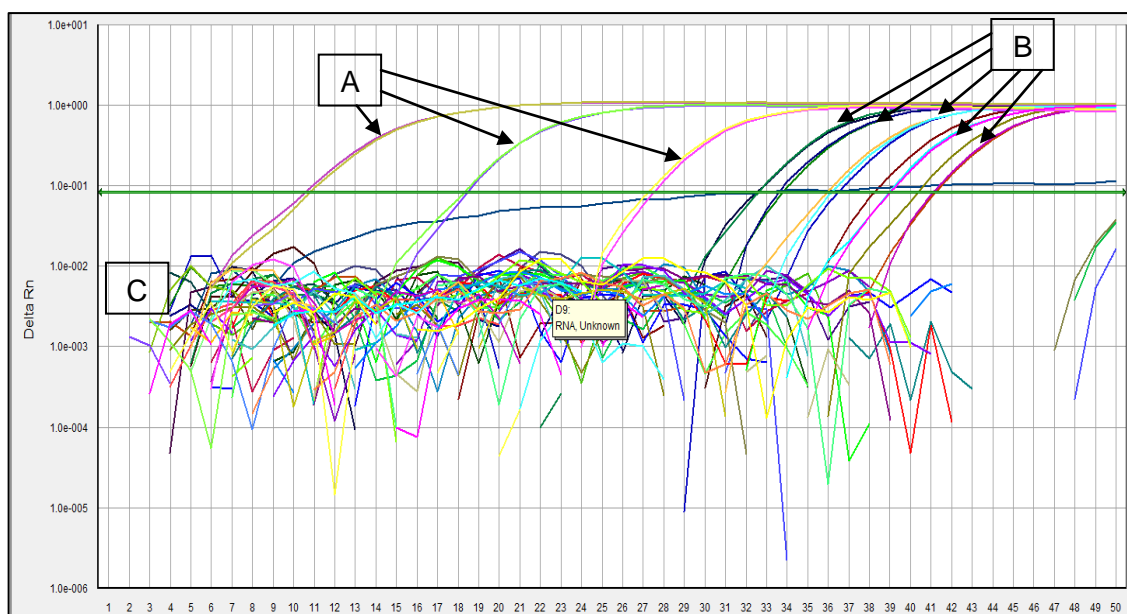


Figura 8: Resultados de *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp. obtidos por qPCR, evidenciando as curvas de amplificação dos controlos positivos (A) e de amostras positivas (B) e a ausência de amplificação dos controlos negativos e de amostras negativas (C) (original).



Ainda, dos 34 animais positivos a *Babesia* spp., apenas 6 estavam co-infectados com *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp., o que corresponde a 17,6% de co-infecção nos animais infectados com *Babesia* spp..

### 3.4 Comparação da detecção de anticorpos por imunofluorescência indirecta com a detecção de DNA pela técnica PCR quantitativa em tempo real

#### 3.4.1 Comparação da detecção de anticorpos anti-*B. canis* por IFI com a detecção de DNA de *Babesia* spp. por qPCR

A Tabela 8 permite a comparação dos resultados obtidos por IFI para *B. canis*, com os obtidos por qPCR para *Babesia* spp.. Assim, é possível constatar que apenas 5 dos 14 animais positivos por IFI (35,7%) apresentaram DNA de um parasita pertencente a *Babesia* spp.. Pelo contrário, 9 desses 14 animais (64,3%) revelaram a presença de anticorpos anti-*B. canis*, mas sem a existência de DNA parasitário. Ainda, é demonstrado que 29 dos 66 animais seronegativos a *B. canis* (43,9%) eram positivos à reacção de qPCR para a detecção de *Babesia* spp..

Tabela 8: Comparação dos resultados obtidos por IFI para *B. canis* com os obtidos por qPCR para *Babesia* spp. (frequência absoluta) (*n* representa o número de animais).

		Resultados obtidos por IFI para <i>B. canis</i>	
		Negativo (n=66)	Positivo (n=14)
Resultados obtidos por qPCR para <i>Babesia</i> spp.	Negativo (n=46)	37	9
	Positivo (n=34)	29	5

### 3.4.2 Comparação da detecção de anticorpos anti-*E. canis* e anti-*A. phagocytophilum* por IFI com a detecção de DNA de *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp. por qPCR

Para melhor compreensão da comparação dos resultados obtidos por IFI e por qPCR, agruparam-se os resultados obtidos por IFI para *E. canis* e *A. phagocytophilum*, uma vez que ambas as bactérias eram identificadas por qPCR, que detectava simultaneamente parasitas pertencentes aos géneros *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp., não fazendo, no entanto, a sua distinção. Assim, no global, foram encontrados 20 animais positivos por IFI para ambos os hemoparasitas: 3 positivos unicamente para *E. canis*, 12 apenas para *A. phagocytophilum* e 5 co-infecções por *E. canis* e *A. phagocytophilum*.

A Tabela 9 permite a comparação dos resultados obtidos por IFI, com os obtidos por qPCR. Deste modo, verifica-se que apenas 7 dos 20 animais positivos por IFI (35%) apresentaram também DNA de um parasita pertencente a *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp.. Pelo contrário, 13 desses 20 animais (65%) revelaram a presença de anticorpos anti-*E. canis*, anti-*A. phagocytophilum* ou simultaneamente contra os dois parasitas, mas sem a existência de DNA parasitário. Ainda, é demonstrado que 9 dos 60 animais negativos por IFI (15%) eram positivos à reacção de qPCR para a detecção de *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp..

Tabela 9: Comparação dos resultados obtidos por IFI para *E. canis* e *A. phagocytophilum* com os obtidos por qPCR para *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp. (frequência absoluta) (*n* representa o número de animais).

		Resultados obtidos por IFI para <i>E. canis</i> e/ou <i>A. phagocytophilum</i> *	
		Negativo (n=60)	Positivo (n=20)
Resultados obtidos por qPCR para <i>Ehrlichia</i> spp./ <i>Anaplasma</i> spp.	Negativo (n=64)	51	13
	Positivo (n=16)	9	7

(\*) Note-se que para facilitar a comparação entre os resultados obtidos por IFI e por qPCR, foram agrupados os resultados obtidos por IFI para *E. canis* e *A. phagocytophilum*, pois a técnica de qPCR detecta os géneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* em simultâneo e sem fazer a sua distinção. Assim, no global, foram encontrados 20 animais positivos por IFI para ambos os hemoparasitas: 3 positivos unicamente para *E. canis*, 12 apenas para *A. phagocytophilum* e 5 co-infecções por *E. canis* e *A. phagocytophilum*.

### 3.4.3 Comparação da detecção de anticorpos anti-*R. conorii* por IFI com a detecção de DNA de *Rickettsia* spp. por qPCR

A Tabela 10 permite a comparação dos resultados obtidos por IFI para *R. conorii*, com os obtidos por qPCR para *Rickettsia* spp.. Tal como é demonstrado, 44 dos 80 cães (55%) apresentaram anticorpos contra *R. conorii* por IFI, mas não foi detectado DNA de *Rickettsia* spp. por qPCR.

Tabela 10: Comparação dos resultados obtidos por IFI para *R. conorii* com os obtidos por qPCR para *Rickettsia* spp. (frequência absoluta) (*n* representa o número de animais).

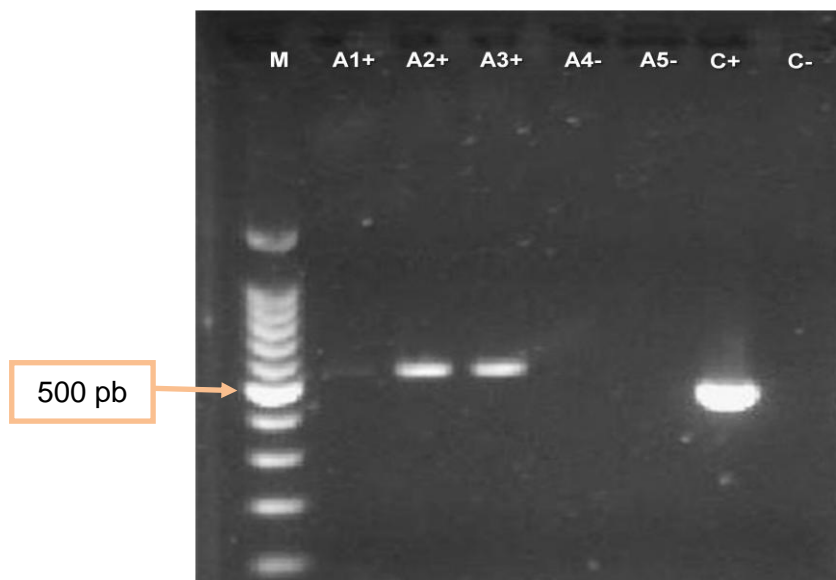
		Resultados obtidos por IFI para <i>R. conorii</i>	
		Negativo (n=36)	Positivo (n=44)
Resultados obtidos por qPCR para <i>Rickettsia</i> spp.	Negativo (n=80)	36	44

### 3.5 Detecção de DNA por PCR convencional e sequenciação nucleotídica

As 34 amostras positivas para *Babesia* spp. por qPCR, foram submetidas à técnica de cPCR, com o objectivo de identificar as espécies de *Babesia* envolvidas na infecção. Porém, apenas 3 dessas 34 amostras (8,8%) foram amplificadas por este método molecular, e ainda, as bandas obtidas tinham um peso molecular superior ao esperado para *Babesia* spp./*Theileria* spp. (Figura 10). De salientar, que uma das 3 amostras positivas por

cPCR pertencia ao cão que se apresentou à consulta num hospital veterinário e que era igualmente positivo ao protozoário *Hepatozoon* spp. detectado em esfregaço sanguíneo.

Figura 10: Resultados de *Babesia* spp./*Theileria* spp. obtidos por cPCR, evidenciando o marcador molecular (M), três amostras positivas (A1+, A2+, A3+), duas amostras negativas (A4-, A5-), o controlo positivo (C+) e o controlo negativo (C-) (original).



Os três produtos amplificados por cPCR e posteriormente purificados e enviados para sequenciação nucleotídica, revelaram três sequências, em que todas elas apresentaram uma identidade de 100% com a espécie *Hepatozoon canis* disponível no GenBank (AY461378.2). Ainda, a sequenciação da amostra positiva por cPCR do animal que também era positivo ao hemoparasita *Hepatozoon* spp. por esfregaço sanguíneo, permitiu confirmar a espécie *H. canis* implicada naquela infecção.

A obtenção destes resultados suscitou a curiosidade em saber se a espécie de *Hepatozoon* observada no esfregaço sanguíneo do animal de canil, e que tinha sido negativa a *Babesia* spp. por qPCR, seria a mesma que as outras três. Assim, o DNA deste animal foi submetido a reacção de cPCR e o produto positivo amplificado foi purificado e enviado para sequenciação. A análise BLAST dessa sequência revelou uma identidade de 100% com a espécie *Hepatozoon canis* disponível no GenBank (AY461378.2).

### 3.6 Influência de factores

A avaliação da influência de factores foi dividida em duas partes, já que existiram variáveis que não podiam ser avaliadas globalmente, devido às diferenças existentes entre as duas populações de cães (animais de canil e animais que foram levados à consulta a um hospital veterinário). Assim, as variáveis globais corresponderão a variáveis avaliadas nos 80 cães,

enquanto as variáveis discriminadas serão avaliadas separadamente nas duas populações de animais.

### 3.6.1 Variáveis globais

As variáveis consideradas globais foram factores como a idade, o sexo, a raça e o concelho de residência, e a avaliação da possibilidade de associação estatística entre estes factores e a positividade a *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp., *B. canis*, *E. canis*, *A. phagocytophilum* e *R. conorii* pode ser consultada na Tabela 11.

Tabela 11: Associação estatística entre a infecção por *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp., *B. canis*, *E. canis*, *A. phagocytophilum* e *R. conorii* e a idade, o sexo, a raça e o concelho de residência.

Agente	Idade	Sexo	Raça	Concelho
<i>Babesia</i> spp.	$p=0,243$	$p=0,3126$	$p=0,07319$	<b><math>p=0,0006</math></b>
<i>Ehrlichia</i> spp./ <i>Anaplasma</i> spp.	$p=0,1471$	$p=0,9086$	$p=0,7342$	$p=0,6881$
<i>B. canis</i>	$p=0,3025$	$p=0,7974$	$p=0,963$	$p=0,4749$
<i>E. canis</i>	$p=0,6593$	$p=0,1082$	$p=0,9986$	$p=0,8969$
<i>A. phagocytophilum</i>	$p=0,3491$	$p=0,817$	$p=0,9324$	$p=0,1512$
<i>R. conorii</i>	<b><math>p=0,0447</math></b>	$p=0,6281$	$p=0,1034$	<b><math>p=0,00004</math></b>

Dos vários factores avaliados, o concelho de residência exerceu influência sobre a positividade a *Babesia* spp. e a seropositividade a *R. conorii*, e a idade exerceu influência sobre a seropositividade a *R. conorii*, apresentando valores de  $p$  inferiores a 0,05.

A análise dos concelhos através da Tabela 12 e da Tabela 13 permitiu verificar que a maior percentagem de indivíduos positivos a *Babesia* spp. era proveniente do concelho de Lisboa (50%) e que a maior percentagem de animais negativos era proveniente do concelho de Loures (45,65%) e que, no caso de *R. conorii*, a maior percentagem de indivíduos seropositivos era do concelho de Sintra (45,45%). Contudo, há que ter em atenção que o maior número de animais estudados provinha de Loures (23 animais), Lisboa (22 animais) e Sintra (21 animais), estando, por isso, estes concelhos melhor representados do que os restantes e, no caso da maior seroprevalência de *R. conorii* em Sintra, deverá ser dada atenção ao facto da maioria destes cães ter estado alojada no canil municipal de Sintra.

Tabela 12: Associação entre infecção por *Babesia* spp. e os vários concelhos abrangidos neste estudo (frequência absoluta e frequência relativa %) (*n* representa o número de animais).

		<b>Amadora (n=2)</b>	<b>Cascais (n=2)</b>	<b>Lisboa (n=22)</b>
<b><i>Babesia</i> spp.</b>	Negativo (n=46)	1 (2,17%)	1 (2,17%)	5 (10,87%)
	Positivo (n=34)	1 (2,94%)	1 (2,94%)	17 (50%)
		<b>Loures (n=23)</b>	<b>Mafra (n=1)</b>	<b>Odivelas (n=4)</b>
<b><i>Babesia</i> spp.</b>	Negativo (n=46)	21 (45,65%)	0 (0%)	3 (6,52%)
	Positivo (n=34)	2 (5,88%)	1 (2,94%)	1 (2,94%)
		<b>Oeiras (n=4)</b>	<b>Sintra (n=21)</b>	<b>Vila Franca de Xira (n=1)</b>
<b><i>Babesia</i> spp.</b>	Negativo (n=46)	1 (2,17%)	14 (30,43%)	0 (0%)
	Positivo (n=34)	3 (8,82%)	7 (20,59%)	1 (2,94%)

Tabela 13: Associação entre infecção por *R. conorii* e os vários concelhos abrangidos neste estudo (frequência absoluta e frequência relativa %) (*n* representa o número de animais).

		<b>Amadora (n=2)</b>	<b>Cascais (n=2)</b>	<b>Lisboa (n=22)</b>
<b><i>R. conorii</i></b>	Negativo (n=36)	2 (5,56%)	0 (0%)	15 (41,67%)
	Positivo (n=44)	0 (0%)	2 (4,55%)	7 (15,91%)
		<b>Loures (n=23)</b>	<b>Mafra (n=1)</b>	<b>Odivelas (n=4)</b>
<b><i>R. conorii</i></b>	Negativo (n=36)	10 (27,78%)	0 (0%)	4 (11,11%)
	Positivo (n=44)	13 (29,55%)	1 (2,27%)	0 (0%)
		<b>Oeiras (n=4)</b>	<b>Sintra (n=21)</b>	<b>Vila Franca de Xira (n=1)</b>
<b><i>R. conorii</i></b>	Negativo (n=36)	4 (11,11%)	1 (2,78%)	0 (0%)
	Positivo (n=44)	0 (0%)	20 (45,45%)	1 (2,27%)

Os animais das classes de idades iguais ou superiores a 2 anos, apresentaram sensivelmente a mesma frequência de seropositividade, assim como um valor muito superior em relação aos cães com idade igual ou inferior a 1 ano. Relativamente aos animais seronegativos, é possível confirmar que a menor percentagem (13,89%) correspondeu aos mais velhos (Tabela 14).

Tabela 14: Associação entre infecção por *R. conorii* e a idade (frequência absoluta e frequência relativa %).

		≤ 1 ano (n=15)	2-5 anos (n=22)	6-9 anos (n=25)	≥ 10 anos (n=18)
<i>R. conorii</i>	Negativo (n=36)	11 (30,56%)	11 (30,56%)	9 (25%)	5 (13,89%)
	Positivo (n=44)	4 (9,09%)	11 (25%)	16 (36,36%)	13 (29,55%)

### 3.6.2 Variáveis discriminadas

As variáveis discriminadas foram avaliadas em separado, uma vez que, no caso do factor presença de carraças nos animais (classificada como positiva ou negativa), este não foi registado pelos diversos funcionários dos canis, não existindo, por isso, informação, ao contrário do conhecimento individual dos proprietários de cada animal que foi levado a um hospital veterinário. Assim, a presença de carraças foi unicamente avaliada nos animais que se apresentaram à consulta. Relativamente ao acesso ao exterior (classificado em permanente ou intermitente) e à eficiência da profilaxia ectoparasiticida (classificada em eficiente ou ineficiente), estas foram duas variáveis constantes para a população de cães de canil (permanente e eficiente, respectivamente), não sendo assim possível fazer inferências nesta população sobre a sua influência na positividade aos agentes. Além disso, ao contrário do que aconteceu na população de cães de canil, existiu variação destes dois factores na população de cães que se apresentou à consulta, pelo que não é correcto a avaliação das duas variáveis de igual forma na população global.

A associação estatística dos três factores para a positividade a *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp., *B. canis*, *E. canis*, *A. phagocytophilum* e *R. conorii* pode ser observada na Tabela 15.

Tabela 15: Associação estatística entre a infecção por *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp., *B. canis*, *E. canis*, *A. phagocytophilum* e *R. conorii* e a presença de carrças, o acesso ao exterior e a eficiência da profilaxia ectoparasiticida, na população de 40 cães que se apresentou à consulta num hospital veterinário.

Agente	Presença de carrças	Acesso ao exterior	Eficiência da profilaxia ectoparasiticida
<i>Babesia</i> spp.	$p=0,4352$	$p=0,3112$	$p=0,2173$
<i>Ehrlichia</i> spp./ <i>Anaplasma</i> spp.	$p=0,7136$	$p=0,4652$	$p=0,5834$
<i>B. canis</i>	$p=0,7895$	$p=0,3758$	$p=0,0566$
<i>E. canis</i>	$p=0,1087$	$p=1$	$p=0,1272$
<i>A. phagocytophilum</i>	$p=0,3361$	$p=0,2119$	$p=0,5738$
<i>R. conorii</i>	$p=0,07102$	$p=0,744$	$p=0,9348$

A interpretação da Tabela 15 revelou não existir associação estatística significativa entre qualquer um dos factores avaliados e a positividade aos diversos agentes pesquisados, pois o valor de  $p$  foi sempre superior a 0,05.

#### 4 Discussão

Aquando da realização do artigo de revisão bibliográfica subordinado ao tema Doenças Caninas Transmitidas por Vectores referido no Capítulo I, percebeu-se que estas doenças constituem um problema de importância crescente a nível mundial e que se apresentam como um grande desafio para os médicos veterinários. Além disso, a percepção de que a informação sobre a babesiose canina em Portugal, sobretudo a detecção e a identificação das espécies envolvidas na infecção por *Babesia* spp., era escassa no país, assim como em comparação com outros países da Europa, principalmente na área Mediterrânea, onde esta e outras DCTV são endémicas, conduziu a um interesse acrescido em compreender melhor a situação epidemiológica destes parasitas em particular. Os estudos de Cardoso *et al.* (2008, 2010b, 2011) admitiram que era necessário alargar as pesquisas a outras regiões do país e a populações maiores e assintomáticas, de modo a formar-se uma ideia mais aprofundada sobre a babesiose canina portuguesa, que permita promover medidas de controlo preventivo mais efectivas e para que o manejo clínico e tratamento sejam totalmente eficazes.

#### 4.1 Detecção de hemoparasitas por esfregaço sanguíneo

Os esfregaços sanguíneos são um método de diagnóstico económico e de rápida execução, mas a detecção microscópica dos piroplasmas pode originar falsos negativos, em especial nas infecções por espécies de *Babesia* de grandes dimensões e nas infecções subclínicas e crónicas, pois a parasitémia é maioritariamente baixa e intermitente (Taboada & Lobetti, 2006; Irwin, 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011). Neste estudo, a baixa sensibilidade do método foi comprovada quando em 80 animais, 34 foram positivos a *Babesia* spp. por qPCR, mas em nenhum destes cães foram observados microscopicamente parasitas deste género no interior dos eritrócitos. Para além da baixa e intermitente parasitémia ser uma explicação possível para a não detecção destes hemoparasitas em esfregaços sanguíneos, o facto do método ter sido realizado a partir de sangue colhido em veia periférica, poderá também ter originado o elevado número de falsos negativos, porque como já foi referido anteriormente, esfregaços sanguíneos feitos a partir de amostras de sangue recolhidas dos capilares sanguíneos da extremidade do pavilhão auricular, podem exibir um maior número de eritrócitos infectados. A não concordância da maioria dos donos dos animais que se apresentaram à consulta em picar mais do que uma vez o seu animal, de modo a obter-se sangue de uma veia periférica para os tubos EDTA e tubo seco, e sangue de uma extremidade para a realização dos esfregaços sanguíneos, fez com que se decidisse que, para manter a uniformidade do estudo respeitante a este método de diagnóstico, todos os esfregaços seriam realizados a partir de sangue colhido em veia periférica.

Relativamente a *E. canis* e *A. phagocytophilum*, estas são espécies cujas mórulas intracitoplasmáticas são difíceis de visualizar em esfregaços sanguíneos, uma vez que as parasitémias são transitórias e as mórulas, quando presentes, existem em pequeno número, pelo que é um método que apresenta uma sensibilidade bastante baixa (Harrus, Waner, Aizenberg, Foley, Poland & Bark, 1998b; Harrus *et al.*, 2005; Greig & Armstrong, 2006; Neer & Harrus, 2006; Carrade *et al.*, 2009; Harrus & Waner, 2011). Essa baixa sensibilidade foi comprovada pelo facto de em 80 animais, 16 serem positivos a *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp. por qPCR, mas em nenhum destes cães terem sido observados microscopicamente parasitas morfológicamente semelhantes às espécies *E. canis* e *A. phagocytophilum*. Embora não tenha sido possível neste trabalho, para aumentar a sensibilidade da técnica, poder-se-á aumentar o número de esfregaços sanguíneos por animal (Harrus & Waner, 2011) ou fazê-los a partir de *buffy coat*, uma vez que os parasitas encontram-se nos leucócitos. Além disso, e ainda que no presente trabalho se tenham avaliado animais assintomáticos, Mylonakis, Koutinas, Billinis, Leontides, Kontos, Papadopoulos, Rallis e Fytianou (2003) demonstraram que os esfregaços feitos a partir de *buffy coat*, ou as citologias de linfonodos, apresentam maior sensibilidade para a detecção de *E. canis* na fase aguda da infecção, do que os esfregaços sanguíneos realizados a partir de sangue periférico.

A detecção accidental de *Hepatozoon* spp. morfológicamente semelhante a *H. canis* em dois cães, revela uma prevalência de 2,5%, aproximando-se dos 2,1% obtidos por Figueiredo (2008) em Bragança e dos 3% por Conceição-Silva, Abranches, Silva-Pereira e Janz (1988) nas regiões de Lisboa e Alcácer do Sal, também em esfregaço sanguíneo. Ainda, Alexandre (2005) relatou uma prevalência de 1,8% de *H. canis* em esfregaços sanguíneos de cães com sinais compatíveis com doença transmitida por ixodídeos no Algarve.

A detecção accidental de *H. canis* em neutrófilos circulantes é comum em cães assintomáticos, uma vez que é um agente com baixa patogenicidade, sendo também frequentemente detectado em co-infecções com outros agentes como *B. vogeli* e *E. canis* (Baneth *et al.*, 1996; Vojta *et al.*, 2009; Baneth, 2011). Ainda que na maioria das vezes o esfregaço sanguíneo seja o método mais utilizado para o diagnóstico de *H. canis*, a observação dos gametócitos em esfregaços sanguíneos é pouco sensível, uma vez que a parasitemia é intermitente e o número circulante de parasitas baixo (Karagenc *et al.*, 2006), razões essas que poderão então explicar a baixa prevalência obtida neste estudo. Para tentar contornar esse problema e aumentar a sensibilidade do método, poder-se-á fazer como foi sugerido por Karagenc *et al.* (2006), que recomendou a observação de esfregaços feitos a partir de *buffy coat* como os que foram realizados por Mylonakis *et al.* (2003) para *E. canis*.

Os dois animais positivos a *Hepatozoon* spp. eram animais com acesso permanente ao exterior, e, como tal, muito expostos aos vectores ixodídeos, e concomitantemente aos agentes por eles transmitidos. Além disso, ao animal que se apresentou à consulta era-lhe realizada uma profilaxia ineficiente, para além de ter história de infestações por carraças, factores esses que aumentaram a predisposição à infecção por *Hepatozoon* spp..

#### **4.2 Detecção de anticorpos por imunofluorescência indirecta**

A pesquisa de *B. canis* por IFI revelou uma seroprevalência de 17,5%, sendo um valor semelhante ao encontrado pela mesma técnica por Silva (2011) numa população de cães de canil em Setúbal (20%), mas diferindo grandemente dos resultados obtidos por Ferreira (2008), que relatou uma prevalência de 58,3%. A seroprevalência de 17,5% encontra-se num valor intermédio ao verificado noutros países da Europa, como 5,7% na Hungria (Hornok, Egelhofer & Farkas, 2006), 14,1% em França (Cabannes, Pelse, Lucchese & Appriou, 2002) e entre valores que variam em Itália de 5,17% (Torina & Caracappa, 2006) a 34% (Cassini, Zanutto, Regalbono, Gabrielli, Calderini, Moretti, Tampieri & Pietrobelli, 2009). A IFI realizada para *B. canis* revelou 3 animais seropositivos (2 cães que foram levados à consulta e 1 cão que foi deixado no canil), aos quais tinha sido efectuada a imunoprofilaxia contra a babesiose canina com a vacina Pirodog®, tendo todos completado a primovacinação e realizado os reforços anuais subsequentes até ao momento da colheita de sangue. Como não foi possível saber se foi efectuada o rastreio de *Babesia* spp.

previamente à vacinação, não se sabe se os anticorpos são apenas vacinais ou se resultaram também de uma exposição prévia ao agente.

Relativamente a *E. canis*, foram detectados anticorpos em 8 animais, correspondendo a uma prevalência real de 4,8%, o que se assemelha aos 5,25% encontrados por Alexandre (2005) no Algarve, mas afastando-se dos valores encontrados no distrito de Setúbal, como 16,25% por Silva (2011) e 50% por Bacellar *et al.* (1995), no distrito de Bragança de 14,8% (Figueiredo, 2008) e na área metropolitana do Porto de 11,4% (Silva 2010). Comparando com as prevalências identificadas na Europa, que variam desde 2,2% na Suíça (Pusterla, Pusterla, Deplazes, Wolfensberger, Muller, Horauf, Reusch & Lutz, 1998), 14,9% e 50% em Itália (Otranto, Paradies, Testini, Latrofa, Weigl, Cantacessi, Mencke, Caprariis, Parisi, Capelli & Stanneck, 2008; Cocco, Sanna, Cillara, Tola, Ximenes, Pinnaparpaglia & Masala, 2003) a 16,7% em Espanha (Solano-Gallego, Llull, Osso, Hegarty & Breitschwerdt, 2006b), verifica-se que o valor obtido neste estudo é bastante baixo.

A prevalência real de *A. phagocytophilum* de 18,7% é muito semelhante à obtida por Figueiredo (2008) de 17,6% em Bragança, assim como por Silva (2011) de 12,5% em Setúbal e por Silva (2010) de 10% no Porto, mas difere dos 54,5% obtidos por Santos *et al.* (2009) no Algarve. Na Europa, os resultados das seroprevalências variam de 43,3% na Alemanha (Kohn, Silaghi, Galke, Arndt & Pfister, 2011), 11,5% em Espanha (Solano-Gallego *et al.*, 2006b) e 8,76% em Itália (Ebani, Cerri, Fratini, Ampola & Andreani, 2008).

*R. conorii* apresentou neste estudo uma prevalência de 55%, contrastando com o valor de 23,75% obtido por Silva (2011) em Setúbal, de 37,1% por Silva (2010) no Porto, de 38,5% por Alexandre (2005) no Algarve e de 85,6% por Bacellar *et al.* (1995) em Setúbal, mas aproximando-se dos 55,3% obtidos em Bragança (Figueiredo, 2008). Na Europa, as seroprevalências de *R. conorii* variam de 56,4% em Espanha (Solano-Gallego *et al.*, 2006b), 62,4% na Croácia (Punda-Polic, Bradaric, Klismanic-Nuber, Mrljak & Giljanovic, 1995), a 73,6% em Itália (Torina & Caracappa, 2006).

Em Portugal, as diferenças entre os valores de seroprevalência obtidos para os hemoparasitas pesquisados neste estudo e aqueles relatados nos restantes trabalhos nacionais, podem ser explicadas por diversas razões, de entre as quais, os estudos terem sido efectuados em diferentes áreas geográficas do país, sendo possível que as diversas regiões exerçam influência diferente no valor da seroprevalência, as populações estudadas terem características diferentes ou as metodologias ou os valores de limiar de positividade utilizados terem sido diferentes. Por exemplo, os valores de seroprevalência de 58,3% para *B. canis* obtidos por Ferreira (2008) poderão estar sobrestimados, uma vez que a população do seu estudo incluiu apenas cães que revelaram positividade para um ou mais agentes transmitidos por ixodídeos. O mesmo acontece com a seroprevalência obtida para *A. phagocytophilum* em que, o valor obtido no presente trabalho (18,7%) em cães assintomáticos, distancia-se grandemente dos 54,5% obtidos por Santos *et al.* (2009),

provavelmente porque neste último a população foi constituída unicamente por cães com suspeita de doença transmitida por ixodídeos. Contudo, a semelhança entre os restantes valores poderá indicar que a seroprevalência da infecção por *A. phagocytophilum* será idêntica nas restantes regiões do país, já que o seu vector pode ser encontrado de Norte a Sul de Portugal (Silva *et al.*, 2006; Santos-Silva *et al.*, 2011). Esta semelhança nas diversas regiões do país também é encontrada nos resultados obtidos a nível nacional por Cardoso, Mendão e Madeira de Carvalho (2012), embora tenha sido utilizado um método serológico diferente (ELISA) e as amostras colhidas desde Outubro de 2010 a Abril de 2011. Nesse estudo demonstraram, para cães assintomáticos, uma seroprevalência de *Anaplasma* spp. semelhante entre as diversas regiões NUTS (do inglês *Nomenclature of Units for Territorial Statistics*) do país: 2,2% na região do Norte, 2,7% na região do Centro, 3,5% na região do Alentejo, 6,3% na região de Lisboa, 10,1% na região do Algarve, 0,0% na Região Autónoma dos Açores e 0,0% na Região Autónoma da Madeira.

Outro exemplo que poderá ser relevante, é a diferença dos valores elevados de seroprevalência para *E. canis* no distrito de Setúbal (16,25% [Silva, 2011] e 50% [Bacellar *et al.*, 1995]), em comparação com o obtido no distrito de Lisboa neste trabalho (4,8%). Uma possível explicação poderá ser dada por Santos-Silva *et al.* (2011), em que o número total de ixodídeos vectores da espécie *R. sanguineus* recolhidos no distrito de Setúbal foi cerca de quatro vezes superior ao número total recolhido em Lisboa, indicando, possivelmente, que existe uma maior dispersão do vector no distrito de Setúbal, e, portanto, uma maior distribuição da erliquiose canina nesse distrito.

Outro exemplo prende-se com a detecção de *R. conorii*, em que neste estudo foram utilizados limiares de positividade de 1:64 (IgG), enquanto Alexandre (2005) utilizou 1:128 (IgG), sendo esperado, logo à partida, um valor inferior de seroprevalência para este último. Porém, a comparação dos limiares de positividade só seria completamente correcta, caso a técnica de IFI utilizada nos dois estudos fosse a mesma, e em ambos os testes tivesse sido utilizado como controlo positivo o mesmo soro padrão titulado em UI previamente definidas.

Tendo estas possíveis justificações em consideração, para que as comparações das seroprevalências (semelhanças ou diferenças) dos diferentes hemoparasitas aqui estudados fossem efectuadas correctamente, seria indispensável conduzir um estudo a nível nacional, como o realizado por Cardoso *et al.* (2012), com uma população homogénea e de maior dimensão, e utilizando o mesmo teste de imunofluorescência indirecta com iguais valores de limiar de positividade para todos os animais testados.

Quando se comparam os resultados obtidos para as seroprevalências dos diferentes hemoparasitas pesquisados, entre os animais alojados em canil e os animais que se apresentaram à consulta num hospital veterinário, verifica-se que elas foram sempre superiores para os primeiros. Isto pode ser justificado pelo facto de todos os cães de canil

terem estado permanentemente no exterior e, assim, mais expostos aos vectores ixodídeos, e concomitantemente aos agentes por eles transmitidos. A exposição constante aos antigénios, seja pelo desenvolvimento do estado de premunicação, já documentada na babesiose e erliquiose canina (Brandão *et al.*, 2003; Harrus, Waner, Aizenberg & Bark, 1998a), seja pela exposição periódica ao parasita (com a sua posterior eliminação) através da picada do vector, faz com que exista uma contínua produção de anticorpos e uma incidência mais elevada nos animais de canil. Também, a grande densidade de animais que convivem diariamente, juntamente com as origens desconhecidas da maioria deles, e com o facto de alguns poderem ser portadores assintomáticos, mas sem serem testados para os vários agentes, faz com que haja uma maior probabilidade de concentração da infecção neste tipo de ambiente.

Os resultados positivos à IFI devem ser interpretados com precaução, pois permitem apenas a evidência indirecta da infecção, para além de que pode ser difícil a interpretação de um título positivo em áreas endémicas (Irwin, 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011), já que os animais mantêm-se seropositivos durante bastante tempo após a eliminação do agente, sendo, por isso, o valor diagnóstico destes testes baixo na ausência de sinais clínicos e alterações hematológicas e bioquímicas (Dantas-Torres & Figueredo, 2006; Cassini *et al.*, 2009; Harrus & Waner, 2011; Kohn *et al.*, 2011; Levin *et al.*, 2012).

Finalmente, é de referir que a interpretação dos resultados obtidos por IFI precisa de ser cuidadosa, uma vez que depende de variáveis que incluem, para além da sensibilidade e especificidade dos testes, já referidas anteriormente para cada caso testado, também do limiar de positividade que foi considerado, da possibilidade de ocorrência de reacções cruzadas e da subjectividade própria do método, uma vez que a emissão de um resultado depende sempre da interpretação do operador.

Em relação aos limiares de positividade, foram utilizados os recomendados pelo laboratório Megacor®, uma vez que o objectivo deste estudo era fazer apenas uma detecção dos agentes. Contudo, poder-se-ia ter utilizado outros valores, como os recomendados, por exemplo, por ESCMID (do inglês *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*), que aconselha que para a detecção de IgG contra *R. conorii*, se utilize um valor de limiar de positividade  $\geq 1:128$ , de modo a tentar diminuir as reacções cruzadas entre as diferentes espécies de *Rickettsia* spp. (Brouqui, Bacellar, Baranton, Birtles, Bjoersdorff, Blanco, Caruso, Cinco, Fournier, Francavilla, Jensenius, Kazar, Laferl, Lakos, Furlan, Maurin, Oteo, Parola, Perez-Eid, Peter, Postic, Raoult, Tellez, Tselentis & Wilske, 2004).

Na literatura consultada está descrito que resultados serológicos positivos podem ocorrer por reactividade cruzada, sobretudo nas detecções cujos limiares de positividade são baixos (Waner *et al.*, 1998; Yamane, Thomford, Gardner, Dubey, Levy & Conrad, 1993; Jensen, Simon, Escobar, Soller, Bullerdiel, Beelitz, Pfister & Nolte, 2006), pelo que a interpretação

dos resultados necessita de ser cuidadosa e complementada com outros métodos de diagnóstico, sobretudo, os moleculares.

Para reduzir o erro que poderá surgir da interpretação do operador, todas as lâminas de IFI foram observadas pela mesma pessoa, como aliás já foi referido nos materiais e métodos.

A elevada percentagem de animais seropositivos a *B. canis* e co-infectados (57,1%) não é de estranhar, uma vez que em zonas endémicas é comum a ocorrência de infecções simultâneas, ou sequenciais, de agentes transmitidos por vectores ixodídeos, seja porque o cão é exposto a diferentes ixodídeos infectados com um único hemoparasita em diferentes pontos no tempo, seja porque os ixodídeos estão simultaneamente infectados com mais do que um agente etiológico.

#### **4.3 Detecção de DNA pela técnica PCR quantitativa em tempo real**

No conhecimento da autora, este estudo permitiu pela primeira vez em Portugal, a detecção de agentes pertencentes aos géneros *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp. e *Rickettsia* spp. no cão, por qPCR. Os rastreios realizados no país para agentes como *B. canis*, *B. vogeli*, *E. canis*, *A. phagocytophilum* e *R. conorii* têm-se baseado na detecção de anticorpos por IFI ou recorrem à técnica de cPCR ou ainda à técnica de RLB (do inglês *Reverse Line Blotting assay*) (Alexandre, 2005; Ferreira, 2008; Figueiredo, 2008; Alexandre, Santos, Núncio, de Sousa, Boínas & Bacellar, 2009; Santos *et al.*, 2009; Cardoso, Tuna, Vieira, Yisaschar-Mekuzas & Baneth, 2010a; Cardoso *et al.*, 2010b; Silva, 2010; Silva, 2011; Yisaschar-Mekuzas *et al.*, 2012).

Respeitante à detecção de *Babesia* spp. foi obtido uma prevalência de 42,5%. Este é um valor bastante elevado e indica que a infecção pode decorrer de qualquer espécie pertencente ao género *Babesia*. A identificação das espécies infectantes seguir-se-ia ao método de qPCR, ao submeter as amostras positivas à técnica de cPCR, utilizando *primers* que detectam o género, e as bandas de peso molecular específico obtidas enviadas para sequenciação, ou, em alternativa, realizar a técnica de cPCR utilizando *primers* específicos para as espécies que se pretende detectar (em particular, *B. canis* e *B. vogeli*).

Todos os estudos realizados no Norte de Portugal sobre *Babesia* spp. foram efectuados utilizando animais suspeitos de babesiose canina, e nos quais todos os cães testados foram positivos a *Babesia* spp. por métodos como cPCR ou a técnica de RLB (Cardoso *et al.*, 2008; Cardoso *et al.*, 2010b; Yisaschar-Mekuzas *et al.*, 2012) e, como o presente trabalho incluiu cães assintomáticos e foi utilizada a técnica de qPCR, não é possível fazer uma comparação de prevalências. Também, a bibliografia consultada permite igualmente verificar que são muito poucos os estudos realizados para a detecção de *Babesia* spp. recorrendo ao teste de qPCR e que só nos últimos anos é que se começou a desenvolver esta técnica para a detecção destes hemoparasitas (Matsuu *et al.*, 2005; Peleg *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010). Na Europa, estudos que recorreram à técnica de cPCR, revelaram valores de

prevalência que variaram desde 2,3% para *B. canis* em cães assintomáticos em Itália (Cassini *et al.*, 2009), 2,3% para *B. canis*, 0,23% para *B. vogeli*, 0,7% para *B. gibsoni* e 96% para *B. canis* em cães suspeitos de babesiose canina na Croácia (Beck *et al.*, 2009), 0,01% para *B. vogeli* em Espanha em cães com sinais clínicos de doença transmitida por ixodídeos (Criado-Fornelio *et al.*, 2007b) a 25,3% para *B. canis* em animais assintomáticos na Polónia (Welc-Faleciak, Rodo, Sinski & Bajer, 2009).

Para ser possível retirar mais conclusões da elevada prevalência de *Babesia* spp. obtida por qPCR neste estudo, seria essencial fazer a identificação das espécies das amostras positivas, uma vez que, por exemplo, é sabido que de uma maneira geral *B. vogeli* é a espécie menos patogénica que infecta o cão, estando frequentemente associada a infecção subclínica (Irwin, 2009). Assim, será espectável que esta seja a espécie mais representada nas 34 amostras positivas detectadas nos animais assintomáticos aqui estudados. Ainda, a distribuição de *R. sanguineus* em Portugal (e Lisboa) é superior à de *D. reticulatus* (Santos-Silva *et al.*, 2011), pelo que no presente trabalho poderá esperar-se um maior número de animais positivos a *B. vogeli*.

Relativamente à detecção simultânea de *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp., foi obtida uma prevalência de 20%, o que indica que a infecção pode decorrer de um agente pertencente ao género *Ehrlichia* ou ao género *Anaplasma*, uma vez que os *primers* utilizados amplificavam ambos os géneros não permitindo, todavia, a sua diferenciação. Idealmente, a identificação das espécies infectantes seguir-se-ia à técnica de qPCR, ao submeter as amostras positivas ao método de cPCR para detecção dos géneros, e as bandas de peso molecular específico obtidas enviadas para sequenciação, ou, em alternativa, realizar o teste de cPCR utilizando *primers* específicos para as espécies que se pretende detectar (*E. canis* e *A. phagocytophilum*).

A literatura publicada sobre a detecção molecular de *E. canis* e *A. phagocytophilum* em Portugal relata trabalhos realizados por cPCR, *nested* PCR e pela técnica de RLB apenas em populações de cães suspeitos de doença transmitida por ixodídeos (Alexandre, 2005; Figueiredo, 2008; Alexandre *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2010a; Cardoso *et al.*, 2010b; Yisaschar-Mekuzas *et al.*, 2012), e, como aconteceu com *Babesia* spp., não é possível fazer comparações entre esses e este estudo. Porém, Alexandre (2005) e Alexandre *et al.* (2009) demonstraram prevalências de *E. canis* de 25,4% e 22%, respectivamente, em cães com sinais clínicos compatíveis com doença transmitida por ixodídeos no Algarve, e Figueiredo (2008) documentou uma prevalência de 0,85% de *E. canis* em Bragança, em cães com exame clínico compatível com doença transmitida por ixodídeos, com serologia positiva ou com ixodídeos a parasitá-los e positivos por PCR aos agentes em estudo. No conhecimento da autora, os trabalhos realizados em Portugal direccionados para a detecção de *Anaplasma* spp. e *A. phagocytophilum* no cão, não identificaram molecularmente a espécie *A. phagocytophilum* (Santos *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2010a; Silva, 2010). Assim, e ainda

que a identificação das espécies permitisse retirar mais conclusões em relação aos resultados aqui obtidos, será possível esperar um maior número de animais infectados com *E. canis*, do que com *A. phagocytophilum*. Por outro lado, Santos-Silva *et al.* (2011) revelaram maior dispersão de *I. ricinus* no distrito de Lisboa do que *R. sanguineus*, e como maior dispersão do vector significa maior dispersão da infecção, poderá ser também esperado que neste estudo se encontre um maior número de infecções por *A. phagocytophilum* do que por *E. canis*.

Na Europa, estudos realizados por qPCR, revelaram uma prevalência de 6,4% de *E. canis* e 0% de *A. phagocytophilum* em Itália em cães com sinais clínicos compatíveis com doença transmitida por ixodídeos (Solano-Gallego, Trotta, Razia, Furlanello & Caldin, 2006c) e de 5,7% de *A. phagocytophilum* na Alemanha, em cães assintomáticos e cães com sinais clínicos ou alterações hematológicas compatíveis com anaplasmose granulocítica canina (Kohn *et al.*, 2011).

A detecção de *Rickettsia* spp. por qPCR revelou uma prevalência de 0%, o que significa que nenhum dos animais apresentava em circulação sanguínea agentes pertencentes a esse género, ou porque realmente não estavam infectados, ou porque os cães foram expostos a este agente, mas eliminaram-no rapidamente, ou porque a colheita foi feita numa altura em que o parasita não estava em circulação, uma vez que nas infecções por *R. conorii* a parasitemia detectável é de curta duração (Levin *et al.*, 2012). Em Portugal, os rastreios moleculares efectuados em cães revelaram, em Bragança, uma prevalência de 1,7% de *Rickettsia* spp. em cães com exame clínico suspeito de doença transmitida por ixodídeos, com serologia positiva ou com ixodídeos a parasitá-los e positivos por PCR aos agentes em estudo (Figueiredo, 2008) e no Algarve uma prevalência de 16,3% de *Rickettsia* spp. em cães com sinais clínicos compatíveis com doença transmitida por ixodídeos (Alexandre, 2005).

Na Europa são muito poucos os estudos que recorreram ao qPCR para a detecção de *Rickettsia* spp., mas em Itália foi documentada uma prevalência de 1,5% para *Rickettsia* spp., detectada por qPCR em cães com sinais clínicos (Solano-Gallego, Trotta, Caldin & Furlanello, 2008a). Assim, se as prevalências para *Rickettsia* spp. em animais sintomáticos é baixa, então será espectável que a prevalência obtida no presente estudo em animais assintomáticos seja bastante baixa.

Quando se comparam os resultados obtidos para as prevalências dos diferentes hemoparasitas pesquisados, entre os animais alojados em canil e os animais que se apresentaram à consulta num hospital veterinário, verifica-se que elas foram sempre superiores para os segundos. Contudo, não foi possível encontrar uma justificação plausível para esta diferença, uma vez que seria esperado uma maior prevalência para os animais de canil, como já foi referido acima para a diferença de prevalências por IFI entre estas duas populações.

Por fim, a detecção de 17,6% de co-infecção nos animais infectados com *Babesia* spp., poderá ser explicada pelas mesmas razões já referidas para as co-infecções identificadas por IFI.

#### **4.4 Comparação da detecção de anticorpos por imunofluorescência indirecta com a detecção de DNA pela técnica PCR quantitativa em tempo real**

Este estudo permitiu verificar que para os mesmos animais, existem discrepâncias nos resultados obtidos por IFI e por qPCR.

Em relação à detecção de anticorpos contra *B. canis* por IFI e de DNA de *Babesia* spp. por qPCR, verificou-se que existiram 9 animais seropositivos, mas negativos por qPCR e 29 animais seronegativos, mas positivos por qPCR.

A detecção de anticorpos contra *B. canis* pode ser realizada 7 dias pós-infecção experimental, persistindo 3 a 5 meses após tratamento e eliminação do agente, sendo de referir, no entanto, que os cães conseguem eliminar naturalmente a infecção (Brandão *et al.*, 2003). A bibliografia consultada não revelou estudos que permitam identificar em que dia é detectado o DNA de *B. canis* pós-infecção. No entanto, Birkenheuer *et al.* (2003b) admitiram ser possível a detecção de DNA de *B. canis* antes da seroconversão. Ainda, Brandão *et al.* (2003) referiram estudos de cães naturalmente infectados com *B. canis*, mas sem terem produzido anticorpos e Taboada e Lobetti (2006) referiram que cães com menos de 8 meses podiam estar infectados, mas serem seronegativos por não conseguirem desenvolver uma resposta humoral adequada.

Como já foi referido anteriormente, para ser possível retirar mais conclusões, seria necessário fazer a identificação das espécies das amostras positivas a *Babesia* spp.. Todavia, e tendo em conta os factos acima enumerados, o elevado número de animais positivos por qPCR mas negativos por IFI, pode ser devido a uma detecção precoce de DNA, antes de ter ocorrido a seroconversão. No presente estudo, apenas um animal positivo por qPCR era muito jovem (com 7 meses), podendo, este caso, enquadrar-se nos animais muito jovens e positivos descritos por Taboada e Lobetti (2006).

Por outro lado, a detecção de animais seropositivos para *B. canis*, mas negativos por qPCR, poderá ser explicada por exemplo, pela persistência dos anticorpos após a eliminação do parasita ou, como os animais vivem numa zona endémica, podem ter sido expostos repetidamente aos antigénios, desenvolvendo uma resposta imunitária eficaz, mas não estando actualmente infectados. Também, o facto de nas infecções crónicas os parasitas ficarem sequestrados nas redes capilares do baço, fígado ou outros órgãos, de onde são libertados periodicamente para a circulação sanguínea (Irwin, 2005), poderá significar que a colheita de sangue do presente estudo possa ter sido efectuada no período de tempo em que os anticorpos estão presentes, mas em que não é detectado DNA do agente em circulação.

Relativamente aos 3 animais vacinados e seropositivos para *B. canis*, apenas um revelava a presença de DNA parasitário, pelo que, neste animal os anticorpos poderão ser vacinais e terem sido também desenvolvidos por reacção à presença do parasita.

A detecção de anticorpos contra *E. canis* e *A. phagocytophilum* por IFI e de DNA de *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp. por qPCR, permitiu verificar que 13 animais eram seropositivos, com presença de anticorpos anti-*E. canis*, anti-*A. phagocytophilum* ou simultaneamente contra os dois parasitas, mas negativos por qPCR para *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp. Pelo contrário, foram identificados 9 cães seronegativos para *E. canis* e/ou *A. phagocytophilum*, mas positivos por qPCR para *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp.

A utilização da técnica de qPCR é extremamente vantajosa, uma vez que permite detectar o DNA dos parasitas logo desde o início da infecção. No caso de *E. canis*, estudos indicam que é possível detectar o DNA do parasita 4 a 10 dias pós-infecção (Harrus & Waner, 2011), enquanto a seroconversão e a detecção de anticorpos anti-*E. canis* está documentada em 12 ou 21 dias pós-infecção (Baneth, Harrus, Ohnona & Schlesinger, 2009; McBride, Corstvet, Gaunt, Boudreaux, Guedry & Walker, 2003) ou 15 dias pós-infecção (Harrus *et al.*, 1998b). Foi também relatada a persistência de anticorpos até dois meses após tratamento e eliminação do parasita *E. canis*, sendo de referir que os animais são capazes de eliminar a bactéria sem tratamento médico (Wen, Rikihisa, Mott, Greene, Kim, Zhi, Couto, Unver & Bartsch, 1997; Harrus *et al.*, 1998b). Relativamente a *A. phagocytophilum*, poucos são os estudos publicados de cães com anaplasmoze granulocítica canina, todavia, sabe-se que é possível detectar no sangue DNA do parasita 6 a 8 dias antes e 3 dias depois do aparecimento das mórulas nos esfregaços sanguíneos e que a seroconversão ocorre 8 dias após a exposição inicial à bactéria ou 2 a 5 dias após a detecção das mórulas em circulação. Além disso, o título de anticorpos pode tornar-se baixo ou mesmo negativo 7 a 8 meses pós-infecção experimental (Greig & Armstrong, 2006; Carrade *et al.*, 2009). Harrus *et al.* (2005) e Carrade *et al.* (2009) relataram estudos em que é possível a identificação de mórulas 4 a 14 dias pós-infecção experimental em cães. Ainda, num rastreio realizado por Kohn, Galke, Beelitz e Pfister (2008) foi demonstrado que animais saudáveis e assintomáticos e animais suspeitos de anaplasmoze granulocítica canina são positivos a *A. phagocytophilum* por qPCR, mas seronegativos por IFI.

Para retirar conclusões correctas sobre as discrepâncias de resultados aqui obtidos entre IFI e qPCR, seria essencial fazer a identificação das espécies das amostras positivas para *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp.. No entanto, tendo em conta os factos acima referidos, verifica-se que é possível fazer uma detecção do DNA de *E. canis* e *A. phagocytophilum* antes da detecção dos anticorpos, sendo esta uma possível justificação para os animais serem positivos por qPCR, mas negativos por IFI. Outra explicação prende-se com o facto de que estes animais poderão estar infectados por outras espécies que não *E. canis* e

*A. phagocytophilum*, como por exemplo *A. platys*, a qual é pertencente ao género *Anaplasma*, já foi encontrada em Portugal (Santos *et al.*, 2009) e o laboratório Megacor® não refere se pode haver reacção cruzada com *A. phagocytophilum*. Pelo contrário, o número elevado de animais seropositivos a *E. canis* e/ou *A. phagocytophilum*, mas negativos por qPCR, pode ser devido à persistência de anticorpos em circulação pós-infecção e eliminação do parasita, ou porque os animais, por viverem numa zona endémica, foram expostos repetidamente aos antígenos, desenvolvendo uma resposta imunitária, mas não estando actualmente infectados.

Relativamente à reactividade cruzada possível na realização de IFI, para além de estar documentada em vários estudos, o laboratório Megacor® indica que é possível que os positivos para *E. canis*, possam ser positivos para *E. chaffeensis* por reacção cruzada. Ora, como este agente pertence ao género *Ehrlichia*, significa que também pode ser identificado na reacção de qPCR, pelo que, o mais provável seria que ele se enquadrasse nos animais que foram positivos por IFI e por qPCR. Porém, em Portugal ainda não foi detectado molecularmente a presença da espécie *E. chaffeensis* nos cães (Cardoso *et al.*, 2010a; Cardoso *et al.*, 2010b) ou em ixodídeos (Santos-Silva, Sousa, Santos, Lopes, Queijo, Doreta, Vitorino & Bacellar, 2006a; Santos-Silva, Sousa, Santos, Melo, Encarnação & Bacellar, 2006b). De notar que o seu vector, *Amblyomma americanum*, restringe-se aos EUA, contudo, já foi demonstrada a sua presença em *I. ricinus* na Rússia (Paddock & Childs, 2003). No conhecimento da autora, existem apenas dois estudos publicados associados a esta espécie no país: um decorreu do diagnóstico de *E. chaffeensis* por serologia numa infecção aguda num humano (Petrovec, Furlan, Zupanc, Strle, Brouqui, Roux & Dumler, 1997; Paddock & Childs, 2003) e o outro está relacionado com um rastreio epidemiológico no Parque Natural de Montesinho numa população humana, que recorreu a IFI e que detectou *E. chaffeensis* num indivíduo com profissão de risco associada à exposição por ixodídeos (Santos-Silva *et al.*, 2009). Como os resultados serológicos positivos podem decorrer de reacção cruzada com outros organismos (Arnez, Petrovec, Lotric-Furlan, Zupanc & Strle, 2001), os resultados seropositivos a *E. chaffeensis* obtidos nesses estudos não permitem afirmar a existência dessa bactéria em Portugal.

Quanto aos resultados obtidos para *R. conorii* por IFI e para *Rickettsia* spp. por qPCR, verificou-se que 55% dos animais manifestaram anticorpos anti-*R. conorii* no momento da colheita sanguínea, mas não apresentaram DNA parasitário em circulação. De acordo com Levin *et al.* (2012) é possível extrapolar uma explicação plausível para estes resultados: no estudo mencionado, nos animais experimentalmente infectados por injeção endovenosa, foi detectada parasitémia até cerca de 7 dias pós-inoculação, enquanto os animais infectados através da picada do ixodídeo da espécie *R. sanguineus* infectado com *R. conorii*, apresentaram parasitémias detectáveis pontualmente nos dias 25 e 56, dias 43, 45 e 58 e dia 43 pós-infecção. Pelo contrário, com excepção de um animal, todos os cães

infectados seroconverteram uma a duas semanas pós-infecção e mantiveram-se seropositivos (e PCR negativos) durante 3 a 7,5 meses. Assim, é possível sugerir que as colheitas sanguíneas do presente estudo possam ter sido feitas no período de tempo em que os anticorpos estão presentes, mas em que não é detectado DNA do agente.

#### **4.5 Detecção de DNA por PCR convencional e sequenciação nucleotídica**

A ausência de bandas de peso molecular específico na cPCR, nas amostras previamente consideradas positivas a *Babesia* spp. por qPCR, e que por sequenciação revelariam espécies de *Babesia*, poderá estar relacionada com o método de amplificação convencional. Sabe-se que esta é uma técnica que apresenta uma menor sensibilidade em comparação com o método de qPCR, uma vez que está dependente de processamento pós-PCR, que inclui a observação dos produtos resultantes no final da reacção em gel de agarose, sendo apenas as amostras consideradas positivas quando apresentam um padrão de bandas no gel de peso molecular específico. Pelo contrário, a técnica de qPCR é uma metodologia que permite ver os resultados em tempo real, acompanhando e registando a evolução dos ciclos através de *software* que é independente do operador e permitindo desde logo a identificação das amostras positivas, mesmo quando presentes em quantidades muito pequenas. Ainda que não se tenham realizado estudos de sensibilidade, pode-se concluir que uma foi superior à outra, uma vez que o DNA das diferentes amostras foi utilizado nas mesmas quantidades, tanto para a pesquisa por qPCR, como por cPCR, obtendo-se unicamente resultados positivos para a primeira.

Relativamente à espécie de *Hepatozoon* que infecta os cães em Portugal, tem sido assumido nos últimos anos que seria o hemoparasita *H. canis*, o causador de hepatozoonose canina. Estas assunções têm sido baseadas na observação em esfregaços sanguíneos de parasitas morfológicamente semelhantes a *H. canis* (Figueiredo, 2008), porém, não é possível afirmar a partir deste método qual será a espécie em causa nas infecções dos cães portugueses. Em 2010 e em 2012, no Norte do país, foram feitas as únicas confirmações da espécie de *Hepatozoon* que infecta os cães em Portugal, através da identificação molecular de *H. canis* (Cardoso *et al.*, 2010b; Yisaschar-Mekuzas *et al.*, 2012). Deste modo, no presente trabalho, a análise BLAST dos produtos de cPCR amplificados e sequenciados revelou uma identidade de 100% com a espécie *H. canis* (GenBank AY461378.2) e permitiu igualmente, e pela primeira vez na área de Lisboa, a identificação molecular de *H. canis*, confirmando definitivamente a espécie envolvida na hepatozoonose canina nos animais em estudo, nesta região do país.

#### **4.6 Influência de factores**

A maior prevalência de infecção por *Babesia* spp. no concelho de Lisboa, e de *R. conorii* no concelho de Sintra, revela que existe um maior risco para a contracção destas infecções

nessas áreas, em comparação com os restantes concelhos estudados. Todavia, é necessário ter em atenção que em 6 dos 9 concelhos estudados, foram poucas as amostras colhidas, e, por isso, estas áreas geográficas não estão tão bem representadas, podendo conduzir a uma falsa conclusão de que estas áreas pouco representadas não são também áreas de risco para contrair a infecção. Além disso, a elevada seroprevalência de *R. conorii* em Sintra poderá ser explicada, ainda que não demonstrada estatisticamente, pelo facto da maioria dos animais desse concelho estar alojada no canil municipal e ter um acesso permanente ao exterior, apresentando, por isso, um contacto mais intenso com os biótopos dos vectores. Em qualquer dos casos, para obter resultados mais fidedignos, seria necessário aumentar o número de animais estudados por cada concelho.

A associação estatisticamente significativa entre a idade e a seropositividade a *R. conorii*, permitiu verificar que os animais com idade superior a 2 anos apresentaram maior risco de serem seropositivos, relação, essa, que também já foi relatada por outros autores (Alexandre, 2005; Figueiredo, 2008). A existência desta dependência poderá ser explicada pelo facto de que, à medida que a idade aumenta, os animais mais velhos vão tendo um período de exposição ao vector superior aos cães com idades menores, podendo apresentar, por isso, uma seroprevalência superior.

A ausência de associação estatística significativa entre os restantes factores e a positividade a *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp., *B. canis*, *E. canis*, *A. phagocytophilum* e *R. conorii* não significa que não exista realmente influência desses factores sobre a positividade aos agentes. Para serem retiradas mais conclusões, seria necessário aumentar o número de indivíduos estudados, de modo a ter uma população maior, até porque, seria de esperar que a eficiência da profilaxia, a visualização de carraças nos animais ou o acesso permanente ao exterior, exercesse influência sobre a prevalência e seroprevalência dos hemoparasitas. Outra razão que pode explicar a ausência de associação estatística, sobretudo entre esses três factores e a positividade aos diversos agentes aqui estudados, é que a informação dada pelos donos aquando da realização dos questionários, não tivesse sido completamente exacta, e que, por exemplo, não tenham notado a presença de carraças nos seus animais e/ou a aplicação de ectoparasiticidas seja até por vezes incorrecta ou não tão regular como afirmaram.

Num estudo realizado em Itália, Cassini *et al.* (2009) indicaram que cães que viviam permanentemente no exterior ou que estivessem alojados em canis, apresentavam maior risco de serem seropositivos para *B. canis* e consideraram que os animais de exterior estão mais expostos aos ixodídeos. Em Portugal, Cardoso *et al.* (2012) demonstraram a não utilização de ectoparasiticidas como um factor de risco para a positividade aos vários hemoparasitas por eles estudados. Na Alemanha, Jensen *et al.* (2006) demonstraram que cães com elevadas infestações de carraças eram significativamente mais seropositivos a *A. phagocytophilum* do que aqueles com cargas parasitárias mais baixas. Um resultado

semelhante foi evidenciado por Welc-Faleciak *et al.* (2009) em que, uma infestação prévia por ixodídeos aumentava o número de casos positivos de babesiose canina.

Ainda, como foi referido anteriormente, a ineficácia da profilaxia ectoparasiticida conduz a uma maior probabilidade de infecção, já que, a prevenção através do controlo dos vectores transmissores dos agentes causadores das DCTV, é uma das estratégias mais eficazes contra a babesiose canina, assim como para qualquer outra DCTV (Stanneck, 2006; Taboada & Lobetti, 2006; Irwin, 2009; Ayoob *et al.*, 2010; Solano-Gallego & Baneth, 2011).

## **5 Considerações finais**

Todos os resultados obtidos neste estudo permitem verificar a possibilidade de detecção de DNA parasitário por qPCR, enquanto os outros testes são negativos, seja porque é detectado antes da ocorrência da seroconversão, seja porque a parasitémia é baixa e intermitente e não detectada por esfregaço sanguíneo. Pelo contrário, verifica-se a persistência de anticorpos na ausência de DNA parasitário. Ainda, a detecção de DNA em detrimento da detecção dos anticorpos, indica provavelmente infecção activa em vez de uma exposição algures no tempo aos agentes. Assim, e devido à elevada divergência obtida entre os resultados por qPCR, por IFI e por esfregaço sanguíneo, a autora aconselha que nas zonas endémicas, cães que sejam levados à consulta e que sejam suspeitos de doença transmitida por ixodídeos, sejam testados por métodos moleculares e complementados pelos testes serológicos. Esta associação é extremamente importante para o rastreio de hemoparasitas no caso particular de animais dadores de sangue, uma vez que é possível a transmissão dos agentes através de transfusões sanguíneas, e só a combinação destes dois tipos de testes é que garante uma verdadeira ausência dos vários hemoparasitas.

Rastreios epidemiológicos que contemplem animais assintomáticos deveriam também ser realizados recorrendo aos métodos moleculares, complementados com os serológicos, uma vez que este trabalho permitiu verificar que animais assintomáticos que sejam positivos por qPCR podem ser negativos por IFI, e vice-versa.

Em qualquer dos casos, é necessário ter em atenção que a detecção de anticorpos ou de DNA não sustenta directamente a relação de causa-efeito entre a detecção directa ou indirecta dos diversos hemoparasitas e as manifestações de doença no animal, sendo particularmente verdade na avaliação dos resultados dos diferentes métodos de diagnóstico em animais que residam em áreas endémicas das DCTV. Para uma correcta avaliação do paciente, o médico veterinário necessita ter espírito crítico e saber fazer a integração dos resultados obtidos pelos diferentes métodos de diagnóstico com os dados obtidos pela história pregressa, sinais clínicos e análises hematológicas e bioquímicas.

Como informação adicional, refere-se que este projecto de mestrado continuará a ser desenvolvido na Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, em parceria com o Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa,

com vista à produção de um artigo internacional. As amostras que foram positivas a *Babesia* spp. por qPCR serão novamente submetidas à técnica de cPCR, desta próxima vez fazendo uso de novos *primers*, com objectivo de amplificação e posterior purificação e sequenciação de amostras positivas que sejam obtidas pelo método convencional. Deste modo, será possível cumprir um dos objectivos que foi proposto inicialmente aquando da realização deste estudo, mas que não foi realizado atempadamente, isto é, identificar molecularmente as espécies de *Babesia* que infectam os cães no distrito de Lisboa, permitindo, assim, compreender melhor a situação epidemiológica dos parasitas que causam babesiose canina em Portugal, e em particular, no distrito de Lisboa.

## Bibliografia

- Adachi, K., Tateishi, M., Horii, Y., Nagamoto, H., Shimizu, T. & Makimura, S. (1994). Elevated erythrocyte-bound IgG value in dogs with clinical *Babesia gibsoni* infection [abstract]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 56(4), 757-759. Acedido em Mar. 3, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7999903>.
- Aktas, M., Altay, K. & Dumanh, N. (2005). Development of a polymerase chain reaction method for diagnosis of *Babesia ovis* infection in sheep and goats. *Veterinary Parasitology*, 133(4), 277-281. Acedido em Maio 22, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401705003067>.
- Alexandre, N.M.L. (2005). *Estudo clínico e epidemiológico da febre botonosa, ehrlichiose canina e borreliose de Lyme numa população de canídeos domésticos do Algarve*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Alexandre, N., Santos, A.S., Nuncio, M.S., de Sousa, R., Boinas, F. & Bacellar, F. (2009). Detection of *Ehrlichia canis* by polymerase chain reaction in dogs from Portugal. *The Veterinary Journal*, 181(3), 343-344. Acedido em Out. 7, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023308001366#>.
- Allen, K.E., Li, Y., Kaltenboeck, B., Johnson, E.M., Reichard, M.V., Panciera, R.J. & Little, S.E. (2008). Diversity of *Hepatozoon* species in naturally infected dogs in the southern United States. *Veterinary Parasitology*, 154(3-4), 220-225. Acedido em Ago. 21, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401708001921>.
- Amici, R.R. (2001). The history of italian parasitology. *Veterinary Parasitology*, 98(1-3), 3-30. Acedido em Fev. 4, 2012, disponível em: <http://his.library.nenu.edu.cn/upload/soft/haoli/114/367.pdf>.
- Arnez, M., Petrovec, M., Lotric-Furlan, S., Zupanc, T.A. & Strle, F. (2001). First european pediatric case of human granulocytic ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(12), 4591-4592. Acedido em Out. 9, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88598/pdf/jm1201004591.pdf>.
- Ayoob, A.L., Hackner, S.G. & Prittie, J. (2010). Clinical management of canine babesiosis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 20(1), 77-89.
- Bacellar, F., Dawson, J.E., Silveira, C.A. & Filipe A.R. (1995). Antibodies against Rickettsiaceae in dogs of Setúbal, Portugal [abstract]. *Central European Journal of Public Health*, 3(2), 100-102. Acedido em Abr. 12, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7655402>.
- Baneth, G. (2006). *Hepatozoon canis* infection. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat*. (3rd ed.). (pp. 698-711). Philadelphia: Saunders, Elsevier.
- Baneth, G. (2007). Canine and feline hepatozoonosis – more than one disease [versão electrónica]. In IVIS, *Proceedings of the 32nd Annual Congress of the World Small Animal Veterinary Association 2007, Sydney, Australia*. Acedido em Ago. 21, 2012, disponível em: [http://www.ivis.org/proceedings/Wsava/2007/pdf/22\\_20070330053520\\_abs.pdf](http://www.ivis.org/proceedings/Wsava/2007/pdf/22_20070330053520_abs.pdf).

- Baneth, G. (2010). *Ehrlichia* and *Anaplasma* infections [versão electrónica]. In IVIS, *Proceedings of the 35th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA 2010, Geneva, Switzerland*. Acedido em Abr. 12, 2012, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2010/d12.pdf>.
- Baneth, G. (2011). Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. *Veterinary Parasitology*, 181(1), 3-11. Acedido em Ago. 21, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401711002767>.
- Baneth, G. Harmelin, A. & Presentey, B.Z. (1995). *Hepatozoon canis* infection in two dogs [abstract]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 206(12), 1891-1894. Acedido em Ago. 21, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7790303>.
- Baneth, G., Harrus, S., Ohnona, F.S. & Schlesinger, Y. (2009). Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. *Veterinary Microbiology*, 136(3-4), 321-325. Acedido em Out. 9, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113508005488>.
- Baneth, G., Mathew, J.S., Shkap, V., Macintire, D.K., Barta, J.R. & Ewing, S. A. (2003). Canine hepatozoonosis: Two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon* spp. *Trends in Parasitology*, 19(1), 27-31. Acedido em Set. 18, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492202000168#>.
- Baneth, G., Samish, M., Alekseev, E., Aroch, I. & Shkap, V. (2001). Transmission of *Hepatozoon canis* to dogs by naturally-fed or percutaneoulsy-injectcd *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Journal of Parasitology*, 87(3), 606-611.
- Baneth, G., Samish, M. & Shkap, V. (2007). Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). *Journal of Parasitology*, 93(2), 283-299.
- Baneth, G., Shkap, V., Presentey, B.Z. & Pipano, E. (1996). *Hepatozoon canis*: The prevalence of antibodies and gametocytes in dogs in Israel. *Veterinary Research Communications*, 20(1), 41-46. Acedido em Ago. 21, 2012, disponível em: <http://www.springerlink.com/content/k466386470425t37/fulltext.pdf>.
- Baneth, G. & Weigler, B. (1997). Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 11(6), 365-370.
- Beck, R., Vojta, L., Mrljak, V., Marinculic, A., Beck, A., Zivicnjak, T. & Cacciò, S.M. (2009). Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *International Journal for Parasitology*, 39(7), 843-848. Acedido em Fev. 18, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751909000277>.
- Bell, A.S. & Ranford-Cartwright, L.C. (2002). Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends in Parasitology*, 18(8), 338-342. Acedido em Ago. 23, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492202023310#>.
- Birkenheuer, A.J., Correa, M. T., Levy, M.G. & Breitschwerdt, E.B. (2005). Geographic distribution of babesiosis among dogs in the United States and association with dog bites: 150 cases (2000–2003). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227(6), 942-947. Acedido em Fev. 18, 2012, disponível em: <http://avmajournals.avma.org/doi/pdf/10.2460/javma.2005.227.942>.

- Birkenheuer, A.J., Horney, B., Bailey, M., Scott, M., Sherbert, B., Catto, V., Marr, H.S. Camacho, A.T. & Ballman, A.E. (2010). *Babesia microti*-like infections are prevalent in North American foxes. *Veterinary Parasitology*, 172(3-4), 179-182. Acedido em Fev. 19, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401710003286>.
- Birkenheuer, A.J., Levy, M.G. & Breitschwerdt, E.B. (2003a). Development and evaluation of a Seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4172-4177. Acedido em Mar. 24, 2012, disponível em: <http://jcm.asm.org/content/41/9/4172.full.pdf+html>.
- Birkenheuer, A.J., Levy, M.G. & Breitschwerdt, E.B. (2004a). Efficacy of combined atovaquone and azithromycin for the therapy of chronic *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) infections in dogs [abstract]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18(4), 494-498. Acedido em Abr. 1, 2012, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2004.tb02573.x/abstract>.
- Birkenheuer, A.J., Levy, M.G., Stebbins, M., Poore, M. & Breitschwerdt, E. (2003b). Serosurvey of anti*Babesia* antibodies in stray dogs and American Pit Bull Terriers and American Staffordshire Terriers from North Carolina. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 39(6), 551-557.
- Birkenheuer, A.J., Neel, J., Ruslander, D., Levy, M.G. & Breitschwerdt, E.B. (2004b). Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in a dog. *Veterinary Parasitology*, 124(3-4), 151-160. Acedido em Fev. 11, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440170400322X>.
- Bohm, M., Leisewitz, A.L. Thompson, P.N. & Schoeman, J.P. (2006). Capillary and venous *Babesia canis rossi* parasitaemias and their association with outcome of infection and circulatory compromise. *Veterinary Parasitology*, 141(1-2), 18-29. Acedido em Mar. 17, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706002846>.
- Boozer, A.L. & Macintire, D.K. (2003). Canine babesiosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 33(4), 885-904.
- Bourdoiseau, G. (2006). Canine babesiosis in France. *Veterinary Parasitology*, 138(1-2), 118-125. Acedido em Fev. 12, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706000628>.
- Brandão, L.P., Hagiwara, M.K. & Myiashiro, S.I. (2003). Humoral immunity and reinfection resistance in dogs experimentally inoculated with *Babesia canis* and either treated or untreated with imidocarb dipropionate. *Veterinary Parasitology*, 114(4), 253-265. Acedido em Mar. 3, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401703001304>.
- Brouqui, P., Bacellar, F., Baranton, G., Birtles, R.J., Bjoersdorff, A., Blanco, J.R., Caruso, G., Cinco, M., Fournier, P.E., Francavilla, E., Jensenius, M., Kazar, J., Laferl, H., Lakos, A., Furlan, S.L., Maurin, M., Oteo, J.A., Parola, P., Perez-Eid, C., Peter, O., Postic, D., Raoult, D., Tellez, A., Tselentis, Y. & Wilske, B. (2004). Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(12), 1108-1132. Acedido em Out. 2, 2012, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-0691.2004.01019.x/pdf>.
- Brown, T.A. (2006). Manipulation of purified DNA. In T.A. Brown (Ed.), *Gene cloning and DNA analysis*. (5th ed.). (pp. 54-86). Oxford: Blakwell Publishing.

- Buling, A., Criado-Fornelio, A., Asenzo, G., Benitez, D., Barba-Carretero, J.C. & Florin-Christensen, M. (2007). A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Veterinary Parasitology*, 147(1-2), 16-25. Acedido em Ago. 23, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401707001823#>.
- Cabannes, A., Pelse, H., Lucchese, F. & Appriou, M. (2002). Séroprévalence de la babésiose canine dans le Sud-Ouest de la France. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 153(1), 27-28. Acedido em Out. 1, 2012, disponível em: [http://www.revmedvet.com/2002/RMV153\\_27\\_28.pdf](http://www.revmedvet.com/2002/RMV153_27_28.pdf).
- Cacciò, S.M., Antunovic, B., Moretti, A., Mangili, V., Marinculic, A., Baric, R.R., Slemenda, S.B. & Pieniazek, N.J. (2002). Molecular characterization of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. *Veterinary Parasitology*, 106(4), 285-292. Acedido em Fev. 12, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401702001127>.
- Camacho, A.T., Pallas, E., Gestal, J.J., Guitián, F.J. & Olmeda, A.S. (2002). *Babesia canis* infection in a splenectomized dog. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 95(1), 17-19.
- Camacho, A.T., Pallas, E., Gestal, J.J., Guitián, F.J., Olmeda, A.S., Telford III, S.R. & Spielman, A. (2003). *Ixodes hexagonus* is the main candidate as vector of *Theileria annae* in northwest Spain. *Veterinary Parasitology*, 112(1-2), 157-163. Acedido em Fev. 19, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440170200417X>.
- Caprariis, D., Dantas-Torres, F., Capelli, G., Mencke, N., Stanneck, D., Breitschwerdt, E.B. & Otranto, D. (2011). Evolution of clinical, haematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-borne pathogens. *Veterinary Microbiology*, 149(1-2), 206-212. Acedido em Fev. 4, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113510004797>.
- Cárdenas, A.M., Doyle, K.C., Zhang, X., Nethery, K., Corstvet, R.E., Walker, D.H. & McBride, J.W. (2007). Enzyme-linked immunosorbent assay with conserved immunoreactive glycoproteins gp36 and gp19 has enhanced sensitivity and provides species-specific immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(2), 123-128. Acedido em Abr. 12, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1797795/pdf/0361-06.pdf>.
- Cardoso, L., Costa, A., Tuna, J., Vieira, L., Osnat, E., Yisaschar-Mekuzas, Y & Baneth, G. (2008). *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* infections in dogs from northern Portugal. *Veterinary Parasitology*, 156(3-4), 199-204. Acedido em Fev. 12, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401708002720>.
- Cardoso, L., Mendão, C. & Madeira de Carvalho, L. (2012). Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal – a national serological study. *Parasites & Vectors*, 5, 62. Acedido em Out. 2, 2012, disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1756-3305-5-62.pdf>.
- Cardoso, L., Tuna, J., Vieira, L., Yisaschar-Mekuzas, Y. & Baneth, G. (2010a). Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal. *The Veterinary Journal*, 183(2), 332-333. Acedido em Out. 7, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023308003705>.

- Cardoso, L., Yisaschar-Mekuzas, Y., Rodrigues, F.T., Costa, A., Machado, J., Diz-Lopes, D. & Baneth, G. (2010b). Canine babesiosis in northern Portugal and molecular characterization of vector-borne co-infections. *Parasites & Vectors*, 3, 27. Acedido em Fev. 12, 2012, disponível em: <http://www.parasitesandvectors.com/content/pdf/1756-3305-3-27.pdf>.
- Carli, E., Tasca, S., Trotta, M., Furlanello, T., Caldin, M. & Solano-Gallego, L. (2009). Detection of erythrocyte binding IgM and IgG by flow cytometry in sick dogs with *Babesia canis canis* or *Babesia canis vogeli* infection. *Veterinary Parasitology*, 162(1-2), 51-57. Acedido em Mar. 3, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401709001022>.
- Carrade, D.D., Foley, J.E., Borjesson, D.L. & Sykes, J.E. (2009). Canine Granulocytic Anaplasmosis: A Review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(6), 1129-1141. Acedido em Abr. 13, 2012, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2009.0384.x/pdf>.
- Carret, C., Walas, F., Carcy, B., Grande, N., Precigout, E., Moubri, K., Schetters, T.P. & Gorenflot, A. (1999). *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossii*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes [abstract]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(3), 298-301. Acedido em Fev. 11, 2012, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1550-7408.1999.tb05128.x/abstract>.
- Cassini, R., Zanutto, S., Regalbono, A.F., Gabrielli, S., Calderini, P., Moretti, A., Tampieri, M.P. & Pietrobelli, M. (2009). Canine piroplasmiasis in Italy: Epidemiological aspects in vertebrate and invertebrate hosts. *Veterinary Parasitology*, 165(1-2), 30-35. Acedido em Out. 1, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401709003951>.
- Centeno-Lima, S., Rosário, V., Parreira, R., Maia, A.J., Freudenthal, A.M., Nijhof, A.M. & Jongejan, F. (2003). A fatal case of human babesiosis in Portugal: Molecular and phylogenetic analysis. *Tropical Medicine and International Health*, 8(8), 760-764. Acedido em Abr. 8, 2012, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-3156.2003.01074.x/pdf>.
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O. & Malandrin, L. (2009). *Babesia* and its hosts: Adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary Research*, 40(2), 37. Acedido em Fev. 25, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2695028/pdf/vetres-40-37.pdf>.
- Cocco, R., Sanna, G., Cillara, M.G., Tola, S., Ximenes, L., Pinnaparpaglia, M.L. & Masala, G. (2003). Ehrlichiosis and rickettsiosis in a canine population of Northern Sardinia [abstract]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990, 126-130. Acedido em Out. 1, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12860613>.
- Conceição-Silva, F.M., Abranches, P., Silva-Pereira, M.C.D. & Janz, J.G. (1988). Hepatozoonosis in foxes from Portugal. *Journal of Wildlife Diseases*, 24(2), 344-347. Acedido em Set. 24, 2012, disponível em: <http://www.jwildlifedis.org/content/24/2/344.long>.
- Criado, A., Martinez, J., Buling, A., Barba, J.C., Merino, S., Jefferies, R. & Irwin, P.J. (2006). New data on epizootiology and genetics of piroplasms based on sequences of small ribosomal subunit and cytochrome b genes. *Veterinary Parasitology*, 142(3-4), 238-247. Acedido em Fev. 19, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440170600402X>.

- Criado-Fornelio, A., Buling, A., Cunha-Filho, N.A., Ruas, J.L., Farias, N.A.R., Rey-Valeiron, C., Pingret, J.L., Etievant, M. & Barba-Carretero, J.C. (2007a). Development and evaluation of a quantitative PCR assay for detection of *Hepatozoon* sp. *Veterinary Parasitology*, 150(4), 352-356. Acedido em Ago. 21, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401707005304>.
- Criado-Fornelio, A., González-del-Río, M.A., Buling-Saraña, A. & Barba-Carretero, J.C. (2003a). Molecular characterization of a *Babesia gibsoni* isolate from a spanish dog. *Veterinary Parasitology*, 117(1-2), 123-129. Acedido em Fev. 18, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401703003224>.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A. & Barba-Carretero, J.C. (2003b). Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe: Part I. Epizootiological aspects. *Veterinary Parasitology*, 113(3-4), 189-201. Acedido em Fev. 12, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401703000785>.
- Criado-Fornelio, A., Rey-Valeiron, C., Buling, A., Barba-Carretero, J.C., Jefferies, R. & Irwin, P. (2007b). New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. *Veterinary Parasitology*, 144(3-4), 261–269. Acedido em Fev. 18, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706005784>
- Dantas-Torres, F. (2008). The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*, 152(3-4), 173-185. Acedido em Abr. 7, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401707006838>.
- Dantas-Torres, F. & Figueredo, L.A. (2006). Canine babesiosis: A Brazilian perspective. *Veterinary Parasitology*, 141(3-4), 197-203. Acedido em Fev. 4, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706004729>.
- Direcção Geral da Saúde: Direcção de Serviços de Epidemiologia e Estatísticas da Saúde, Divisão de Epidemiologia (2010). *Doenças de declaração obrigatória*. Lisboa: DGS.
- Dixit, P., Dixit, A.K. & Varshney, J.P. (2010). Evidence of new pathogenic *Theileria* species in dogs. *Journal of Parasitic Diseases*, 34(1), 29-32. Acedido em Fev. 19, 2012, disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3081695/pdf/12639\\_2010\\_Article\\_9.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3081695/pdf/12639_2010_Article_9.pdf)
- Duarte, S.C., Linhares, G.F.C., Romanowsky, T.N., Neto, O.J.S. & Borges, L.M.F. (2008). Assessment of primers designed for the subspecies-specific discrimination among *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* and *Babesia canis rossii* by PCR assay. *Veterinary Parasitology*, 152(1-2), 16-20. Acedido em Mar. 25, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401707006693>.
- Duh, D., Tozon, N., Petrovec, M., Strasek, K. & Avsic-Zupanc, T. (2004). Canine babesiosis in Slovenia: Molecular evidence of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli*. *Veterinary Research*, 35(3), 363-368. Acedido em Fev. 12, 2012, disponível em: [http://www.vetres-archive.org/file/Vet.Res.\\_0928-4249\\_2004\\_35\\_3/Vet.Res.\\_0928-4249\\_2004\\_35\\_3\\_ART0010.pdf](http://www.vetres-archive.org/file/Vet.Res._0928-4249_2004_35_3/Vet.Res._0928-4249_2004_35_3_ART0010.pdf).

- Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P.J., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y. & Rurangirwa, F.R. (2001). Reorganization of genera on the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 2145-2165. Acedido Abr. 12, 2012, disponível em: <http://ijsb.sgmjournals.org/content/51/6/2145.full.pdf>.
- Ebani, V., Cerri, D., Fratini, F., Ampola, M. & Andreani, E. (2008). Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in domestic and wild animals from central Italy. *New Microbiologica*, 31(3), 371-375. Acedido em Out. 1, 2012, disponível em: [http://www.newmicrobiologica.org/pub/allegati\\_pdf/2008/3/371.pdf](http://www.newmicrobiologica.org/pub/allegati_pdf/2008/3/371.pdf).
- ESCCAP (2012). *Control of Vector-Borne Diseases in Dogs and Cats*. (ESCCAP Guideline 05). Malvern: UK. Acedido em Out. 02, 2012, disponível em: <http://www.esccap.org/uploads/file/ESCCAP%20Guidelines%20GL5%2001Oct2012.pdf>.
- Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., Jones, M.F., Vetter, E.A., Yao, J.D.C., Wengenack, N.L., Rosenblatt, J.E., Cockerill III, F.R. & Smith, T.F. (2006). Real-time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), 165-256. Acedido em Ago. 23, 2012, disponível em: <http://cmr.asm.org/content/19/1/165.full.pdf+html>.
- Ferreira, M. F. (2008). *Parasitoses Caninas Transmitidas por Ixodídeos*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Figueiredo, T.C.D. (2008). *Estudo da Prevalência de Doenças Associadas a Vectores em Canídeos Domésticos do Distrito de Bragança*. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Clínica. Lisboa: Faculdade de Medicina de Lisboa – Universidade de Lisboa.
- Foldvári, G., Hell, E. & Farkas, R. (2005). *Babesia canis canis* in dogs from Hungary: Detection by PCR and sequencing. *Veterinary Parasitology*, 127(3-4), 221-226. Acedido em Fev. 12, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401704004881>.
- Forlano, M., Scofield, A., Elisei, C., Fernandes, K.R., Ewing, S.A. & Massard, C.L. (2005). Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 134(1-2), 1-7. Acedido em Ago. 21, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440170500316X>.
- Fritz, D. (2010). A PCR study of piroplasms in 166 dogs and 111 horses in France. *Parasitology Research*, 106(6), 1339-1342. Acedido em Fev. 18, 2012, disponível em: <http://www.springerlink.com/content/125xp67626270324/fulltext.pdf>.
- Fukumoto, S., Suzuki, H., Igarashi, I. & Xuan, X. (2005). Fatal experimental transplacental *Babesia gibsoni* infections in dogs. *International Journal for Parasitology*, 35(9), 1031-1035. Acedido em Fev. 18, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751905001463>.

- Fukumoto, S., Xuan, X., Shigeno, S., Kimbita, E., Igarashi, I., Nagasawa, H., Fujisaki, K. & Mikami, T. (2001). Development of a polymerase chain reaction method for diagnosing *Babesia gibsoni* infection in dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 63(9), 977-81. Acedido em Mar. 25, 2012, disponível em: [http://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/63/9/977/\\_pdf](http://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/63/9/977/_pdf).
- Furlanello, T., Fiorio, F., Caldin, M., Lubas, G. & Solano-Gallego, L. (2005). Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. *Veterinary Parasitology*, 134(1-2), 77-85. Acedido em Mar. 11, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401705003699>.
- Gal, A., Loeb, E., Yisaschar-Mekuzas, Y. & Baneth, G. (2007). Detection of *Ehrlichia canis* by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. *The Veterinary Journal*, 175(2), 212-217. Acedido em Abr. 12, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023307000536#>.
- García, A.T.C. (2006). Piroplasm infection in dogs in northern Spain. *Veterinary Parasitology*, 138(1-2), 97-102. Acedido em Fev. 12, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706000598>.
- Gopegui, R.R., Peñalba, B., Goicoa, A., Espada, Y., Fidalgo, L.E. & Espino, L. (2007). Clinico-pathological findings and coagulation disorders in 45 cases of canine babesiosis in Spain. *The Veterinary Journal*, 174(1), 129-132. Acedido em Mar. 3, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023306001183>.
- Gorenflot, A. & Vial, H.J. (2006). Chemotherapy against babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 138(1-2), 147-160. Acedido em Fev. 5, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706000677>.
- Greene, C. (2006). Rickettsial infections. In M.J., Day & S.E., Shaw (Eds.), *Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat*. (pp. 134-137). London: Manson Publishing.
- Greene, C.E. & Breitschwerdt, E.B. (2006). Rocky Mountain Spotted Fever, Murine Typhuslike Disease, Rickettsialpox, Typhus, and Q Fever. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat*. (3rd ed.). (pp. 232-241). Philadelphia: Saunders, Elsevier.
- Greig, B. & Armstrong, P.J. (2006). Canine Granulocytotropic Anaplasmosis (*A. phagocytophilum* infection). In C.E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat*. (3rd ed.). (pp. 219-224). Philadelphia: Saunders, Elsevier.
- Gubbles, J.M., De Vos, A.P., Van Der Weide, M., Viseras, J., Schouls, L.M., De Vries, E. & Jongejan, F. (1999). Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1782-1789. Acedido em Maio 22, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC84950/pdf/jm001782.pdf>.
- Gulanber, A., Gorenflot, A., Schetters, T.P.M. & Carcy, B. (2006). First molecular diagnosis of *Babesia vogeli* in domestic dogs from Turkey. *Veterinary Parasitology*, 139(1-3), 224-230. Acedido em Fev. 18, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706001579>.

- Hamel, D., Silaghi, C., Knaus, M., Visser, M., Kusi, I., Rapti, D., Rehbein, S. & Pfister, K., (2009). Detection of *Babesia canis* subspecies and other arthropod-borne diseases in dogs from Tirana, Albania. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 121(3), 42-45. Acedido em Fev. 12, 2012, disponível em: <http://www.springerlink.com/content/n237171gw2279546/fulltext.pdf>.
- Harrus, S. & Waner, T. (2011). Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. *The Veterinary Journal*, 187(3), 292-296. Acedido em Abr. 12, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023310000353>.
- Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, I. & Bark, H. (1998a). Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: evaluation of a 6-week course. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(7), 2140-2142. Acedido em Out. 2, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC105010/pdf/jm002140.pdf>.
- Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, I., Foley, J.E., Poland, A.M. & Bark, H. (1998b). Amplification of Ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(1), 73-76. Acedido em Set. 24, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC124810/pdf/jm000073.pdf>.
- Harrus, S., Waner, T., Bjoersdorff, A. & Shaw, S. (2005). Ehrlichiosis and anaplasmosis. In M.J. Day & S.E. Shaw (Eds.), *Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat*. (pp. 120-133). London: Manson Publishing.
- Hartelt, K., Rieker, T., Oehme, R.M., Brockmann, S.O., Müller, W. & Dorn, N. (2007). First evidence of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) in dogs in western Europe. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 7(2), 163-166.
- Harvey, J.W. (2001). *Atlas of Veterinary Hematology: Blood and Bone Marrow of Domestic Animals*. Philadelphia: Saunders, Elsevier.
- Higuchi, S., Fujimori, M., Hoshi, F., Kawamura, S. & Yasuda, Y. (1995). Development of *Babesia gibsoni* in the salivary glands of the larval tick, *Rhipicephalus sanguineus* [abstract]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 57(1), 117-119. Acedido em Fev. 18, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7756402>.
- Higuchi, S., Izumitani, M., Hoshi, H., Kawamura, S. & Yasuda, Y. (1999). Development of *Babesia gibsoni* in the midgut of larval tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 61(6), 689-691. Acedido em Fev. 18, 2012, disponível em: [http://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/61/6/689/\\_pdf](http://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/61/6/689/_pdf).
- Higuchi, S., Kuroda, H., Hoshi, H., Kawamura, S. & Yasuda, Y. (1991). Development of *Babesia gibsoni* in the midgut of the nymphal stage of the tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 61(6), 697-699. Acedido em Fev. 18, 2012, disponível em: [http://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/61/6/697/\\_pdf](http://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/61/6/697/_pdf).
- Homer, M.J., Aguilar-Delfin, I., Telford III, S.R., Krause P.J. & Persing, D.H. (2000). Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(3), 451-469.
- Hornok, S., Egelhofer, R. & Farkas, R. (2006). Seroprevalence of canine babesiosis in Hungary suggesting breed predisposition. *Parasitology Research*, 99(6), 638-642. Acedido em Out. 1, 2012, disponível em: <http://www.springerlink.com/content/q03078222805k681/fulltext.pdf>.

- Hossain, M.A., Yamato, O., Yamasaki, M. & Maede, Y. (2004). Inhibitory effect of pyrimidine and purine nucleotides on the multiplication of *Babesia gibsoni*: possible cause of low parasitemia and simultaneous reticulocytosis in canine babesiosis. *Journal of Veterinary Medical Science*, 66(4), 389-95. Acedido em Mar. 3, 2012, disponível em: [http://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/66/4/389/\\_pdf](http://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/66/4/389/_pdf).
- Inokuma, H., Yoshizaki, Y., Matsumoto, K, Okuda, M., Onishi, T., Nakagome, K., Kosugi, R. & Hirakawa, M. (2004). Molecular survey of *Babesia* infection in dogs in Okinawa, Japan. *Veterinary Parasitology*, 121(3-4), 341-346. Acedido em Fev. 18, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401704001268>.
- Irwin, P.J. (2002). Companion animal parasitology: a clinical perspective. *International Journal for Parasitology*, 32(5), 581-593. Acedido em Fev. 4, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751901003617>.
- Irwin, P. (2005) Canine Babesiosis. In M.J. Day & S.E. Shaw (Eds.), *Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat*. (pp. 63-77). London: Manson Publishing.
- Irwin, P. J. (2007). PUPS, PCRs and platelets: *Ehrlichia* and *Anaplasma* infections of dogs in Australia and overseas [versão eletrônica]. In IVIS, *Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association, Sydney, Australia, 2007*. Acedido em Abr. 12, 2012, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/Wsava/2007/pdf/irwin1006.pdf>.
- Irwin, P.J. (2009). Canine babesiosis: From molecular taxonomy to control. *Parasites & Vectors*, 2(1): S4. Acedido em Fev. 4, 2012, disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1756-3305-2-S1-S4.pdf>.
- Irwin, P.J. & Hutchinson, G.W. (1991). Clinical and pathological findings of *Babesia* infection in dogs. *Australian Veterinary Journal*, 68(6), 204-209.
- Jacobson, L.S. (2006). The South African form of severe and complicated babesiosis: Clinical advances 1994-2004. *Veterinary Parasitology*, 138(1-2), 126-139. Acedido em Fev. 18, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440170600063X>.
- Jacobson, L.S. & Lobetti, R.G. (1996). Rhabdomyolysis as a complication of canine babesiosis [abstract]. *Journal of Small Animal Practice*, 37(6), 286-291. Acedido em Mar. 10, 2012, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.1996.tb02381.x/abstract>.
- Jacobson, L.S. & Lobetti, R.G. (2005). Glucose, lactate, and pyruvate concentrations in dogs with babesiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 66(2), 244-250. Acedido em Mar. 3, 2012, disponível em: <http://avmajournals.avma.org/doi/pdf/10.2460/ajvr.2005.66.244>.
- Jefferies, R., Ryan, U.M. & Irwin, P.J. (2007a). PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. *Veterinary Parasitology*, 144(1-2), 20-27. Acedido em Mar. 25, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706005413>.
- Jefferies, R., Ryan, U.M., Jardine, J., Broughton, D.K., Robertson, I.D. & Irwin, P.J. (2007b). Blood, Bull Terriers and babesiosis: Further evidence for direct transmission of *Babesia gibsoni* in dogs. *Australian Veterinary Journal*, 85(11), 459-463.

- Jefferies, R., Ryan, U.M., Jardine, J., Robertson, I.D. & Irwin, P.J. (2007c). *Babesia gibsoni*: Detection during experimental infections and after combined atovaquone and azithromycin therapy. *Experimental Parasitology*, 117(2), 115-123. Acedido em Mar. 3, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489407000914>.
- Jefferies, R., Ryan, U.M., Muhlnickel, C.J. & Irwin, P.J. (2003). Two species of canine *Babesia* in Australia: Detection and characterization by PCR. *Journal of Parasitology*, 89(2), 409-412. Acedido em Fev. 18, 2012, disponível em: <http://www.journalofparasitology.org/doi/pdf/10.1645/0022-3395%282003%29089%5B0409%3ATSOCBI%5D2.0.CO%3B2>
- Jensen, J., Simon, D., Escobar, H.M., Soller, J.T., Bullerdiek, J., Beelitz, P., Pfister, K. & Nolte, I. (2006). *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Zoonoses and Public Health*, 54(2), 94-101. Acedido em Out. 7, 2012, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1863-2378.2007.01028.x/pdf>.
- Jittapalapong, S., Rungphisutthipongse, O., Maruyama, S., Schaefer, J.J. & Stich, R.W. (2006). Detection of *Hepatozoon canis* in stray dogs and cats in Bangkok, Thailand [abstract]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1081, 479-488. Acedido em Ago. 21, 2012, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1196/annals.1373.071/abstract?systemMessage=Wiley+Online+Library+will+be+disrupted+on+25+August+from+13%3A00-15%3A00+BST+%2808%3A00-10%3A00+EDT%29+for+essential+maintenance&userIsAuthenticated=false&deniedAccessCustomisedMessage=>.
- Karagenc, T.I., Pasa, S., Kirli, G., Hosgor, M., Bilgic, H.B., Ozon, Y.H., Atasoy, A. & Eren, H. (2006). A parasitological, molecular and serological survey of *Hepatozoon canis* infection in dogs around the Aegean coast of Turkey. *Veterinary Parasitology*, 135(2), 113-119. Acedido em Ago. 21, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401705004097>.
- Keller, N., Jacobson, L.S., Nel, M., Clerq, M., Thompson, P.N. & Schoeman, J.P. (2004). Prevalence and risk factors of hypoglycemia in virulent canine babesiosis [abstract]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18(3), 265-270. Acedido em Mar. 3, 2012, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2004.tb02544.x/abstract>.
- Kelly, P.J., Matthewman, L.A., Mason, P.R., Courtney, S., Katsande, C. & Rukwava, J. (1992). Experimental infection of dogs with a Zimbabwean strain of *Rickettsia conorii* [abstract]. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(5), 322-326. Acedido em Abr. 14, 2012, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1404553>.
- Kim, C., Iseki, H., Herbas, M.S., Yokoyama, N., Suzuki, H., Xuan, X., Fujisaki, K. & Igarashi, I. (2007). Development of taqman-based real-time PCR assays for diagnostic detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(5), 837-841. Acedido em Ago. 23, 2012, disponível em: <http://www.ajtmh.org/content/77/5/837.full.pdf+html>.
- Kjemtrup, A.M. & Conrad, P.A. (2006). A review of the small canine piroplams from California: *Babesia conradae* in the literature. *Veterinary Parasitology*, 138(1-2), 112-117. Acedido em Fev. 12, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706000616>.

- Kjemtrup, A.M., Kocan, A.A., Whitworth, L., Meinkoth, J., Birkenheuer, A.J., Cummings, J., Boudreaux, M.K., Stockham, S.L., Irizarry-Rovira, A. & Conrad, P.A. (2000). There are at least three genetically distinct small piroplasms from dogs. *International Journal for Parasitology*, 30(14), 1501–1505. Acedido em Fev. 12, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002075190000120X>.
- Kjemtrup, A.M., Wainwright, K., Miller, M., Penzhorn, B.L. & Carreno, R.A. (2006). *Babesia conradae*, sp. Nov., a small canine *Babesia* identified in California. *Veterinary Parasitology*, 138(1-2), 103-111. Acedido em Fev. 12, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706000604>.
- Kohn, B., Galke, D., Beelitz, P. & Pfister, K. (2008). Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(6), 1289-1295.
- Kohn, B., Silaghi, C., Galke, D., Arndt, G. & Pfister, K. (2011). Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Research in Veterinary Science*, 91(1), 71-76. Acedido em Out. 1, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003452881000295X>.
- Lehtinen, L.E., Birkenheuer, A.J., Droleskey, R.E. & Holman, P.J. (2008). In vitro cultivation of a newly recognized *Babesia* sp. in dogs in North Carolina. *Veterinary Parasitology*, 151(2-4), 150-157. Acedido em Fev. 11, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S03044017070005754>.
- Levin, M.L., Killmaster, L.F. & Zemtsova, G.E. (2012). Domestic dogs (*Canis familiaris*) as reservoir hosts for *Rickettsia conorii*. *Vector-Borne And Zoonotic Diseases*, 12(1), 28-33.
- Li, Y., Wang, C., Allen, K.E., Little, S.E., Ahluwalia, S.K., Gao, D., Macintire, D.K., Blagburn, B.L. & Kaltenboeck, B. (2008). Diagnosis of canine *Hepatozoon* spp. infection by quantitative PCR. *Veterinary Parasitology*, 157(1-2), 50-58. Acedido em Ago. 21, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401708003403>.
- Lobetti, R.G. (1998). Canine babesiosis. *The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 20(4), 418-430.
- Lobetti, R.G. (2005). Cardiac involvement in canine babesiosis. *Journal of the South African Veterinary Association*, 76(1), 4-8.
- Lobetti, R.G., Reyers, F. & Nesbit, J.W. (1996). The comparative role of hemoglobinemia and hypoxia in the development of canine babesial nephropathy. *Journal of the South African Veterinary Association*, 67, 188-198.
- M'ghirbi, Y. & Bouattour, A. (2008). Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* from naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Tunisia. *Veterinary Parasitology*, 152(1-2), 1-7. Acedido em Fev. 18, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S03044017070006747>.
- Macintire, D.K., Boudreaux, M.K., West, G.D., Bourne, C., Wright, J.C. & Conrad, P.A. (2002). *Babesia gibsoni* infection among dogs in the southeastern United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 220(3), 325-329. Acedido em Fev. 12, 2012, disponível em: <http://avmajournals.avma.org/doi/pdf/10.2460/javma.2002.220.325>.

- Mackay, I.M., Mackay, J.F., Nissen, M.D. & Sloots, T.P. (2007). Real-time PCR: History and fluorogenic chemistries. In I.M. Mackay (Ed.), *Real-Time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization*. (pp. 1-39). Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- Mahoney, D.F. (1977). Babesia of domestic animals. In J.P. Kreier (Ed.), *Parasitic Protozoa Volume IV*. (pp. 1-43). New York: Academic Press.
- Marchetti, V., Lubas, G., Baneth, G., Modenato, M. & Mancianti, F. (2009). Hepatozoonosis in a dog with skeletal involvement and meningoencephalomyelitis [abstract]. *Veterinary Clinical Pathology*, 38(1), 121-152. Acedido Ago. 21, 2012, disponível em: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-165X.2008.00080.x/abstract?systemMessage=Wiley+Online+Library+will+be+disrupted+on+25+August+from+13%3A00-15%3A00+BST+%2808%3A00-10%3A00+EDT%29+for+essential+maintenance&userIsAuthenticated=false&deniedAccessCustomisedMessage=.](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-165X.2008.00080.x/abstract?systemMessage=Wiley+Online+Library+will+be+disrupted+on+25+August+from+13%3A00-15%3A00+BST+%2808%3A00-10%3A00+EDT%29+for+essential+maintenance&userIsAuthenticated=false&deniedAccessCustomisedMessage=)
- Marques, C., Duarte, A., Leal, A., Santos, A.S., Veloso, R., Meireles, J., Santos-Silva, M., Tavares, L. & Pereira da Fonseca, I. (2012). Detecção de agentes de DTC em ixodídeos de Portugal [comunicação oral]. *Simposium Merial: Congresso Hospital Veterinário Montenegro, Santa Maria da Feira, Fevereiro, 2012*.
- Matijakto, V., Mrljak, V., Kis, I., Kucer, N., Forsek, J., Zivcinkjak, T., Romc, Z., Simec, Z. & Ceron, J.J. (2007). Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Veterinary Parasitology*, 144(3-4), 242-250. Acedido em Mar. 3, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706005814>.
- Matjila, P.T., Leisewitz, A.L., Jongejan, F. & Penzhorn, B.L. (2008a). Molecular detection of tick-borne protozoal and ehrlichial infections in domestic dogs in South Africa. *Veterinary Parasitology*, 155(1-2), 152-157. Acedido em Fev. 18, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401708002197>.
- Matjila, P.T., Leisewitz, A.L., Oosthuizen, M.C., Jongejan, F. & Penzhorn, B.L. (2008b). Detection of a *Theileria* species in dogs in South Africa. *Veterinary Parasitology*, 157(1-2), 34-40. Acedido em Fev. 19, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401708003439>.
- Matjila, T.P., Nijhof, A.M., Taoufik, A., Houwers, D., Teske, E., Penzhorn, B.L., de Lange, T. & Jongejan, F. (2005). Autochthonous canine babesiosis in The Netherlands. *Veterinary Parasitology*, 131(1-2), 23-29. Acedido em Fev. 12, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401705001937>.
- Matsuu, A., Miyamoto, K., Ikadai, H., Okano, S. & Higuchi, S. (2006). Short Report: Cloning of the *Babesia gibsoni* cytochrome b gene and isolation of three single nucleotide polymorphisms from parasites present after atovaquone treatment. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(4), 593-597. Acedido em Abr, 1, 2012, disponível em: <http://www.ajtmh.org/content/74/4/593.full.pdf+html>.
- Matsuu, A., Ono, S., Ikadai, H., Uchide, T., Imamura, S., Onuma, M., Okano, S. & Higuchi, S. (2005). Development of a SYBR green real-time polymerase chain reaction assay for quantitative detection of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) DNA. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(6), 569-573. Acedido em Ago. 23, 2012, disponível em: <http://vdi.sagepub.com/content/17/6/569.full.pdf>.

- McBride, J.W., Corstvet, R.E., Gaunt, S.D., Boudreaux, C., Guedry, T. & Walker, D.H. (2003). Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. *Infection and Immunity*, 71(5), 2516-2524. Acedido em Out. 9, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC153292/pdf/1806.pdf>.
- Miyama, T., Sakata, Y., Shimada, Y., Ogino, S., Watanabe, M., Itamoto, K., Okuda, M., Verdida, R.A., Xuan, X., Nagasawa, H. & Inokuma, H. (2005). Epidemiological survey of *Babesia gibsoni* infection in dogs in eastern Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67(5), 467-471. Acedido em Fev. 18, 2012, disponível em: [http://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/67/5/467/\\_pdf](http://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/67/5/467/_pdf).
- Moreau, Y., Vidor, E., Bissuel, E. & Dubreuil, N. (1989). Vaccination against canine babesiosis: an overview of field observations. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83, 95-96.
- Murase, T., Ueda, T., Yamato, O., Tajima, M. & Maede, Y. (1996). Oxidative damage and enhanced erythrophagocytosis in canine erythrocytes infected with *Babesia gibsoni* [abstract]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 58(3), 259-261. Acedido em Mar. 3, 2012, disponível em: <http://ukpmc.ac.uk/abstract/MED/8777235>.
- Murata, T., Inoue, M., Tateyama, S., Taura, Y. & Nakama, S. (1993). Vertical transmission of *Hepatozoon canis* in dogs [abstract]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 55(5), 867-868. Acedido em Ago. 21, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8286548>.
- Murata, T., Inoue, M., Taura, Y., Nakama, S., Abe, H. & Fujisaki, K. (1995). Detection of *Hepatozoon canis* oocyst from ticks collected from the infected dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 57(1), 111-112.
- Mylonakis, M.E., Koutinas, A.F., Billinis, C., Leontides, L.S., Kontos, V., Papadopoulos, O., Rallis, T. & Fytianou, A. (2003). Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A comparison between five methods. *Veterinary Microbiology*, 91(2-3), 197-204. Acedido em Set. 24, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113502002985#>.
- Mylonakis, M.E., Leontides, L., Gonen, L., Billinis, C., Koutinas, A.F. & Baneth, G. (2005). Anti-*Hepatozoon canis* serum antibodies and gamonts in naturally-occurring canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Parasitology*, 129(3-4), 229-233. Acedido em Ago. 21, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401705000543>.
- Neer, T.M. & Harrus, S. (2006). Canine Monocytotropic Ehrlichiosis and Neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminatum*, *N. sennetsu* and *N. risticii* infections). In C.E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat*. (3rd ed.). (pp. 203-216). Philadelphia: Saunders, Elsevier.
- Nicholas, F.W. (Ed.). (2003). *Introduction to veterinary genetics*. (2nd ed). Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Oines, O., Storli, K. & Brun-Hansen, H. (2010). First case of babesiosis caused by *Babesia canis canis* in a dog from Norway. *Veterinary Parasitology*, 171(3-4), 350-353. Acedido em Fev. 12, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401710001810>.

- Onishi, T., Ueda, K., Horie, M., Kajikawa, T. & Ohishi, I. (1990). Serum hemolytic activity in dogs infected with *Babesia gibsoni* [abstract]. *The Journal of Parasitology*, 76(4), 564-567. Acedido em Mar. 3, 2012, disponível em <http://www.jstor.org/discover/10.2307/3282841?uid=3738880&uid=2&uid=4&sid=21100713167461>.
- Otranto, D. & Dantas-Torres, F. (2010). Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives. *Parasites & Vectors*, 3, 2. Acedido em Fev. 4, 2012, disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1756-3305-3-2.pdf>.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F. & Breitschwerdt, E.B. (2009a). Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: Part one. *Trends in Parasitology*, 25(4), 157-163. Acedido em Fev. 4, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492209000476>.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F. & Breitschwerdt, E.B. (2009b). Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: Part two. *Trends in Parasitology*, 25(5), 228-235. Acedido em Fev. 4, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492209000634>.
- Otranto, D., Paradies, P., Testini, G., Latrofa, M.S., Weigl, S., Cantacessi, C., Mencke, N., Caprariis, D., Parisi, A., Capelli, G. & Stanneck, D. (2008). Application of 10% imidacloprid/50% permethrin to prevent *Ehrlichia canis* exposure in dogs under natural conditions. *Veterinary Parasitology*, 153(3-4), 320-328. Acedido em Out. 1, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401708000940#>.
- Oyamada, M., Davoust, B., Boni, M., Dereure, J., Bucheton, B., Hammad, A., Itamoto, K., Okuda, M., Inokuma, H. (2005). Detection of *Babesia canis rossi*, *B. canis vogeli*, and *Hepatozoon canis* in dogs in a village of eastern Sudan by using a screening PCR and sequencing methodologies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(11), 1343-1346. Acedido em Fev. 18, 2012, disponível em: <http://cvi.asm.org/content/12/11/1343.full.pdf+html>.
- Paddock, C.D. & Childs, J.E. (2003). *Ehrlichia chaffeensis*: A prototypical emerging pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(1), 37-64.
- Parola, P., Paddock, C.D. & Raoult, D. (2005). Tick-borne rickettsioses around the world: Emerging diseases challenging old concepts. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 719-756. Acedido em Abr. 14, 2012, disponível em: <http://cmr.asm.org/content/18/4/719.full.pdf+html>.
- Passos, L.M.F., Geiger, S.M., Ribeiro, M.F.B., Pfister, K., Zahler-Rinder, M. (2005). First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 127(4), 81-85. Acedido em Fev. 18, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401704004145>.
- Peleg, O., Baneth, G., Eyal, O., Inbar, J. & Harrus, S. (2010). Multiplex real-time qPCR for the detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis vogeli*. *Veterinary Parasitology*, 173(3-4), 292-299. Acedido em Ago. 23, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401710004000#>.
- Penzhorn, B.L., Lewis, B.D., de Waal, D.T. & López Rebollar, L.M (1995). Sterilisation of *Babesia canis* infections by imidocarb alone or in combination with diminazene [abstract]. *Journal of the South African Veterinary Association*, 66(3), 157-159. Acedido em Abr. 1, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8596187>.

- Perez, M., Rikihisa, Y. & Wen, B. (1996). *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: Antigenic and genetic characterization. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(9), 2133-2139. Acedido em Abr. 12, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC229204/pdf/342133.pdf>.
- Petrovec, M., Furlan, S.L., Zupanc, T.A., Strle, F., Brouqui, P., Roux, V. & Dumler, J.S. (1997). Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(6), 1556-1559. Acedido em Out. 9, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC229786/pdf/351556.pdf>.
- Porchet, M.J., Sager, H., Muggli, L., Oppliger, A., Muller, N., Frey, C. & Gottstein, B. (2007). A descriptive epidemiological study on canine babesiosis in the Lake Geneva region [abstract]. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 149(10), 457-465. Acedido em Fev. 12, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17983018>.
- Punda-Polic, V., Bradaric, N., Klismanic-Nuber, Z., Mrljak, V. & Giljanovic, M. (1995). Antibodies to spotted fever group rickettsiae in dogs in Croatia. *European Journal of Epidemiology*, 11(4), 389-392. Acedido em Out. 2, 2012, disponível em: <http://www.springerlink.com/content/u5t46411p0050469/fulltext.pdf>.
- Pusterla, N., Pusterla, J.B., Deplazes, P., Wolfensberger, C., Muller, W., Horauf, A., Reusch, C. & Lutz, H. (1998). Seroprevalence of *Ehrlichia canis* and of canine granulocytic *Ehrlichia* infection in dogs in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(12), 3460-3462. Acedido em Out. 1, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC105221/pdf/jm003460.pdf>.
- R Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*. Acedido em Set. 18, 2012, disponível em: <http://www.R-project.org/>.
- Rar, V.A., Maksimova, T.G., Zakharenko, L.P., Bolykhina, S.A., Dobrotvorskyy, A.K. & Morozova, O.V. (2005). *Babesia* DNA detection in canine blood and *Dermacentor reticulatus* ticks in southwestern Siberia, Russia [abstract]. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 5(3), 285-287. Acedido em Fev. 12, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Babesia%20DNA%20detection%20in%20canine%20blood%20and%20Dermacentor%20reticulatus%20ticks%20in%20southwestern%20Siberia%2C%20Russia>.
- Reiczigel, J., Földi, J. & Ózsvári, L. (2010). Exact confidence limits for prevalence of a disease with an imperfect diagnostic test. *Epidemiology and Infection*, 138(11), 1674-1678.
- Rubini, A.S., Paduan, K.S., Martins, T.F., Labruna, M.B. & O'Dwyer, L.H. (2009). Acquisition and transmission of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) by the tick *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 164(2-4), 324-327. Acedido em Ago. 21, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401709003045>.
- Santos, A.S., Alexandre, N., Sousa, R., Nuncio, M.S., Bacellar, F. & Dumler, J.S. (2009). Serological and molecular survey of *Anaplasma* species infection in dogs with suspected tickborne disease in Portugal. *The Veterinary Record*, 164, 168-171.
- 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. *Emerging Infectious Diseases*, 10(9), 1643-1648. Acedido em Abr. 13, 2012, disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/10/9/pdfs/04-0276.pdf>.

- Santos-Silva, M.M., Beati, L., Santos, A.S., De Sousa, R., Nuncio, M.S., Melo, P., Santos-Reis, M., Fonseca, C., Formosinho, P., Vilela, C. & Bacellar, F. (2011). The hard-tick fauna of mainland Portugal (Acari: Ixodidae): An update on geographical distribution and known associations with hosts and pathogens. *Experimental and Applied Acarology*, 55(1), 85-121. Acedido em Fev. 19, 2012, disponível em: <http://www.springerlink.com/content/14k270w415417482/fulltext.pdf>.
- Santos-Silva, M.M., Santos, A.S., Sousa, R., Casimiro, E., Estrada-Peña, A., Lopes, D., Queijo, E., Doreta, A. & Bacellar, F. (2009). Os ixodídeos em Saúde Pública. In Carlos Borrego *et al.* (Eds.), *Investigação em Ambiente e Saúde: Desafios e Estratégias*. (pp. 65-69). Universidade de Aveiro, CESAM: Incograf
- Santos-Silva, M., Sousa, R., Santos, A.S., Lopes, D., Queijo, E., Doreta, A., Vitorino, L. & Bacellar, F. (2006a). Ticks and tick-borne Rickettsiae surveillance in Montesinho Natural Park, Portugal. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078, 137-142.
- Santos-Silva, M.M., Sousa, R., Santos, A.S., Melo, P., Encarnação, V. & Bacellar, F. (2006b). Ticks parasitizing wild birds in Portugal: Detection of *Rickettsia aeschlimannii*, *R. Helvetica* and *R. massiliae*. *Experimental and Applied Acarology*, 39(3-4), 331-338.
- Sasanelli, M., Paradies, P., Greco, B., Eyal, O., Zaza, V. & Baneth, G. (2010). Failure of imidocarb dipropionate to eliminate *Hepatozoon canis* in naturally infected dogs based on parasitological and molecular evaluation methods. *Veterinary Parasitology*, 171(3-4), 194-199. Acedido em Ago. 21, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401710002153>.
- Sasaki, M., Omobowale, O., Tozuka, M., Ohta, K., Matsuu, A., Nottidge, H.O., Hirata, H., Ikadai, H. & Oyamada, T. (2007). Molecular survey of *Babesia canis* in dogs in Nigeria. *Journal of Veterinary Medical Science*, 69(11), 1191-1193. Acedido em Fev. 18, 2012, disponível em: [http://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/69/11/1191/\\_pdf](http://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/69/11/1191/_pdf).
- Schettters, T. (2005). Vaccination against canine babesiosis. *Trends in Parasitology*, 21(4), 179-184. Acedido em Abr. 7, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492205000462>.
- Schettters, T.P.M, Kleuskens, J., Carcy, B., Gorenflot, A. & Vermeulen, A. (2007). Vaccination against large *Babesia* species from dogs. *Parassitologia*, 49(1), 13-17.
- Schettters, T.P.M., Kleuskens, J., Scholtes, N. & Bos, H.J. (1992). Vaccination of dogs against *Babesia canis* infection using parasite antigens from in vitro culture. *Parasite Immunology*, 14(3), 295-305.
- Schettters, T.H., Kleuskens, J., Scholtes, N. & Bos, H.J. (1995). Strain variation limits protective activity of vaccines based on soluble *Babesia canis* antigens [abstract]. *Parasite Immunology*, 17(4), 215-218. Acedido em Abr. 7, 2012, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3024.1995.tb00891.x/abstract>.
- Schettters, T.P.M, Kleuskens, J.A.G.M., Scholtes, N.C., Gorenflot, A., Moubri, K. & Vermeulen, A.N. (2001). Vaccination of dogs against heterologous *Babesia canis* infections using antigens from culture supernatants. *Veterinary Parasitology*, 100(1-2), 75-86. Acedido em Abr. 7, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440170100485X>.

- Schettters, T.P.M., Kleuskens, J.A.G.M., Scholtes, N.C., Pasman, J.W. & Bos, H.J. (1994). Vaccination of dogs against *Babesia canis* infection using antigens from culture supernatants with emphasis on clinical babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 52(3-4), 219-233.
- Schettters, T.P.M., Kleuskens, J.A.G.M., Scholtes, N.C., van de Crommert, J., Krijen, E., Moubri, K., Gorenflot, A. & Vermeulen, A.N. (2006). Onset and duration of immunity against *Babesia canis* infection in dogs vaccinated with antigens from culture supernatants. *Veterinary Parasitology*, 138(1-2), 140-146. Acedido em Abr. 7, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706000665>.
- Schettters, T.P.M., Moubri, K. & Cooke, B.M. (2009). Comparison of *Babesia rossi* and *Babesia canis* isolates with emphasis on effects of vaccination with soluble parasite antigens: A review. *Journal of the South African Veterinary Association*, 80(2), 75-78.
- Schettters, T.P.M., Scholtes, N.C., Kleuskens, J.A.G.M. & Bos, H.J. (1996). Not peripheral parasitaemia but the level of soluble parasite antigen in plasma correlates with vaccine efficacy against *Babesia canis*. *Parasite Immunology*, 18(1), 1-6.
- Shaw, S. & Day, M. (2005). Introduction. In S.E. Shaw & M.J. Day (Eds), *Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat*. (pp. 9, 10). London: Manson Publishing.
- Shaw, S.E., Day, M.J., Birtles, R.J. & Breitschwerdt, E.B. (2001). Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends in Parasitology*, 17(2), 74-80. Acedido em Fev. 4, 2012, disponível em: [http://www.cvbd.org/static/documents/tick-borne\\_infectious\\_diseases\\_of\\_dogs\\_shaw\\_2001.pdf](http://www.cvbd.org/static/documents/tick-borne_infectious_diseases_of_dogs_shaw_2001.pdf).
- Sikorski, L.E., Birkenheuer, A.J., Holowaychuk, M.K., McCleary-Wheeler, A.L., Davis, J.M. & Littman, M.P. (2010). Babesiosis caused by a large *Babesia* species in 7 immunocompromised dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(1), 127-131.
- Silva, E.E.C.M. (2010). *Ehrlichia canis, Rickettsia conorii e Anaplasma phagocytophilum – Estudo da prevalência por IFI e PCR, em população canina da área metropolitana do Porto*. Relatório Final de Estágio do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Porto: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto. Acedido em Abr. 14, 2012, disponível em <http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/21734/2/TESE%20DE%20EVA%20SILVA%20MED%20VET%202010.pdf>.
- Silva, I.P.C. (2011). *Estudo de hemoparasitas transmitidos por vectores, em cães de canil, Setúbal, Portugal*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Silva, M.M., Santos, A.S., Formosinho, P. & Bacellar, F. (2006). Carraças associadas a patologias infecciosas em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 19, 39-48. Acedido Fev. 19, 2012, disponível em: <http://www.actamedicaportuguesa.com/pdf/2006-19/1/039-048.pdf>.
- Simões, P.B., Cardoso, L., Araújo, M., Yisaschar-Mekuzas, Y. & Baneth, G. (2011). Babesiosis due to the canine *Babesia microti*-like small piroplasm in dogs – First report from Portugal and possible vertical transmission. *Parasites & Vectors*, 4, 50. Acedido em Fev. 19, 2012, disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1756-3305-4-50.pdf>.
- Simposium Veterinário (2011). Medicamentos e Produtos da Saúde Animal [versão electrónica]. Apifarma. Acedido em Abr. 7, 2012, disponível em: <http://www.apifarma.pt/simposiumvet/Paginas/default.aspx>.

- Solano-Gallego, L. & Baneth, G. (2011). Babesiosis in dogs and cats – Expanding parasitological and clinical spectra. *Veterinary Parasitology*, 181(1), 48-60. Acedido em Fev. 11, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401711002846>.
- Solano-Gallego, L., Kidd, L., Trotta, M., Marco, M.D., Caldin, M., Furlanello, T. & Breitschwerdt, E. (2006a). Febrile illness associated with *Rickettsia conorii* infection in dogs from Sicily. *Emerging Infectious Diseases*, 12(12), 1985-1988. Acedido em Abr. 14, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3291343/pdf/06-0326.pdf>.
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Osso, M., Hegarty, B. & Breitschwerdt, E. (2006b). A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Veterinary Research*, 37(2), 231-244. Acedido em Out. 1, 2012, disponível em: [http://www.vetres-archive.org/file/Vet.Res.\\_0928-4249\\_2006\\_37\\_2/Vet.Res.\\_0928-4249\\_2006\\_37\\_2\\_ART0005.pdf](http://www.vetres-archive.org/file/Vet.Res._0928-4249_2006_37_2/Vet.Res._0928-4249_2006_37_2_ART0005.pdf).
- Solano-Gallego, L., Trotta, M., Caldin, M. & Furlanello, T. (2008a). Molecular survey of *Rickettsia* spp. in sick dogs in Italy [abstract]. *Zoonoses and Public Health*, 155(8-10), 521-525. Acedido em Out. 8, 2012, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1863-2378.2008.01149.x/abstract?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false>.
- Solano-Gallego, L., Trotta, M., Carli, E., Carcy, B., Caldin, M. & Furlanello, T. (2008b). *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Veterinary Parasitology*, 157(3-4), 211-221. Acedido em Fev. 12, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440170800366X>.
- Solano-Gallego, L., Trotta, M., Razia, L., Furlanello, T. & Caldin, M. (2006c). Molecular survey of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* from blood of dogs in Italy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078, 515-518.
- Sousa, R., Nóbrega, S.D., Bacellar, F. & Torgal, J. (2003). Sobre a realidade da febre escaro-nodular em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 16, 429-436. Acedido em Abr. 14, 2012, disponível em: <http://www.actamedicaportuguesa.com/pdf/2003-16/6/429-436.pdf>.
- Stanneck, D. (2006). Modern approaches to prevent canine vector borne diseases (CVBD) [versão electrónica]. In IVIS, *International Congress of the Italian Association of Companion Animal Veterinarians, Società Culturale Italiana Veterinari per Animali da Compagnia, Rimini, Italy, 19 – 21, May*, pp. 123-124. Acedido em Fev. 4, 2012, disponível em: [http://www.ivis.org/proceedings/scivac/2006/stanneck1\\_en.pdf?LA=1](http://www.ivis.org/proceedings/scivac/2006/stanneck1_en.pdf?LA=1).
- Stegeman, J.R., Birkenheuer, A.J., Kruger, J.M. & Breitschwerdt, E.B. (2003). Transfusion-associated *Babesia gibsoni* infection in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222(7), 959–963,952. Acedido em Fev. 18, 2012, disponível em: <http://avmajournals.avma.org/doi/pdf/10.2460/javma.2003.222.959>.
- Suzuki, K., Wakabayashi, H., Takahashi, M., Fukushima, K., Yabuki, A. & Endo, Y. (2007). A possible treatment strategy and clinical factors to estimate the treatment response in *Babesia gibsoni* infection. *Journal of Veterinary Medical Science*, 69(5), 563-568. Acedido em Abr. 1, 2012, disponível em: [http://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/69/5/563/\\_pdf](http://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/69/5/563/_pdf).

- Taboada, J. & Lobetti, R. (2006). Babesiosis. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat*. (3rd ed.). (pp. 722-736). Philadelphia: Saunders, Elsevier.
- Torina, A. & Caracappa, S. (2006). Dog tick-borne diseases in Sicily [abstract]. *Parassitologia*, 48(1-2), 145-147. Acedido em Out. 1, 2012, disponível em: <http://ukpmc.ac.uk/abstract/MED/16881419>.
- Trapp, S.M., Messik, J.B., Vidotto, O., Jojima, F.S. & Morais, H.S.A. (2006). *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 141(1-2), 177-180. Acedido em Mar. 25, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706002810>.
- Uilenberg, G. (2006). *Babesia* – A historical overview. *Veterinary Parasitology*, 138(1-2), 3-10. Acedido em Fev. 4, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706000513>.
- Uilenberg, G., Franssen, F.F.J., Perie, N.M., & Spanjer, A.A.M. (1989). Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Veterinary Quarterly*, 11(1), 33–40. Acedido em Fev. 11, 2012, disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/01652176.1989.9694194>.
- Uilenberg, G., Verdiesen, P.A.H.M. & Zwart, D. (1981). Imidocarb: A chemoprophylactic experiment with *Babesia canis*. *The Veterinary Quarterly*, 3(3), 118-123. Acedido em Abr. 7, 2012, disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/01652176.1981.9693811>.
- Valasek, M.A. & Repa, J.J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29(3), 151-159. Acedido em Ago. 23, 2012, disponível em: <http://advan.physiology.org/content/29/3/151.full.pdf+html>.
- Varela, A.S. (2003). Tick-borne Ehrlichiae and Rickettsiae of dogs. In D.D. Bowman (Ed.), *Companion and exotic animal parasitology*. International Veterinary Information Service (IVIS), Ithaca, New York. Acedido em Abr. 12, 2012, disponível em: [http://www.ivis.org/advances/Parasit\\_Bowman/varela/chapter\\_frm.asp?LA=1](http://www.ivis.org/advances/Parasit_Bowman/varela/chapter_frm.asp?LA=1).
- Vercammen, F., De Deken, R. & Maes, L. (1996a). Prophylactic activity of imidocarb against experimental infection with *Babesia canis*. *Veterinary Parasitology*, 63(3-4), 195-198. Acedido em Abr. 7, 2012, disponível em: [http://ac.els-cdn.com/0304401795009019/1-s2.0-0304401795009019-main.pdf?\\_tid=5adbd0381c6fa00f273e0a5681d34d81&acdnat=1334709421\\_afd8514a79fe6b2d864dd6ee44609fe6](http://ac.els-cdn.com/0304401795009019/1-s2.0-0304401795009019-main.pdf?_tid=5adbd0381c6fa00f273e0a5681d34d81&acdnat=1334709421_afd8514a79fe6b2d864dd6ee44609fe6).
- Vercammen, F., De Deken, R. & Maes, L. (1996b). Prophylactic treatment of experimental canine babesiosis (*Babesia canis*) with doxycycline. *Veterinary Parasitology*, 66(3-4), 251-255. Acedido em Abr. 7, 2012, disponível em: [http://ac.els-cdn.com/S0304401796010163/1-s2.0-S0304401796010163-main.pdf?\\_tid=4963635aa892ef5d95dd6282bdeed0a0&acdnat=1334709316\\_6c6157f7f4feffe4a3601964a14e6517](http://ac.els-cdn.com/S0304401796010163/1-s2.0-S0304401796010163-main.pdf?_tid=4963635aa892ef5d95dd6282bdeed0a0&acdnat=1334709316_6c6157f7f4feffe4a3601964a14e6517).
- Vial, H.J. & Gorenflot, A. (2006). Chemotherapy against babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 138(1-2), 147-160. Acedido em Mar. 31, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706000677>.
- Vojta, L., Mrljak, V., Curkovic, S., Zivcnjak, T., Marinculic, A. & Beck, R. (2009). Molecular epizootiology of canine hepatozoonosis in Croatia. *International Journal for Parasitology*, 39(10), 1129-1136. Acedido em Ago. 21, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751909001015>.

- Walker, D.H. (2007). Rickettsiae and rickettsial infections: The current state of knowledge. *Clinical Infectious Diseases*, 45(1), S39-44. Acedido em Abr. 14, 2012, disponível em: [http://cid.oxfordjournals.org/content/45/Supplement\\_1/S39.full.pdf+html](http://cid.oxfordjournals.org/content/45/Supplement_1/S39.full.pdf+html).
- Wall, R. & Pitts, K. (2005). Arthropod vectors of infectious disease: Biology and control. In S.E. Shaw & M.J. Day (Eds.), *Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat*. (pp. 11-22). London: Manson Publishing.
- Wall, R. & Shearer, D. (2001). *Veterinary Ectoparasites: Biology, Pathology & Control*, (2nd ed.). (pp. 67-78). Oxford: Blackwell Science.
- Waner, T., Strenger, C., Keysary, A. & Harrus, S. (1998). Kinetics of serologic cross-reactions between *Ehrlichia canis* and the *Ehrlichia phagocytophila* genogroups in experimental *E. canis* infection in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 66(3-4), 237-243. Acedido em Out. 2, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242798001986#>.
- Wang, C., Ahluwalia, S.K., Li, Y., Gao, D., Poudel, A., Chowdhury, E., Boudreaux, M.K. & Kaltenboeck, B. (2010). Frequency and therapy monitoring of canine *Babesia* spp. infection by high-resolution melting curve quantitative FRET-PCR. *Veterinary Parasitology*, 165(1-2), 11-18. Acedido em Ago. 23, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401709006645>.
- Welc-Faleciak, R., Rodo, A., Sinski, E. & Bajer, A. (2009). *Babesia canis* and other tick-borne infections in dogs in Central Poland. *Veterinary Parasitology*, 166(3-4), 191-198. Acedido em Out. 7, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401709005718>.
- Wen, B., Rikihisa, Y., Mott, J.M., Greene, R., Kim, H., Zhi, N., Couto, G.C., Unver, A. & Bartsch, R. (1997). Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(7), 1852-1855. Acedido em Out. 9, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC229855/pdf/351852.pdf>.
- Wlosniewski, A., Leriche, M.A., Chavigny, C., Ulmer, P., Donnay, V., Boulouis, H.J., Mahl, PH. & Druilhe, P. (1997). Etude du portage asymptomatique de *Babesia canis* en zone d'enzootie. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 20(1), 75-86. Acedido em Mar. 3, 2012, disponível em: [http://ac.els-cdn.com/S0147957196000203/1-s2.0-S0147957196000203-main.pdf?\\_tid=55a9b79e-1458-11e2-8892-00000aacb362&acdnat=1350038221\\_686ff454c00927a35b8954a0740552b3](http://ac.els-cdn.com/S0147957196000203/1-s2.0-S0147957196000203-main.pdf?_tid=55a9b79e-1458-11e2-8892-00000aacb362&acdnat=1350038221_686ff454c00927a35b8954a0740552b3).
- Woldehiwet, Z. (2010). The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Veterinary Parasitology* 167(2-4), 108-122. Acedido em Abr. 13, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401709005469#>.
- World Health Organization: Department of Control of Neglected Tropical Diseases (2006). *Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance*. Londres: WHO. Acedido em Abr. 7, 2012, disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO\\_CDS\\_NTD\\_WHOPES\\_GCDPP\\_2006.1\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_CDS_NTD_WHOPES_GCDPP_2006.1_eng.pdf).
- World Health Organization: Regional Office for Europe (2004). *The vector-borne human infections of Europe: their distribution and burden on public health*. Copenhagen: WHO. Acedido em Abr. 12, 2012, disponível em: [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0008/98765/e82481.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0008/98765/e82481.pdf).

- Wulansari, R., Wijaya, A., Ano, H., Horii, Y., Nasu, T., Yamane, S. & Makimura, S. (2003). Clindamycin in the treatment of *Babesia gibsoni* infections in dogs [abstract]. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 39(6), 558-562. Acedido em Abr. 1, 2012, disponível em: <http://www.jaaha.org/content/39/6/558.short>.
- Yamane, I., Thomford, J.W., Gardner, I.A., Dubey, J.P., Levy, M. & Conrad, P.A. (1993). Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Babesia gibsoni* infections in dogs [abstract]. *American Journal of Veterinary Research*, 54(10), 1579-1584. Acedido em Out. 2, 2012, disponível em: <http://ukpmc.ac.uk/abstract/MED/8250380>.
- Yeagley, T.J., Reichard, M.V., Hempstead, J.E., Allen, K.E., Parsons, L.M., White, M.A., Little, S.E. & Meinkoth, J.H. (2009). Detection of *Babesia gibsoni* and the canine small *Babesia* 'Spanish isolate' in blood samples obtained from dogs confiscated from dog fighting operations. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 235(5), 535-539. Acedido em Fev. 18, 2012, disponível em: <http://avmajournals.avma.org/doi/pdf/10.2460/javma.235.5.535>.
- Yisaschar-Mekuzas, Y., Jaffe, C.L., Pastor, J., Cardoso, L. & Baneth, G. (2012). Identification of *Babesia* species infecting dogs using reverse line blot hybridization for six canine piroplasms, and evaluation of co-infection by other vector-borne pathogens. *Veterinary Parasitology* (2012). Acedido em Out. 31, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401712004578#>.
- Zahler, M., Rinder, H., Schein, E. & Gothe, R. (2000). Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. *Veterinary Parasitology*, 89(3), 241-248. Acedido em Fev. 12, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401700002028>.
- Zahler, M., Schein, E., Rinder, H. & Gothe, R. (1998). Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. *Parasitology Research*, 84(7), 544-548. Acedido em Fev. 11, 2012, disponível em: <http://www.springerlink.com/content/8ch7x78l5b5m196b/fulltext.pdf>.
- Zygner, W., Gójska, O., Rapacka, G., Jaros, D. & Wedrychowicz, H. (2007). Hematological changes during the course of canine babesiosis caused by large *Babesia* in domestic dogs in Warsaw (Poland). *Veterinary Parasitology*, 145(1-2), 146-151. Acedido em Mar. 11, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706006443>.

## ANEXOS

### Anexo I. Princípios activos existentes em Portugal utilizados no controlo de ixodídeos no cão

Tabela 16: Princípios activos existentes em Portugal, utilizados no controlo de ixodídeos no cão (Simposium Veterinário, 2011).

Princípio activo	Apresentação, via de administração e periodicidade	Especificações
<b>Amitraz</b>	Coleira, 4-4meses	-
<b>Amitraz (20mg/kg) + metaflumizona (20mg/kg)</b>	<i>Spot-on</i> , mensal	1 mês de protecção
<b>Deltametrina</b>	Coleira, 6-6 meses	6 meses de protecção
<b>Diazinão</b>	Coleira, 4-4 meses	-
<b>Fipronil</b>	<i>Spot-on</i> (6,7mg/kg), mensal	1 mês de protecção
	<i>Spray</i> , mensal (7,5mg/kg)	4-5 semanas de protecção
<b>Fipronil (6,7mg/kg) + metopreno (6mg/kg)</b>	<i>Spot-on</i> , mensal	1 mês de protecção
<b>Fipronil + metopreno + amitraz</b>	<i>Spot-on</i> mensal	5 semanas de protecção
<b>Imidaclopride (100mg/ml) + permetrina (500mg/ml)</b>	<i>Spot-on</i> , mensal	3-4 semanas de protecção
<b>Imidaclopride + flumetrina</b>	Coleira, 8-8 meses	8 meses
<b>Permetrina (100mg/kg)</b>	<i>Spot-on</i> , mensal	1 mês de protecção
	<i>Spray</i> , mensal	
<b>Permetrina + Butóxido de piperonilo</b>	Champô, semanal	-
<b>Piriprol (12,5mg/kg)</b>	<i>Spot-on</i> mensal	1 mês de protecção
<b>Propoxur</b>	Coleira, período de protecção 10 semanas a 4 meses	10 semanas de protecção
	Pó para aplicação tópica, semanal	-
	<i>Spray</i> para aplicação tópica e ambiental, semanal	-
<b>Propoxur + Flumetrina</b>	Coleira, 7-7 meses	7 meses

## Anexo II. Inquérito realizados aos proprietários da população canina residente em canis

### Inquérito realizado aos proprietários da população canina estudada – CANIL

Nome do Animal \_\_\_\_\_

Nome do Dono \_\_\_\_\_

1. História pregressa (anotar se for assintomático)

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

2. Freguesia, concelho e distrito da residência \_\_\_\_\_

3. Idade \_\_\_\_\_

4. Sexo \_\_\_\_\_

5. Raça \_\_\_\_\_

6. Pelagem

a. Comprimento \_\_\_\_\_

b. Cor \_\_\_\_\_

c. Tipo \_\_\_\_\_

d. Anteriormente teve alguma doença dermatológica? Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

Se sim, qual? \_\_\_\_\_

7. Há quanto tempo está no canil?

a. < 6 meses

b. > 6 meses

8. O animal tem acesso ao exterior? Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

Se sim:

a. Permanente ou intermitente? \_\_\_\_\_

9. Animal tem contacto com outros cães? Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

10. Alguma vez observou carraças no animal? Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

11. Alguma vez teve história de febre da carraça? Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

Se sim:

a. Quando? \_\_\_\_\_

b. Fez tratamento etiológico? Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

i. Se sim, qual foi o tratamento aplicado? \_\_\_\_\_

ii. Se sim, o animal recuperou clinicamente? Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

iii. Se não, o animal recuperou clinicamente de forma espontânea? Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

c. Alguma vez apresentou recaídas? Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

13. Costuma realizar profilaxia para ectoparasitas? Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

Se sim:

i. Com que frequência? \_\_\_\_\_

ii. Qual a forma de aplicação? \_\_\_\_\_

iii. Qual o nome comercial/princípio activo? \_\_\_\_\_

14. Há registo de alguma reacção secundária que possa impedir o uso de insecticidas/acaricidas?

Qual? \_\_\_\_\_

15. Vacina contra a babesiose (*Babesia canis*): Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

Se sim:

a. Quando realizou a primovacinação? \_\_\_\_\_

b. A primovacinação foi completa? \_\_\_\_\_

c. Fez reforços anuais? \_\_\_\_\_

16. Doenças concomitantes: Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

Se sim:

a. Quais? \_\_\_\_\_

b. Quando surgiram? \_\_\_\_\_

c. Fez tratamento etiológico? Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

Se sim, qual? \_\_\_\_\_

d. O animal recuperou clinicamente? Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

17. Actualmente faz alguma medicação? Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

Se sim:

Qual a medicação? \_\_\_\_\_

### Anexo III. Inquérito realizados aos proprietários da população canina que apareceu à consulta num hospital veterinário

#### Inquérito realizado aos proprietários da população canina estudada – HOSPITAL

Nome do Animal \_\_\_\_\_

Nome do Dono \_\_\_\_\_

1. História pregressa (anotar se for assintomático)

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

2. Freguesia, concelho e distrito da residência \_\_\_\_\_

3. Idade \_\_\_\_\_

4. Sexo \_\_\_\_\_

5. Raça \_\_\_\_\_

6. Pelagem

a. Comprimento \_\_\_\_\_

b. Cor \_\_\_\_\_

c. Tipo \_\_\_\_\_

d. Anteriormente teve alguma doença dermatológica? Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

Se sim, qual? \_\_\_\_\_

7. Desde quando está com o proprietário? \_\_\_\_\_

8. Aptidão

a. Companhia

b. Guarda

c. Caça

9. Proveniência do animal

a. Loja

b. Criador

c. Canil

d. Oferecido por particular

e. Rua – animal errante

f. Nascido na casa do proprietário

10. O animal tem acesso ao exterior? Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

Se sim:

a. Permanente ou intermitente? \_\_\_\_\_

b. Frequenta espaços públicos? Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

Se sim:

i. À trela ou solto? \_\_\_\_\_

ii. Quantas vezes por dia? \_\_\_\_\_

iii. Acesso a relvados ou campos abandonados? \_\_\_\_\_

iv. Brinca com outros cães? \_\_\_\_\_

11. O animal costuma acompanhar os donos nos fins-de-semana ou férias? Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

Se sim, qual o local para onde vai

- i. Praia
- ii. Campo
- iii. Cidade
- iiii. Outros (especifique) \_\_\_\_\_

12. Onde dorme?

- a. Cama própria?
- b. Cama dos donos?
- c. Casota/canil?
- d. Outros (especifique) \_\_\_\_\_

13. Há mais animais em casa? Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

- a. Se sim, quais? \_\_\_\_\_

14. Alguma vez observou carraças no animal? Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

15. Alguma vez teve história de febre da carraça? Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

Se sim:

- a. Quando? \_\_\_\_\_
- b. Fez tratamento etiológico? Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_
  - i. Se sim, qual foi o tratamento aplicado? \_\_\_\_\_
  - ii. Se sim, o animal recuperou clinicamente? Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_
  - iii. Se não, o animal recuperou clinicamente de forma espontânea?  
Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_
- c. Alguma vez apresentou recaídas? Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

17. Costuma realizar profilaxia para ectoparasitas? Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

Se sim:

- i. Com que frequência? \_\_\_\_\_
- ii. Qual a forma de aplicação? \_\_\_\_\_
- iii. Qual o nome comercial/princípio activo? \_\_\_\_\_

18. Há registo de alguma reacção secundária que possa impedir o uso de insecticidas/acaricidas?  
Qual? \_\_\_\_\_

19. Vacina contra a babesiose (*Babesia canis*): Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

Se sim:

- a. Quando realizou a primovacinação? \_\_\_\_\_
- b. A primovacinação foi completa? \_\_\_\_\_
- c. Fez reforços anuais? \_\_\_\_\_

20. Doenças concomitantes: Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

Se sim:

- a. Quais? \_\_\_\_\_
- b. Quando surgiram? \_\_\_\_\_
- c. Fez tratamento etiológico? Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_  
Se sim, qual? \_\_\_\_\_
- d. Recuperou clinicamente? Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

21. Actualmente faz alguma medicação? Sim \_\_\_\_; Não \_\_\_\_

- Se sim, qual a medicação? \_\_\_\_\_

## **Anexo IV. Pesquisa de anticorpos por Imunofluorescência Indirecta dos vários agentes transmitidos por ixodídeos, incluídos neste estudo.**

### **I. MegaScreen FLUOBABESIA canis**

*Kit para a Detecção de Anticorpos anti-Babesia canis em Soro ou Plasma*

#### **Procedimento**

Retirar os componentes do *kit* e deixá-los à temperatura ambiente (20-25°C) antes de abrir os frascos ou os invólucros das lâminas. O conjugado tem sempre de ser armazenado no escuro.

1. Remover cuidadosamente a lâmina do invólucro e identificá-la com o nome ou número dos pacientes.
2. Preparar diluições iniciais de 1:20 (5 µL de amostra + 95 µL de PBS) para todos os soros não testados.
3. Os controlos Positivo e Negativo estão prontos a usar.
4. Aplicar 10 µL de cada diluição no poço associado e identificar a sua localização para referência posterior. A aplicação das amostras deve ser feita a partir da periferia dos poços.
5. Colocar a lâmina numa câmara húmida e incubar durante 30 minutos a 37°C.
6. Remover a câmara húmida da incubadora. Lavar os poços com PBS (se for utilizada uma garrafa de lavagem, aplicar uma corrente suave no centro da lâmina e não directamente nos poços). Eliminar as gotas remanescentes sacudindo a lâmina e repetir a lavagem em PBS mais duas vezes, cinco minutos cada. Não permitir que os poços sequem entre os passos de lavagem. Retirar as lâminas e, apoiando a aresta maior da lâmina sobre papel de filtro, bater com precaução.
7. Adicionar imediatamente 1 gota de Conjugado anti-Cão-IgG-FITC em cada poço. A aplicação de soro ou conjugado deve ser feita a partir da periferia dos poços. Colocar as lâminas na câmara húmida a incubar por mais 30 minutos a 37°C. A incubação deve ser feita no escuro para proteger o conjugado fotossensível.
8. Lavar as lâminas como no passo 6.
9. Adicionar 2 gotas de meio de montagem na lamela e colocar a lâmina cuidadosamente sobre a lamela, comprimindo-a de modo a remover as bolhas de ar aprisionadas.
10. Observar as lâminas coradas numa ampliação de 400x, comparando cada poço com a intensidade visual e aparência do padrão de fluorescência visualizado nos poços de controlo Positivo e Negativo.
11. As lâminas podem ser armazenadas no escuro, entre 2-8°C, até 24 horas.

## II. MegaScreen FLUOEHRlichia canis

*Kit para a Detecção de Anticorpos anti-Ehrlichia canis em Soro ou Plasma*

### Procedimento

Retirar os componentes do *kit* e deixá-los à temperatura ambiente (20-25°C) antes de abrir os frascos ou os invólucros das lâminas. O conjugado tem sempre de ser armazenado no escuro!

1. Remover cuidadosamente a lâmina do invólucro e identificá-la com o nome ou número dos pacientes.
2. Preparar diluições iniciais de 1:40 (5 µL de amostra + 195 µL de PBS) para todos os soros não testados.
3. Os controlos Positivo e Negativo estão prontos a usar.
4. Aplicar 10 µL de cada diluição no poço associado e identificar a sua localização para referência posterior. A aplicação das amostras deve ser feita a partir da periferia dos poços.
5. Colocar a lâmina numa câmara húmida e incubar durante 30 minutos a 37°C.
6. Remover a câmara húmida da incubadora. Lavar os poços com PBS (se for utilizada uma garrafa de lavagem, aplicar uma corrente suave no centro da lâmina e não directamente nos poços). Eliminar as gotas remanescentes sacudindo a lâmina e repetir a lavagem em PBS mais duas vezes, cinco minutos cada. Não permitir que os poços sequem entre os passos de lavagem. Retirar as lâminas e, apoiando a aresta maior da lâmina sobre papel de filtro, bater com precaução.
7. Adicionar imediatamente 1 gota de Conjugado anti-Cão-IgG-FITC em cada poço. A aplicação de soro ou conjugado deve ser feita a partir da periferia dos poços. Colocar as lâminas na câmara húmida a incubar por mais 30 minutos a 37°C. A incubação deve ser feita no escuro para proteger o conjugado fotossensível.
8. Lavar as lâminas como no passo 6.
9. Adicionar 2 gotas de meio de montagem na lamela e colocar a lâmina cuidadosamente sobre a lamela, comprimindo-a de modo a remover as bolhas de ar aprisionadas.
10. Observar as lâminas coradas numa ampliação de 400x, comparando cada poço com a intensidade visual e aparência do padrão de fluorescência visualizado nos poços de controlo Positivo e Negativo.
11. As lâminas podem ser armazenadas no escuro, entre 2-8°C, até 24 horas.

### III. MegaScreen FLUOANAPLASMA phagocytophilum

Kit para a Detecção de Anticorpos anti-*Anaplasma phagocytophilum* em Soro ou Plasma

#### Procedimento

Retirar os componentes do *kit* e deixá-los à temperatura ambiente (20-25°C) antes de abrir os frascos ou os invólucros das lâminas. O conjugado tem sempre de ser armazenado no escuro!

1. Remover cuidadosamente a lâmina do invólucro e identificá-la com o nome ou número dos pacientes.
2. Preparar diluições iniciais de 1:50 (5 µL de amostra + 245 µL de PBS) para todos os soros não testados. Nos soros positivos, preparar diluições seriadas (50 µL da diluição anterior + 50 µL de PBS), para determinar o título máximo.
3. Os controlos Positivo e Negativo estão prontos a usar. Para cada lâmina, adicionar 20 µL do controlo Negativo e 20 µL do controlo Positivo.
4. Aplicar 20 µL de cada diluição no poço associado e identificar a sua localização para referência posterior. A aplicação das amostras deve ser feita a partir da periferia dos poços.
5. Colocar a lâmina numa câmara húmida e incubar durante 30 minutos a 37°C.
6. Remover a câmara húmida da incubadora. Lavar os poços com PBS (se for utilizada uma garrafa de lavagem, aplicar uma corrente suave no centro da lâmina e não directamente nos poços). Eliminar as gotas remanescentes sacudindo a lâmina e repetir a lavagem em PBS mais duas vezes, cinco minutos cada. Não permitir que os poços sequem entre os passos de lavagem. Retirar as lâminas e, apoiando a aresta maior da lâmina sobre papel de filtro, bater com precaução.
7. Adicionar imediatamente 1 gota de Conjugado anti-Cão-IgG-FITC em cada poço. A aplicação de soro ou conjugado deve ser feita a partir da periferia dos poços. Colocar as lâminas na câmara húmida a incubar por mais 30 minutos a 37°C. A incubação deve ser feita no escuro para proteger o conjugado fotossensível.
8. Lavar as lâminas como no passo 6.
9. Adicionar 2 gotas de meio de montagem na lamela e colocar a lâmina cuidadosamente sobre a lamela, comprimindo-a de modo a remover as bolhas de ar aprisionadas.
10. Observar as lâminas coradas numa ampliação de 400x, comparando cada poço com a intensidade visual e aparência do padrão de fluorescência visualizado nos poços de controlo Positivo e Negativo.
11. As lâminas podem ser armazenadas no escuro, entre 2-8°C, até 24 horas.

#### IV. MegaScreen FLUORICKETTSIA conorii

Kit para a Detecção de Anticorpos anti-*Rickettsia conorii* em Soro ou Plasma

##### Procedimento

Retirar os componentes do *kit* e deixá-los à temperatura ambiente (20-25°C) antes de abrir os frascos ou os invólucros das lâminas. O conjugado tem sempre de ser armazenado no escuro!

1. Remover cuidadosamente a lâmina do invólucro e identificá-la com o nome ou número dos pacientes.
2. Preparar diluições iniciais de 1:64 (5 µL de amostra + 315 µL de PBS) para todos os soros não testados. Nos soros positivos, preparar diluições seriadas (50 µL da diluição anterior + 50 µL de PBS), para determinar o título máximo.
3. Os controlos Positivo e Negativo estão prontos a usar. Para cada lâmina, adicionar 20 µL do controlo Negativo e 20 µL do controlo Positivo.
4. Aplicar 10 µL de cada diluição no poço associado e identificar a sua localização para referência posterior. A aplicação das amostras deve ser feita a partir da periferia dos poços.
5. Colocar a lâmina numa câmara húmida e incubar durante 30 minutos a 37°C.
6. Remover a câmara húmida da incubadora. Lavar os poços com PBS (se for utilizada uma garrafa de lavagem, aplicar uma corrente suave no centro da lâmina e não directamente nos poços). Eliminar as gotas remanescentes sacudindo a lâmina e repetir a lavagem em PBS mais duas vezes, cinco minutos cada. Não permitir que os poços sequem entre os passos de lavagem. Retirar as lâminas e, apoiando a aresta maior da lâmina sobre papel de filtro, bater com precaução.
7. Adicionar imediatamente 1 gota de Conjugado anti-Cão-IgG-FITC em cada poço. A aplicação de soro ou conjugado deve ser feita a partir da periferia dos poços. Colocar as lâminas na câmara húmida a incubar por mais 30 minutos a 37°C. A incubação deve ser feita no escuro para proteger o conjugado fotossensível.
8. Lavar as lâminas como no passo 6.
9. Adicionar 2 gotas de meio de montagem na lamela e colocar a lâmina cuidadosamente sobre a lamela, comprimindo-a de modo a remover as bolhas de ar aprisionadas.
10. Observar as lâminas coradas numa ampliação de 400x, comparando cada poço com a intensidade visual e aparência do padrão de fluorescência visualizado nos poços de controlo Positivo e Negativo.
11. As lâminas podem ser armazenadas no escuro, entre 2-8°C, até 24 horas.

## **Anexo V. Protocolo de extração de DNA a partir de 300µL de sangue total (ArchivePure DNA Blood Kit – 30 ml<sup>®</sup> [5 PRIME]).**

### **Purificação de DNA a partir de 300 µL de sangue total**

Para amostras congeladas a -80°C: descongelar as amostras em banho-maria a 37°C e colocá-las em gelo até serem utilizadas.

#### **Lise Celular**

1. Adicionar 300 µL de sangue total a um tubo de 1,5 ml contendo 900 µL de RBC Lysis Solution. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente; inverter gentilmente 10 vezes durante a incubação.
2. Centrifugar durante 3 minutos a 13000 x *g*. Remover o máximo de sobrenadante possível com uma micropipeta, deixando no fundo do tubo um *pellet* branco e cerca de 10-20 µL de líquido residual.
3. Fazer um vortex durante 10 segundos para ressuspender as células no líquido residual; este ponto facilita grandemente a lise celular no passo seguinte. O *pellet* branco de células não deve ser visível após o vortex.
4. Adicionar 300 µL de Cell Lysis Solution às células ressuspensas e pipetar apirando o produto no sentido ascendente e descendente de modo a lisar as células. As amostras são estáveis na Cell Lysis Solution durante, pelo menos, dois anos à temperatura ambiente.

#### **Tratamento com Proteinase**

1. Adicionar 7 µL de Proteinase K ao lisado celular.
2. Misturar a amostra invertendo o tubo 25 vezes e incubar a 56°C durante 1 hora.

#### **Precipitação Proteica**

1. Colocar a amostra no gelo durante 3 minutos, para arrefecê-la rapidamente.
2. Adicionar 100 µL de Protein Precipitation Solution ao lisado celular.
3. Fazer um vortex a velocidade elevada, durante 20 segundos, para misturar uniformemente a Protein Precipitation Solution com o lisado celular.
4. Centrifugar a 13000 x *g* durante 2 minutos. O precipitado proteico deve formar um *pellet* acastanhado e firme. Caso o *pellet* não esteja firme, repetir o passo 3, seguido de incubação no gelo durante 5 minutos e repetir o passo 4.

### **Precipitação do DNA**

1. Transferir o sobrenadante contendo o DNA (deixando o *pellet* proteico precipitado no fundo do tubo) para um novo tubo de 1,5ml, contendo 300 µL de isopropanol 100% (2-propanol).
2. Misturar a amostra invertendo gentilmente o tubo 50 vezes.
3. Centrifugar a 13000 x *g* durante 2 minutos; o DNA aparece sob a forma de um pequeno *pellet* branco.
4. Descartar o sobrenadante e escoar brevemente o tubo para um papel absorvente. Adicionar 300 µL de etanol 70% e inverter o tubo várias vezes para lavar o *pellet* de DNA.
5. Centrifugar a 13000 x *g* durante 2 minutos. Eliminar o etanol cuidadosamente, porque o *pellet* pode estar solto e confirmar sempre a sua presença no tubo.
6. Inverter e escoar o tubo sobre um papel absorvente e deixar a secar ao ar durante 10 minutos.

### **Hidratação do DNA**

1. Adicionar 100 µL de DNA Hydratation Solution e fazer um vortex durante 5 segundos, a velocidade intermédia.
2. Incubar a amostra a 65°C durante 1 hora e/ou durante a noite a temperatura ambiente.
3. Armazenar o DNA a 4°C. Porém, para armazenamento por períodos longos de tempo, armazenar a -20°C.

## Anexo VI. Programa do termociclador para a reacção de cPCR

Tabela 17: Programa de amplificação dos géneros *Babesia* e *Theileria* por cPCR.

Número de ciclos	Tempo (segundos)	Temperatura
1	180	94°C
35	30	94°C
	44	55°C
	45	72°C
1	300	72°C

Tabela 18: Reagentes e respectivas concentrações utilizadas na reacção de cPCR para amplificação dos géneros *Babesia* e *Theileria*.

Reagentes	Concentração usada na mix
dNTPs	200 µM
10X PCR <i>buffer</i>	1 X
Primer - forward	0,25 µM
Primer - reverse	0,25 µM
MgCl <sub>2</sub>	1,25 mM
Taq Polymerase	1,8 U
DNA	0,1 µg
<b>Volume final (µL): 25</b>	