

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



NOVAS METODOLOGIAS APLICADAS AO ESTUDO DA EPIDEMIOLOGIA DA SARNA  
SARCÓPTICA EM CARNÍVOROS SILVESTRES

JULIETA FERNANDES ROUSSEAU

ORIENTADOR:

Doutor Nuno Gonçalo Carvalho Caroço  
dos Santos

COORIENTADOR:

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

2020



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



NOVAS METODOLOGIAS APLICADAS AO ESTUDO DA EPIDEMIOLOGIA DA SARNA  
SARCÓPTICA EM CARNÍVOROS SILVESTRES

JULIETA FERNANDES ROUSSEAU

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor Virgílio da Silva Almeida

VOGAIS:

Doutora Sandra de Oliveira Tavares de  
Sousa Jesus

Doutor Nuno Gonçalo Carvalho Caroço  
dos Santos

ORIENTADOR:

Doutor Nuno Gonçalo Carvalho Caroço  
dos Santos

COORIENTADOR:

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

2020

## DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE OU DISSERTAÇÃO

Nome: Julieta Fernandes Rousseau

Título da Tese ou  
Dissertação: Novas metodologias aplicadas ao estudo da epidemiologia da sarna sarcóptica em carnívoros silvestres

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2020

Designação do curso de  
Mestrado ou de  
Doutoramento: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Clínica  Produção Animal e Segurança Alimentar  
 Morfologia e Função  Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de  6 meses,  12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial\*;

\* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

O presente trabalho foi incorporado num artigo científico, encontrando-se na fase de revisão por pares.

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 23 de novembro de 2020

Assinatura: Julieta Rousseau

## **Agradecimentos**

Várias pessoas contribuíram de diferentes formas para a concretização deste trabalho e às quais estou verdadeiramente grata.

Ao meu orientador, Doutor Nuno Santos, pelos conhecimentos transmitidos e pela disponibilidade, ajuda, simpatia e amizade ao longo do estágio e da redação da dissertação. Um enorme obrigada!

Ao meu coorientador, Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho, que por lecionar parasitologia de uma forma tão cativante, me levou a escolher esta área para o meu estágio e tese. Obrigada também por me ter apresentado este projeto e por toda a ajuda na sua concretização.

Ao CIBIO, por me ter acolhido tão bem, e em especial à Raquel Godinho, Francisco Álvares, Susana Lopes, Diana Castro, Patrícia Ribeiro e Sofia Mourão por todo o apoio na execução do trabalho prático.

Ao Jorge Costa, que gentilmente cedeu os vídeos de armadilhas fotográficas.

Aos médicos veterinários do INIAV, pela possibilidade de participar nas necrópsias e pelo conhecimento que transmitiram.

Aos coautores do artigo: Mónia Nakamura, Helena Rio-Maior, Francisco Álvares, Rémi Choquet, Luís Madeira de Carvalho, Raquel Godinho e Nuno Santos, por todas as sugestões que se revelaram fundamentais.

Many thanks to École Nationale Vétérinaire d'Alfort for the internship opportunity provided, and in particular to Professor Jacques Guillot and all the parasitology teachers, as well as Charlotte Gary and the entire research team.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, que foi uma segunda casa nos últimos 5 anos e à qual tenho orgulho em pertencer.

E à minha maravilhosa família, queridos amigos e aos, não menos importantes, companheiros de quatro patas.

# Novas Metodologias Aplicadas ao Estudo da Epidemiologia da Sarna Sarcóptica em Carnívoros Silvestres

## Resumo

A sarna sarcóptica, provocada pelo ácaro *Sarcoptes scabiei*, é uma doença cutânea que afeta várias populações de carnívoros silvestres. Em algumas populações de raposa (*Vulpes vulpes*) a sarna originou consideráveis declínios populacionais. No lobo (*Canis lupus*), apesar de a sarna não ser diretamente responsável por elevada mortalidade, os animais afetados sofrem de alterações fisiológicas e comportamentais. A população lupina portuguesa divide-se em subpopulações fragmentadas e está confinada à região norte do país, pelo que esta doença poderá originar efeitos populacionais mais significativos.

Com o presente trabalho pretendeu-se, i) desenvolver um novo método de monitorização não-invasiva através da deteção molecular de *S. scabiei* em amostras fecais de lobo ii) descrever a epidemiologia da sarna sarcóptica em carnívoros silvestres (lobo e raposa) da região Noroeste de Portugal entre 1997 e 2019, combinando dados resultantes da análise laboratorial, utilizando métodos sorológicos para identificação de anticorpos específicos, métodos moleculares para deteção de DNA de *Sarcoptes* sp. em amostras fecais não-invasivas e métodos de observação direta para deteção de *Sarcoptes* sp. em digestões de pele alopecica, bem como dados de campo constituídos por foto-armadilhas de populações selvagens; iii) validar e avaliar o desempenho do método molecular não-invasivo através de modelos multi-evento de captura-recaptura.

Foi possível identificar *S. scabiei* por microscopia em 8/14 (57%, IC<sub>95%</sub> 32,6-78,6%) amostras de lobo e em 5/6 (83%, IC<sub>95%</sub> 43,7-97%) amostras de raposa. Na sorologia, 28/81 amostras foram positivas (prevalência predita de 45,4%, IC<sub>95%</sub> 30,3-60,5%). Nos métodos moleculares, foi detetado DNA de *S. scabiei* em 71/843 amostras fecais de lobo (prevalência predita de 7,2%, IC<sub>95%</sub> 5,0-9,4%). Nas foto-armadilhas, 11/72 (15%, IC<sub>95%</sub> 8,8-25,3%) deteções de lobos e 33/369 (9%, IC<sub>95%</sub> 6,4-12,3%) de raposas apresentavam lesões compatíveis com sarna.

A combinação destes métodos permitiu um estudo epidemiológico mais completo da sarna sarcóptica. Observou-se um período de alta prevalência em 2006-2009, com um pico no ano 2008 por sorologia (94,8%), enquanto que nos métodos moleculares, o pico ocorreu no ano 2009 (11,7%). Através das foto-armadilhas, a alopecia foi predominante entre fevereiro e julho e observaram-se alterações no padrão de atividade. Através do modelo multi-evento foi estimado que lobos com sarna apresentam uma mortalidade 18,4% (IC<sub>95%</sub> -15,2-49,6%) superior à dos lobos não infetados (não significativa) e foi estimada uma sensibilidade de 34,0% (IC<sub>95%</sub> 15,9-58,4%) e uma especificidade de 100% para o novo método desenvolvido.

**Palavras-chave:** Carnívora; *Sarcoptes scabiei*; PCR; Sorologia; Foto-armadilhas.

# New Methodologies for the Study of Sarcoptic Mange Epidemiology in Wild Carnivores

## Abstract

Sarcoptic mange, caused by the mite *Sarcoptes scabiei* is an enzootic skin disease that affects several populations of wild carnivores. In some red fox populations (*Vulpes vulpes*) mange have caused considerable population declines. Although in the wolf (*Canis lupus*), mange seems not directly responsible for high mortality, the affected animals present physiological and behavioural changes. The Portuguese lupine population is divided into fragmented subpopulations and is confined to the northern region of the country, so this disease may lead to more significant population effects.

This work aimed to i) develop a new method for non-invasive monitoring through molecular detection of *S. scabiei* in wolf faecal samples ii) describe the epidemiology of sarcoptic mange in wild carnivores (wolf and fox) in the North-Western region of Portugal between 1997 and 2019 by combining data resulting from laboratory analysis, using serological methods for the identification of specific antibodies, molecular methods for the detection of *Sarcoptes* sp. DNA in non-invasive faecal samples and direct observation methods for the detection of *Sarcoptes* sp. in alopecic skin digestions, as well as field data from camera trapping of wild populations; iii) validate and evaluate the performance of the non-invasive molecular method through multi-event capture-recapture models.

It was possible to identify the mite *S. scabiei* by microscopy in 8/14 (57%, CI<sub>95%</sub> 32.6-78.6%) wolf samples and in 5/6 (83%, CI<sub>95%</sub> 43.7-97%) fox samples. In serology, 28/81 samples were positive (predicted prevalence of 45.4%, CI<sub>95%</sub> 30.3-60.5%). In the molecular methods, *S. scabiei* DNA was detected in 71/843 faecal samples of wolves (predicted prevalence of 7.2%, CI<sub>95%</sub> 5.0-9.4%). In camera trapping, 11/72 (15%, CI<sub>95%</sub> 8.8-25.3%) wolves and 33/369 (9%, CI<sub>95%</sub> 6.4-12.3%) foxes with compatible mange lesions were detected.

The combination of different methods allowed a more complete epidemiological study of sarcoptic mange. A period of high prevalence was observed in 2006-2009, with a peak in the year 2008 by serology (94.8%) while in molecular methods, the peak occurred in the year 2009 (11.7%). By camera trapping, alopecia was found to be predominant between February and July and changes in the activity pattern were observed. With the multi-event capture-recapture model, it was estimated that wolves with mange showed a mortality rate 18.4% (CI<sub>95%</sub> -15.2-49.6%) higher than non-infected wolves (non-significant), and a sensitivity of 34.0% (CI<sub>95%</sub> 15.9-58.4%) and a specificity of 100% for the new method developed were estimated.

**Keywords:** Carnivora; *Sarcoptes scabiei*; PCR; Serology; Camera trapping.

## Índice

Agradecimentos .....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Índice .....	vi
Lista de figuras.....	ix
Lista de tabelas .....	ix
Lista de gráficos .....	ix
Abreviaturas, siglas e símbolos .....	x
Comunicações científicas.....	xii
1. Atividades desenvolvidas durante o estágio .....	1
1.1. Estágio curricular .....	1
1.1.1. Centro de Investigação em Biodiversidade e Genética (CIBIO).....	1
1.1.2. Atividades desenvolvidas .....	1
1.2. Estágio extracurricular .....	2
1.2.1. École Nationale Vétérinaire d'Alfort (EnVA).....	2
1.2.2. Atividades desenvolvidas .....	2
2. Revisão bibliográfica .....	3
2.1. Sarna sarcóptica.....	3
2.1.1. Etiologia e ciclo biológico.....	3
2.1.1.1. Classificação.....	3
2.1.1.2. Morfologia .....	4
2.1.1.3. Ciclo biológico.....	4
2.1.2. Epidemiologia.....	4
2.1.2.1. Variabilidade e especificidade.....	4
2.1.2.2. Transmissão e sobrevivência.....	5
2.1.3. Patogenia e sinais clínicos .....	6
2.1.3.1. Sinais clínicos e evolução da doença.....	6
2.1.3.2. Hipersensibilidade e imunidade .....	8
2.1.3.3. Complicações .....	9
2.1.4. Diagnóstico.....	10
2.1.4.1. Clínico.....	10
2.1.4.2. Observação direta – raspagem/digestão cutânea .....	10
2.1.4.3. Histopatologia .....	11
2.1.4.4. Sorologia.....	11
2.1.4.5. Foto-armadilhas .....	12
2.1.4.6. Métodos moleculares.....	13

2.1.4.7. Outros métodos .....	14
2.1.5. Tratamento, controlo e prevenção .....	14
2.1.5.1. Animais domésticos .....	14
2.1.5.2. Animais selvagens .....	15
2.1.5.3 Prevenção.....	17
2.1.6. Saúde pública.....	17
2.2. Sarna sarcóptica na fauna selvagem .....	18
2.3. Carnívoros silvestres .....	22
2.3.1. Lobo ( <i>Canis lupus</i> ) .....	22
2.3.1.1. Taxonomia .....	22
2.3.1.2. Características morfológicas .....	22
2.3.1.3. Distribuição .....	23
2.3.1.4. Habitat e alimentação .....	23
2.3.1.5. Organização social e ciclo anual .....	24
2.3.1.6. Ameaças e estatuto de conservação .....	25
2.3.2. Raposa ( <i>Vulpes vulpes</i> ).....	26
2.3.2.1. Taxonomia .....	26
2.3.2.2. Características morfológicas .....	26
2.3.2.3. Distribuição .....	27
2.3.2.4. Habitat e alimentação .....	27
2.3.2.5. Organização social e ciclo anual .....	28
2.3.2.6. Ameaças e estatuto de conservação .....	28
3. Objetivos .....	29
4. Material e métodos .....	29
4.1. Área de estudo .....	29
4.2. Método de observação direta.....	29
4.3. Foto-armadilhas .....	30
4.4. Método sorológico.....	31
4.4.1. Amostras .....	31
4.4.2. ELISA.....	32
4.5. Métodos moleculares.....	33
4.5.1. Amostras invasivas.....	33
4.5.1.1. Extração de DNA total.....	33
4.5.1.1.1. Método salino .....	33
4.5.1.1.2. <i>EasySpin</i> ® .....	33
4.5.1.2. Reação em Cadeia da Polimerase.....	34
4.5.2. Amostras não-invasivas.....	35

4.5.2.1. Amostras.....	35
4.5.2.2. Extração de DNA .....	36
4.5.2.3. Reação em Cadeia da Polimerase.....	36
4.6. Análise estatística .....	37
4.6.1. Comparação da atividade diária entre animais com e sem lesões compatíveis com sarna detetados por foto-armadilhas .....	38
4.6.2. Determinação dos pontos de corte para o método sorológico .....	38
4.6.3. Utilização de modelos binomiais mistos lineares generalizados nos métodos sorológico e molecular .....	38
4.6.4. Modelo multi-evento de captura-recaptura aplicado ao método molecular não-invasivo .....	39
5. Resultados .....	41
5.1. Método de observação direta.....	41
5.2. Foto-armadilhas .....	43
5.3. Método sorológico.....	47
5.4. Métodos moleculares .....	49
5.4.1. Extração de DNA e PCR de amostras invasivas .....	49
5.4.2. PCR de amostras não-invasivas.....	50
5.4.3. Modelo multi-evento de captura-recaptura aplicado ao método molecular não-invasivo .....	53
6. Discussão.....	53
6.1. Método de observação direta.....	53
6.2. Foto-armadilhas .....	54
6.3. Método sorológico.....	56
6.4. Método molecular não-invasivo e modelos multi-evento de captura-recaptura .....	58
6.5. Considerações finais.....	60
7. Conclusão e perspectivas futuras .....	61
8. Bibliografia .....	62
Anexos .....	74
Anexo 1. Abordagem metodológica e parametrizações utilizadas nos modelos multi-evento de captura-recaptura.....	74
Anexo 2. Abstract Scientific Reports .....	77
Anexo 3. Abstract Jornadas de Dermatologia de Paris .....	78
Anexo 4. Declaração de apresentação oral .....	79

## Lista de figuras

Figura 1 Aspeto externo de animais necropsiados com LCS.....	41
Figura 2 Observação de <i>S. scabiei</i> ao microscópio após digestão cutânea.....	41
Figura 3 Exemplos de fotografias de animais exibindo LCS, captadas por foto-armadilhas	43
Figura 4 Representação geográfica da % de LCS por câmara de foto-armadilhas.....	46
Figura 5 Resultado da observação do gel de eletroforese (a 0,8%) com avaliação do DNA total extraído por dois métodos diferentes.....	49
Figura 6 Resultado da observação do gel de eletroforese do controlo positivo (raposa 18-001) para os dois métodos de extração e para os dois genes .....	49
Figura 7 Resultado da eletroforese capilar do controlo positivo (raposa 18-001) para os dois genes .....	50
Figura 8 Resultado da observação do gel de eletroforese dos lobos SMLM 126 e SMLM 130 para o gene 16S.....	50
Figura 9 Resultado da eletroforese capilar de uma amostra positiva e de uma amostra positiva com um fragmento amplificado com tamanho 1-2 pb de diferença do controlo positivo .....	51
Figura 10 Representação geográfica do resultado molecular das amostras não-invasivas ..	52

## Lista de tabelas

Tabela 1 Resultados da análise estatística referente à atividade diária de lobos e raposas detetados por foto-armadilhas .....	45
Tabela 2 Resultados do GLMM dos dados serológicos em lobos e raposas .....	48
Tabela 3 Resultado do GLMM dos dados moleculares não-invasivos de lobos.....	51
Tabela 4 Vantagens e desvantagens dos vários métodos de diagnóstico de sarna sarcóptica em carnívoros silvestres.....	60

## Lista de gráficos

Gráfico 1 Distribuição do número e tipo de amostras analisadas por sorologia por cada ano .....	31
Gráfico 2 Distribuição do número de amostras não-invasivas analisadas por cada ano.....	35
Gráfico 3 Resultados do exame microscópico em lobos.....	42
Gráfico 4 Resultados do exame microscópico em raposas .....	42
Gráfico 5 Distribuição do número de deteções de lobos e raposas por foto-armadilhas entre maio de 2018 e outubro de 2019.....	43

Gráfico 6 Prevalência de LCS detetadas por armadilhas fotográficas em raposas e lobos durante dois anos consecutivos .....	44
Gráfico 7 Prevalência de LCS detetadas por armadilhas fotográficas em raposas e lobos por mês .....	44
Gráfico 8 Distribuição da atividade de lobos com ou sem LCS detetados por armadilhas fotográficas ao longo do dia .....	45
Gráfico 9 Distribuição da atividade de raposas com ou sem LCS detetadas por armadilhas fotográficas ao longo do dia .....	45
Gráfico 10 Associação entre presença/ausência de LCS e positividade ou negatividade sorológica.....	47
Gráfico 11 Seroprevalência predita de sarna em lobos, utilizando soro como amostra, de 1997 a 2019 .....	48
Gráfico 12 Prevalência predita de sarna por métodos moleculares com amostras não-invasivas recolhidas aleatoriamente de 2006 a 2018 .....	52

## Abreviaturas, siglas e símbolos

1 % - Percentagem	20 CITES - Convenção sobre o Comércio
2 < - Menor	21 Internacional das Espécies da Fauna e da
3 > - Maior	22 Flora Silvestres Ameaçadas de Extinção
4 ± - Mais ou menos	23 cm - centímetro
5 ® - Marca registada	24 cm <sup>2</sup> - centímetro quadrado
6 µL - Microlitro	25 CN - Controlo negativo
7 µm - Micrograma	26 CONGEN - <i>Conservation Genetics and</i>
8 µm - Micrómetro	27 <i>Wildlife Management</i>
9 µM - Micromolar	28 COX1 - <i>Cytochrome c oxidase subunit 1</i>
10 AICc - <i>Akaike information criterion</i>	29 (Citocromo c oxidase subunidade 1)
11 <i>corrected for small sample size</i> (Critério	30 CP - Controlo Positivo
12 de informação Akaike corrigido para o	31 CR - Captura-recaptura
13 tamanho da amostra mais baixo)	32 CTM - Centro de Testagem Molecular
14 AUC - <i>Area under the ROC curve</i> (Área	33 DNA - Ácido desoxirribonucleico
15 sob a curva ROC)	34 DO - Densidade óptica
16 CHUV-FS - <i>Centre hospitalier universitaire</i>	35 ELISA - <i>Enzyme-Linked Immunosorbent</i>
17 <i>veterinaire - Faune sauvage</i>	36 <i>Assay</i> (Ensaio de imunoabsorção
18 CIBIO - Centro de Investigação em	37 enzimática)
19 Biodiversidade e Recursos Genéticos	38 EN - <i>Endangered</i> (Em perigo)
	39 EnVA - <i>École Nationale Vétérinaire d'Alfort</i>

1	FMV-UL - Faculdade de Medicina	30	LTE - <i>Lung tissue extract</i> (Extrato de tecido
2	Veterinária - Universidade de Lisboa	31	pulmonar)
3	g - Força gravítica	32	m - metro
4	g - grama	33	mg - miligrama
5	GLMM - <i>Generalized linear mixed model</i>	34	mm - milímetro
6	(Modelo misto linear generalizado)	35	MHC - <i>Major histocompatibility complex</i>
7	GOF - Teste <i>Goodness-Of-Fit</i>	36	(Complexo principal de
8	HIV-SIDA - Vírus da imunodeficiência	37	histocompatibilidade)
9	humana - Síndrome da imunodeficiência	38	mL - mililitro
10	adquirida	39	NaOH - Hidróxido de Sódio
11	HR - Humidade relativa	40	nm - Nanómetro
12	HTLV-1 - Vírus linfotrópico da célula T	41	NT - <i>Near threatened</i> (Quase ameaçada)
13	humana	42	°C - Graus Celsius
14	IC <sub>95%</sub> - Intervalo de confiança de 95%	43	P - Percentagem da densidade óptica do
15	ICNF - Instituto da Conservação da	44	controlo negativo
16	Natureza e das Florestas	45	pb - Pares de bases
17	IgG - Imunoglobulina G	46	PBS - <i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão
18	INIAV - Instituto Nacional de Investigação	47	fosfato-salino)
19	Agrária e Veterinária	48	PCR - <i>Polymerase Chain Reaction</i>
20	ITS2 - <i>Internal transcribed spacer 2</i>	49	(Reação da polimerase em cadeia)
21	(Espaçador interno transcrito 2)	50	PO - <i>Per os</i>
22	kg - quilograma	51	RT - Resultado do teste
23	km <sup>2</sup> - quilómetro quadrado	52	se - Sensibilidade
24	KOH - Hidróxido de Potássio	53	SMLM - Sistema de Monitorização de
25	LAMP - <i>Loop Mediated Isothermal</i>	54	Lobos Mortos
26	<i>Amplification</i> (Amplificação isotérmica	55	sp - Especificidade
27	mediada por alça)	56	™ - Marca comercial
28	LC - <i>Least Concern</i> (Pouco preocupante)	57	V - Volt
29	LCS - Lesões compatíveis com sarna		
58			
59			
60			
61			
62			
63			
64			

1 **Comunicações científicas**

2

3 1. Artigo submetido à revista Scientific Reports (Anexo 2).

4 Julieta Rousseau, Mónia Nakamura, Helena Rio-Maior, Francisco Álvares, Rémi  
5 Choquet, Luís Madeira de Carvalho, Raquel Godinho, Nuno Santos. **Novel method for non-**  
6 **invasive molecular survey of sarcoptic mange in wildlife: diagnostic performance in**  
7 **wolves evaluated by multievent capture-recapture models.**

8

9 2. Participação como coautora em *abstract* submetido para as Jornadas de  
10 Dermatologia de Paris 2020 (Anexo 3).

11 Charlotte Gary, Amaury Briand, Anne Lespine, Ludwig S. Aho, Arnaud Jannic, Julieta  
12 Rousseau, Lucy Foucher, Thomas Lilin, Françoise Botterel, Olivier Chosidow, Jacques Guillot,  
13 Charlotte Bernigaud. **Efficacité d'une forte dose d'ivermectine et d'une dose unique de**  
14 **moxidectine dans un modèle porcin de gale.**

15

16 3. Os resultados preliminares deste estudo foram expostos, numa apresentação oral  
17 (Anexo 4), à equipa de investigação Dynamic no dia 17 de fevereiro de 2020, em Paris,  
18 França, com o título **New methodologies for the study of sarcoptic mange epidemiology**  
19 **in wild carnivores.**

20

21

## **1. Atividades desenvolvidas durante o estágio**

### **1.1. Estágio curricular**

O último ano do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL) contempla o estágio curricular e a respetiva dissertação de mestrado que têm como objetivo principal a aprendizagem, treino e aprofundamento dos conhecimentos numa área específica das Ciências Veterinárias.

O estágio curricular foi realizado no Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos (CIBIO) pertencente à Universidade do Porto e localizado no Campus de Vairão, Vila do Conde, Porto, sob a orientação do Doutor Nuno Santos. Teve início a 2 de setembro de 2019 e terminou a 29 de novembro de 2019.

#### **1.1.1. Centro de Investigação em Biodiversidade e Genética (CIBIO)**

O CIBIO é um centro de investigação reconhecido internacionalmente e que desenvolve pesquisa nos três principais componentes da biodiversidade: genes, espécies e ecossistemas. É composto por vários grupos de investigação, estando este trabalho inserido no grupo CONGEN (*Conservation Genetics and Wildlife Management*). A componente prática deste trabalho foi realizada no Centro de Testagem Molecular (CTM), que se insere no CIBIO mas funciona como uma unidade independente, realizando investigação aplicada aos recursos genéticos animais e vegetais e prestando serviços à comunidade com base na aplicação de ferramentas genéticas e moleculares, especialmente no que diz respeito a espécies domésticas e variedades agrícolas.

#### **1.1.2. Atividades desenvolvidas**

Inicialmente, foi recebida formação teórico-prática em várias técnicas laboratoriais, das quais: extração de DNA, realização de PCR, testagem dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose e por eletroforese capilar em aparelho sequenciador e sequenciação por método de Sanger, métodos de ELISA e digestão de pele para observação direta de ácaros ao microscópio. Durante este período, foram consolidados os conhecimentos prévios e foram realizadas as técnicas descritas. Numa segunda fase, os conhecimentos adquiridos foram aplicados na execução da componente laboratorial deste trabalho.

Foi ainda possível o acompanhamento de outros projetos, nomeadamente de medição de cortisol em pelo de lobo, preparação de armadilhas e captura de coelhos (colheita de amostras, avaliação morfológica e colocação de microchip), sorologias para deteção de anticorpos em lebres e coelhos para doenças como a Mixomatose e a Doença Hemorrágica Viral, e o acompanhamento de necrópsias realizadas a lobos e raposas nas instalações do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), Vairão, Porto, com avaliação morfológica dos animais, colheita de amostras e identificação da possível causa de morte.

## **1.2. Estágio extracurricular**

Foi também realizado um estágio extracurricular ao abrigo do programa de mobilidade Erasmus+ que permitiu aprofundar os conhecimentos e obter treino especializado nas áreas de parasitologia, micologia e dermatologia. O estágio foi realizado em Paris, França, na *École Nationale Vétérinaire d'Alfort* (EnVA), sob a orientação do Prof. Doutor Jacques Guillot, com início a 6 de janeiro de 2020 e fim a 6 de março de 2020.

### **1.2.1. École Nationale Vétérinaire d'Alfort (EnVA)**

A EnVA é uma das mais antigas faculdades de Medicina Veterinária, fundada em 1765, e uma das quatro existentes em França. Localiza-se em Maisons-Alfort, Paris, França.

Para além da instituição de ensino, propriamente dita, estão também inseridos hospitais (animais de companhia, equinos, animais de pecuária e de fauna selvagem), um laboratório de análises (Biopôle) e unidades de investigação, das quais o grupo de investigação Dynamic, uma colaboração com a Faculdade de Medicina de Créteil, Paris, França, que se dedica ao estudo da dinâmica das interações hospedeiro-patógeno, terapêuticas e resistências em micologia médica e veterinária.

### **1.2.2. Atividades desenvolvidas**

O estágio permitiu o acompanhamento da equipa de professores de parasitologia e micologia nas suas atividades e projetos. Destaca-se a componente de investigação, com participação num estudo experimental em sarna sarcóptica através da utilização de um modelo animal suíno para avaliação clínica e farmacológica e posterior extrapolação para medicina humana, acompanhando a fase de contaminação e desenvolvimento da doença e a de tratamento e cura. Foi também possível a participação em algumas aulas do curso de Medicina Veterinária e de Medicina Humana e em algumas reuniões/apresentações do grupo de investigação Dynamic. Houve ainda uma componente laboratorial no Biopôle, com a realização de diferentes técnicas de coprologia qualitativas e quantitativas, das quais, sedimentação, flutuação, técnica de Baermann e método de McMaster. E uma componente clínica através da avaliação e monitorização de animais selvagens no hospital de fauna selvagem (CHUV-FS). Outras atividades desenvolvidas incluíram a visita ao Mercado Internacional de Rungis, o maior mercado grossista de produtos agroalimentares frescos do mundo e a ida a Champignelles, um centro de aplicação para animais de pecuária, pertencente à EnVA, com visita a uma exploração de bovinos de carne, onde foi realizada a avaliação dos animais e suas instalações e colheita de amostras fecais para posterior análise parasitológica.

## **2. Revisão bibliográfica**

### **2.1. Sarna sarcóptica**

A sarna sarcóptica é uma doença cutânea que afeta humanos e animais, altamente contagiosa e globalmente difundida, sendo causada pelo ácaro *Sarcoptes scabiei* (Bornstein et al. 2001). A doença é reconhecida desde tempos bíblicos, sendo uma das primeiras doenças humanas com etiologia conhecida (Roncalli 1987). Em 1687, o médico italiano Giovan Cosimo Bonomo em colaboração com o farmacêutico Diacinto Cestoni, revelou a relação entre o ácaro e a sarna, demonstrando pela primeira vez que um organismo microscópico podia ser a causa de uma doença, e iniciando assim uma nova era na medicina (Roncalli 1987). Em 1746, Linnaeus, descreveu e denominou como *Acarus humanus subcutaneous* o ácaro no Homem (*Homo sapiens*) e *Acarus exulcerans* nos animais. Em 1778, De Geer, fez a primeira boa descrição de *Acarus scabiei* que recolheu de lesões de sarna, sendo que em 1802, Latreille estabeleceu o género *Sarcoptes*, ficando assim a denominação de *Sarcoptes scabiei*, que se mantém até aos dias de hoje. Dorfeuilles pode ser considerado como o primeiro cientista a descobrir a presença de ácaros em gado afetado com sarna. Em 1812, Jean Baptiste Gohier, professor na Escola Veterinária de Lyon, recolheu ácaros de lesões de sarna em cavalos e o seu colega St. Didier realizou a sua descrição e ilustração. No início do século XIX, apesar dos avanços na parasitologia veterinária, muitos médicos recusavam-se a aceitar a natureza parasitária da doença, até que em 1834, o estudante de medicina Simon Renucci, “redescobriu” o *Acarus scabiei* a partir de lesões de um paciente afetado (Fain 1968; Roncalli 1987).

Como abordado por Fain (1968), o ácaro do género *Sarcoptes* (Latreille, 1802), espécie *Sarcoptes scabiei* (Linnaeus, 1758) é a espécie da qual surgiram várias variedades e pensa-se que o hospedeiro primário foi o Homem, ocorrendo depois a transmissão para os animais domésticos e destes para os selvagens, com adaptação das diferentes variedades ao seu novo hospedeiro e diminuição da capacidade de reinfetar o Homem (Fain 1978).

#### **2.1.1. Etiologia e ciclo biológico**

##### **2.1.1.1. Classificação**

O ácaro da sarna da espécie *Sarcoptes scabiei* pertence ao reino Animalia, filo Arthropoda, classe Arachnida, subclasse Acarina, ordem Sarcoptiformes (Astigmata), superfamília Sarcoptoidea, família Sarcoptidae, subfamília Sarcoptinae e género *Sarcoptes* (Mullen and O'Connor 2019).

### **2.1.1.2. Morfologia**

Com base na apreciação morfológica feita por Fain (1968), são ácaros microscópicos (<500 µm), sendo o macho aproximadamente 2/3 da fêmea, circulares ou ovais. O gnatosoma é curto e com largura e comprimento semelhantes, com quelíceras robustas e pedipalpos. O idiossoma é convexo dorsalmente e achatado ventralmente. Nas fêmeas e ácaros imaturos observam-se finas estrias transversais na cutícula enquanto que nos machos estas são menos marcadas. As fêmeas apresentam espinhos dorsais triangulares bem desenvolvidos, ao passo que nos machos e ácaros imaturos estes são menos numerosos. Além dos espinhos, possuem também pelos dorsais robustos. As patas são curtas tendo as larvas três pares de patas e as ninfas e adultos quatro. O primeiro e segundo pares de patas anteriores estendem-se para além da margem do corpo e terminam com uma ventosa. No macho, o quarto par de patas termina também com uma ventosa. As outras patas terminam com um longo pelo. Os pedículos társicos são longos e não-segmentados. Todos os segmentos terminais das patas têm garras e o ânus é terminal ou dorso-terminal.

### **2.1.1.3. Ciclo biológico**

O ácaro passa por cinco fases de desenvolvimento: ovo, larva, protoninfa, tritoinfa e, por fim, adulto macho ou adulto fêmea, demorando todo este processo aproximadamente 2 semanas (Arlian and Morgan 2017). O seu ciclo biológico é passado nas camadas exteriores da epiderme, nas quais escavam túneis/galerias, passando do estrato córneo para o granuloso e deste para o espinhoso. As fêmeas colocam 1 a 4 ovos por dia, nos túneis, e as larvas eclodem em cerca de 3 dias. A larva hexápode sai do túnel, desenvolve-se até adulto e, posteriormente, à superfície da pele, vai procurar um parceiro para acasalar (Head et al. 1990; Bornstein et al. 2001; Elsheikha and Wright 2015; Arlian and Morgan 2017). A penetração da pele pode ocorrer em qualquer fase do ciclo de vida e requer menos de 30 minutos de contacto direto, havendo a libertação de uma secreção que lisa o tecido córneo do hospedeiro e permite que o ácaro forme túneis mais profundos, utilizando as patas anteriores (Arlian, Runyan, Achar, et al. 1984). Os ácaros alimentam-se de células vivas e linfa podendo, no entanto, sobreviver fora do hospedeiro 2 a 3 semanas em ambientes húmidos e temperados (Bornstein et al. 2001; Elsheikha and Wright 2015).

## **2.1.2. Epidemiologia**

### **2.1.2.1. Variabilidade e especificidade**

*S. scabiei* é capaz de infetar um grande leque de hospedeiros em todo o mundo, no entanto existe especificidade para cada espécie de hospedeiro e um baixo grau de infeção cruzada entre diferentes espécies de hospedeiros, pelo que as várias variedades são

denominadas segundo a espécie do hospedeiro predominante, como por exemplo *S. scabiei* var. *canis* (Pence and Ueckermann 2002; Bowman 2014). A grande variabilidade deste ácaro deverá ser considerada como o resultado da contínua reprodução cruzada entre estirpes que afetam o homem e os animais (Fain 1978).

Quando num hospedeiro atípico, as infeções são temporárias e a doença autolimitante. No entanto, estes hospedeiros podem servir de reservatório temporário e veículos de transmissão para os hospedeiros preferenciais (Arlian et al. 1988). Estão, contudo, reportados vários casos de infeção cruzada com estabelecimento de infeção permanente, como por exemplo entre raposa (*Vulpes vulpes*) e lobo (*Canis lupus*) (Oleaga et al. 2013), raposa e guaxinim (*Procyon lotor*) (Rentería-Solís et al. 2014), coelho (*Oryctolagus cuniculus*) e cão (*Canis lupus familiaris*) (Arlian, Runyan, and Estes 1984), chita (*Acinonyx jubatus*) e gazela-de-thomson (*Eudorcas thomsonii*) (Gakuya et al. 2012) e serow japonês (*Capricornis crispus*) e cães-guaxinim (*Nyctereutes procyonoides*) (Matsuyama et al. 2019).

A utilização de técnicas moleculares permitiu investigar e compreender a biologia dos ácaros e as interações entre estes e os seus hospedeiros (Arlian and Morgan 2017). Recorrendo a genotipagem a partir de microssatélites, Rasero et al. (2010) sugeriu a existência de ácaros derivados de 3 grupos diferentes, consoante o *táxon* do hospedeiro (carnívoro, herbívoro ou omnívoro) e que o fluxo genético ocorre dentro de cada grupo, mas não entre diferentes grupos. No entanto, outros trabalhos demonstram a existência de fluxo genético entre diferentes *taxa* (por exemplo carnívoro e herbívoro) devido a relações do tipo predador-presa (Gakuya et al. 2011; Matsuyama et al. 2019). Oleaga et al. (2013) sugere que o lobo, espécie com uma distribuição geográfica ampla e com um grande número de espécies com as quais pode entrar em contacto, ora como predador, ora como necrófago, pode estar mais predisposto a infeções repetidas com ácaros geneticamente distintos de diferentes espécies.

### **2.1.2.2. Transmissão e sobrevivência**

A transmissão ocorre principalmente por contacto direto entre um indivíduo afetado e outro saudável, mas também pode ocorrer pelo contacto com fomites contaminados (Arlian and Morgan 2017). Nos animais com um comportamento mais social deverá ocorrer predominantemente a transmissão direta, enquanto que em espécies mais solitárias a transmissão indireta pode ter maior significado (Niedringhaus, Brown, Sweeley, et al. 2019).

Todas as fases de vida do ácaro saem dos túneis e vagueiam na pele, o que torna possível que caiam, e, assim, fiquem deslocados do hospedeiro e possam contaminar o ambiente ou fomites (Arlian and Morgan 2017). A transmissão indireta está, no entanto, dependente do tempo de sobrevivência do ácaro fora do hospedeiro (até 19 dias) e que depende, por sua vez, das condições de humidade relativa (HR) e temperatura ambientais,

sendo os ácaros favorecidos por baixas temperaturas (10-15°C) e elevada HR (97%) (Arlian and Morgan 2017; Niedringhaus, Brown, Ternent, et al. 2019). Assim, será espectável uma maior sobrevivência do ácaro fora do hospedeiro durante certas alturas do ano, como o outono e primavera, apesar de ser pouco provável que o ambiente seja um reservatório ou uma fonte prolongada de infecção (Niedringhaus, Brown, Ternent, et al. 2019).

### **2.1.3. Patogenia e sinais clínicos**

#### **2.1.3.1. Sinais clínicos e evolução da doença**

Segundo Walker e Stachecki (2002), os ácaros afetam a saúde dos animais das seguintes formas: i) Dano tecidual que leva a dermatite; ii) Perda de sangue ou fluídos corporais; iii) Reações alérgicas; iv) Criação de condições para infecções bacterianas secundárias.

O período de incubação em canídeos infetados experimentalmente varia entre 10 a 30 dias dependendo da dose infecciosa (Bornstein et al. 2001). As primeiras lesões aparecem em áreas com relativamente pouco revestimento piloso, como o aspeito lateral do codilho, o pavilhão auricular e região isquiática nos canídeos, que posteriormente coalescem e tornam-se generalizadas (Nimmervoll et al. 2013; Bowman 2014).

Em carnívoros, a evolução da doença parece ocorrer da seguinte forma: Numa primeira fase, podem observar-se pápulas 1 a 3 semanas após exposição e crostas 4 a 5 semanas após a exposição (Samuel 1981; Nimmervoll et al. 2013). Após 1 mês, pode encontrar-se pelo nas fezes, devido ao prurido que leva ao lambar constante das zonas afetadas (Samuel 1981). A pelagem torna-se baça, surge alopecia no dorso, cauda, flancos, orelhas, nariz e à volta dos olhos. Nesta fase, a carga parasitária é baixa, os linfonodos encontram-se ligeiramente aumentados e histologicamente observam-se numerosos eosinófilos (Samuel 1981; Nimmervoll et al. 2013). Na segunda fase da doença (7 a 9 semanas pós infecção), também denominada hiperqueratótica ou crostosa e que pode revelar-se fatal, as crostas coalescem, cobrindo a maior parte do corpo, há exsudação serosa extensa e o animal ganha um odor intenso característico. A ingestão de alimento diminui e o animal fica inquieto passando muito do seu tempo a lambar e a coçar as regiões do corpo afetadas, o que também pode ser responsável pela disseminação das lesões. Ocorre emaciação, desidratação, observa-se linfadenomegália grave, e a nível histológico observa-se grande carga parasitária, aumento do número de linfócitos e mastócitos e complicações bacterianas e fúngicas secundárias (Samuel 1981; Pence and Ueckermann 2002; Nimmervoll et al. 2013). Na terceira fase, que corresponde à cura, podendo seguir a segunda ou, por vezes, a primeira fase, observa-se alopecia grave, lenhificação e hiperpigmentação, linfonodos raramente aumentados, ausência de ácaros e infiltração celular mista (Nimmervoll et al. 2013).

Apesar de na maioria dos casos as lesões cutâneas serem uma combinação de crostas e alopecia, foi reportado, que em raposas, nos meses mais frios do ano, devido à maior espessura do pelo de Inverno, pode verificar-se a presença de crostas sem alopecia. Assim como pode ocorrer alopecia e ausência de crostas, por exemplo numa fase de recuperação da doença (Nimmervoll et al. 2013). A apresentação da doença pode também variar consoante a espécie, sendo que nos lobos se observa essencialmente a forma alopecica (com baixa carga parasitária) e na raposa e ungulados a forma hiperqueratótica (com elevada carga parasitária) (Oleaga et al. 2012; Martinez et al. 2020).

Em carnívoros não sujeitos a tratamento ou sem cura espontânea, a morte ocorre passados 2 a 4 meses após infeção, estando no entanto dependente da dose infecciosa e da resistência à infeção do próprio indivíduo (Samuel 1981; Newman et al. 2002). Dependendo da espécie afetada, a sarna grave pode resultar em 80% de mortalidade numa população de animais selvagens, sendo especialmente preocupante em espécies animais ameaçadas, na qual pode ser devastadora (Brewster et al. 2017). A forma crónica e potencialmente fatal ocorre quando os ácaros infetam um hospedeiro adequado e desenvolvem uma carga parasitária crescente, ocorrendo particularmente em animais imunocomprometidos ou em populações naïves. Em contrapartida, quando o ácaro infeta um hospedeiro não preferencial, ocorre doença temporária e autolimitante (Nimmervoll et al. 2013; Kraabøl et al. 2015).

Em animais cronicamente infetados ocorrem alterações estruturais patológicas em variados órgãos e nos parâmetros sanguíneos, sendo que os produtos dos próprios ácaros como toxinas salivares e antigénios, imunocomplexos circulantes e infeções bacterianas secundárias podem contribuir para tais alterações (Arlian et al. 1990). Está reportada a presença de depósitos amiloides no fígado, rim, intestino, baço e língua, edema hepatocelular periportal, colangite, hipertrofia adrenocortical, abscessos corticais nos rins, abscessos brônquicos e necrose do córtex da adrenal (Arlian et al. 1990; Espinosa et al. 2017). No entanto, todas as alterações fisiopatológicas foram consideradas reversíveis (Arlian et al. 1990). Animais afetados podem desenvolver uma fórmula leucocitária inflamatória característico de doença crónica com eosinofilia marcada e neutrofilia. Pode ainda ocorrer anemia, hipoproteinemia, hipoalbuminemia, hipoglicemia, e hipocalcemia, e aumento da uremia, de aspartato aminotransferase, hiperbilirrubinemia, hipernatremia, hipercloremia e hiperfosfatemia (Little et al. 1998; Skerratt et al. 1999; Newman et al. 2002; Kido et al. 2011). Ademais, a desidratação e anorexia podem levar a insuficiente perfusão renal, e a existência de infeção bacteriana secundária grave predispõe a bacteriemia e sepsis com consequente morte do animal (Kido et al. 2011).

### 2.1.3.2. Hipersensibilidade e imunidade

Desenvolvem-se interações complexas entre *S. scabiei* que produz antígenos e o hospedeiro, que constrói uma resposta imunitária (Davis and Moon 1990). Sugere-se que numa fase inicial, os ácaros terão a capacidade de modular a resposta imunitária do hospedeiro, através da secreção de moléculas imunomoduladoras, permitindo a proliferação e o estabelecimento de uma população de ácaros e atrasando o aparecimento dos primeiros sintomas (Arlian and Morgan 2017). Posteriormente, os sinais agudos de sarna sarcóptica estão relacionados com uma reação de hipersensibilidade aos ácaros, uma vez que é libertada na pele uma grande quantidade de material antigénico, que inclui excreções e secreções dos ácaros vivos, ácaros mortos e cascas de ovos (Pence and Ueckermann 2002).

Segundo o estudo imuno-histoquímico de Martinez et al. (2020), os animais infetados com *S. scabiei* parecem montar uma resposta imunitária inata, com o predomínio de macrófagos e uma menor proporção de linfócitos e plasmócitos. Em lobos, verificaram-se elevadas contagens de macrófagos, o que se pode refletir numa resposta mais eficaz, com o desenvolvimento de lesões alopecicas. Por outro lado, nas raposas verificou-se um maior número de células inflamatórias e uma resposta humoral mais forte, mas que se pode revelar pouco eficaz, resultando em lesões hiperqueratóticas.

A resposta do tipo celular é caracterizada por infiltrados celulares nas lesões cutâneas ou à sua periferia, constituídos por linfócitos, mastócitos, neutrófilos e eosinófilos e a resposta humoral pela produção de anticorpos (produzidos por linfócitos B e plasmócitos) contra antígenos de *S. scabiei* (Arlian and Morgan 2017; Lastuti et al. 2018; Martinez et al. 2020). Em canídeos, estes anticorpos são detetáveis no sangue 2 a 5 semanas após infeção (Bornstein and Zakrisson 1993; Bornstein et al. 1995) e podem ser detetados entre 1 a 4,5 meses após tratamento (Lower et al. 2001).

Algumas espécies desenvolvem uma reação de hipersensibilidade imediata – tipo I (com aumento de mastócitos e eosinófilos), como é o caso da raposa, camurça (*Rupicapra rupicapra*) e veado (*Cervus elaphus*), (Martinez et al. 2020). Outras espécies desenvolvem uma reação de hipersensibilidade retardada - tipo IV (com aumento de linfócitos T) em conjunto com o tipo I, como é o caso do Homem (Walton and Currie 2007), lobo (Oleaga et al. 2011; Martinez et al. 2020), porco (*Sus scrofa domesticus*) (Davis and Moon 1990) e wombat (*Vombatus ursinus*) (Skerratt 2003). À medida que a reação de hipersensibilidade progride, a carga parasitária diminui. No entanto, à medida que o prurido aumenta, aumentam também o número e a gravidade das lesões traumáticas (Pence and Ueckermann 2002).

### 2.1.3.3. Complicações

Infeções secundárias estão frequentemente associadas com sarna sarcóptica (Bowman 2014), sendo facilitadas pela disbiose da microbiota cutânea que ocorre nos animais afetados, onde se observa uma reduzida diversidade microbiana, uma composição da comunidade microbiana alterada e maior abundância de patógenos oportunistas, entre os quais se destacam *Staphylococcus pseudintermedius* e *Corynebacterium* spp. (Decandia et al. 2019). Além disso, o prurido intenso leva à automutilação, com consequentes escoriações, e infeções bacterianas e fúngicas secundárias (Bornstein et al. 1995; Bowman 2014).

Os ácaros gastam diretamente energia dos seus hospedeiros ao consumirem a sua linfa e tecidos lisados e, indiretamente pela necessidade de proteína na produção de crostas hiperqueratóticas e subsequente descamação cutânea, pelo prurido constante, que provoca inquietude nestes animais e utilização das reservas energéticas e, adicionalmente, pela redução da pelagem de cobertura, o que vai implicar maior gasto energético para a manutenção da temperatura, pelo que estes animais têm menor peso e menores reservas de gordura, resultado de subnutrição prolongada, e demonstram sinais clínicos de catabolismo muscular aumentado (Newman et al. 2002).

A subnutrição pode, por sua vez, reduzir a resistência e levar ao aumento da fecundidade, crescimento e carga parasitária dos ácaros (Kraabøl et al. 2015). Pode ainda ocorrer algum tipo de interação entre *S. scabiei* e endoparasitas, como demonstrado por Balestrieri et al. (2006), no qual a prevalência de cestodes e nematodes foi superior em raposas com sarna, sugerindo uma interação que envolve respostas imunitárias. As infeções concomitantes em animais com sarna podem aumentar de forma acentuada a taxa de mortalidade (Kraabøl et al. 2015), sendo que, quer a sarna sarcóptica, quer a infeção por helmintes gastrointestinais, afetam a ingestão/absorção de proteína, aumentando, provavelmente, a suscetibilidade a infeções (Newman et al. 2002). Além disso, a coocorrência de sarna pode favorecer os helmintes, inibindo a expulsão de adultos e aumentando a sua produção de ovos, o que resulta numa maior contaminação ambiental (Balestrieri et al. 2006).

Em termos reprodutivos, as fêmeas afetadas podem ter um menor número de folículos ovários a desenvolver e a ovular devido ao défice de nutrientes e, assim, terem menor número de crias comparando com fêmeas não afetadas por sarna. Além disso, é provável a transmissão vertical das mães para as crias por contacto direto após o nascimento (Fthenakis et al. 2001). As gónadas tornam-se inativas ou minimamente ativas (Skerratt et al. 1999) e nos machos há redução da massa testicular (Sarasa et al. 2011).

Ao nível da produção animal, a sarna sarcóptica tem efeitos negativos na eficiência de conversão alimentar, na produção leiteira, ganho de peso e qualidade do couro, originando perdas económicas importantes (Elbers et al. 2000; Rehbein et al. 2003).

## **2.1.4. Diagnóstico**

### **2.1.4.1. Clínico**

Os sinais clínicos, lesões e sua localização, já abordados, podem suportar o diagnóstico de sarna sarcóptica. Contudo, o pelo abundante dos animais pode esconder algumas lesões, principalmente em casos ligeiros (Bowman 2014). Além do mais, as lesões podem ser distintas consoante o hospedeiro e assim haver necessidade de aplicar outro método de diagnóstico de forma a confirmar a suspeita (Bornstein et al. 2001).

No que diz respeito à fauna selvagem, a observação à distância de lesões, como alopecia e crostas, é especialmente importante pois permite avaliar os animais sem recorrer à sua captura (Fraser, Martin, et al. 2018). Como evidenciado por Fraser, Martin, et al. (2018) há uma correlação positiva entre a gravidade das lesões e a carga parasitária. No entanto, quando o número de ácaros é reduzido, nas fases iniciais da doença, as lesões podem não ser detetadas. Assim, em contexto de campo, a prevalência de sarna por este método deve ser sempre considerada como uma subestimativa da prevalência real.

Em cães, um reflexo otopodal positivo, no qual a rápida fricção do bordo da orelha leva a que o animal execute movimentos de arranhar/coçar com o membro posterior ipsilateral, aumenta a suspeita de sarna (Mueller et al. 2001).

### **2.1.4.2. Observação direta – raspagem/digestão cutânea**

Técnicas de observação direta requerem a recuperação do ácaro a partir do hospedeiro, *ante* ou *post mortem*, e sua posterior observação com recurso a meios de ampliação. No hospedeiro vivo, realizam-se raspagens cutâneas profundas com o auxílio de um bisturi ou lâmina, até ao ponto de emergir líquido sero-sanguinolento. Antes da observação microscópica, é importante aquecer ligeiramente as raspagens, de forma a que os ácaros se tornem mais ativos, e assim, mais facilmente observáveis. Para recuperar ácaros de um cadáver, devem recolher-se amostras de pele com lesões e colocá-las numa placa de Petri. É também importante fornecer uma fonte de calor previamente à observação, sendo esta realizada num estereomicroscópio. Alternativamente, as raspagens ou os pedaços de pele podem ser colocados numa solução de 10-20% de hidróxido de potássio (KOH), que fará a digestão da amostra, e, de seguida, realizar uma centrifugação e observação do sedimento ao microscópio (Bornstein et al. 2001). De forma a maximizar a deteção de ácaros, devem ser realizadas raspagens cutâneas de várias áreas afetadas (Peltier et al. 2018). Também se pode observar a presença de ovos ou fezes (*scybala*) dos ácaros (Currier and Ceilley 2010).

Em cães e lobos afetados por sarna, os ácaros não são fáceis de encontrar, inclusivamente em casos graves, contrastando com raposas, porcos e ursos (*Ursus americanus*), onde se podem encontrar centenas a milhares de ácaros, o que sugere

diferentes evoluções da doença (Oleaga et al. 2011; Bowman 2014; Peltier et al. 2018). A sensibilidade deste método depende ainda de vários fatores como a apresentação clínica, a amostragem de diferentes localizações ou o número de amostras recolhidas e a experiência do operador (Walton and Currie 2007).

Em animais em que apesar dos sinais clínicos compatíveis com sarna (prurido, crostas e alopecia) obtiveram raspagens cutâneas negativas, pode tentar-se um diagnóstico terapêutico, avaliando o resultado do tratamento com antiparasitários (Mueller et al. 2001).

#### **2.1.4.3. Histopatologia**

As características histológicas presentes em amostras de pele afetada por sarna permitem reforçar ou confirmar o diagnóstico. Destas características destaca-se a existência de dermatite eosinofílica ou linfocítica, acantose e hiperqueratose paraqueratótica grave (Mörner and Christensson 1984; Little et al. 1998; Niedringhaus, Brown, Sweeley, et al. 2019). É ainda possível observar ácaros ou partes destes, ovos e evidências de coinfeção com outros microrganismos como bactérias e fungos (Head et al. 1990; Peltier et al. 2018). Em ursos está descrita a coinfeção com o nematode de vida-livre *Pelodera strongyloides*, visível em cortes histológicos (Fitzgerald et al. 2008; Peltier et al. 2018).

#### **2.1.4.4. Sorologia**

A infeção por *S. scabiei* induz uma resposta humoral no hospedeiro que origina anticorpos circulantes (protetores ou não) (Arlian and Morgan 2017). Podem, portanto, ser utilizados testes sorológicos para determinar se houve exposição ao ácaro, não diferenciando, contudo, exposição prévia de doença clínica atual (Niedringhaus, Brown, Sweeley, et al. 2019). A sorologia permite verificar se um animal com lesões cutâneas compatíveis com sarna ou lesões cutâneas atípicas foi ou não infetado com o ácaro *S. scabiei*. Contudo, para deteções individuais precoces, a sorologia pode não ser fiável dado o atraso na resposta humoral, sendo, por outro lado, uma técnica útil em estudos epidemiológicos (Bornstein et al. 2001).

Foram desenvolvidos e avaliados vários ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) para utilização em diferentes espécies animais, das quais se incluem raposas (Bornstein et al. 2006), lobos (Fuchs et al. 2016), porcos (Kessler et al. 2003), camurças (Casais et al. 2007) e ursos (Peltier et al. 2018). Na Europa, estão disponíveis kits comerciais ELISA para deteção de anticorpos IgG contra *S. scabiei*: *Sarcoptes-ELISA® 2001 Dog* (sensibilidade de 92,1% e especificidade de 94,6%, com deteção de anticorpos 3 semanas após infeção) para cães e *Sarcoptes-ELISA 2001® Pigs* (sensibilidade de 95% e especificidade de 97%, com deteção de anticorpos 5 semanas após infeção) para porcos

(Kessler et al. 2003; Afosa 2018). Segundo Arlian e Morgan (2017), apesar das diferentes variedades de *S. scabiei* terem especificidade de hospedeiro, elas possuem moléculas antigénicas semelhantes e, portanto, relacionam-se imunologicamente, sendo dessa forma possível a deteção de anticorpos contra *S. scabiei* com a utilização de um ELISA baseado na variante de outro hospedeiro (Lower et al. 2001; Peltier et al. 2018).

Em animais mortos, podem encontrar-se anticorpos em fluídos corporais do tórax e abdómen e em extrato de tecido pulmonar (LTE) (Mörner et al. 1988; Ferroglio et al. 2000; Jakubek et al. 2012). A concentração de anticorpos é 1 a 3 vezes menor no LTE em comparação ao soro (Ferroglio et al. 2000). Se tal facto não for tido em conta, poderão ocorrer mais resultados falsos negativos neste tipo de amostras comparativamente a amostras de soro (Jakubek et al. 2012). Este tipo de amostra mostra-se conveniente pelo seu baixo custo, facilidade de obtenção simplificando a colheita de amostras por caçadores ou outras pessoas menos especializadas e pela possibilidade de analisar amostras de pulmão (armazenadas em congelação) vários meses após a sua colheita (Mörner et al. 1988; Ferroglio et al. 2000; Bornstein et al. 2006).

#### **2.1.4.5. Foto-armadilhas**

A utilização de câmaras remotas com captura de fotografias ou vídeos pode ser utilizado como diagnóstico não-invasivo de sarna sarcóptica em populações animais selvagens pois permite identificar animais com lesões compatíveis com sarna (LCS) e oferece informações sobre os animais afetados ao longo do tempo e em diferentes lugares (Oleaga et al. 2011). Pode ainda fornecer informação importante relativamente ao estilo de vida de animais afetados com sarna, como por exemplo a sua distribuição espacial, e diminui o enviesamento de animais afetados serem mais facilmente capturados (Carricondo-Sanchez et al. 2017). Através da observação dos principais sinais clínicos (alopécia, seborreia, crostas) é possível identificar casos moderados a graves de sarna. No entanto, pode ser difícil distinguir casos moderados de sarna de alterações sazonais do pelo, o que torna este método de diagnóstico mais tardio comparativamente a outros, uma vez que deteta indivíduos em fases mais avançadas da doença (Brewster et al. 2017). Por outro lado, não permite identificar a real etiologia da doença cutânea ou alopecia nem determinar a espécie de ácaro potencialmente envolvida (Niedringhaus, Brown, Sweeley, et al. 2019).

A utilização de termografia infravermelha fornece informação relativa ao gasto energético acrescido em animais com sarna (Cross et al. 2016).

#### 2.1.4.6. Métodos moleculares

Os métodos moleculares surgiram como uma alternativa no diagnóstico de sarna sarcóptica e têm sido utilizados na caracterização e estudo da diversidade genética de *S. scabiei* e análise de fluxos genéticos entre várias populações de hospedeiros (Arlian and Morgan 2017; Peltier et al. 2018). Os marcadores moleculares utilizados incluem os genes de DNA mitocondrial 12S (Skerratt et al. 2002), 16S (Angelone-Alasaad et al. 2015) e COX1 (Wong et al. 2015; Peltier et al. 2018), de DNA ribossomal ITS2 (Zahler et al. 1999; Peltier et al. 2018) e de DNA de microssatélites (Soglia et al. 2007; Rasero et al. 2010).

Os ácaros não têm de estar fisicamente presentes nas raspagens cutâneas para o seu DNA ser detetado pela técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR), uma vez que o seu DNA e excreções são incorporados nas células do estrato córneo da pele e dessa forma surgem nas raspagens cutâneas. Pelo que apesar de ser uma técnica mais dispendiosa, tem uma sensibilidade superior permitindo identificar com maior facilidade casos de sarna com apresentação atípica ou cuja microscopia foi negativa, incluindo casos iniciais da doença com baixa carga parasitária, e assim implementar medidas de controlo e tratamento de forma antecipada prevenindo a transmissão e minimizando o risco de surtos (Wong et al. 2015; Fraser, Martin, et al. 2018).

Em 2013, Stephenson et al. elaborou um ensaio de PCR para deteção de DNA de *Notoedres cati* em amostras fecais de lince-pardo (*Lynx rufus*). Tal descoberta permite detetar a doença de uma forma não-invasiva, evitando a captura e imobilização de espécies selvagens, o que requer tempo e recursos consideráveis e com potencial morbilidade e implicações no bem-estar dos animais (Santos et al. 2017). Este método baseia-se no facto da sarna notoédrica (tal como a sarcóptica) induzir prurido, passando os animais afetados (carnívoros, principalmente) grande parte do seu tempo em atividades de *grooming*, o que possibilita a ingestão dos ácaros e a sua excreção nas fezes. Como mais-valia desta técnica destaca-se a possibilidade de estudar a distribuição e dispersão da doença, assim como identificar populações livres de sarna. Apesar das vantagens já expostas, este método tem também alguns inconvenientes como a degradação do DNA das fezes e a presença de inibidores de PCR, *grooming* realizado de forma inconsistente ou número insuficiente de ácaros ingerido, diluição dos ácaros em grandes volumes de fezes e amostragem duplicada caso não haja informação adicional quanto à identificação individual dos animais (Stephenson et al. 2013; Peltier et al. 2018). Um modelo semelhante foi aplicado a fezes de urso, para deteção de DNA de *S. scabiei*, com utilização de *primers* para os genes ITS2 e COX1 mas com resultados insatisfatórios (Peltier et al. 2018).

Em 2018, foi desenvolvido um ensaio de amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP), que permite a rápida deteção (30 minutos) de DNA do ácaro *S. scabiei* proveniente de raspagens cutâneas (Fraser, Carver, et al. 2018).

#### **2.1.4.7. Outros métodos**

A utilização de cães detetores toma partido da notável capacidade olfatória da espécie, em que estes são treinados para identificar animais afetados por sarna, através do seguimento destes últimos pelo seu odor característico (Alasaad et al. 2012).

Profissionais de fauna selvagem e caçadores, podem também ser sensibilizados para esta doença e fornecerem informações importantes quanto à sua distribuição e a alterações da sua ocorrência (Haas et al. 2018). A realização de questionários destinados a parceiros no terreno é também uma opção eficiente e de baixo custo para monitorizar a dispersão espaciotemporal da sarna sarcóptica (Trainer and Hale 1969; Pisano et al. 2019).

Durante a realização de necrópsias podem recolher-se amostras cutâneas para posterior análise e possível deteção de *S. scabiei* e pode observar-se um quadro característico da doença com a presença de dermatite, caquexia, estômago com pouco conteúdo ou vazio e linfadenopatia em casos mais avançados da doença (Nimmervoll et al. 2013).

Num estudo realizado em cães-guaxinim, foram utilizadas coleiras de rastreamento de forma a estudar os efeitos espaciais e temporais da sarna sarcóptica nestes animais selvagens, tendo sido demonstrado um declínio abrupto da sua atividade com a evolução da doença (Süld et al. 2017). Noutro estudo, a utilização de radiotelemetria foi aplicada a lobos, permitindo a deteção de alterações comportamentais associadas à sarna, tais como o aumento da necrofagia e longos períodos de inatividade (Shelley and Gehring 2002).

### **2.1.5. Tratamento, controlo e prevenção**

#### **2.1.5.1. Animais domésticos**

Sendo a sarna sarcóptica altamente contagiosa, os animais afetados deverão ser isolados se possível. O ambiente, camas e utensílios de escovagem devem ser tratados com um acaricida ambiental (por exemplo que contenha permetrina) prevenindo a possível reinfeção por estas fontes (Curtis 2004). Em cães, o tratamento com selamectina ou moxidectina *spot-on*, com repetição do tratamento passadas 4 semanas, é normalmente suficiente. Em casos crónicos ou severos, poderá ser necessário o tratamento a cada 2 semanas. Banhos com amitraz são outra opção terapêutica eficaz, mas as aplicações *spot-on* são preferíveis dada a maior facilidade de aplicação e o menor risco de reações adversas. O spray de fipronil pode ser usado *off-label* em fases iniciais ou em indivíduos aos quais está contraindicada a utilização de outros produtos (por exemplo fêmeas grávidas ou em lactação ou animais muito jovens) ou como complemento nos casos mais graves. Em caso de infeção bacteriana secundária, será necessário um antibiótico adequado por 4 a 6 semanas. Devido ao potencial zoonótico, veterinários e tutores dos animais deverão aplicar regras de higiene e

de proteção individual quando em contacto com os animais afetados (Curtis 2004; Elsheikha and Wright 2015).

Nas novas moléculas pertencentes ao grupo das isoxazolinas, a administração *off-label* de fluralaner a uma dose mínima de 25 mg/kg, via oral, mostrou-se efetiva na eliminação da infecção (Romero et al. 2016). Também sarolaner administrado, via oral, em duas doses de 2 mg/kg cada, com intervalo de 1 mês entre cada dose, foi eficaz no tratamento de cães naturalmente infetados com *S. scabiei* (Becskei et al. 2016). A terapêutica sistêmica *off-label* com lactonas macrocíclicas como ivermectina, milbemicina oxima, moxidectina e selamectina, também demonstrou sucesso no controlo da sarna sarcóptica canina (Curtis 2004).

Caso a doença não esteja confirmada e o animal não melhore em 3 a 4 semanas de tratamento, este deve ser reavaliado e outros diagnósticos diferenciais, como dermatite atópica, reação alérgica à picada da pulga, intolerância alimentar, piodermatite, dermatite a *Malassezia*, queilietilose, sarna otodéctica e pêfigo foliáceo, devem ser tidos em conta. No entanto os acaricidas modernos atuam em diferentes espécies de ectoparasitas, pelo que uma resposta favorável ao tratamento não oferece uma confirmação absoluta de sarna sarcóptica (Curtis 2004).

Em animais de produção, deve minimizar-se a transmissão da doença para as crias, através do tratamento das mães antes do parto, realização de vazios sanitários e tratamento seletivo ou abate dos animais gravemente afetados (Davis and Moon 1990).

### **2.1.5.2. Animais selvagens**

Conforme abordado por Martin et al. (2019), o controlo de sarna sarcóptica em populações selvagens é condicionado pelo pouco conhecimento da componente indireta de transmissão, pela imunidade variável do hospedeiro ao parasita que influencia a reinfeção e pelo risco de resistência do ácaro após utilização prolongada e generalizada de acaricidas.

Na fauna selvagem, a administração de ivermectina é o tratamento mais comumente utilizado: injeção subcutânea, manual ou por disparo de dardo à distância, com uma dose de 200 a 400 µg/kg, repetida 1 a 4 vezes em intervalos de 10 a 14 dias. A administração de terapêutica de suporte, como fluídos intravenosos, nutrição hipercalórica e antibióticos quando necessário, parece ter um efeito significativo na taxa de recuperação (Rowe et al. 2019). A ausência de atividade ovicida da ivermectina faz com que os ácaros adultos sejam mortos no primeiro tratamento, mas que os ovos se mantenham viáveis, com eclosão posterior de novos ácaros, o que demonstra a importância de um segundo tratamento (Bernigaud et al. 2018). Por outro lado, a utilização de fármacos com uma maior persistência no plasma e na pele (por exemplo fluralaner e moxidectina), requer uma única administração, mesmo não tendo efeito ovicida, dado que este problema é ultrapassado uma vez que os ácaros recém-eclodidos ainda estarão expostos ao fármaco (Bernigaud et al. 2018; Van Wick and Hashem 2019).

O estudo de Van Wick e Hashem (2019) demonstrou o tratamento eficaz de um urso-negro afetado, através da utilização de uma dose oral de 44 mg/kg de fluralaner. Esta opção terapêutica é promissora no tratamento de animais selvagens afetados com sarna, pois requer apenas uma dose, não havendo necessidade de transferência ou recaptura dos animais para administração de doses adicionais e, aparentemente, confere proteção contra ectoparasitas por aproximadamente 3 meses (Rowe et al. 2019; Van Wick and Hashem 2019).

Os métodos não-invasivos são ferramentas revolucionárias no tratamento e controlo de doenças, no entanto o sucesso da administração é a sua maior limitação quando comparados com métodos diretos (como capturar-injetar-libertar) em que a eficácia de administração é alta, mas que dependem, porém, da capacidade de captura dos animais e são de carácter invasivo (Martin et al. 2019). Em wombats foi desenvolvido um método de tratamento não-invasivo com a utilização das chamadas '*burrow flaps*', correspondendo a abas/portas colocadas à entrada das tocas, contendo um acaricida tópico (1 ml/10kg peso vivo de moxidectina) que é dispensado quando os animais entram ou saem da sua toca (DPIPWE 2018). As principais limitações deste método são o possível tratamento de animais sem sarna, a eficácia e sucesso da administração baixos e o tratamento parcial dos animais, com possível desenvolvimento de resistências, pelo que se sugere o aperfeiçoamento do método e da formulação (Martin et al. 2019). O controlo ambiental através da fumigação das tocas é irrealista e levanta questões éticas com a exposição dos animais aos produtos de fumigação, e logísticas uma vez que o acesso às tocas é difícil (Martin et al. 2019).

O controlo da doença através da remoção de animais afetados pode ser contraproducente e resultar em mais casos de doença devido ao maior movimento dos animais para zonas "livres" de animais. Por outro lado, o tratamento individual de animais tem normalmente pouco valor nas populações selvagens (Bornstein et al. 2001). No entanto, em determinadas populações nas quais a sarna está a ter um forte impacto, especialmente espécies ameaçadas que vivem em populações pequenas e isoladas, pode valer a pena a sua captura, tratamento e libertação (Bornstein et al. 2001). A integração das duas estratégias mostra-se, contudo, eficaz e reduz a intensidade média de infeção para um nível baixo, como evidenciado por Skerratt et al. (2004), onde é sugerida a destruição e remoção de animais moderadamente a gravemente afetados e o tratamento da restante população com um acaricida eficaz de longa duração, sendo possível que a "imunidade de grupo" contra o ácaro previna o estabelecimento de infeções em outros animais. Como abordado por Alasaad et al. (2012) outro aspeto importante reside no facto da destruição e remoção seletiva depender de um diagnóstico à distância nos animais selvagens. Tal diagnóstico pode ser dificultado por apresentações ocultas da doença e assim, originar falsos negativos. Neste caso, pode ser útil recorrer a cães detetores de sarna que detetam, inclusivamente, casos iniciais da doença.

### **2.1.5.3 Prevenção**

Os acaricidas utilizados no tratamento da sarna sarcóptica têm efeitos tóxicos no Homem e animais, conhecidos e desconhecidos, e a resistência às terapêuticas convencionais tem aumentado ao longo dos anos, pelo que a vacinação surge como uma alternativa atrativa com o objetivo de proteger populações suscetíveis e/ou limitar a transmissão da doença (Arlan and Morgan 2017; Khalil et al. 2017). Uma vez que a infeção por *S. scabiei* induz uma resposta imunitária humoral, com aumento do título de anticorpos (IgG), poderiam ser utilizadas proteínas antigénicas do ácaro para o desenvolvimento de uma futura vacina (Arlan et al. 1994; Lastuti et al. 2018). Já se realizaram tentativas de imunização em que muitas das falhas relatadas podem ser atribuídas a adjuvantes, ao plano de imunização, à dose de antígeno e ao método de administração (Arlan and Morgan 2017).

Na fauna selvagem, a transmissão poderá ser reduzida diminuindo contactos não naturais entre indivíduos, nomeadamente, reduzindo locais de alimentação artificial - pois promovem grandes densidades animais e conseqüentemente contribuem para um maior contacto direto e indireto intra e interespecífico - ou substituição destes por locais de alimentação com menor quantidade de alimento distribuídos por uma área maior, e manutenção de regras de biossegurança durante a captura, manipulação e transporte de animais (Sorensen et al. 2014; Süld et al. 2014; Niedringhaus, Brown, Sweeley, et al. 2019).

### **2.1.6. Saúde pública**

No Homem, a sarna sarcóptica (escabiose) é causada pelo ácaro *S. scabiei* var. *hominis*, ocorre globalmente e afeta mais de 200 milhões de pessoas, sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde como Doença Tropical Negligenciada (WHO). A maior taxa de infeção ocorre em países tropicais, especialmente em comunidades onde coexiste pobreza, sobrepopulação e acesso limitado a tratamento (WHO). Em países desenvolvidos, a doença ocorre principalmente em instituições, como centros de cuidados de idosos ou crianças e hospitais (Bouvresse and Chosidow 2010), em pacientes imunodeprimidos (por exemplo infetados com HIV-SIDA ou HTLV-1) (Brites et al. 2002), em comunidades desfavorecidas (Arnaud et al. 2016) e prisões (CDC 2010). Circunstâncias demográficas como as guerras e migrações são também fatores importantes (Currier et al. 2011). Atualmente observa-se um afluxo de imigrantes, provenientes maioritariamente do Norte de África e Médio Oriente, que procuram asilo no continente Europeu. Estas são populações vulneráveis uma vez que são acomodadas em abrigos sobrelotados por longos períodos e com falta de condições, e após terem viajado em barcos ou camiões igualmente sobrelotados. Tais factos tornam a sarna uma das doenças mais frequentemente observadas nas atuais populações de refugiados (Bloch-Infanger et al. 2017).

As lesões cutâneas ocorrem tipicamente nos espaços interdigitais das mãos, cotovelos, genitais, axilas, peito e abdómen (Hengge et al. 2006). Nos pacientes afetados, a doença causa um impacto moderado na sua qualidade de vida pois sofrem de prurido constante que leva a desconforto, privação de sono e falta de produtividade na escola ou trabalho, de estigma social e ainda problemas económicos relacionados com os custos do tratamento (Hay et al. 2012). Além disso, a sarna é, frequentemente, complicada por infeção bacteriana secundária por *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*, que pode evoluir para sepsis, glomerulonefrite e febre reumática agudas (Engelman et al. 2013). Ocorre, no Homem, uma forma atípica de sarna, com potencial mortalidade elevada, denominada sarna crostosa ou Norueguesa, que se caracteriza por uma superinfeção de ácaros, usualmente encontrada em indivíduos imunocomprometidos ou com patologia mental como demência ou trissomia 21 (Brites et al. 2002; Tsutsumi et al. 2005; Lee et al. 2019).

Estão reportados vários casos de transmissão de *S. scabiei* de animais para humanos, apesar da especificidade das várias variantes (Walton and Currie 2007). O contacto próximo com animais de companhia leva a que a infeção por *S. scabiei* var. *canis* seja uma das zoonoses mais frequentes (Aydingöz and Mansur 2011). Em zonas rurais, detentores de gado e caçadores estão mais propensos à doença zoonótica (Kraabøl et al. 2015) e o risco de transmissão animal-Homem é também superior em determinadas atividades em que ocorre contacto ocupacional (por exemplo veterinários) com animais domésticos ou selvagens com sarna (Currier and Ceilley 2010). No entanto, fora do hospedeiro preferencial, o ácaro não se reproduz ativamente e a doença ganha um carácter autolimitante, com um período de incubação menor, sintomas transitórios, lesões localizadas nas áreas de contacto com os animais e sem os característicos túneis profundos (Bandi and Saikumar 2013; Pisano et al. 2019). A prevenção deve incluir a identificação precoce dos animais afetados, e o seu tratamento (Bandi and Saikumar 2013). Pode também ocorrer transmissão zoonótica reversa (Currier and Ceilley 2010).

## **2.2. Sarna sarcóptica na fauna selvagem**

Mais de 100 espécies de hospedeiros, selvagens e domésticos, foram reportados com sarna sarcóptica (Bornstein et al. 2001). O aumento do número de hospedeiros pode levar à expansão do parasita com aparecimento da doença em hospedeiros atípicos. Além disso, mudanças ambientais de origem antropogénica, como as alterações climáticas e o aumento do contacto entre humanos, animais domésticos e selvagens, podem aumentar a suscetibilidade dos hospedeiros e contribuir para a ocorrência de surtos (Niedringhaus, Brown, Sweeley, et al. 2019).

A gravidade da sarna sarcóptica é altamente variável nas populações de animais selvagens, podendo ter um forte impacto em populações naïves e suscetíveis (Niedringhaus,

Brown, Sweeley, et al. 2019), sendo que em populações estáveis, epizootias de sarna não afetam a dimensão da população a longo prazo, mas em populações pequenas, geneticamente comprometidas ou espécies ameaçadas ou em vias de extinção, os efeitos podem ser devastadores. Verificaram-se epizootias em canídeos silvestres na América do Norte, Europa e Austrália, em felídeos na Europa e África, em ungulados na Europa, em wombats e coalas na Austrália e em macacos e vários bovídeos selvagens em África (Pence and Ueckermann 2002). Em certas espécies, a sarna é particularmente grave, como na raposa (Soulsbury et al. 2007; Pisano et al. 2019), cabra-montês (*Capra pyrenaica*) (Espinosa et al. 2017) e wombat (Skerratt et al. 1999; Martin, Burridge, et al. 2018).

A sarna sarcóptica é enzoótica em várias populações de canídeos selvagens, tornando-se periodicamente epizoótica. Epizootias de sarna podem ocorrer devido à introdução externa de uma nova estirpe virulenta de *S. scabiei*, pela mutação de uma estirpe já existente com aumento da sua patogenicidade e/ou por uma maior suscetibilidade da população hospedeira, e podem estar relacionadas com a densidade das populações (Pence et al. 1983). No norte de Portugal (Parque Nacional da Peneda-Gerês), a sarna sarcóptica é enzoótica entre os canídeos selvagens e domésticos, tendo sido registada uma epizootia localizada geograficamente e temporalmente em lobos e raposas nos anos 2007 e 2008 (Santos et al. 2012).

A raposa é afetada por uma forma letal de sarna sarcóptica, na qual a pele pode ficar 10 vezes mais espessa e com uma enorme carga parasitária (Bowman 2014). Esta espécie demonstra menor capacidade de montar uma resposta imunitária apropriada à infeção quando comparada com outras espécies, ocorrendo reações de hipersensibilidade imediata que se podem manter até 4 meses após a completa resolução dos sinais clínicos (Little et al. 1998). No entanto, Davidson et al. (2008), através de um estudo de dez anos em raposas na Noruega, sugere que há uma adaptação hospedeiro-parasita, com existência de infeções subclínicas ou de baixo grau e ainda recuperação de algumas raposas afetadas, o que também demonstra a possibilidade desta espécie ser um reservatório de *S. scabiei*. Epizootias de sarna em raposas têm causado, na Europa, importantes declínios populacionais (Mörner 1992; Soulsbury et al. 2007; Kraabøl et al. 2015), sendo provável que as raposas infetadas sobrevivam apenas um quinto do tempo comparativamente com um animal não infetado da mesma idade e sexo, independentemente de terem ou não recebido uma dose de tratamento (Newman et al. 2002). Segundo Mörner e Christensson (1984), as raposas acabam por morrer pouco antes dos 3 meses após infeção devido a fraqueza e dificuldade em obter alimento. Noutro estudo, foi demonstrado que a sobrevivência é de cerca de 4 meses, mas pode variar entre os 23 a 271 dias, neste último caso com implicações epidemiológicas importantes (Newman et al. 2002) e podendo ocorrer a transmissão a outras espécies, nomeadamente

espécies ameaçadas como a raposa do ártico (*Vulpes lagopus*) e lince euroasiático (*Lynx lynx*) (Mörner 1992; Kraabøl et al. 2015).

A transmissão pode ocorrer quer por contacto direto e/ou indireto, sendo o comportamento social da espécie e/ou a utilização de esconderijos, respetivamente, características importantes na transmissão da doença entre indivíduos da mesma espécie ou de espécies diferentes (Kołodziej-Sobocińska et al. 2014; Montecino-Latorre et al. 2019). Em lobos, o tamanho da alcateia não parece ser um fator de risco para a transmissão e desenvolvimento da doença, podendo mesmo ter um efeito protetor através da aquisição de alimento e defesa de território por parte do grupo. Por outro lado, a prevalência dentro da alcateia já poderá influenciar positivamente o risco de transmissão (Almberg et al. 2015). De forma semelhante, outro estudo sugeriu que a dinâmica da sarna é melhor explicada pela transmissão dependente da frequência, do que dependente da densidade (Devenish-Nelson et al. 2014). A prevalência de sarna pode aumentar em épocas de maior stress ambiental, como o inverno (Jimenez, Bangs, Sime, et al. 2010; Almberg et al. 2015), ou durante as estações mais secas (Zumpt and Ledger 1973; Gakuya et al. 2012), dependendo da espécie afetada e do seu habitat.

Há também uma grande probabilidade de transmissão de *S. scabiei* das presas para os seus predadores, durante o processo de caça e alimentação destes, o que leva a um fluxo genético de *Sarcoptes* sp. na direção presa-predador por transferência direta de ácaros. Em Masai-Mara, Quênia, foram demonstradas semelhanças genéticas entre populações de ácaros do género *Sarcoptes* sp. de leão (*Panthera leo*) e gnu (*Connochaetes taurinus*), de gazela-de-thomson e chita e de gnu e chita, estando este fluxo de genes dependente das preferências de presas por parte do predador. Além disso, as presas infetadas podem ter uma resposta de fuga reduzida e por isso serem mais facilmente predadas (Gakuya et al. 2011; Gakuya et al. 2012). Por outro lado, a direção da transmissão pode ocorrer no sentido oposto, com os predadores a transmitirem a doença às suas presas, o que pode acontecer pelo contacto direto das presas com carcaças dos seus predadores com sarna ou pela partilha de habitats intensivamente utilizados pelas duas populações de mamíferos, com consequente transmissão indireta (Matsuyama et al. 2019). A doença envolve maiores necessidades de energia e provoca alterações comportamentais, pelo que os predadores podem compensar os elevados custos energéticos caçando presas com maior frequência, através de necrofagia mais frequente ou consumindo as carcaças de forma mais completa. Podem, portanto, observar-se efeitos secundários da infeção por *Sarcoptes* sp. nas taxas de consumo de presas, na dinâmica da teia alimentar, nas interações presa-predador e nas comunidades de necrófagos (Shelley and Gehring 2002; Cross et al. 2016).

À medida que a sarna sarcóptica progride, origina efeitos fisiológicos e comportamentais no hospedeiro, que têm interações complexas, influenciando-se ou

amplificando-se mutuamente e resultando numa “cascata” de impactos no animal (Martin, Fraser, et al. 2018). Animais afetados por sarna e em estádios avançados da doença, tornam-se fracos e subnutridos (Mörner and Christensson 1984; Skerratt et al. 1999), têm menores reservas de gordura e demonstram sinais clínicos de catabolismo muscular acelerado (Skerratt et al. 1999; Newman et al. 2002). Além disso, a falta de pelo compromete a termorregulação, o que leva a gastos energéticos aumentados para a manutenção da temperatura corporal, especialmente durante a noite e em condições ventosas (Murray et al. 2015; Cross et al. 2016). A perda de calor para o ambiente através da pele pode ser particularmente impactante quando a alopecia é considerável (>50%) (Martin, Fraser, et al. 2018). Lobos afetados por sarna sarcóptica podem abandonar a sua alcateia e refugiarem-se em zonas de menor altitude (Jimenez, Bangs, Sime, et al. 2010). Assim, estes animais têm pior sucesso na caça e na competição por carcaças, e devido à dificuldade em obter alimento são obrigados a procurar alimento “fácil”, como restos da alimentação humana, principalmente no inverno em que a alimentação natural é escassa e as condições são exigentes em termos energéticos, aproximando-se de povoações humanas. Tal facto pode aumentar os encontros com humanos, animais domésticos e outros animais selvagens e representar uma fonte de contágio e conflito (Süld et al. 2014; Murray et al. 2015; Carricondo-Sanchez et al. 2017). Por outro lado, para animais afetados, locais de alimentação artificial podem ser recursos essenciais, especialmente no inverno, facilitando a dispersão da doença entre animais da mesma espécie ou de espécies diferentes (Süld et al. 2014).

Os carnívoros selvagens são menos ativos durante o dia, o que permite a coexistência entre estes e os humanos em áreas desenvolvidas (Murray et al. 2015). No entanto, a atividade passa a ser mais diurna em animais com sarna e estes podem, inclusivamente, perder o medo dos humanos (Trainer and Hale 1969; Borchard et al. 2012). O aumento da atividade diurna pode ser justificado pela capacidade termorreguladora estar comprometida havendo uma preferência para se movimentarem em alturas mais quentes do dia, pela necessidade contínua de procura de alimento de forma a satisfazer as elevadas necessidades energéticas e pela incapacidade de competirem com animais saudáveis durante a noite (Skerratt et al. 1999; Borchard et al. 2012; Murray et al. 2015; Cross et al. 2016). Adicionalmente, não conseguem manter-se ativos por muito tempo (Shelley and Gehring 2002; Cross et al. 2016), e paralelamente, são incapazes de descansar por longos períodos, provavelmente devido ao prurido constante (Martin, Fraser, et al. 2018). Num estudo realizado em cães-guaxinim foi demonstrado que a atividade diária dos animais doentes diminuiu de forma abrupta, provavelmente devido a sepsis e consequente falência orgânica (Süld et al. 2017).

A capacidade reprodutiva é também afetada, sendo que as gónadas tornam-se inativas ou minimamente ativas (Skerratt et al. 1999), há redução da massa e

degenerescência testicular em machos (Little et al. 1998; Soulsbury et al. 2007; Sarasa et al. 2011), fêmeas afetadas têm menor número de crias, incapacidade de levar a gravidez até ao fim ou não se reproduzem (Pence et al. 1983; Fthenakis et al. 2001; Soulsbury et al. 2007) e a mortalidade juvenil é superior em fases enzoóticas de sarna (Soulsbury et al. 2007).

Há, desta forma, a criação de um ciclo vicioso, no qual a doença pode ser a causa ou efeito da deterioração do indivíduo. Por exemplo, um animal com uma pobre condição corporal é mais propenso ao desenvolvimento da doença e é mais suscetível desta ser grave, o que resulta na deterioração crescente da sua condição, afetando o seu desempenho e sobrevivência. Ao nível da população, uma grande proporção de indivíduos em más condições levará a um grande número de infeções e infeções mais graves, o que resulta numa maior exposição aos patógenos e conseqüentemente um maior impacto na dinâmica do hospedeiro (Beldomenico and Begon 2010).

## **2.3. Carnívoros silvestres**

### **2.3.1. Lobo (*Canis lupus*)**

#### **2.3.1.1. Taxonomia**

O lobo pertence ao reino Animalia, filo Chordata, classe Mammalia, ordem Carnivora, família Canidae, género *Canis*, espécie *Canis lupus* (Linnaeus, 1758), ocorrendo na península ibérica uma subespécie endémica, o lobo ibérico, *Canis lupus signatus* (Cabrera, 1907) (Boitani 2018).

#### **2.3.1.2. Características morfológicas**

Sendo uma espécie amplamente distribuída e com habitats muito variados, a sua variação fenotípica é elevada (Boitani 2000). Assim, no lobo ibérico o peso médio varia entre 25 e 55 kg (fêmeas são as mais pequenas), têm um comprimento de 130 a 180 cm (incluindo a cauda) e altura ao garrote de 60 a 80 cm. A cabeça é volumosa e as orelhas rígidas e triangulares. Os olhos são frontalizados e cor de topázio. Os membros são fortes e robustos. São digitígrados, possuindo 4 dedos nos membros posteriores, e 5 nos membros anteriores com o primeiro dedo sem contacto com o chão. A pelagem tem uma coloração dominante cinzenta e amarela acastanhada com manchas brancas evidentes e caracteriza-se pela existência de faixas longitudinais negras na superfície anterior dos membros anteriores e por uma lista negra dorsal que vai do garrote à cauda. A pelagem é densa durante o Inverno (início da muda em outubro), com mais pelos lanosos (subpelo) e pelos de revestimento mais longos, o que lhe confere maior resistência às condições meteorológicas e uma aparência mais corpulenta, mas mais rala no Verão (início da muda em março/abril), com os pelos lanosos

quase inexistentes e os de revestimento mais curtos com tons mais amarelados, conferindo-lhe um aspeto mais magro (Grupo Lobo 2016).

### **2.3.1.3. Distribuição**

O lobo é o segundo maior predador da Europa, ficando somente atrás do urso-pardo (*Ursus arctos*). É o mamífero terrestre que teve a maior área de distribuição, tendo ocupado todo o hemisfério Norte acima do paralelo 20° N. Atualmente, devido ao extermínio da espécie por parte do Homem, a sua distribuição é muito mais reduzida, restando na Europa pequenas populações remanescentes em Portugal, Espanha, Itália, Grécia e Finlândia e populações mais numerosas na Europa de Leste. Há, no entanto, uma recuperação natural da espécie em alguns países como França, Alemanha, Suíça, Suécia e Noruega (Boitani 2000). Podem ser encontrados desde o nível do mar até 2.500 m de altitude (Boitani 2018).

Em Portugal, a população de lobos está reduzida a uma área de cerca de 20% em relação à área que ocupava no início do século XX em que correspondia à quase totalidade do território nacional (Petrucci-Fonseca 1990). Ocupa nos dias de hoje cerca de 20.000 km<sup>2</sup> no Norte e Centro do país e divide-se em duas subpopulações, separadas pelo rio Douro, em que a que se encontra a norte deste rio ocupa uma área de 13.600 km<sup>2</sup>, com 54 alcateias (45 confirmadas e 9 prováveis) e está em contacto com a população espanhola, e a que se encontra a sul ocupa 6.800 km<sup>2</sup>, com 9 alcateias (6 confirmadas e 3 prováveis) e estando aparentemente isolada. A subpopulação a norte do rio divide-se em três núcleos populacionais estáveis: Peneda-Gerês no Noroeste, Bragança-Montesinho no Nordeste e Vila-Real-Alvão na região central do Norte de Portugal (Pimenta et al. 2005; Álvares et al. 2015). A população lupina em Portugal representa cerca de 15% da população ibérica (Cabral et al. 2005).

### **2.3.1.4. Habitat e alimentação**

O lobo adapta-se a uma grande variedade de habitats, mesmo em condições extremas, naturais ou antropogénicas, preferindo áreas com pouca perturbação humana e com presas disponíveis, por exemplo ungulados selvagens (Eggermann et al. 2011; Boitani 2018). É geralmente encontrado em floresta, montanha, mato e campo, mas também em paisagens áridas e tundra ártica (Smith 2002; Boitani 2018). Em Portugal, as regiões montanhosas do Norte e Centro do país, favorecem esta espécie, dado que a densidade humana é inferior, há maior disponibilidade alimentar e uma utilização agrícola menos intensiva (Rio-Maior et al. 2019).

A sua dieta inclui grandes presas mas também pequenos mamíferos, aves, invertebrados, vegetação, carcaças e restos alimentares do Homem, requerendo 2,5 a 6,3 kg de alimento por dia (Mech and Boitani 2004; Boitani 2018). Dada a maior facilidade para caçar

presas débeis ou doentes, o lobo pode ser responsável pela diminuição da ocorrência de doenças nas espécies de que se alimenta (Tanner et al. 2019).

Em Portugal, a escassez de presas selvagens (veado, corço – *Capreolus capreolus*, javali - *Sus scrofa* e cabra-montês) fazem com que o lobo se alimente de gado doméstico (cabras - *Capra aegagrus hircus*, ovelhas - *Ovis aries*, vacas - *Bos taurus* e cavalos - *Equus caballus*), sendo esta a sua fonte de alimento principal e originando desta forma prejuízos na pecuária (Álvares et al. 2015). Os lobos consomem ainda, de forma regular, outros carnívoros, como cães domésticos, raposas e gatos (*Felis catus*), controlando dessa forma as populações de carnívoros de médio porte, nomeadamente de cães errantes e assilvestrados (Álvares et al. 2015).

### **2.3.1.5. Organização social e ciclo anual**

Os lobos vivem em unidades sociais (alcateias), com aproximadamente 7 indivíduos (2-15) em que o casal dominante, e monogâmico, se reproduz e estabelece o seu território, e ocorre cooperação na caça, reprodução e defesa de território. No Verão, a alcateia apresenta o número máximo de indivíduos e no Inverno o número mínimo, sendo por isso uma fase mais desafiante. Nas fêmeas, o estro dura 5 a 7 dias e ocorre uma vez por ano, geralmente entre janeiro e março (em Portugal março/abril). A gestação dura 60 a 62 dias e têm em média 6/7 (1 a 11) crias que nascem entre abril e junho (em Portugal maio/junho) (Boitani 2000; Smith 2002; Grupo Lobo 2016). Durante e após o parto utilizam esconderijos, e, posteriormente, *rendez-vous* que são locais de criação onde os jovens aprendem a caçar (Iliopoulos et al. 2014). No Inverno seguinte ao seu nascimento, com aproximadamente 10 meses, os lobos jovens começam a caçar com a alcateia. Permanecem nesta até aos 2 anos de idade, podendo depois dispersar e procurar um parceiro para formar uma nova alcateia e se fixarem num novo território (fenómeno de dispersão) ou permanecer na alcateia tentando conquistar níveis de dominância superiores, estando esta escolha dependente da densidade das presas, da densidade de lobos e da existência de territórios livres. Também aos 2 anos de idade, as fêmeas atingem a maturidade sexual, o que ocorre aos 3 anos no caso dos machos. No estado selvagem vivem em média 5/6 anos (elevada mortalidade de juvenis e subadultos), mas podem chegar aos 13 e em cativeiro aos 17 anos (Boitani 2000; Smith 2002; Grupo Lobo 2016).

O nível hierárquico é comunicado através de linguagem corporal e facial e as vocalizações, como uivos, são utilizadas na comunicação entre os membros da alcateia ou como marcação de território para outras alcateias. São animais noctívagos com áreas vitais de 130 a 13.000 km<sup>2</sup> (Smith 2002). A atividade noturna dos lobos parece seguir um padrão bimodal, com dois picos de atividade, um durante a primeira metade da noite a que se segue um curto período de repouso e outro pico durante a madrugada (Grupo Lobo 2016).

Em Portugal, deverão existir 200 a 400 indivíduos dos quais aproximadamente 90% ocorrem a norte do rio Douro e cerca de 10% a sul deste rio (Pimenta et al. 2005; ICN 2006a). Os números médios de indivíduos por alcateia são de 4 adultos e 3,3 crias a norte do Douro e 4,2 adultos e 2,3 crias a sul. O seguimento de lobos tem sido possível graças à utilização de radiotelemetria, e, mais recentemente, telemetria GPS, o que possibilita obter a sua localização e informação sobre as suas áreas vitais e movimentos de dispersão. As áreas vitais variaram de 47 a 1.082 km<sup>2</sup> com os valores mais elevados a corresponderem a lobos dispersantes (Álvares et al. 2015). Têm também sido implementados outros métodos de monitorização, tais como foto-armadilhas e métodos moleculares não-invasivos, que permitem monitorizar e estudar a estrutura e dinâmica das alcateias e a saúde corporal dos indivíduos (Pimenta et al. 2005; Galaverni et al. 2012).

#### **2.3.1.6. Ameaças e estatuto de conservação**

A nível global, a espécie tem o estatuto de 'Pouco Preocupante' (LC) e a população ibérica o estatuto de 'Quase Ameaçada' (NT) (Boitani 2018). A nível nacional, o seu estatuto de conservação é considerado, desde 1990, como 'Em Perigo' (EN) uma vez que a espécie tem uma população com menos de 250 indivíduos maduros. É, em Portugal, uma espécie estritamente protegida tendo legislação específica (Lei nº90/88, de 13 de agosto e Decreto-Lei nº139/90, de 27 de abril) que regulamenta o sistema de compensações financeiras aos proprietários de efetivos pecuários que foram alvo de prejuízos causados por lobos e proíbe o seu abate, captura, detenção, transporte, comercialização, exposição de exemplares e a perturbação ou destruição do seu habitat (Cabral et al. 2005; Grupo Lobo 2016). Ademais, em termos comunitários, esta espécie encontra-se incluída no Anexo II da Convenção Internacional de Espécies de Fauna e Flora Selvagens Ameaçadas de Extinção (CITES) como espécie potencialmente ameaçada, no Anexo II da Convenção de Berna como espécie estritamente protegida, e nos Anexos II e IV da Diretiva Habitats como espécie prioritária (Pimenta et al. 2005).

Em Portugal as suas principais ameaças são i) a escassez de recursos alimentares, quer por escassez de presas selvagens quer pela diminuição da criação de gado em regime extensivo; ii) a escassez de áreas de refúgio devido à destruição ou substituição da vegetação autóctone; iii) a destruição do habitat por exemplo devido a incêndios que comprometem a disponibilidade de locais de repouso e criação e em que as suas presas são também afetadas; iv) a fragmentação do habitat por exemplo devido à implementação de grandes infraestruturas como barragens e autoestradas; v) a perseguição humana direta ou indireta, por exemplo com caça furtiva, envenenamento e atropelamento; vi) as doenças infecciosas como a esgana; vii) as doenças parasitárias como a sarna sarcóptica que compromete a resistência física e a sobrevivência dos animais, principalmente durante o Inverno; viii) os atrasos no pagamento

dos prejuízos atribuídos ao lobo que contribuem para a perseguição humana desta espécie; ix) a ausência de medidas para a proteção dos animais domésticos face a ataques de lobo, como colocação de cercas elétricas ou distribuição de cães de gado a criadores; x) e a existência de cães errantes ou assilvestrados que competem com os lobos por território e alimento, podendo ser os responsáveis pelos ataques ao gado, mas cujos prejuízos são atribuídos ao lobo, e a possibilidade de hibridação (Oliveira and Carmo 2000; ICN 2006a; Rio-Maior et al. 2008; Müller et al. 2011; Grupo Lobo 2016). Na subpopulação a sul do Douro, o isolamento e fragmentação condicionam a sua sobrevivência (Cabral et al. 2005).

Em 1999 foi implementado pelo Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF) o Sistema de Monitorização de Lobos Mortos (SMLM) com o objetivo de conhecer as principais causas de morte e recolher amostras para o desenvolvimento de estudos científicos para a conservação da espécie. O atropelamento surge como a causa de morte mais frequente, seguindo-se o tiro, laço, doenças infecciosas, veneno, traumatismos de origem desconhecida e agressão por outros canídeos (Pimenta et al. 2005; Álvares et al. 2015). A mortalidade é superior no Outono/Inverno, provavelmente por nesta altura os animais utilizarem mais as zonas marginais da sua área vital e pelo fenómeno de dispersão em que os lobos podem frequentar áreas desconhecidas e eventualmente mais humanizadas, logo com maiores riscos (Pimenta et al. 2005). A mortalidade registada teve um rácio de 1 macho para 0,53 fêmeas, o que pode ser explicado pelo fenómeno de dispersão, mais comum em machos. Além disso, nas diferentes classes etárias, a mortalidade foi de 31% em adultos (> 2 anos), 20% em subadultos/adulto jovem (1-2 anos) e 49% em juvenis/crias (< 1 ano), sendo que a maior percentagem destes últimos pode estar relacionada com a sua inexperiência e com o abandono do local de cria (Pimenta et al. 2005). A população a sul do rio Douro apresenta maior instabilidade pois trata-se de uma população marginal, sem comunicação com a restante população ibérica e com mortalidade de origem antropogénica superior (Pimenta et al. 2005).

## **2.3.2. Raposa (*Vulpes vulpes*)**

### **2.3.2.1. Taxonomia**

A raposa pertence ao reino Animalia, filo Chordata, classe Mammalia, ordem Carnivora, família Canidae, género *Vulpes* e espécie *Vulpes vulpes* (Linnaeus, 1758) (Hoffmann and Sillero-Zubiri 2016).

### **2.3.2.2. Características morfológicas**

O seu peso adulto varia de 3 a 14 kg, o comprimento (cabeça e corpo) de 45,5 a 90 cm e o comprimento da cauda de 30 a 55,5 cm. A coloração do pelo é castanha avermelhada,

mas pode variar entre o castanho, vermelho, cinzento e amarelo. A parte inferior dos membros é geralmente negra e a ponta da cauda é branca ou preta. Os olhos são amarelados e o nariz é preto ou castanho escuro. As orelhas são grandes, pontiagudas, eretas e negras dorsalmente. Os membros anteriores têm 5 dedos, sendo o primeiro rudimentar e sem contacto com o chão e os membros posteriores 4 dedos (Macdonald and Reynolds 2004; Fox 2007).

### **2.3.2.3. Distribuição**

A raposa é o mamífero terrestre com a maior distribuição geográfica, cobrindo quase 70 milhões de km<sup>2</sup> (Schipper et al. 2008) . Pode ser encontrada em todo o hemisfério Norte, desde o Círculo Polar Ártico à América do Norte, Europa, Norte de África, estepes Asiáticas, Índia e Japão. Não é encontrada na Islândia, ilhas do Ártico, algumas partes da Sibéria e em desertos extremos, e na República da Coreia é considerada como extinta. A subespécie europeia foi introduzida no Leste dos Estados Unidos e no Canadá no final do século XVII, na Austrália no início do século XIX e na Tasmânia nos anos 1990 (Macdonald and Reynolds 2004; Hoffmann and Sillero-Zubiri 2016). Tem, no território continental português, uma distribuição ubíqua e é considerada espécie cinegética (Decreto-Lei nº227-B/2000, de 15 de setembro) (Álvares et al. 2019).

### **2.3.2.4. Habitat e alimentação**

São animais muito adaptáveis que podem ser encontrados desde o nível do mar até 4.500 m de altitude em diversos habitats como tundra, deserto ou duna, floresta, montanha e centro de cidades, sendo o seu habitat natural seco com paisagem mista como matagal, campo, mato ou terrenos agrícolas. Adaptam-se de forma satisfatória a áreas urbanas e em muitos habitats parecem estar intimamente associados à população humana, mesmo em áreas de agricultura intensiva (Hoffmann and Sillero-Zubiri 2016).

São considerados omnívoros oportunistas, alimentando-se dos recursos mais abundantes no seu território e requerendo aproximadamente 500 g de alimento por dia (Macdonald and Reynolds 2004). Geralmente os mamíferos constituem a base da sua dieta, (maioritariamente lagomorfos, dos quais coelho-bravo, ou micromamíferos, como roedores). Na sua ausência, a raposa também se alimenta de aves, insetos como ortópteros e coleópteros, e frutos (Pires 2001). Têm também comportamento necrófago e aproveitam restos de comida humana (Macdonald and Reynolds 2004).

### **2.3.2.5. Organização social e ciclo anual**

A unidade social básica é o par, mas grupos com até 6 indivíduos, geralmente 1 macho adulto e 2 a 5 fêmeas, podem partilhar o território, dependendo do habitat (Macdonald and Reynolds 2004).

O comportamento de acasalamento varia entre i) macho e fêmea monogâmicos; ii) machos com mais que uma companheira; iii) e uma única fêmea dominante com outras fêmeas submissas a ajudar na criação dos seus filhos. Os juvenis dispersam entre os 6 e os 12 meses de idade, entre outubro e janeiro, e os machos dispersam para zonas mais distantes comparativamente às fêmeas (Macdonald and Reynolds 2004). Nas fêmeas, o estro ocorre uma vez por ano e dura 1 a 6 dias, sendo a ovulação espontânea. Os machos têm um ciclo de fecundidade em que a espermatogénese completa só ocorre entre novembro e março. O período de acasalamento varia consoante a latitude sendo de dezembro a janeiro no Sul, janeiro a fevereiro em regiões centrais e fevereiro a abril no Norte. A gestação dura 51 a 53 dias e têm em média 5 (1 a 13) crias, que nascem entre março e maio, permanecem com os seus pais e/ou grupo de fêmeas pelo menos até ao Outono e atingem a maturidade sexual entre os 9 e 10 meses de idade (Macdonald and Reynolds 2004; Fox 2007). A longevidade em cativeiro é de 10 a 12 anos, mas em estado selvagem poderá ser inferior devido a causas não naturais de mortalidade (Fox 2007).

A marcação de território é efetuada através da urina, fezes, secreções dos sacos anais, glândula supracaudal e glândulas em torno dos lábios, no ângulo da mandíbula e entre as almofadas plantares. Além disso, comunicam através de vocalizações e expressões faciais (Macdonald and Reynolds 2004). A sua atividade é maioritariamente noturna e crepuscular e geralmente são solitários e independentes durante a caça (Macdonald and Reynolds 2004). A sua área vital depende da qualidade do habitat mas pode ser entre 5 a 12 km<sup>2</sup>, ou superior em habitats mais pobres (20 a 50 km<sup>2</sup>) (Fox 2007).

### **2.3.2.6. Ameaças e estatuto de conservação**

A raposa tem predadores naturais como águias, coiotes, lobos, ursos, pumas e humanos, sendo as raposas jovens as mais predadas. O Homem é o predador mais significativo, que as caça para obter a sua pele ou para reduzir grandes populações consideradas como pestes (Fox 2007). A caça e captura para obtenção da sua pele, envenenamentos, atropelamentos, doenças infecciosas e parasitárias, como a raiva e sarna sarcóptica, e degradação, perda e fragmentação do habitat são as suas principais ameaças (Macdonald and Reynolds 2004; Hoffmann and Sillero-Zubiri 2016).

O seu estatuto de conservação é classificado como 'Pouco Preocupante' (LC) em Portugal e globalmente (Hoffmann and Sillero-Zubiri 2016; Álvares et al. 2019).

### 3. Objetivos

Este trabalho teve como principais objetivos: **i)** Implementação de um novo método laboratorial para deteção molecular de *Sarcoptes scabiei* em amostras fecais de lobo; **ii)** Descrição da epidemiologia da sarna sarcóptica em carnívoros silvestres (lobo e raposa) no Noroeste de Portugal entre 1997 e 2019, combinando dados resultantes da utilização de métodos sorológicos para identificação de anticorpos específicos, métodos moleculares para deteção de DNA de *Sarcoptes* sp. em amostras não-invasivas e métodos de observação direta para deteção de *Sarcoptes* sp. em digestões de pele alopecica, com dados de armadilhas fotográficas de populações selvagens; **iii)** Validação e avaliação do desempenho do método molecular não-invasivo para a deteção de DNA de *Sarcoptes scabiei* em lobos, através de modelos multi-evento de captura-recaptura.

### 4. Material e métodos

#### 4.1. Área de estudo

Os carnívoros silvestres estudados pertencem à região do Alto Minho, no Noroeste de Portugal. A área de estudo abrange uma paisagem montanhosa (até 1430 m acima do nível médio do mar), com um clima temperado atlântico-mediterrânico caracterizado por verões quentes e invernos chuvosos, com uma precipitação média anual de 1200 mm e com pouca neve (<30 dias/ano) e uma temperatura média anual de 14°C (IPMA 2012; INE 2013). A paisagem é dominada pelo Homem (Rio-Maior et al. 2019) e habitada por uma população lupina aparentemente estável dividida em 15-20 alcateias (Pimenta et al. 2005). A raposa é, nesta área, um canídeo abundante (Álvares et al. 2019).

#### 4.2. Método de observação direta

Durante as necrópsias de lobos e raposas recolheram-se amostras de pele quando estava presente alopecia ou outras lesões compatíveis com sarna (LCS). Para observação direta de ácaros ou respetivos ovos ao microscópio foi realizado um protocolo de digestão de pele (Bornstein et al. 2006): cortou-se aproximadamente 2 cm<sup>2</sup> de pele em 10 pedaços, que se colocaram num copo com 20 mL de água e 3,8 g de Hidróxido de Sódio (NaOH), seguindo-se uma incubação a 36°C durante 2 horas. Após a incubação, os pedaços de pele digerida foram desprezados e colocou-se o líquido em tubos *Falcon*, ao que se seguiu uma centrifugação a 600 g durante 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e, por fim, efetuou-se o esfregão do depósito em lâmina de microscópio, seguido de observação na ampliação de 100x. Os ácaros *S. scabiei* foram identificados de acordo com as suas características morfológicas (Fain 1968).

Previamente (2002-2011), já haviam sido analisadas 15 amostras. No presente trabalho, este protocolo foi aplicado a mais 5 amostras de pele (2014-2019), recolhidas aquando da respetiva necrópsia. Os animais em questão eram uma raposa (*Vulpes vulpes* – 18-001) e quatro lobos (*Canis lupus* – SMLM 126; SMLM 130; SMLM 132; SMLM 135). No total foi efetuada necrópsia a 20 animais com LCS, dos quais 14 eram lobos e 6 eram raposas. Nos lobos, 9 eram machos (2 juvenis, 3 subadultos e 4 adultos) e 5 eram fêmeas (2 juvenis, e 3 adultos). Nas raposas, 4 eram machos (4 adultos) e 2 eram fêmeas (1 subadulto e 1 adulto).

### 4.3. Foto-armadilhas

Os vídeos resultantes de armadilhas fotográficas foram cedidos pelo autor Jorge Costa e pelo CIBIO. Estes vídeos dizem respeito a um intervalo de tempo que vai desde maio de 2018 a outubro de 2019. As câmaras foram colocadas na região de Paredes de Coura, pertencente ao sítio de importância comunitária Corno do Bico onde o coberto vegetal é constituído por uma extensa e bem preservada mancha florestal. Na área agrícola predominam os sistemas pecuários extensivos (pequenos ruminantes, equinos e bovinos autóctones) (ICN 2006b).

As câmaras permaneceram no mesmo local por 15 dias, estando em diferentes locais 2 a 3 câmaras em simultâneo. De forma a atrair os animais para perto das câmaras era colocado um isco alimentar na sua proximidade, sendo este renovado passados 7 dias. Foram utilizadas câmaras para armadilhas fotográficas das marcas *Moultrie*, *Keep Guard*, *StealthCam* e *Bushwhacker*. As câmaras estavam ligadas 24h/dia, sendo ativadas pelo movimento e fazendo uma gravação de 30 segundos ou tirando uma fotografia, dependendo da câmara. Todos os vídeos/fotografias foram analisados individualmente por três pessoas diferentes (o autor incluído), e classificados quanto à espécie observada (raposa ou lobo), número de indivíduos observados e número de indivíduos com LCS, tendo-se chegado a um consenso quanto à classificação de cada vídeo/fotografia. As lesões classificadas como compatíveis com sarna foram a presença de alopecia (Meek et al. 2014). Considerou-se que registos fotográficos obtidos com menos de 30 minutos de intervalo entre si correspondiam à mesma deteção, ou seja, ao mesmo indivíduo, excetuando os casos em que, apesar de os registos terem menos de 30 minutos entre si, os indivíduos eram de espécie diferente (Meek et al. 2014). Foram eliminados do estudo os vídeos/fotografias não classificáveis, em que devido à fraca qualidade de imagem por adversidades meteorológicas ou pela não observação da totalidade do corpo do animal, era impossível concluir quanto à presença ou não de alopecia. No caso dos lobos, as câmaras situavam-se no território das alcateias Boulhosa e Cruz Vermelha. Estas alcateias são consideradas instáveis, sendo a da Cruz Vermelha constituída por um reduzido número de animais, sujeito a grande mortalidade e com

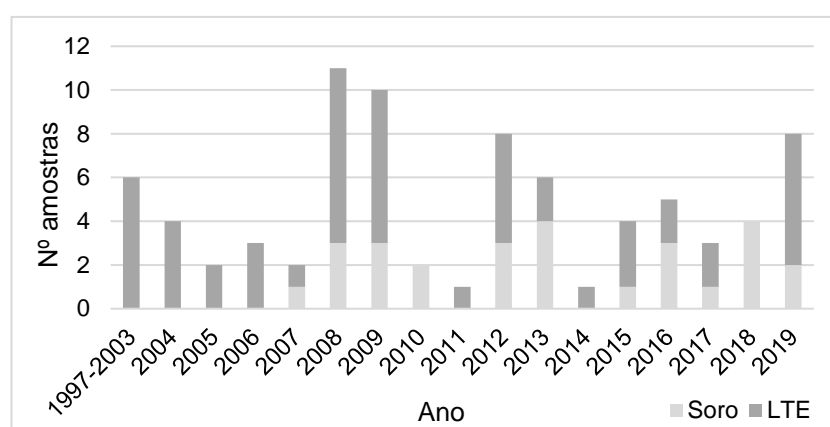
ocorrência de reprodução bastante irregular (Pimenta et al. 2005). A localização das câmaras e a percentagem de animais com LCS observados para cada câmara encontra-se representado na figura 4 (capítulo 5.2.).

#### 4.4. Método sorológico

##### 4.4.1. Amostras

As amostras utilizadas nos métodos sorológicos correspondiam a soro ou a extrato de tecido pulmonar (LTE) de lobos e raposas capturados para fins científicos ou encontrados mortos, respetivamente. O número e tipo de amostras por cada ano está representado no gráfico 1.

**Gráfico 1 Distribuição do número e tipo de amostras analisadas por sorologia por cada ano**



Estas amostras foram colhidas de 1997 a 2019, sendo que 39 amostras já haviam sido analisadas em 2010, compreendendo o período de 1997-2010, e 42 amostras foram analisadas em 2019, no decorrer do presente trabalho, e compreendem o período de 2010-2019. Portanto, é considerado um total de 81 amostras, em que 27 (33%) são soros (22 de lobo e 5 de raposa) e 54 (67%) LTE (39 de lobo e 15 de raposa).

Para a colheita de soro (não realizado pelo autor), os animais foram capturados com laços de perna *Belisle®* (Edouard Belisle, Saint Veronique, Quebec, Canada) e imobilizados quimicamente com uma injeção intramuscular de uma mistura de quetamina ( $4,71 \pm 1,17$  mg/kg) (Imalgene®, Merial, Lyon, France) e medetomidina ( $0,10 \pm 0,03$  mg/kg) (Domitor®, Merial, Lyon, France) com base numa estimativa do peso dos animais capturados, e dependendo da situação, por injeção com seringa manual, injeção com seringa de bastão ou zarabatana. A colheita de sangue fez-se por venopunção das veias cefálica ou safena e preservação em tubos sem anticoagulante, com posterior separação do soro por centrifugação a 1430 g durante 10 minutos e armazenamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  até à sua utilização. A reversão da imobilização foi efetuada com uma injeção intramuscular de atipamezol ( $0,40 \pm 0,01$  mg/kg) (Revertor®, Merial, Lyon, France) (Santos et al. 2017).

Para colher o extrato do tecido pulmonar, realizou-se um protocolo adaptado de Ferroglio et al. (2000). O pulmão foi colhido aquando da realização das necrópsias e armazenado a -20°C até ao processamento. Colheu-se aproximadamente 1 g de tecido pulmonar, dividindo essa quantidade em 4/5 partes e colocando num tubo *Falcon*. Foi adicionado 1 mL de PBS, seguido de agitação durante 4 minutos. Por fim, foi realizada uma centrifugação a 800 g durante 10 minutos com posterior recolha do sobrenadante e seu armazenamento a -20°C até à sua utilização.

#### 4.4.2. ELISA

Foi utilizado o *kit Sarcoptes-ELISA 2001® Dog* (AFOSA GmbH, Dahlewitz, Germany) que se trata de um ELISA indireto com a deteção de anticorpos (IgG) contra antígenos do ácaro, tendo uma sensibilidade e especificidade em cão de 92,1% e 94,6%, respetivamente (Afosa 2018).

Para a sua realização foram seguidas as instruções do fabricante, com pequenas adaptações. Todas as amostras e controlos foram testados em duplicado. Inicialmente, as amostras foram diluídas com a solução de diluição, mas tendo em consideração a espectável menor concentração de anticorpos nos LTE (Ferroglio et al. 2000), este tipo de amostra foi diluído a 1:50 e o soro a 1:100. Posteriormente, adicionou-se 100 µL de cada amostra diluída ao respetivo poço da placa de ELISA, assim como os controlos positivo e negativo fornecidos no *kit*. Seguiu-se uma incubação de 60 minutos à temperatura ambiente (18-25°C) após a qual foi realizada a lavagem da placa com 300 µL de solução de lavagem, 4 vezes, com recurso ao equipamento de lavagens automático (*ELx50, BioTek®*, France). Adicionou-se 100 µL da solução com o conjugado a cada poço e incubou-se novamente durante 60 minutos à temperatura ambiente. Seguiu-se a segunda lavagem, repetindo-se o que foi descrito na primeira. Foram, depois, adicionados 100 µL de solução com o substrato a cada poço e feita uma incubação de 15 minutos à temperatura ambiente e com colocação da placa em local escuro. Para finalizar, adicionou-se 100 µL de solução de paragem a cada poço e foi efetuada a leitura da densidade óptica a 450 nm no leitor de microplacas (*iMark™, Bio-Rad*, Portugal).

Tal como indicado pelo fornecedor, para verificar que o procedimento ocorreu corretamente foram calculadas as médias das densidades ópticas dos controlos negativo (CN) e positivo (CP) ( $DO_{CN}$  e  $DO_{CP}$ , respetivamente), assim como a percentagem (P) da densidade óptica do controlo negativo com a seguinte fórmula:  $P = \frac{DO_{cn} \times 100}{DO_{cp}}$ . O teste é validado se  $DO_{CP} > 0,8 < 2,8$ , e  $P < 20$ . De seguida,  $DO_{CN}$  foi subtraída à média das densidades ópticas de cada amostra ( $DO_{Amostra, corr}$ ) e à média das densidades ópticas do controlo positivo ( $DO_{CP, corr}$ ). Por fim, para obtenção do resultado do teste (RT), foi aplicada a seguinte fórmula:

$$RT = \frac{DO_{Amostra, corr} \times 100}{DO_{cp, corr}} .$$

## 4.5. Métodos moleculares

### 4.5.1. Amostras invasivas

#### 4.5.1.1. Extração de DNA total

Extraiu-se DNA da amostra de pele com lesões, colhida aquando da necrópsia, de uma raposa (18-001) infetada com sarna (confirmado por observação de *S. scabiei* ao microscópio após digestão com NaOH), para posterior utilização como controlo positivo. Foram realizados dois métodos de extração diferentes que serão de seguida detalhados.

##### 4.5.1.1.1. Método salino

Na extração de DNA pelo método salino (acetato de amónia) colocou-se um pequeno volume de tecido triturado (aproximadamente 30 mg) em 600 µL de solução de lise num *ependorf* (temporário) e adicionou-se 20 µL de proteinase K, seguido de homogeneização no *vortex* e incubação a 55°C durante a noite. Após a incubação, os passos que se seguem foram repetidos duas vezes: adicionou-se 700 µL de acetato de amónia, homogeneização no *vortex* e centrifugação a frio (10°C) a 12300 g durante 14 minutos passando o sobrenadante (800 a 1000 µL) para outro *ependorf* (definitivo). Os passos que seguem foram, também, repetidos duas vezes: adicionou-se 600 µL de isopropanol frio, seguindo-se de mistura por inversão do tubo e centrifugação a 12300 g durante 12 minutos com rejeição do sobrenadante tendo o cuidado de não rejeitar a *pellet* (geralmente no fundo do *ependorf*). De seguida, adicionou-se 1000 µL de etanol 70% frio e misturou-se por inversão do tubo. Posteriormente, realizou-se uma centrifugação a 12300 g durante 15 minutos e rejeitou-se o etanol, novamente com o cuidado de não perder o *pellet* de DNA. Deixou-se a secar à temperatura ambiente durante a noite para que evaporasse todo o etanol e, posteriormente, hidratou-se o DNA com 50 µL de tampão de eluição, ficando aproximadamente 2 horas em agitação suave.

##### 4.5.1.1.2. EasySpin®

Na extração de DNA pelo *kit* de colunas *EasySpin® Genomic DNA* (Citomed, Lisbon, Portugal) para tecido foram seguidas as instruções do fabricante, em que cerca de 30 mg de tecido passaram pelas fases de lise, de digestão, de lavagens e de eluições, com a realização de duas eluições.

No total foram realizadas quatro réplicas da mesma amostra (em cada método de extração) de forma a aumentar a probabilidade de pelo menos numa delas haver DNA do ácaro. Todas as réplicas (quatro do método salino, quatro da 1ª eluição e quatro da 2ª eluição do método *EasySpin®*) foram posteriormente submetidas a eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com *GelRed™* avaliando-se a presença do DNA total. Para tal, 2 µL de DNA de cada réplica, com 3 µL de azul de bromofenol (marcador de cor), correu em gel de agarose

em Tris-Borato-EDTA a 300 V. A visualização foi feita através de um transiluminador de ultravioletas (UV) *Universal Hood II* (Bio-Rad, Segrate, Milan, Italy).

Foi também realizada a extração de DNA às amostras de pele de lobo (SMLM 126 e 130) recorrendo apenas ao *kit EasySpin®*, com a realização de duas e três réplicas, respetivamente.

#### 4.5.1.2. Reação em Cadeia da Polimerase

Foram realizadas duas reações em cadeia da polimerase (PCR) distintas. Numa delas, amplificou-se um fragmento de 262 pb do gene citocromo c oxidase subunidade 1 (COX1) de *S. scabiei* com a utilização de um *primer forward* específico, scabF1 (5' CTTATTATTCCTGGATTGGRTA 3') e de um *primer reverse* específico scabR2 (5' CTAATTTTCCTCCTAATATTGTWGA 3') (adaptado de Wong et al. 2015). Na outra reação de PCR, amplificou-se um fragmento de 132 pb do gene mitocondrial 16S rDNA utilizando um *primer forward* específico, SSUDF (5' GGGTCTTTTTGTCTTGGGAATAAA 3') e um *primer reverse* específico SSUDR (5' CTAAGGTAGCGAAATCATTAGC 3') (adaptado de Angelone-Alasaad et al. 2015). Em ambos os PCRs, foi implementado um protocolo de marcação fluorescente (M13-tail – FAM) para permitir a identificação do tamanho dos fragmentos amplificados num sequenciador automático (Blacket et al. 2012).

Foi utilizado DNA extraído pelos dois métodos, com a realização de 4 réplicas em cada. No DNA extraído pelo *kit EasySpin®* foi utilizada a 1ª eluição.

Considerando um volume final de reação de 13 µL, foram utilizados 5 µL de *MyTaq™ HS Mix* (Bioline, London, UK), 0,04 µL de *primer forward*, 0,4 µL de *primer reverse*, 0,4 µL de fluorescência M13-tail e 3,16 µL de água. Os *primers* foram utilizados a 10 µM. Realizaram-se 8 réplicas (4 com o DNA do *kit EasySpin®* e 4 do método salino) para cada gene, sendo que em cada réplica foram utilizados volumes e concentrações de DNA diferentes. Assim: réplica 1 e 2 com 4 µL de DNA diluído 1:4; e réplica 3 e 4 com 4 µL de DNA diluído 1:6.

A amplificação do DNA foi realizada num termociclador T100™ (Bio-Rad, Hercules, California, USA) com os seguintes protocolos: **1)** Para o COX1, desnaturação inicial de 10 minutos a 95°C, 45 ciclos de amplificação (1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 72°C) e extensão final de 10 minutos a 72°C, com manutenção a 10°C após o fim da reação (adaptado de Wong et al. 2015). **2)** Para o 16S, desnaturação inicial de 10 minutos a 95°C, 45 ciclos de amplificação (30 segundos a 95°C, 45 segundos a 53°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C) e extensão final de 10 minutos a 72°C, com manutenção a 10°C após o fim da reação (adaptado de Angelone-Alasaad et al. 2015).

O produto da reação de PCR foi testado em gel de agarose a 2% corado com *GelRed™*. Para tal, 2 µL de produto de PCR de cada réplica, com 3 µL de azul de bromofenol correu em gel de agarose em Tris-Borato-EDTA a 300 V. Como marcador de pesos

moleculares foi utilizado 2  $\mu$ L de NZYDNA *ladder V* (NZYTech). A visualização foi feita através de um transiluminador de UV *Universal Hood II* (Bio-Rad, Segrate, Milan, Italy). Por fim, foi realizada uma eletroforese capilar no aparelho sequenciador ABI3130xl *Genetic Analyser* (Applied Biosystems®, Foster City, California, USA) para averiguar o tamanho em pares de base do fragmento amplificado através da utilização de uma fluorescência com tamanho padrão *GeneScan™ - 500 LIZ™* (Applied Biosystems®, Foster City, California, USA). Os resultados foram analisados manualmente e identificados os tamanhos dos fragmentos com recurso ao *GeneMapper 5* (Applied Biosystems®, Foster City, California, USA).

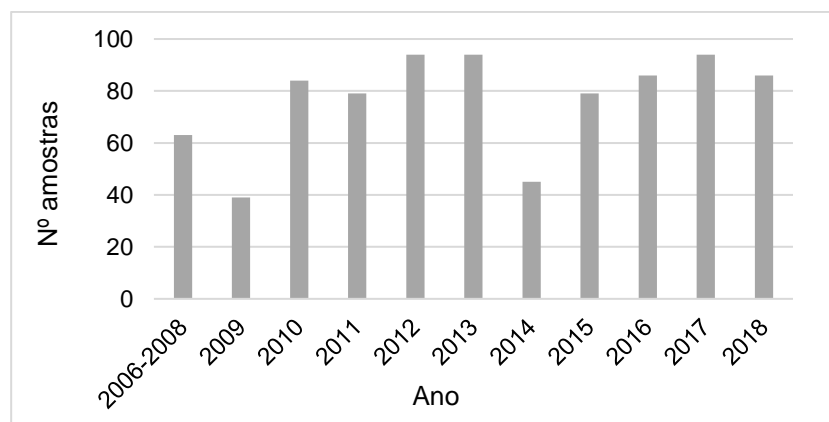
Foram também realizados PCRs ao DNA extraído da pele dos lobos SMLM 126 e SMLM 130, recolhida aquando das respetivas necrópsias, apenas para o gene 16S.

## 4.5.2. Amostras não-invasivas

### 4.5.2.1. Amostras

As amostras de dejetos de lobo analisadas foram colhidas (não realizado pelo autor) ao longo de treze anos (2006 a 2018) para outros fins científicos. No total, foram analisadas 843 amostras, sendo a sua distribuição ao longo dos anos representada no gráfico 2.

**Gráfico 2 Distribuição do número de amostras não-invasivas analisadas por cada ano**



Eram colhidas aproximadamente 10 g de fezes e colocadas num frasco de 125 mL com etanol a 95% (proporção de 1 para 4) e tomando as medidas necessárias para evitar qualquer contaminação (Nakamura et al. 2017). Até ao seu processamento, as amostras fecais foram mantidas à temperatura ambiente. Cerca de dois terços das amostras (559/843) foram colhidas em percursos sistemáticos ou não sistemáticos, sendo considerada um tipo de colheita aleatória. As amostras do terço restante (284/843) foram colhidas em *rendez-vous*, que correspondem a locais de agregação sazonal de uma alcateia, e nos quais existe grande quantidade de amostras dos lobos que a compõem. A localização das amostras não-invasivas

analisadas e o seu resultado ao PCR para *S. scabiei* encontra-se representado na figura 10 (capítulo 5.4.2.).

#### **4.5.2.2. Extração de DNA**

A extração de DNA de fezes de lobo e posteriores amplificações para certos marcadores moleculares foi realizada, anteriormente, por técnicos de laboratório pertencentes ao CTM do CIBIO. As amostras não-invasivas apresentam uma quantidade de DNA reduzida em comparação com amostras invasivas, e a sua contaminação com outras fontes de DNA pode impossibilitar a sua utilização (Rio-Maior et al. 2008). Tendo isto em conta, as amostras foram manipuladas em instalações próprias (laboratório com ventilação estéril com pressão positiva e luz UV ligada nos intervalos de utilização e câmara de extração de DNA também com luz UV e esterilização do material) e foram tomadas medidas para prevenção de contaminações (técnico especializado e equipado com bata, luvas, touca, máscara e proteção de sapatos) (Rio-Maior et al. 2008). Após a extração, o DNA foi mantido a -20°C.

O protocolo utilizado foi o da Guanidina-Tiocianato/Sílica sendo uma adaptação de Gerloff et al. (1995) no qual se remove a camada exterior do excremento (contém células epiteliais da mucosa intestinal do lobo) e se realizam várias lavagens com o objetivo de obter as células e lisá-las para libertação do DNA, que se liga, de seguida, a partículas de sílica, precipitando por centrifugação. Por fim, realiza-se a purificação do DNA com colunas *Microcon YM-30* (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) (Godinho et al. 2015).

Posteriormente à extração e com o objetivo de identificação de espécie, de género e individual, o DNA de cada amostra foi processado de forma independente para cada tipo de marcadores moleculares: loci DBX e DBY para sexagem, DNA mitocondrial para identificação de espécie e microssatélites autossómicos (quatro reações multiplex utilizando o kit QIAGEN Multiplex PCR) para identificação individual (Rio-Maior et al. 2008; Nakamura et al. 2017). Na análise que se segue só foram utilizadas amostras que se confirmou pertencerem a lobos.

#### **4.5.2.3. Reação em Cadeia da Polimerase**

Tal como para a extração de DNA de amostras não-invasivas, também na preparação do PCR foram utilizadas instalações próprias e medidas de prevenção de contaminação, como o equipamento de proteção individual.

Para a realização das reações de PCR com as amostras não-invasivas, optou-se por amplificar o fragmento de 132 pb do gene mitocondrial 16S rDNA uma vez que fragmentos mais longos são mais difíceis de amplificar quando se lida com DNA de baixa qualidade proveniente de amostras fecais (Beja-Pereira et al. 2009). De forma a reduzir os custos, utilizaram-se quatro fluorescências (M13-tail) diferentes (FAM, VIC, NED e PET), o que

permitiu a realização de um *multiloading* aquando da eletroforese capilar. Assim, foram utilizados o *primer forward* SSUDF e o *primer reverse* SSUDR acima descritos.

Os volumes utilizados na reação de PCR foram também os descritos para as amostras invasivas (gene 16S), à exceção da água (2,16 µL), sendo que para as amostras não-invasivas foi utilizado um volume de DNA de 2,5 µL. Em todas as placas foi incluído um controlo negativo (incluía todos os reagentes exceto o DNA) e um controlo positivo (com volume de DNA entre 2 e 2,5 µL). Tratando-se de amostras não-invasivas, realizaram-se 2 réplicas para cada amostra, aumentando desta forma a probabilidade de amplificação.

A amplificação do DNA foi realizada como descrito para as amostras invasivas (gene 16S). O controlo positivo e o negativo e uma amostra selecionada aleatoriamente foram testados em gel de agarose a 2% (com realização dos mesmos procedimentos e utilização dos mesmos equipamentos descritos para as amostras invasivas). Por fim, os produtos amplificados foram separados por uma eletroforese capilar (com realização dos mesmos procedimentos e utilização dos mesmos equipamentos descritos para as amostras invasivas).

Com base nos resultados obtidos, foram feitas repetições para o gene COX1, com a amplificação de um fragmento de 262 pb deste gene. Foram utilizados o *primer forward* scabF1 e o *primer reverse* scabR2 acima descritos.

Os volumes utilizados na reação de PCR foram os descritos para as amostras invasivas (gene COX1) à exceção da água (2,16 µL). Tal como anteriormente referido, para as amostras não-invasivas utilizou-se um volume de DNA de 2,5 µL e incluídos os controlos positivo e negativo. Tratando-se de amostras não-invasivas, e de um gene que em amplificações anteriores se mostrou mais difícil de amplificar, realizaram-se 3 réplicas para cada amostra. A amplificação do DNA foi realizada como descrito para as amostras invasivas (gene COX1). Tal como para o gene 16S, foi feita a testagem dos controlos por eletroforese em gel de agarose e, para a totalidade das amostras e controlos, a eletroforese capilar.

As amostras foram classificadas como positivas se pelo menos uma das réplicas amplificasse a sequência de DNA pretendida.

#### **4.6. Análise estatística**

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software RStudio 3.6.1 (RStudio Team 2019), com exceção da análise do método molecular não-invasivo através de modelos multi-evento de captura-recaptura (capítulo 4.5.4), que foi realizada nos softwares U-CARE (Choquet, Lebreton, et al. 2009) e E-SURGE (Choquet, Rouan, et al. 2009). Para dados de prevalência bruta, os intervalos de confiança de 95% de Wilson foram estimados usando o package *epitools* (Aragon 2020). Os gráficos foram efetuados em Microsoft Excel para Microsoft 365 (<https://www.microsoft.com/pt-pt/microsoft-365/excel>) e no software RStudio

3.6.1 (RStudio Team 2019). Os mapas foram efetuados no programa QGIS 3.10.0 (QGIS Development Team 2019).

#### **4.6.1. Comparação da atividade diária entre animais com e sem lesões compatíveis com sarna detetados por foto-armadilhas**

Através dos dados de foto-armadilhas, obteve-se um registo da distribuição da atividade dos animais ao longo do dia, sendo que as deteções são mais frequentes quando os animais estão ativos e menos frequentes quando estes estão inativos. Com esta informação, é possível analisar o nível de atividade de uma determinada população amostrada (Rowcliffe et al. 2014). Para tal, utilizou-se a package *Activity* (Rowcliffe 2019). Nesta análise os dados temporais foram convertidos em radianos e foram utilizadas funções *kernel* para dados circulares. Os dados foram analisados de forma separada para lobos e raposas, sendo que cada espécie foi dividida em dois grupos (animais sem LCS e animais com LCS). Foram utilizadas as funções *compareAct* (de forma a comparar a atividade diária dos animais com e sem LCS) *compareCkern* (calcular a probabilidade dos dois grupos de observações (com e sem LCS) terem origem na mesma distribuição) e *compareTimes* (comparar a atividade ao longo do dia - em diferentes horas - dentro do mesmo grupo).

#### **4.6.2. Determinação dos pontos de corte para o método sorológico**

Para a análise dos resultados sorológicos, a informação relativa à presença de LCS aquando do exame externo, ora nas necrópsias (LTE), ora nas capturas (soro) e a observação microscópica de *S. scabiei* em amostras de pele digeridas foram tidas em conta para o cálculo dos pontos de corte. Assim, para cada animal obteve-se o RT e a classificação do exame externo/microscópico. Foi utilizada a package *OptimalCutpoints* (Lopez-Raton et al. 2014) para a determinação do ponto de corte do teste de ELISA, com maximização da especificidade (sp) e sensibilidade (se), tendo sido aplicado de forma independente para as amostras de soro e de LTE. Posteriormente, cada animal foi classificado em seropositivo ou seronegativo consoante os pontos de corte estimados.

#### **4.6.3. Utilização de modelos binomiais mistos lineares generalizados nos métodos sorológico e molecular**

Foram utilizados modelos binomiais mistos lineares generalizados (GLMM), com o objetivo de identificar as variáveis relacionadas com os resultados da sorologia e método molecular não-invasivo e corrigir a influência de eventuais fatores de confusão relacionados com o processo de amostragem. As variáveis independentes analisadas no GLMM da sorologia foram o tipo de amostra (soro e LTE) e a espécie animal (lobo e raposa) como efeitos

fixos, e o ano de recolha da amostra (1997 a 2019) como efeito aleatório. As classes de referência foram estabelecidas com base no tamanho da sua amostra e proporção de positivos: soro e lobo. No GLMM do método molecular não-invasivo, as variáveis independentes analisadas incluíram o tipo de recolha (recolha aleatória e *rendez-vous*) e o sexo dos animais (feminino e masculino) como efeitos fixos, e o ano (2006 a 2018) como efeito aleatório. As classes de referência foram tipo de recolha aleatória e fêmea pelas razões supramencionadas. Nos dois modelos, alguns anos foram agrupados (1997-2003 no GLMM da sorologia e 2006-2008 no GLMM molecular) de forma a atingir um tamanho de amostra adequado (Gráfico 1 e 2).

A partir do GLMM e para se obter a prevalência predita serológica e molecular de sarna em lobos geral e para cada ano e os correspondentes intervalos de confiança de 95% para os efeitos aleatórios, foi utilizada a package *merTools* (Knowles and Frederick 2016). Os valores-*p* foram calculados segundo o método de graus de liberdade de Satterthwaite utilizando a package *lmerTest* (Kuznetsova et al. 2017).

#### **4.6.4. Modelo multi-evento de captura-recaptura aplicado ao método molecular não-invasivo**

Os modelos multi-evento de captura-recaptura (CR) foram aplicados a cerca de metade das amostras não-invasivas (445/843 (53%) correspondendo a 219 lobos individuais entre 2006 e 2018), nas quais estava disponível informação adicional relativa à identificação individual. Para a maioria das amostras (432/445 (97%)) também estava disponível informação relativa ao sexo dos indivíduos.

A história de encontros de um determinado indivíduo pode ser apresentada como dados de CR (Choquet, Rouan, et al. 2009). Estes dados podem, por sua vez, ser analisados através de modelos multi-evento de CR, que consideram estados e observações geradas a partir do estado subjacente de um indivíduo, tendo em conta a incerteza na atribuição do estado e as probabilidades de deteção  $<1$  (Pradel 2005). Os estados (geralmente não observáveis) estão ligados por matrizes probabilísticas a eventos (observáveis) (Pradel 2005). Assim, em cada ocasião de captura, um evento é observado e registado num histórico de encontros. Estes modelos são importantes ferramentas no estudo de doenças infecciosas e parasitárias em animais selvagens, permitindo estimar parâmetros epidemiológicos relacionados com taxas de infeção e sobrevivência (Lachish et al. 2011; Chambert et al. 2012).

Os estados individuais considerados foram: lobos vivos infetados com sarna (S+), lobos vivos não infetados com sarna (S-) e os lobos mortos (M). Numa dada amostragem, um animal pode estar vivo nas classes S+, S- ou pode estar morto. Os eventos considerados foram: lobo genotipado não detetado num determinado ano (0), lobo genotipado detetado com

PCR a *S. scabiei* negativo (1), lobo genotipado detetado com PCR a *S. scabiei* positivo (2) ou lobo genotipado detetado, mas não testado para *S. scabiei* (3).

Os modelos de CR podem ser influenciados por efeitos de transiência, que significa que indivíduos detetados pela primeira vez (“novos indivíduos”) têm uma menor probabilidade de serem detetados de novo no futuro, em comparação com indivíduos que tinham sido detetados anteriormente (“indivíduos antigos”) (Choquet, Lebreton, et al. 2009). Para verificar a existência de efeitos de transiência significativos foi utilizado o programa U-CARE (Choquet, Lebreton, et al. 2009). Dada a atual indisponibilidade de testes *Goodness-Of-Fit* (GOF) para modelos multi-evento, os dados foram convertidos para estados únicos (0 – ausência; 1 – presença). Os testes GOF indicaram efeitos de transiência significativos, com  $p=0,034$ . Na sequência dos resultados dos testes GOF, a transiência foi incluída na matriz de sobrevivência em todos os modelos (Genovart and Pradel 2019). Isto é conseguido através da modelização separada da sobrevivência dos lobos detetados pela primeira vez (idade 1) e dos que foram detetados subsequentemente (idade 2) (Genovart and Pradel 2019).

Os modelos multi-evento foram implementados no programa E-SURGE (Choquet, Rouan, et al. 2009). Inicialmente, os dados são carregados e é especificado o número de estados (3), eventos (4), grupos (3 - fêmea, macho ou sexo desconhecido), classes de idade (2 - primeiro encontro e encontros subsequentes) e covariáveis (1 - seroprevalência). Posteriormente, o procedimento de especificação do modelo consiste em i) implementar a forma estrutural básica das matrizes utilizando a interface GEPAT, ii) definir um modelo linear de cada parâmetro utilizando a interface GEMACO e iii) fixar os valores iniciais dos parâmetros utilizando a interface IVFV. No anexo 1 encontram-se as matrizes utilizadas (Tabela A1), e a parametrização do GEMACO e IVFV para cada modelo (Tabela A2).

O modelo incluía as seguintes matrizes: estado inicial, sobrevivência, transição entre S+ e S- dependente da sobrevivência, deteção, probabilidade de ser testado e incerteza na atribuição do estado. Na interface GEMACO (Choquet 2008), são utilizados atalhos pré-definidos para especificar quais os parâmetros que devem ser tempo-constantemente, tempo-específicos ou estado-específicos (em que, "i" significa constância, "t" significa efeito temporal, "f" significa que os parâmetros não são iguais em cada linha da matriz e "to" significa que os parâmetros não são iguais em cada coluna da matriz). Em seguida definiu-se um conjunto de modelos candidatos incorporando combinações biologicamente relevantes de efeitos sobre a sobrevivência, transição entre estados, probabilidades de deteção e incerteza. A seroprevalência de sarna, para cada ano, predita pelo GLMM e estandardizada, foi incluída como uma covariável temporal para estimar a transição entre os estados não infetado (S-) e infetado (S+). Para os eventos, a probabilidade de deteção no primeiro encontro é 1 porque o histórico do encontro está condicionado à primeira captura e as probabilidades de deteção seguintes dependem do estado e da ocasião temporal. Assim, a formulação para o evento é

"firste+nexte" e na interface IVFV, ao especificar os valores dos parâmetros iniciais, deve-se restringir o valor beta associado à primeira detecção a 1 antes de executar o modelo. A probabilidade de não ser testado para *S. scabiei* foi estabelecida em todos os modelos como sendo igual à proporção de amostras com genotipagem individual que não foram testadas para a detecção de sarna (0,247). Relativamente à incerteza na atribuição do estado, a probabilidade de um lobo não infetado ser testado positivo foi consistentemente estimada como próxima de 0, tendo sido fixada neste valor nos modelos 1-3 e 5 (Anexo 1 - tabela A2). Em relação a outras definições do programa, utilizou-se o cálculo *Hessian* dos intervalos de confiança das estimativas dos parâmetros, EM(20)+Quasi-Newton *nonlinear solver* e 50 valores iniciais aleatórios múltiplos. Para escolher entre modelos e avaliar o efeito da sarna na sobrevivência e a sensibilidade e especificidade do teste de diagnóstico molecular não-invasivo, foram selecionados os modelos com o critério de informação Akaike corrigido para o tamanho da amostra (AICc) mais baixo (Burnham and Anderson 2002).

## 5. Resultados

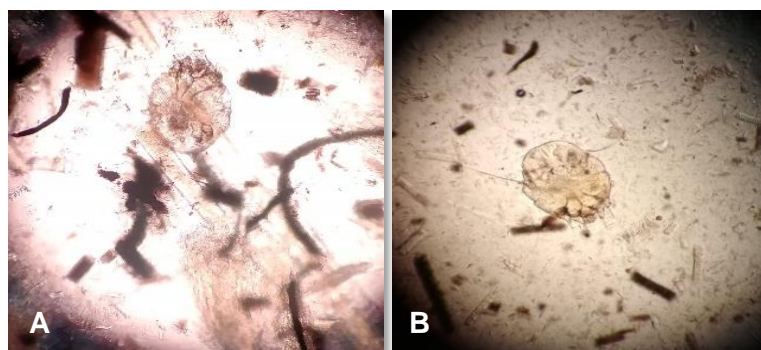
### 5.1. Método de observação direta

As amostras de pele de lobos e raposas, cujo exame externo durante a necrópsia revelou LCS (Figura 1), evidenciaram, em alguns casos, a presença de ácaros *S. scabiei* após a digestão e observação do sedimento ao microscópio (Figura 2).



Legenda: A) Lobo SMLM 132. B) Lobo SMLM 135. C) Lobo SMLM 130.

Figura 1 Aspeto externo de animais necropsiados com LCS

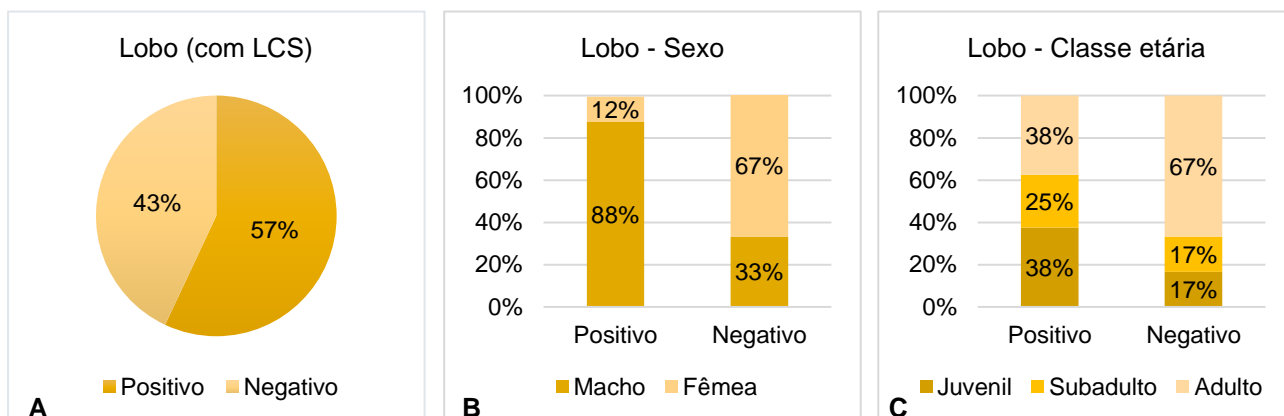


Legenda: A) *S. scabiei* (raposa 18-001); Ampliação de 45x. B) *S. scabiei* (lobo SMLM 135); Ampliação de 34x

Figura 2 Observação de *S. scabiei* ao microscópio após digestão cutânea

No caso dos lobos, em 57% (8/14, IC<sub>95%</sub> 32,6-78,6%) das amostras de pele com LCS, foi possível observar o ácaro *S. scabiei* (Gráfico 3A), sendo que 88% (7/8) dos positivos eram machos e 12% (1/8) fêmeas (Gráfico 3B). Nesta espécie, os positivos eram 38% (3/8) juvenis, 25% (2/8) subadultos e 38% (3/8) adultos (Gráfico 3C). A causa de morte foi atribuída à sarna em um dos animais (7% (1/14)), mas não isoladamente, sendo que nesse caso também se verificou a existência de um traumatismo. Este animal era um macho subadulto (SMLM 135).

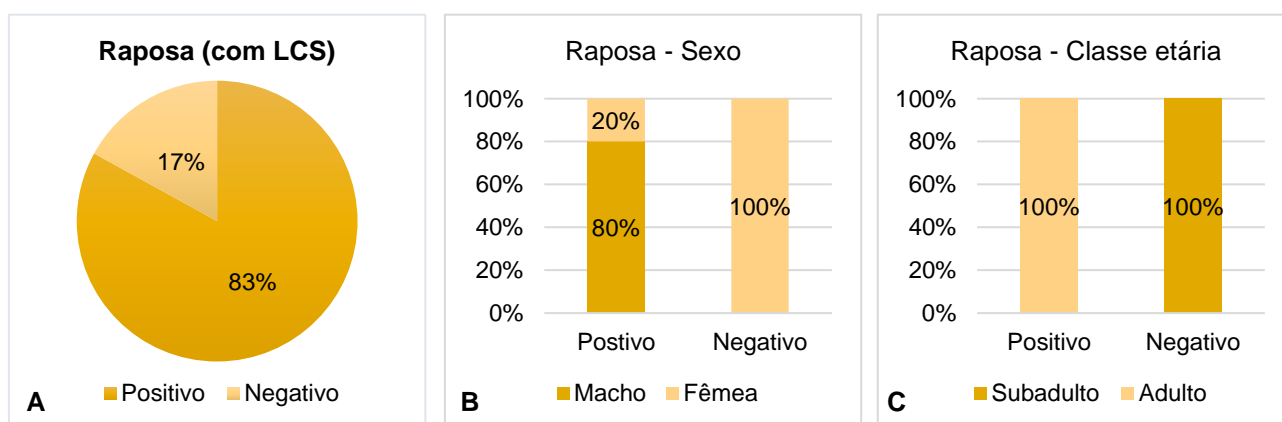
**Gráfico 3 Resultados do exame microscópico em lobos**



**Legenda:** **A)** Percentagem de amostras positivas e negativas à digestão cutânea em lobos com LCS. **B)** Percentagem de amostras positivas e negativas com especificação do sexo dos animais. **C)** Percentagem de amostras positivas e negativas com especificação classe etária.

No caso das raposas, foi possível observar o ácaro *S. scabiei* em 83% (5/6, IC<sub>95%</sub> 43,7-97%) das amostras (Gráfico 4A), sendo que 80% (4/5) dos positivos eram machos e 20% (1/5) fêmeas (Gráfico 4B). Nesta espécie não foram analisados juvenis e os positivos eram 100% (5/5) dos adultos (Gráfico 4C). A causa de morte foi atribuída à sarna em 33% (2/6) das raposas. Estes dois animais eram adultos, uma fêmea (17-0114) e um macho (08-0127).

**Gráfico 4 Resultados do exame microscópico em raposas**

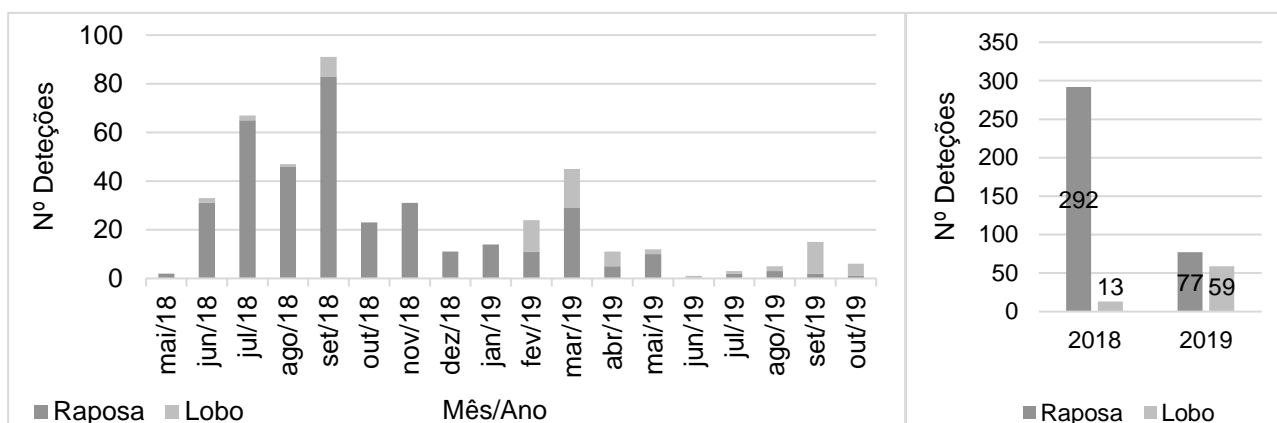


**Legenda:** **A)** Percentagem de amostras positivas e negativas à digestão cutânea em raposas com LCS. **B)** Percentagem de amostras positivas e negativas com especificação do sexo dos animais. **C)** Percentagem de amostras positivas e negativas com especificação da classe etária.

## 5.2. Foto-armadilhas

No total, foram realizadas 518 deteções das espécies-alvo, em que 441 (85%) eram raposas e 77 (15%) lobos. No entanto, em 77/518 deteções não foi possível estabelecer uma classificação relativa à presença de LCS dada a qualidade do vídeo/fotografia ou devido ao aparecimento fugaz do animal. Assim, foram classificadas 441 deteções quanto à presença ou ausência de LCS (e só estes serão considerados na análise seguinte), em que 369 (84%) eram raposas e 72 (16%) eram lobos. A maioria (304/441) destas deteções ocorreram em 2018. Não foram detetadas raposas em junho de 2019 nem lobos em maio, outubro, novembro e dezembro de 2018 e janeiro de 2019 (Gráfico 5). Destes animais classificáveis, 44/441 (10%, IC<sub>95%</sub> 7,5-13,1%) apresentavam LCS, sendo que 33 (75%) eram raposas e 11 (25%) eram lobos.

**Gráfico 5 Distribuição do número de deteções de lobos e raposas por foto-armadilhas entre maio de 2018 e outubro de 2019**



As lesões alopecicas foram observadas na cauda, região dorso-lombar e membros, ou por todo o corpo. Em certos casos, também foi possível observar hiperpigmentação cutânea (Figura 3).



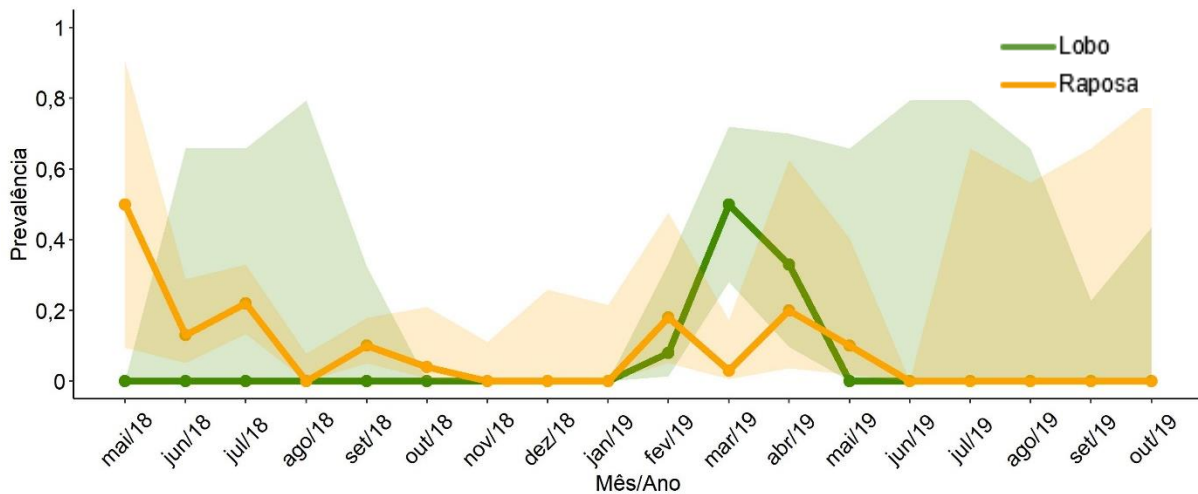
**Legenda:** A) Lobo com alopecia generalizada e hiperpigmentação cutânea. B) Raposa com alopecia na cauda. C) Raposa com alopecia na cauda e região dorso-lombar. **Créditos:** Jorge Costa/CIBIO

**Figura 3 Exemplos de fotografias de animais exibindo LCS, captadas por foto-armadilhas**

Através dos registos de foto-armadilhas, foi calculada a prevalência de alopecia/LCS ao longo de dois anos (2018 e 2019) (Gráfico 6). Esta é definida como o número de animais

detetados com LCS sobre o número total de animais detetados. A prevalência foi calculada de forma independente para raposas e para lobos, sendo que em raposas, a prevalência média de LCS foi de 9% (33/369, IC<sub>95%</sub> 6,4-12,3%) e em lobos de 15% (11/72, IC<sub>95%</sub> 8,8-25,3%). Os meses com maior percentagem de casos positivos foram, no caso das raposas, maio e julho de 2018 (50% (1/2) e 22% (14/65), respetivamente) e fevereiro e abril de 2019 (18% (2/11) e 20% (1/5), respetivamente). No caso dos lobos, os meses com maior percentagem de casos positivos foram março e abril de 2019 (50% (8/16) e 33% (2/6), respetivamente).

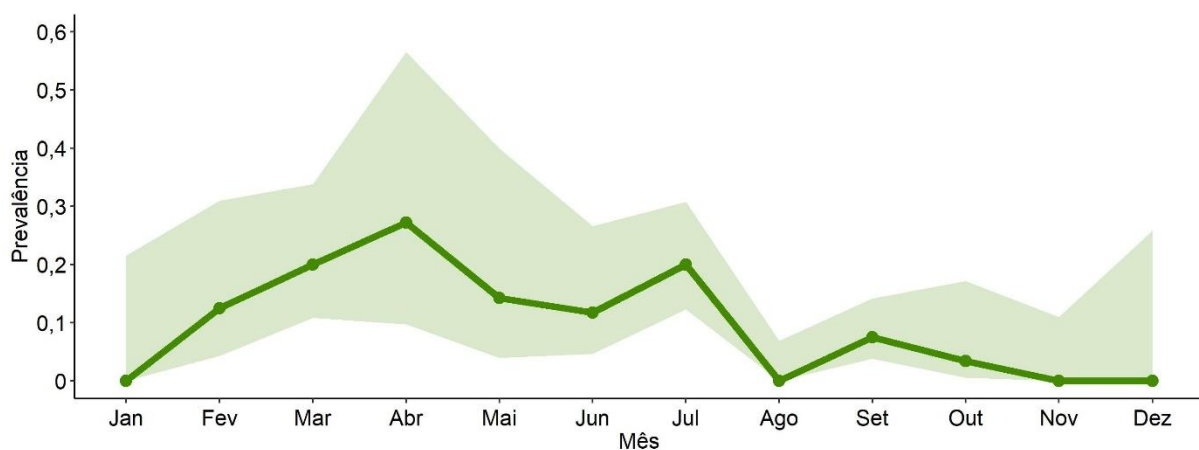
**Gráfico 6 Prevalência de LCS detetadas por armadilhas fotográficas em raposas e lobos durante dois anos consecutivos**



**Legenda:** IC<sub>95%</sub> representado pelo sombreado verde (lobo) e laranja (raposa).

Agrupando as deteções de animais com LCS por mês, a altura do ano onde se verifica um aumento das deteções de animais com LCS vai desde fevereiro a julho, com os meses de março (20% (9/45)), abril (27% (3/11)) e julho (20% (14/70)) a terem a maior percentagem (Gráfico 7).

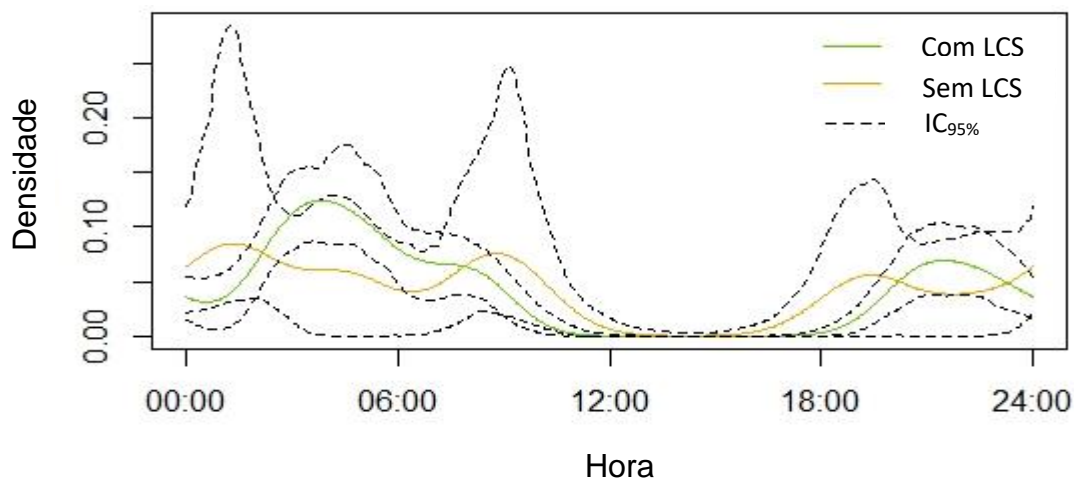
**Gráfico 7 Prevalência de LCS detetadas por armadilhas fotográficas em raposas e lobos por mês**



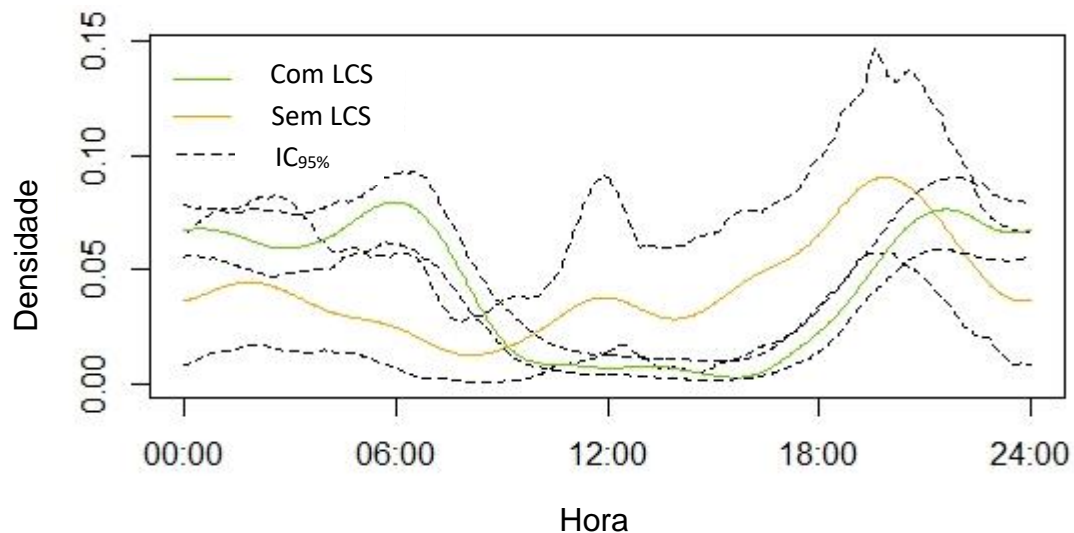
**Legenda:** IC<sub>95%</sub> representado pelo sombreado verde.

No que diz respeito à atividade diária (Gráficos 8 e 9), e segundo a análise estatística realizada, os lobos sem LCS foram menos ativos que os lobos com LCS. Nas raposas, verificou-se o oposto, sendo que as raposas sem LCS foram mais ativas. Nas duas espécies, a diferença não foi significativa ( $p>0,05$ ). Verificou-se ainda uma sobreposição das atividades diárias dos dois grupos, que foi de 67% nos lobos e de 64% nas raposas. No entanto, no caso das raposas observou-se que o padrão de atividade dos dois grupos (com e sem LCS) não pertencem à mesma distribuição ( $p<0,05$ ), ou seja, o seu padrão de atividade é diferente. Paralelamente, pela observação das atividades ao longo do dia, verificou-se que há diferenças significativas ( $p<0,05$ ) para os animais sem LCS em ambas as espécies (Tabela 1).

**Gráfico 9 Distribuição da atividade de lobos com ou sem LCS detetados por armadilhas fotográficas ao longo do dia**



**Gráfico 8 Distribuição da atividade de raposas com ou sem LCS detetadas por armadilhas fotográficas ao longo do dia**



Assim, o padrão de atividade nos lobos é diferente para os alopécicos (uniforme ao longo do dia), e a sua atividade total é maior (ambas as diferenças não são significativas).

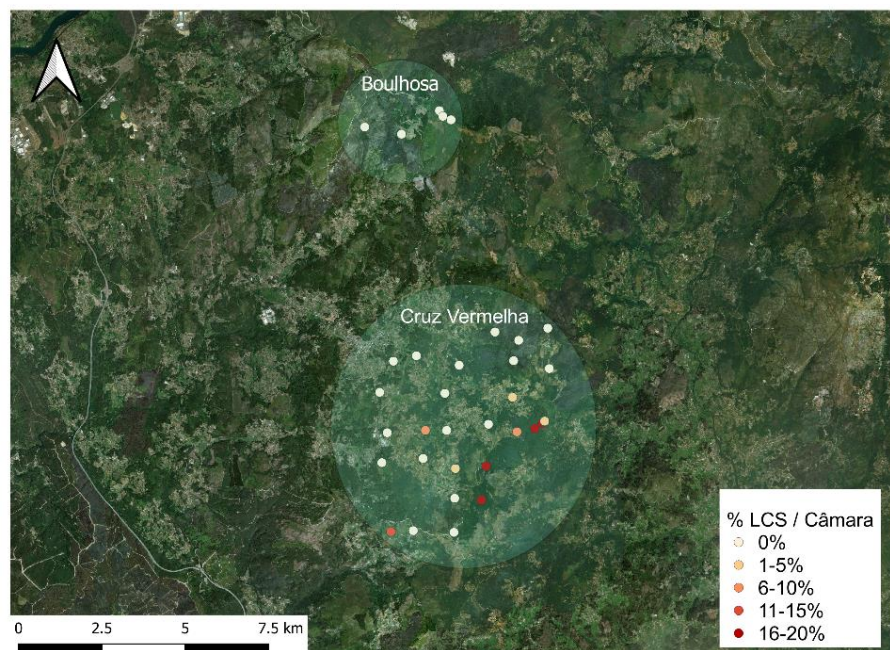
Nas raposas, o padrão de atividade é significativamente diferente para as alopécicas (uniforme ao longo do dia) e a sua atividade total é menor (não significativamente) (Tabela 1).

**Tabela 1 Resultados da análise estatística referente à atividade diária de lobos e raposas detetados por foto-armadilhas**

	Lobos			Raposas		
	Resultado	Erro-padrão	Valor-p	Resultado	Erro-padrão	Valor-p
<b>compareAct</b>						
Sem vs com LCS	-0,16	0,12	0,21	0,06	0,11	0,58
<b>compareCkern</b>						
Sem vs com LCS	0,67	0,07	0,17	0,64	0,04	0,00 *
<b>compareTimes – sem LCS</b>						
0h vs 6h	-0,19	0,07	6,20e-03 *	-0,05	0,04	2,13e-01
0h vs 12h	0,13	0,04	1,65e-03 *	0,23	0,02	0,00 *
0h vs 18h	0,13	0,04	1,46e-03 *	0,21	0,03	1,44e-15 *
6h vs 12h	0,32	0,06	1,02e-08 *	0,27	0,03	0,00 *
6h vs 18h	0,32	0,06	8,59e-09 *	0,25	0,03	9,99e-16 *
12h vs 18h	0,00	0,00	8,25e-01	-0,2	0,02	1,94e-01
<b>compareTimes – com LCS</b>						
0h vs 6h	0,07	0,14	0,63	0,04	0,08	0,62
0h vs 12h	0,19	0,10	0,07	0,00	0,09	0,99
0h vs 18h	0,18	0,11	0,10	-0,07	0,09	0,41
6h vs 12h	0,12	0,11	0,26	-0,04	0,09	0,63
6h vs 18h	0,11	0,11	0,33	-0,11	0,08	0,17
12h vs 18h	-0,01	0,05	0,79	-0,07	0,09	0,44

Legenda: ' \* '  $p < 0,05$ .

No território da alcateia Boulhosa não foram feitas deteções de LCS em nenhuma das câmaras. No território da alcateia da Cruz Vermelha, a percentagem de deteções com LCS em cada câmara variou entre 0 e 20% (Figura 4).



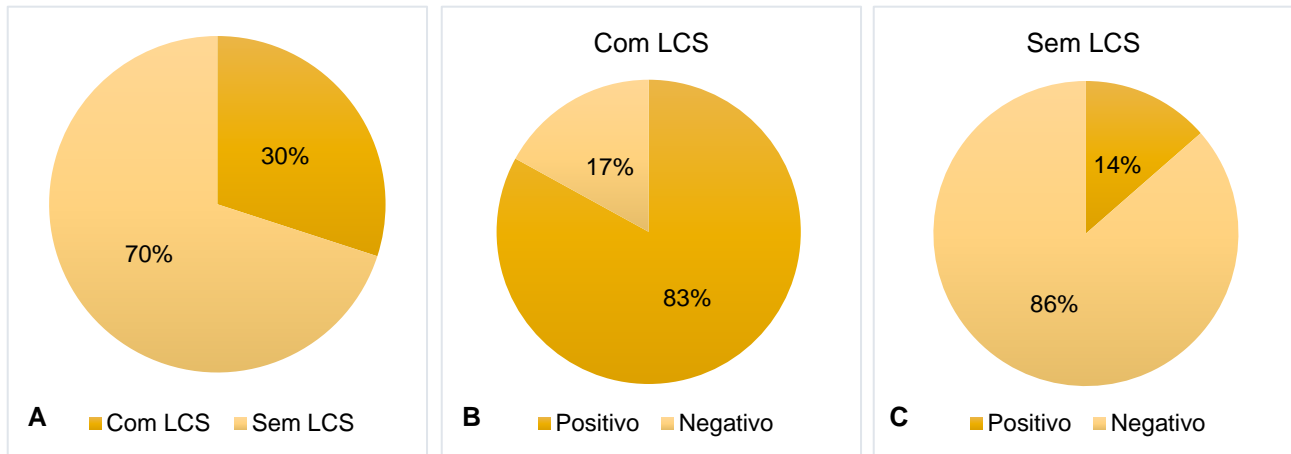
**Figura 4 Representação geográfica da % de LCS por câmara de foto-armadilhas**

### 5.3. Método sorológico

O teste de ELISA foi validado, pois  $DO_{CP}=1,3$  ([0,8 e 2,8]) e  $P=9,1$  ( $<20$ ).

Dos animais cujas amostras foram analisadas sorologicamente, 30% (24/81) apresentavam lesões compatíveis com sarna. Dentro deste grupo, 83% (20/24) foi positivo na sorologia. Por outro lado, 70% (57/81) não apresentava LCS, e dentro deste grupo, 14% (8/57) foi positivo na sorologia (Gráfico 10A, 10B e 10C).

**Gráfico 10 Associação entre presença/ausência de LCS e positividade ou negatividade sorológica**



**Legenda:** **A)** Percentagem de animais com e sem LCS analisados sorologicamente. **B)** Percentagem de amostras positivas e negativas de animais com LCS. **C)** Percentagem de amostras positivas e negativas de animais sem LCS.

Obtiveram-se pontos de corte distintos para os dois tipos de amostra, sendo que para o soro este foi de 558 ( $sp=78,9\%$ ,  $IC_{95\%}$  54,4-93,9%;  $se=87,5\%$ ,  $IC_{95\%}$  47,3-99,7%) e para o LTE foi de 126 ( $sp=89,5\%$ ,  $IC_{95\%}$  75,2-97,1%;  $se=87,5\%$ ,  $IC_{95\%}$  61,7-98,4%). A área sob a curva ROC (AUC) foi estimada em 84,2% ( $IC_{95\%}$  69,2-99,2%) para o soro e 90,5% ( $IC_{95\%}$  81,7-99,2%) para o LTE. Os animais foram considerados positivos ou negativos consoante o seu RT foi superior ou inferior, respetivamente, ao ponto de corte estabelecido para o tipo de amostra em questão.

No total, 21/61 (34,4%,  $IC_{95\%}$  23,8-47%) lobos e 7/20 (35%,  $IC_{95\%}$  18,1-56,7%) raposas foram positivos na sorologia.

Dada a grande variabilidade dos dados, foi necessário corrigir o efeito dos diferentes fatores de enviesamento na obtenção da estimativa da prevalência. Assim, o GLMM permite indicar quais os fatores (espécie, amostra e/ou ano) que estão relacionados com a seroprevalência e obter uma estimativa desta última para cada ano (1997-2019), tendo em linha de conta a informação das duas espécies (raposa e lobo) e dos dois tipos de amostra (soro e LTE).

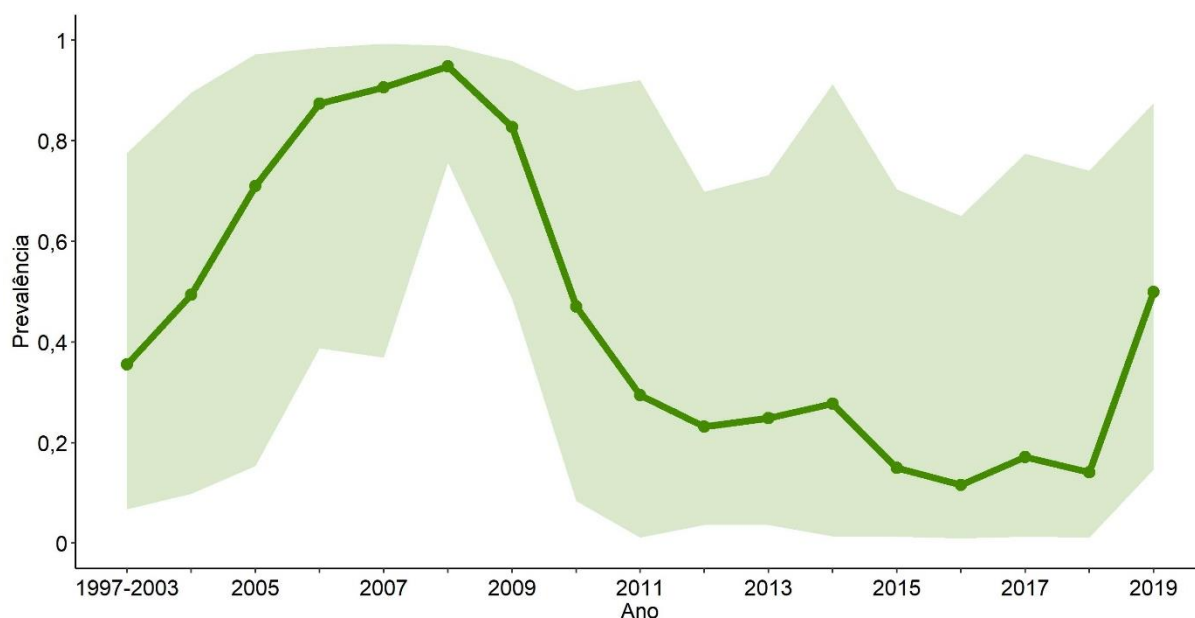
O GLMM demonstrou uma tendência não-significativa para uma menor seroprevalência nas raposas comparativamente aos lobos ( $p=0,085$ ) e uma menor proporção de amostras LTE positivas comparativamente ao soro ( $p=0,277$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2 Resultados do GLMM dos dados serológicos em lobos e raposas**

Variável	Estimativa	Erro-padrão	Valor $p$
<u>Efeitos fixos</u>			
Intercept	-0,357	0,796	0,654
Tipo de amostra			
LTE	-0,848	0,781	0,277
Espécie			
Raposa	-1,667	0,966	0,085
<u>Efeito aleatório</u>			
Variância		3,957	
Desvio-padrão		1,989	
N anos		17	
N amostras		80	

A seroprevalência geral de sarna sarcóptica estimada pelo GLMM entre 1997 e 2019 foi de 45,4% (IC<sub>95%</sub> 30,3-60,5%). A seroprevalência predita em lobos variou entre 11,6% (IC<sub>95%</sub> 1,0-65,1%) em 2016 e 94,8% (IC<sub>95%</sub> 75,7-98,9%) em 2008 e demonstra a existência de um pico entre 2006 e 2009 (Gráfico 11).

**Gráfico 11 Seroprevalência predita de sarna em lobos, utilizando soro como amostra, de 1997 a 2019**

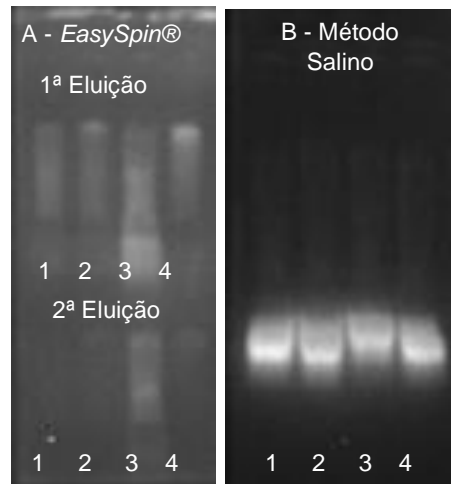


**Legenda:** IC<sub>95%</sub> representado pelo sombreado verde.

## 5.4. Métodos moleculares

### 5.4.1. Extração de DNA e PCR de amostras invasivas

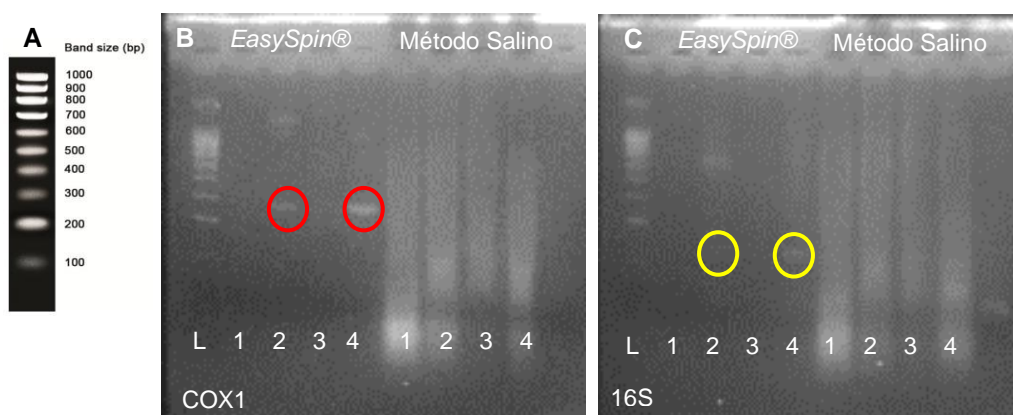
De forma a confirmar o sucesso da extração de DNA, pelos dois métodos utilizados, da amostra de pele (raposa 18-001), realizou-se uma corrida por eletroforese em gel a 0,8% com verificação da presença de DNA total (Figura 5).



Legenda: A) *EasySpin®* com 1ª e 2ª eluição. B) Método Salino. 1,2,3,4 – Réplicas.

**Figura 5 Resultado da observação do gel de eletroforese (a 0,8%) com avaliação do DNA total extraído por dois métodos diferentes**

Posteriormente, realizaram-se duas reações de PCR. A primeira com amplificação de um fragmento de 262 pb do gene COX1 de *S. scabiei* e a segunda com amplificação de um fragmento de 132 pb do gene mitocondrial 16S rDNA de *S. scabiei*, com realização de 8 réplicas para cada gene (4 com o DNA do *kit EasySpin®* e 4 do método salino). Pelo *kit EasySpin®* houve detecção de bandas de interesse por observação do gel de eletroforese (para ambos os genes), enquanto que para o método salino estas bandas não foram detetadas. Na figura 6 encontram-se os resultados das eletroforeses em gel.

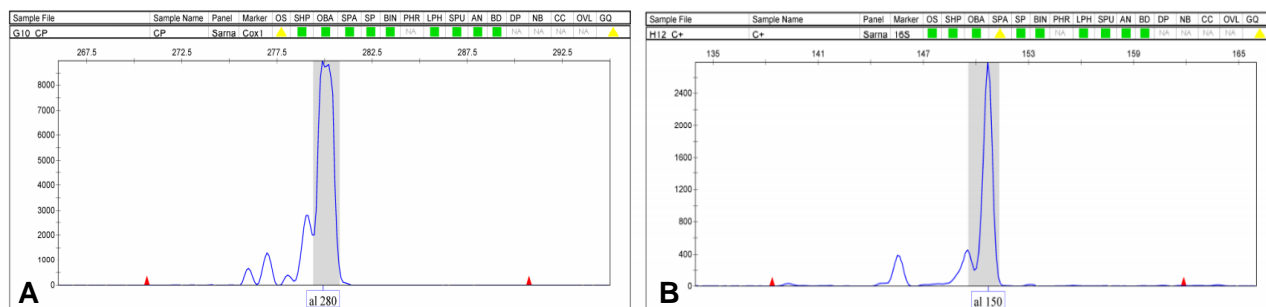


Legenda: A) Marcador de pesos moleculares NZYDNA ladder V. B) COX1. C) 16S. L – Marcador de pesos moleculares NZYDNA ladder V. 1, 2, 3, 4 – Réplicas. **Círculo vermelho** – Fragmento de 280 pb do gene COX1. **Círculo amarelo** – Fragmento de 150 pb do gene 16S.

**Figura 6 Resultado da observação do gel de eletroforese do controlo positivo (raposa 18-001) para os dois métodos de extração e para os dois genes**

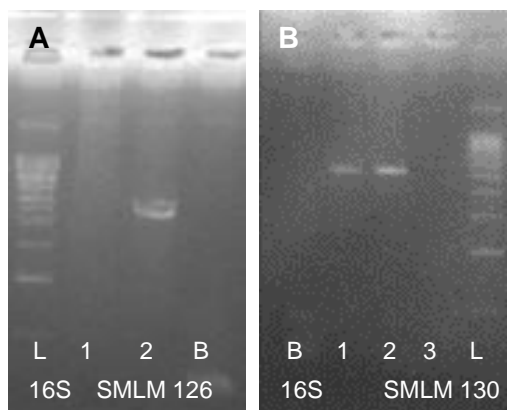
De forma a determinar o tamanho exato em pares de base, realizou-se uma eletroforese capilar (com utilização dos produtos de PCR correspondentes ao DNA extraído pelo *kit EasySpin®*). O tamanho em pb do fragmento amplificado varia consoante a fluorescência utilizada (FAM, VIC, NED ou PET). Neste caso, foi utilizada a fluorescência FAM (18 pb) pelo que o tamanho do fragmento amplificado foi de 280 pb (280-18=262 pb) para o gene COX1 e 150 pb (150-18=132 pb) para o gene 16S (Figura 7).

**Figura 7 Resultado da eletroforese capilar do controlo positivo (raposa 18-001) para os dois genes**



**Legenda: A)** Fragmento de 262 (280-18) pb do gene COX1. **B)** Fragmento de 132 (150-18) pb do gene 16S.

Relativamente aos lobos SMLM 126 e SMLM 130, o resultado do PCR, confirmado por eletroforese em gel de agarose, foi negativo para ambos (Figura 8).



**Legenda: A)** SMLM 126. **B)** SMLM 130. **L** – Marcador de pesos moleculares NZYDNA *ladder* V. 1, 2, 3 – Réplicas. **B** – Controlo negativo

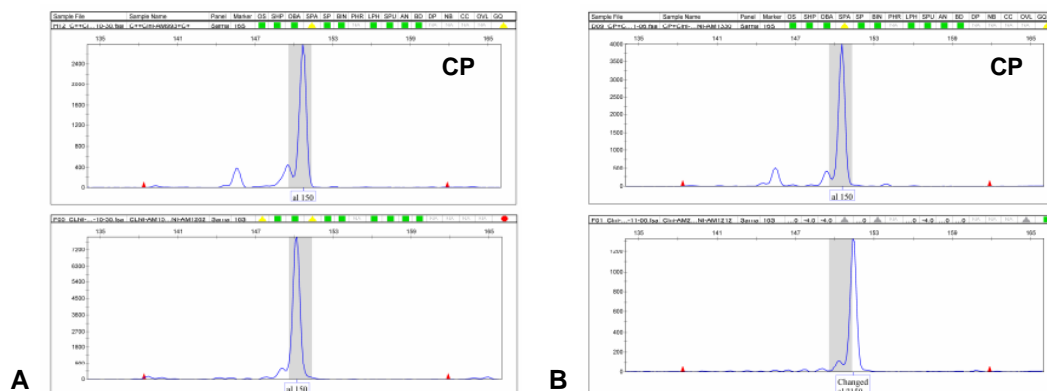
**Figura 8 Resultado da observação do gel de eletroforese dos lobos SMLM 126 e SMLM 130 para o gene 16S**

#### 5.4.2. PCR de amostras não-invasivas

Para as amostras não-invasivas optou-se por utilizar os *primers* relativos ao gene 16S de *S. scabiei*, pois tendo um tamanho em pares de base inferior, seria mais facilmente distinguido de fragmentos inespecíficos eventualmente amplificados e com tamanhos superiores.

Obtiveram-se 39/843 amostras não-invasivas positivas. No entanto, noutras 32/843 amostras, o fragmento amplificado tinha um tamanho 1-2 pb inferior ou superior ao controlo positivo. Observando o formato das curvas de deteção (Figura 9), há semelhanças entre as

curvas correspondentes a amostras positivas e as curvas correspondentes a amostras com um fragmento amplificado com tamanho 1-2 pb de diferença do controlo positivo. Tais diferenças deverão ser o resultado de polimorfismos (inserções ou supressões) nas regiões hipervariáveis do gene 16S rDNA.



**Legenda:** A) Amostra positiva. B) Amostra positiva cujo fragmento amplificado apresentou um tamanho 1-2 pb diferente do controlo positivo. CP – Controlo positivo.

**Figura 9** Resultado da eletroforese capilar de uma amostra positiva e de uma amostra positiva com um fragmento amplificado com tamanho 1-2 pb de diferença do controlo positivo

Assim, 71 amostras foram classificadas como positivas ao DNA de *S. scabiei*. Em 48 das 71 (68%) amostras, os resultados foram concordantes entre réplicas. A estas 71 amostras com resultado positivo foi, ainda, realizado um segundo PCR, com os *primers* para o gene COX1 de *S. scabiei*. Nesse caso apenas se obtiveram 6/71 amostras positivas.

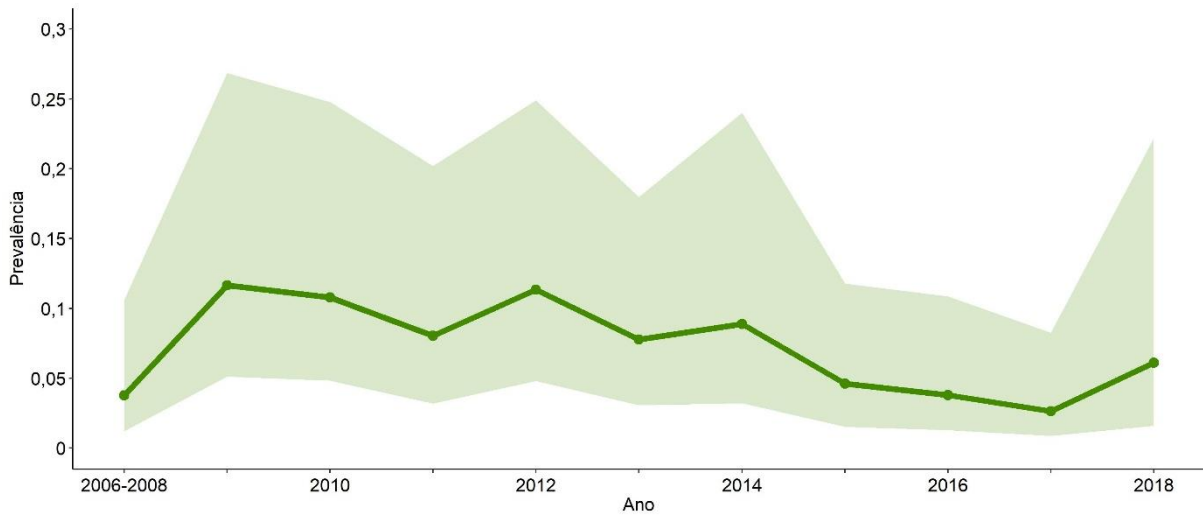
Dada a grande variabilidade dos dados, foi necessário avaliar o efeito dos diferentes fatores de enviesamento na obtenção da estimativa da prevalência. Assim, o GLMM permite indicar quais os fatores (tipo de colheita, sexo e/ou ano) que estão relacionados com a prevalência e obter uma estimativa desta última para cada ano (2006-2018), tendo em linha de conta a informação dos dois tipos de colheita de amostra (aleatória ou *rendez-vous*) e do sexo dos animais (fêmea ou macho). O GLMM demonstrou que o tipo de recolha não teve um efeito significativo ( $p=0,471$ ) e que não houve diferenças entre sexos ( $p=0,405$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3** Resultado do GLMM dos dados moleculares não-invasivos de lobos

Variável	Estimativa	Erro-padrão	Valor <i>p</i>
<u>Efeitos fixos</u>			
Intercept	-2,710	0,399	<0,001
Sexo			
Masculino	0,309	0,371	0,405
Tipo de recolha			
<i>Rendez-vous</i>	-0,317	0,440	0,471
<u>Efeito aleatório</u>			
Variância		0,519	
Desvio-padrão		0,721	
N anos		11	
N amostras		442	

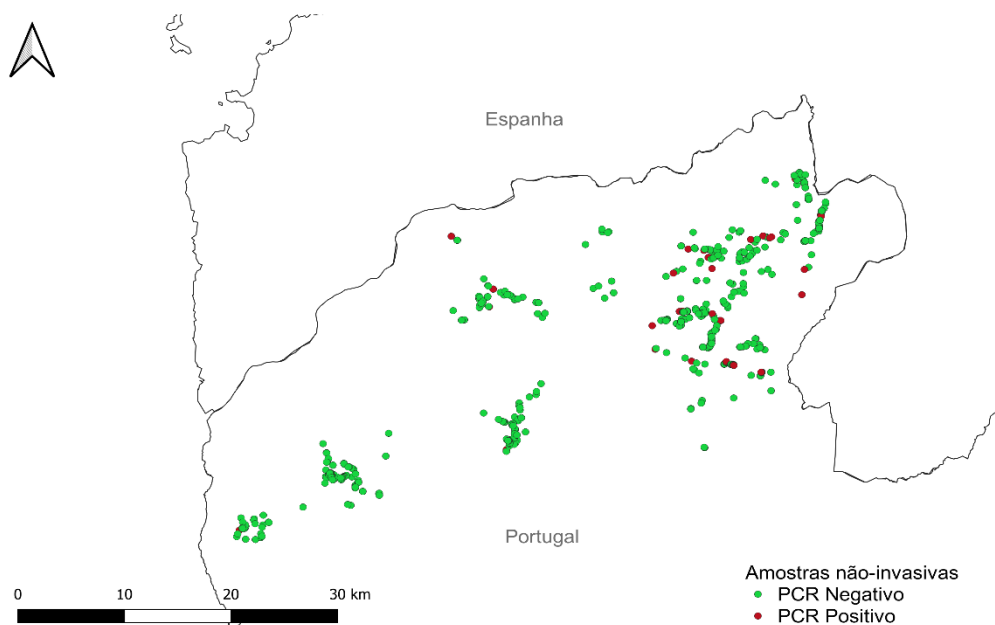
A prevalência geral de sarna sarcóptica em lobos através das amostras fecais não-invasivas de 2006 a 2018, estimada pelo GLMM, foi de 7,2% (IC<sub>95%</sub> 5,0-9,4%). A prevalência predita foi superior em 2009 (11,7%, IC<sub>95%</sub> 5,1-26,9%) e inferior em 2017 (2,6% IC<sub>95%</sub> 0,9-8,3%), indo ao encontro dos resultados obtidos pelo GLMM da sorologia (Gráfico 12).

**Gráfico 12 Prevalência predita de sarna por métodos moleculares com amostras não-invasivas recolhidas aleatoriamente de 2006 a 2018**



**Legenda:** IC<sub>95%</sub> representado pelo sombreado verde.

Na figura 10 podem observar-se os vários locais correspondentes à colheita das amostras não-invasivas analisadas e o resultado do respetivo PCR.



**Figura 10 Representação geográfica do resultado molecular das amostras não-invasivas**

### **5.4.3. Modelo multi-evento de captura-recaptura aplicado ao método molecular não-invasivo**

No melhor modelo, 25/50 cadeias globais convergiram para o mínimo e o AICc foi de 1114,40 (Anexo 1 - tabela A2). Este modelo considerou não existir diferença na mortalidade entre lobos infetados e lobos não infetados com sarna e estimou que 34,0% (IC<sub>95%</sub> 15,9-58,4%) dos lobos infetados testaram positivo, o que corresponde à sensibilidade do método de diagnóstico molecular não-invasivo. Estimou também que 100% dos lobos não infetados testaram negativo, o que corresponde à especificidade do método de diagnóstico molecular não-invasivo. Esta última estimativa foi consistente entre modelos, mesmo naqueles em que este parâmetro foi estimado em vez de fixado (Modelo 4, anexo 1 - tabela A2).

Apesar do melhor modelo não incluir o efeito da sarna sarcóptica na sobrevivência, o segundo melhor modelo ( $\Delta$ AICc=0,48, modelo 2, anexo 1 - tabela A2) inclui esse efeito, tendo estimado uma mortalidade 18,4% (IC<sub>95%</sub> -15,2-49,6%) mais elevada nos lobos individualmente identificados infetados com sarna, em comparação aos lobos não-infetados. Além disso, o terceiro melhor modelo ( $\Delta$ AICc=1,47, modelo 3, anexo 1 - tabela A2) apoia a existência de um efeito diferencial da sarna sarcóptica na sobrevivência entre os dois sexos, tendo estimado uma mortalidade 19,6% (IC<sub>95%</sub> -35,5-64,5%) mais elevada nos lobos machos individualmente identificados infetados do que nas fêmeas infetadas.

## **6. Discussão**

### **6.1. Método de observação direta**

O exame microscópico revelou-se pouco sensível no caso dos lobos, uma vez que em apenas 57% (8/14, IC<sub>95%</sub> 32,6-78,6%) das amostras de pele com LCS foi possível identificar o ácaro *S. scabiei*. Por outro lado, nas raposas, em 83% (5/6, IC<sub>95%</sub> 43,7-97%) das amostras com LCS, o ácaro foi identificado. Tal diferença pode ser explicada por diferentes evoluções da doença nas duas espécies, sendo que os lobos podem controlar melhor a doença, tendo dessa forma, menor carga parasitária comparativamente às raposas, cuja doença evolui, frequentemente, para a forma hiperqueratótica, com elevada carga parasitária (Oleaga et al. 2012; Martinez et al. 2020), e por outros fatores como a apresentação clínica, a amostra colhida e a experiência do operador (Walton and Currie 2007). Relativamente à apresentação clínica, à medida que a reação de hipersensibilidade progride, a carga parasitária diminui, sendo que em animais com lesões essencialmente alopecicas (forma de apresentação mais comum em lobos e forma característica da fase de recuperação) o número de ácaros isolados é inferior (Pence and Ueckermann 2002; Nimmervoll et al. 2013; Martinez et al. 2020).

Em ambas as espécies, a maioria das amostras positivas pertenciam a machos (88% nos lobos e 80% nas raposas). Estes podem passar mais tempo a explorar fora da sua área

vital e dispersar mais que as fêmeas, assim como dispersar para zonas mais distantes, o que pode implicar um maior contacto com outros animais, e dessa forma, mais possibilidades de se infetarem (Pence et al. 1983; Macdonald and Reynolds 2004; Pimenta et al. 2005).

A sarna foi a causa de morte em 33% (2/6) das raposas submetidas a necrópsia, sendo que nesta espécie a doença pode frequentemente revelar-se fatal, tendo os animais afetados um tempo de sobrevivência 5 vezes inferior comparativamente a animais saudáveis (Newman et al. 2002; Bowman 2014). Nos lobos, a sarna contribuiu para a causa de morte em apenas um dos animais submetidos a necrópsia (7% (1/14)). É, no entanto, importante referir que apesar da sarna não ter sido atribuída nos restantes animais como a causa de morte, esta é uma doença debilitante, que origina uma “cascata” de impactos no animal, dos quais fraqueza e subnutrição (Skerratt et al. 1999; Martin, Fraser, et al. 2018), e eventualmente maior aproximação a povoações humanas, e aumento da atividade durante horas diurnas, de forma a obter alimento (Borchard et al. 2012; Murray et al. 2015; Carricondo-Sanchez et al. 2017). Estas alterações comportamentais podem levar a um maior conflito com o Homem e assim ocorrerem mais mortes por causas antropogénicas, tais como atropelamentos, tiro, laço e envenenamentos.

## **6.2. Foto-armadilhas**

As foto-armadilhas destacam-se pelo seu carácter não-invasivo, por não ser um método enviesado (ao contrário de outros métodos que envolvem a captura dos animais e nos quais os animais afetados podem mais facilmente ser capturados) e pela possibilidade de tirar conclusões sobre a doença ao longo do tempo e em diferentes lugares e sobre o estilo de vida dos animais afetados (Oleaga et al. 2011; Carricondo-Sanchez et al. 2017). No entanto, oferece apenas informação sobre a existência de LCS, não havendo uma confirmação laboratorial da doença, e os casos iniciais passam, provavelmente, despercebidos (Brewster et al. 2017; Niedringhaus, Brown, Sweeley, et al. 2019). Neste estudo, os animais foram classificados unicamente quanto à presença de alopecia, sendo que esta foi observada principalmente na região posterior do corpo, e em alguns casos de forma mais generalizada. Pela observação de vídeos e fotografias de armadilhas fotográficas, obteve-se uma prevalência média de LCS de 15% (11/72, IC<sub>95%</sub> 8,8-25,3%) nos lobos e 9% (33/369, IC<sub>95%</sub> 6,4-12,3%) nas raposas, para os anos de 2018 e 2019.

Pode observar-se uma diferença de aproximadamente um ano entre o primeiro pico de LCS em raposas (maio a julho de 2018) e o pico de LCS em lobos (março a abril de 2019), e uma sobreposição deste último com o segundo pico de LCS das raposas (fevereiro a abril de 2019). Deve referir-se, no entanto, que entre maio e julho de 2018 (primeiro pico de LCS em raposas) são poucas as deteções de lobos. De forma semelhante, no estudo de Oleaga et al. (2011), com análise de dados de foto-armadilhas, observou-se um atraso de um ano

entre as detecções de LCS em raposas e em lobos. A raposa, poderá então ser a espécie que mantém a doença e a transmite para outras espécies, sendo que esta hipótese já foi colocada noutros estudos (Oleaga et al. 2011; Rentería-Solís et al. 2014). Davidson et al. (2008) sugere a possibilidade de as raposas serem um reservatório de *S. scabiei* com a existência de infecções subclínicas ou de baixo grau e a recuperação de alguns animais.

A maioria das detecções de animais com LCS ocorreu entre os meses de fevereiro e julho, com os principais picos nos meses de março (20% (9/45)), abril (27% (3/11)) e julho (20% (14/70)). Verificou-se, portanto, alguma sazonalidade da doença, sendo que se verificaram mais animais com LCS no final do Inverno, durante a Primavera e no início do Verão. A escassez de alimento durante o inverno torna esta estação uma época de maior stress ambiental, o que pode aumentar a prevalência de sarna (Almberg et al. 2015). Os meses de Inverno (tempo frio e ventoso) podem ser particularmente difíceis para animais afetados por sarna pois têm gastos energéticos acrescidos e a alopecia compromete a sua capacidade termorreguladora (Cross et al. 2016). Também no Inverno, ocorre o fenómeno de dispersão e a alcateia apresenta um número mínimo de indivíduos (Pimenta et al. 2005), o que pode diminuir o efeito protetor da alcateia (aquisição de alimento e defesa de território) (Almberg et al. 2015). Por outro lado, a maior prevalência durante a Primavera e início do Verão pode estar relacionada com o maior tempo de sobrevivência do ácaro no exterior (até 19 dias com temperaturas de 10 a 15°C e elevada HR) (Arlian and Morgan 2017) possibilitando a transmissão indireta entre indivíduos da mesma espécie ou de espécies diferentes por partilha de tocas/esconderijos (Kołodziej-Sobocińska et al. 2014; Montecino-Latorre et al. 2019). Paralelamente à transmissão indireta, a transmissão direta poderá ser facilitada durante os períodos de acasalamento (com transmissão entre os machos e as fêmeas ou entre machos durante eventuais lutas) e de nascimento das crias (com transmissão dos progenitores ou outros animais do grupo para as crias/juvenis), períodos estes que ocorrem, quer em lobos, quer em raposas, do final do Inverno até ao início do Verão (Fthenakis et al. 2001; Smith 2002; Fox 2007). No estudo de Pérez et al. (2017) em cabras-montesas, foi sugerida a existência de alguma sincronização entre os ciclos reprodutivos do hospedeiro e do ácaro, sendo este último beneficiado pela imunossupressão associada à gravidez. É também proposta a possibilidade de as ninfas terem um papel importante na transmissão vertical de sarna aquando do nascimento das crias.

Os carnívoros selvagens são ativos essencialmente durante a noite (Smith 2002; Fox 2007). No entanto, a sarna induz alterações comportamentais nos animais afetados, podendo ocorrer uma alteração deste padrão, com os animais a tornarem-se mais diurnos (Borchard et al. 2012). No presente estudo, verificou-se que o padrão de atividade foi diferente nos animais alopecicos, tendo sido uniforme ao longo dia, ao contrário do padrão de atividade dos animais não alopecicos. No caso das raposas, a diferença foi significativa. No caso dos lobos,

não significativa, o que pode estar relacionado com o pequeno tamanho da amostra. Esta alteração no padrão de atividade pode estar associada com a opção dos animais com sarna se movimentarem em horas mais quentes do dia, dada a termorregulação estar comprometida e pela necessidade contínua de procura de alimento de forma a satisfazerem as elevadas necessidades energéticas (Borchard et al. 2012; Murray et al. 2015; Cross et al. 2016). Pode também ser explicada pela incapacidade de descansarem por longos períodos de tempo devido ao prurido constante ou resultar de um mecanismo de segregação temporal, pela incapacidade de competirem com os animais saudáveis durante a noite (Borchard et al. 2012; Murray et al. 2015; Martin, Fraser, et al. 2018).

O aumento das necessidades energéticas atribuídas à sarna, pode ser compensado por um aumento das taxas de consumo ou pela diminuição de outras necessidades energéticas (Cross et al. 2016). A atividade total foi maior nos lobos com LCS e menor nas raposas com LCS (não significativamente), em comparação com os animais sem LCS da mesma espécie. Poderíamos esperar o contrário, já que os lobos são uma espécie que vive em comunidade, pelo que poderiam ter um maior suporte da sua alcateia (Almberg et al. 2015), e as raposas uma espécie mais solitária, e assim necessitarem de despender mais tempo à procura de alimento. No entanto, as raposas são afetadas por sarna sarcóptica de uma forma mais exuberante e, mais frequentemente, desenvolvem doença grave (Bowman 2014), pelo que podem, desta forma, tornar-se menos ativas. Por outro lado, também está reportado que lobos com sarna podem abandonar a sua alcateia (Jimenez, Bangs, Sime, et al. 2010), o que poderá, por sua vez, levar a um aumento da sua atividade à procura de alimento e de um território para se fixarem.

### **6.3. Método sorológico**

Para deteção de anticorpos contra *S. scabiei* em lobos e raposas foi aplicado um *kit* comercial de ELISA para cães, uma vez que a existência de moléculas antigénicas semelhantes entre diferentes variedades de *S. scabiei* torna possível a deteção de anticorpos contra o ácaro, utilizando um ELISA baseado na variante de outro hospedeiro (Lower et al. 2001; Arlian and Morgan 2017; Peltier et al. 2018). Apesar de no *kit* comercial utilizado, a solução do conjugado conter anticorpos anti-cão, foi possível detetar anticorpos contra *S. scabiei* nas amostras de raposa e lobo, tal como verificado noutros estudos em carnívoros selvagens (Bornstein et al. 2006; Peltier et al. 2018).

Pelo facto de a concentração de anticorpos ser 1 a 3 vezes menor no LTE comparativamente ao soro (Ferroglio et al. 2000), realizou-se uma menor diluição nas amostras de LTE (1:50) relativamente às amostras de soro (1:100) e o ponto de corte do teste de ELISA foi calculado de forma independente para cada tipo de amostra.

Em 4/24 (17%) dos animais que apresentavam LCS quando observados durante necrópsia ou captura, não foram detetados anticorpos contra *S. scabiei*. Tal facto pode corresponder a animais em fases iniciais da doença, uma vez que se verifica um atraso da resposta humoral, com a seroconversão a ocorrer 2 a 5 semanas após infeção, havendo tempo para se formarem as primeiras lesões de sarna (Bornstein and Zakrisson 1993; Bornstein et al. 1995). Além disso, e apesar da sarna sarcóptica ser a doença cutânea, causada por um ectoparasita, com maior significado em lobos e raposas (Soulsbury et al. 2007; Oleaga et al. 2011), também se poderá pensar noutros diagnósticos diferenciais, tais como pediculose causada pelo piolho mordedor *Trichodectes canis* (Jimenez, Bangs, Drew, et al. 2010) e sarna demodécica causada pelo ácaro *Demodex canis* (Elston CA and Elston DM 2014). Por outro lado, em 8/57 (14%) dos animais que não apresentavam LCS no exame externo, foram detetados anticorpos contra *S. scabiei*. Neste caso, pode dever-se a indivíduos na fase de recuperação da doença, sendo que há persistência dos anticorpos (até 4,5 meses após tratamento, em cães) apesar da resolução das lesões (Lower et al. 2001), ou, eventualmente, a não deteção de lesões aquando do exame externo (por exemplo, em animais com pelagem de Inverno e lesões dificilmente visíveis) ou falsos positivos por contaminação laboratorial. De facto, os testes sorológicos aplicados a amostras de campo de animais selvagens estão longe de ser perfeitos, como demonstrado pela precisão de diagnóstico estimada em 84,2% (IC<sub>95%</sub> 69,2-99,2%) para o soro e 90,5% (IC<sub>95%</sub> 81,7-99,2%) para o LTE. No entanto, num estudo de sarna sarcóptica em raposas, o teste sorológico apresentou um melhor desempenho (Bornstein et al. 2006). A natureza multiespécie (lobo e raposa) e o tamanho limitado do conjunto de dados do presente estudo, pode ter afetado o desempenho da sorologia.

Com base no GLMM, a seroprevalência predita média de sarna foi de 45,4% (IC<sub>95%</sub> 30,3-60,5%). Verificou-se um pico em 2006-2009, com o valor máximo no ano 2008 (94,8%, IC<sub>95%</sub> 75,7-98,9%). Os resultados das amostras de 1997 a 2010 já haviam sido incorporados noutros estudos, tendo sido revelada a presença de uma epizootia de sarna sarcóptica em lobos e raposas nos anos de 2007 e 2008, localizada geográfica e temporalmente e ocorrendo nos outros anos de uma forma enzoótica (Santos et al. 2012). Curiosamente, nas Astúrias (norte de Espanha e a aproximadamente 200 km da presente área de estudo), foi também verificado um pico de sarna em lobos em 2007-2008 e, na região oeste, uma seroprevalência global entre 2004 e 2008 de 35% (IC<sub>95%</sub> 15,4-59,2%) (Oleaga et al. 2011). Em contrapartida, a seroprevalência global reportada nos lobos da Escandinávia entre 1998 e 2013 foi inferior (10,1%, IC<sub>95%</sub> 6,4-15,1%) à da Península Ibérica (Fuchs et al. 2016). Fuchs et al. (2016) considerou que tal diferença pode estar relacionada com a existência, na Península Ibérica, de densidades de animais selvagens mais elevadas e um maior contacto dos lobos com animais domésticos.

#### **6.4. Método molecular não-invasivo e modelos multi-evento de captura-recaptura**

O prurido característico da sarna sarcóptica faz com que os animais afetados se automitalem com as unhas ou dentes (Pence and Ueckermann 2002). Nos carnívoros, o comportamento de *grooming* aumenta nos animais com sarna (com aparecimento de pelos nas fezes, inclusivamente) o que possibilita a ingestão dos ácaros, com posterior excreção fecal (Samuel 1981; Stephenson et al. 2013). Assim, torna-se possível a amplificação e detecção de DNA do ácaro através da técnica de PCR, com utilização de amostras fecais (Stephenson et al. 2013). Do conhecimento do autor, o presente estudo é o primeiro a detetar, com sucesso, DNA de *S. scabiei* através de métodos moleculares não-invasivos.

Esta técnica permite detetar *S. scabiei* de uma forma não-invasiva (evitando a captura e imobilização de espécies selvagens, o que requer tempo e recursos consideráveis e acarreta implicações no bem-estar animal (Santos et al. 2017)), estudar a sua distribuição e dispersão e identificar populações livres de sarna (Stephenson et al. 2013). Também facilita a obtenção de amostras de maior dimensão e a amostragem repetida ao longo do tempo, essencial para estudos epidemiológicos longitudinais. No entanto, algumas desvantagens deste método são a amostragem duplicada, a menos que se realize a identificação dos indivíduos (por métodos moleculares, por exemplo) e a necessidade de identificação de espécie (igualmente por métodos moleculares), de forma a ter a certeza da espécie à qual a amostra fecal pertence.

Algumas situações podem levar à ocorrência de falsos negativos como a degradação do DNA das fezes e presença de inibidores de PCR, o *grooming* realizado de forma inconsistente, número insuficiente de ácaros ingeridos (por exemplo em espécies que apresentam baixa carga parasitária, como é o caso do lobo, ou em fases iniciais ou de recuperação da doença) ou excreção de ácaros intermitente e à diluição dos ácaros/DNA em grandes volumes de fezes (Stephenson et al. 2013; Peltier et al. 2018). Tais situações, contribuem, provavelmente, para uma moderada sensibilidade do método, tal como estimado pelos modelos multi-evento de CR (34,0%, IC<sub>95%</sub> 15,9-58,4%). No estudo semelhante de Stephenson et al. (2013) em sarna notoédrica em lince também se verificou uma sensibilidade moderada (52,6%), mas ainda assim, um tanto superior à sensibilidade obtida neste estudo. No entanto, a típica evolução da sarna sarcóptica nos lobos deverá ser um fator a ter em conta, uma vez que se caracteriza por baixas cargas parasitárias (Oleaga et al. 2012), e, portanto, poderá esperar-se um menor número de ácaros ingerido durante a atividade de *grooming*, pelo que nesta espécie, este método poderá ter uma menor sensibilidade. Assim sendo, a sensibilidade do método molecular não-invasivo poderá depender da patologia da sarna nas diferentes espécies hospedeiras, assim como do seu comportamento de *grooming*.

Podem também ocorrer falsos positivos por contaminação laboratorial, ou se as presas das quais os animais se alimentaram tinham sarna, ou se animais saudáveis realizaram *allogrooming* a animais que estejam parasitados com *S. scabiei*. No entanto, os resultados obtidos (especificidade de 100%) sugerem que estas situações não são frequentes uma vez que a probabilidade de DNA de *S. scabiei* ser amplificado em amostras fecais de lobos não infetados foi estimada como nula em todos os modelos multi-evento de CR selecionados.

Em média, a prevalência de sarna com este método, predita pelo GLMM, foi de 7,2% (IC<sub>95%</sub> 5,0-9,4%). Tal como anteriormente relatado em lobos ibéricos (Oleaga et al. 2011), não foram encontradas diferenças significativas na prevalência entre sexos. A prevalência predita de sarna em lobos pelos métodos moleculares variou ao longo dos anos, com um valor mínimo em 2017 (2,6%, IC<sub>95%</sub> 0,9-8,3%) e um valor máximo em 2009 (11,7%, IC<sub>95%</sub> 5,1-26,9%). Esta tendência temporal, em que se verifica uma menor prevalência nos últimos anos, é semelhante à obtida através do método sorológico.

Os modelos multi-evento de CR indicaram que lobos individualmente identificados infetados com sarna apresentam uma mortalidade 18,4% (IC<sub>95%</sub> -15,2-49,6%) superior, comparativamente aos lobos não infetados com sarna. Na América do Norte, o risco de mortalidade foi também superior (27-34%) em lobos infetados com sarna (Niedringhaus, Brown, Sweeley, et al. 2019), embora atenuado pelo aumento do tamanho da alcateia (maior suporte nutricional e de defesa de território) (Almberg et al. 2015). No caso da população lupina ibérica, a existência de uma baixa diversidade genética no complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II (Rocha et al. 2019), que está envolvido na resposta imunitária a parasitas extracelulares (Schwensow et al. 2007), como é o caso de *S. scabiei*, pode levar a uma maior suscetibilidade à sarna sarcóptica.

Curiosamente, para os lobos individualmente identificados infetados com sarna foi estimada uma mortalidade superior nos machos comparativamente às fêmeas. Apesar de existir, em muitas espécies de animais selvagens, uma tendência geral para cargas parasitárias mais elevadas nos machos do que nas fêmeas, existe pouca evidência de que a mortalidade seja diferente entre sexos (Klein 2004; Zuk 2009). O aparente aumento da suscetibilidade dos lobos machos à sarna sarcóptica pode estar relacionado com diferenças imunológicas, hormonais ou comportamentais entre os sexos (Klein 2004).

Embora o intervalo de confiança destas estimativas não exclua uma diferença nula na mortalidade, deve ter-se em conta que em Portugal a espécie tem uma população com menos de 250 indivíduos maduros, dividida em subpopulações fragmentadas e confinada à região Norte do país (Pimenta et al. 2005). Sabendo que os efeitos da sarna podem ser mais notórios em populações pequenas, geneticamente comprometidas ou espécies ameaçadas (Pence and Ueckermann 2002) e que as mudanças ambientais de origem antropogénica (por exemplo alterações climáticas e aumento do contacto entre humanos, animais domésticos e

selvagens) podem aumentar a suscetibilidade dos hospedeiros e contribuir para a ocorrência de surtos (Niedringhaus, Brown, Sweeley, et al. 2019), este aumento da mortalidade pode ter impactos na conservação da espécie requerendo, no entanto, mais investigação.

## 6.5. Considerações finais

Foi desenvolvido e validado um novo método de monitorização de sarna sarcóptica em lobos, através da deteção molecular de DNA de *S. scabiei* de uma forma não-invasiva. Embora tenha sido desenvolvido e validado utilizando amostras de lobos, este método também deverá ser útil em outras espécies selvagens e destaca-se pela sua elevada especificidade e pelo seu carácter não-invasivo.

Os vários métodos apresentados têm conhecidas vantagens e desvantagens (Tabela 4 - adaptado de Mounsey et al. 2013), sendo que a utilização de dois ou mais métodos em paralelo fornece informação complementar no estudo da sarna sarcóptica em populações selvagens. Além disso, a sua escolha deve basear-se na espécie animal alvo, no objetivo do estudo (por exemplo, diagnóstico individual ou estudo epidemiológico), no equipamento laboratorial e de campo disponíveis e nos custos inerentes a cada método.

**Tabela 4 Vantagens e desvantagens dos vários métodos de diagnóstico de sarna sarcóptica em carnívoros silvestres**

Método	Vantagens	Desvantagens
<b>Exame externo</b> (capturas, necrópsias)	- Sensível - Simples - Baixo custo	- Baixa especificidade (manifestações atípicas ou diagnósticos diferenciais) - Enviesado
<b>Exame Microscópico</b> (raspagem/digestão de raspagem cutânea)	- Elevada especificidade - Simples - Baixo custo	- Baixa sensibilidade (dificuldade em encontrar ácaros) - Depende de um operador tecnicamente qualificado
<b>Sorologia</b>	- Boa sensibilidade e especificidade - Estudos epidemiológicos	- Necessidade de captura (soro) e possível enviesamento dos animais capturados - Equipamento laboratorial - Casos iniciais sem Ac detetáveis devido a atraso da resposta humoral
<b>Foto-armadilhas</b>	- Não-invasivo	- Baixa especificidade (dificuldade em diagnosticar casos ligeiros/iniciais; diagnósticos diferenciais)
<b>Método molecular não-invasivo</b>	- Não-invasivo - Elevada especificidade (deteção de pequenas quantidades de DNA) - Estudos epidemiológicos - Maior amostragem	- Baixa sensibilidade (DNA tem de estar presente) - Amostragem duplicada - Requer identificação de espécie - Equipamento laboratorial e custo

Adaptado de Mounsey et al. (2013)

## 7. Conclusão e perspectivas futuras

A sarna sarcóptica é uma doença cutânea causada pelo ácaro *S. scabiei*, globalmente difundida e altamente contagiosa, afetando humanos e animais. Apesar da especificidade de hospedeiro, há possibilidade de infecção temporária, ou mesmo permanente, com variantes de outro hospedeiro. Os principais sinais clínicos são alopecia, crostas e prurido, sendo uma doença na qual os indivíduos afetados perdem qualidade de vida e origina efeitos secundários variados, fisiológicos e comportamentais. Em certas espécies (como a raposa) ou populações suscetíveis (isoladas e/ou fragmentadas), esta doença pode ser particularmente grave e ter um grande impacto, levando a declínios populacionais ou mesmo extinções locais. Em Portugal, nas populações de lobo e raposa, a doença é considerada enzoótica, com ocorrência de epizootias esporadicamente. Torna-se por isso essencial implementar sistemas de vigilância da doença, utilizando preferencialmente métodos não-invasivos. Neste trabalho foram aplicados e analisados diferentes métodos de deteção e estudo da sarna sarcóptica em lobos e raposas da região Noroeste de Portugal, dos quais, necrópsias e digestão cutânea com visualização do ácaro ao microscópio, foto-armadilhas, sorologia e métodos moleculares. Foram abordadas vantagens e desvantagens dos vários métodos e foi realizada uma avaliação da situação epidemiológica da sarna sarcóptica nas duas espécies-alvo.

Este trabalho permitiu aplicar pela primeira vez (do conhecimento do autor) um método molecular não-invasivo para deteção de DNA de *S. scabiei* em lobos, que demonstrou ter uma elevada especificidade, que se destaca pelo seu carácter não-invasivo, e que poderá vir a ser um método inovador na monitorização de sarna em populações selvagens. A aplicação do modelo multi-evento CR combinando os resultados moleculares com os sorológicos revelou-se fundamental para estimar parâmetros de mortalidade nos lobos infetados com sarna e para a avaliação do desempenho deste novo método.

No futuro, seria interessante estudar a sarna sarcóptica abrangendo não só o núcleo populacional de lobos do Alto Minho, mas também os outros núcleos a norte do rio Douro, assim como a população de lobos a sul deste rio (onde a sarna poderá ter efeitos mais devastadores dada a maior fragilidade e isolamento desta população), e comparando com as raposas da mesma região. A aplicação do método molecular não-invasivo a raposas não foi realizada no decorrer deste trabalho, mas acrescentaria informação importante quanto à epidemiologia da doença nesta espécie e quanto ao funcionamento do método. A genotipagem do ácaro detetado, quer nas fezes, quer na pele, permitiria descobrir a variante de *S. scabiei* envolvida, concluindo acerca da sua origem, transmissão e fluxos genéticos existentes. No decorrer de necrópsias também seria interessante colher fezes diretamente do intestino grosso/reto do animal e aplicar a reação de PCR descrita, colher LTE para deteção de anticorpos e realizar o exame externo e digestão cutânea de lesões alopecicas, e, desta forma, comparar, para o mesmo animal, os resultados dos vários métodos de diagnóstico.

## 1 **8. Bibliografia**

- 2 Afosa. 2018. *Sarcoptes*-ELISA 2001® Dog. Instructions for use.
- 3 Alasaad S, Permunion R, Gakuya F, Mutinda M, Soriguer RC, Rossi L. 2012. Sarcoptic-mange  
4 detector dogs used to identify infected animals during outbreaks in wildlife. BMC Vet  
5 Res. 8(1):110. doi:10.1186/1746-6148-8-110.
- 6 Almberg ES, Cross PC, Dobson AP, Smith DW, Metz MC, Stahler DR, Hudson PJ. 2015.  
7 Social living mitigates the costs of a chronic illness in a cooperative carnivore. Ecol  
8 Lett. 18(7):660–667. doi:10.1111/ele.12444.
- 9 Álvares F, Barroso I, Espírito-Santo C, Costa G, Fonseca C, Godinho R, Nakamura M,  
10 Petrucci-Fonseca F, Pimenta V, Ribeiro S, et al. 2015. Situação de referência para o  
11 Plano de Ação para a Conservação do Lobo-Ibérico em Portugal. ICNF/CIBIO-  
12 INBIO/CE3C/UA Lisboa.
- 13 Álvares F, Ferreira CC, Barbosa A. Márcia, Rosalino LM, Pedroso NM, Bencatel Joana. 2019.  
14 Carnívoros. In: Bencatel J, Sabino-Marques H, Álvares F, Moura AE, Barbosa A M,  
15 editors. Atlas de Mamíferos de Portugal. 2nd ed. Universidade de Évora, Portugal. p.  
16 66–99.
- 17 Angelone-Alasaad S, Molinar Min AR, Pasquetti M, Alagaili AN, D'Amelio S, Berrilli F, Obanda  
18 V, Gebely MA, Soriguer RC, Rossi L. 2015. Universal conventional and real-time PCR  
19 diagnosis tools for *Sarcoptes scabiei*. Parasites and Vectors. 8(1):587.  
20 doi:10.1186/s13071-015-1204-8.
- 21 Aragon TJ. 2020. epitools: epidemiology tools. R package version 0.5-10.1. [https://cran.r-](https://cran.r-project.org/package=epitools)  
22 [project.org/package=epitools](https://cran.r-project.org/package=epitools).
- 23 Arlian LG, Runyan RA, Achar S, Estes SA. 1984. Survival and infestivity of *Sarcoptes scabiei*  
24 var. *canis* and var. *hominis*. J Am Acad Dermatol. 11(2):210–215. doi:10.1016/S0190-  
25 9622(84)70151-4.
- 26 Arlian LG, Runyan RA, Estes SA. 1984. Cross infestivity of *Sarcoptes scabiei*. J Am Acad  
27 Dermatol. 10(6):979–986. doi:10.1016/S0190-9622(84)80318-7.
- 28 Arlian LG, Vyszenski-Moher DL, Cordova D. 1988. Host specificity of *S. scabiei* var. *canis*  
29 (Acari: Sarcoptidae) and the role of host odor. J Med Entomol. 25(1):52–56.  
30 doi:10.1093/jmedent/25.1.52.
- 31 Arlian LG, Bruner RH, Stuhlman RA, Ahmed M, Vyszenski-Moher DL. 1990. Histopathology in  
32 hosts parasitized by *Sarcoptes scabiei*. J Parasitol. 76(6):889–894.
- 33 Arlian LG, Morgan MS, Vyszenskimohar DL, Stemmer BL. 1994. *Sarcoptes scabiei*: the  
34 circulating antibody response and induced immunity to scabies. Exp Parasitol.  
35 78(1):37–50. doi:10.1006/expr.1994.1004.
- 36 Arlian LG, Morgan MS. 2017. A review of *Sarcoptes scabiei*: past, present and future. Parasites  
37 and Vectors. 10(1):297. doi:10.1186/s13071-017-2234-1.
- 38 Arnaud A, Chosidow O, Détrez MA, Bitar D, Huber F, Foulet F, Le Strat Y, Vandentorren S.  
39 2016. Prevalences of scabies and pediculosis corporis among homeless people in the  
40 Paris region: results from two randomized cross-sectional surveys (HYTPEAC study).  
41 Br J Dermatol. 174(1):104–112. doi:10.1111/bjd.14226.
- 42 Aydingöz I, Mansur A. 2011. Canine scabies in humans: a case report and review of the  
43 literature. Dermatology. 223(2):104–6. doi:10.1159/000327378.
- 44 Balestrieri A, Remonti L, Ferrari N, Ferrari A, Valvo T Lo, Robetto S, Orusa R. 2006. Sarcoptic  
45 mange in wild carnivores and its co-occurrence with parasitic helminths in the Western

- 1 Italian Alps. Eur J Wildl Res. 52(3):196–201. doi:10.1007/s10344-006-0036-4.
- 2 Bandi KM, Saikumar C. 2013. Sarcoptic mange: a zoonotic ectoparasitic skin disease. J Clin  
3 Diagnostic Res. 7(1):156–157. doi:10.7860/JCDR/2012/4839.2694.
- 4 Becskei C, De Bock F, Illambas J, Cherni JA, Fourie JJ, Lane M, Mahabir SP, Six RH. 2016.  
5 Efficacy and safety of a novel oral isoxazoline, sarolaner (Simparica™), for the  
6 treatment of sarcoptic mange in dogs. Vet Parasitol. 222:56–61.  
7 doi:10.1016/j.vetpar.2016.02.017.
- 8 Beja-Pereira A, Oliveira R, Alves PC, Schwartz MK, Luikart G. 2009. Advancing ecological  
9 understandings through technological transformations in noninvasive genetics. Mol  
10 Ecol Resour. 9(5):1279–1301. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02699.x.
- 11 Beldomenico PM, Begon M. 2010. Disease spread, susceptibility and infection intensity:  
12 vicious circles?. Trends Ecol Evol. 25(1):21–27. doi:10.1016/j.tree.2009.06.015.
- 13 Bernigaud C, Fang F, Fischer K, Lespine A, Aho LS, Mullins AJ, Teclé B, Kelly A, Sutra JF,  
14 Moreau F, et al. 2018. Efficacy and pharmacokinetics evaluation of a single oral dose  
15 of afoxolaner against *Sarcoptes scabiei* in the porcine scabies model for human  
16 infestation. Antimicrob Agents Chemother. 62(9):e02334-17. doi:10.1128/AAC.02334-  
17 17.
- 18 Blacket MJ, Robin C, Good RT, Lee SF, Miller AD. 2012. Universal primers for fluorescent  
19 labelling of PCR fragments - an efficient and cost-effective approach to genotyping by  
20 fluorescence. Mol Ecol Resour. 12(3):456–463. doi:10.1111/j.1755-  
21 0998.2011.03104.x.
- 22 Bloch-Infanger C, Bättig V, Kremo J, Widmer AF, Egli A, Bingisser R, Battegay M, Erb S. 2017.  
23 Increasing prevalence of infectious diseases in asylum seekers at a tertiary care  
24 hospital in Switzerland. PLoS One. 12(6):1–12. doi:10.1371/journal.pone.0179537.
- 25 Boitani L. 2000. Action Plan for the conservation of the wolves (*Canis lupus*) in Europe.  
26 Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats. Council of  
27 Europe, Strasbourg.
- 28 Boitani L. 2018. *Canis lupus*. IUCN Red List Threat Species 2018. [accessed 2020 Apr 1].  
29 <https://www.iucnredlist.org/species/3746/144226239>.
- 30 Borchard P, Eldridge DJ, Wright IA. 2012. *Sarcoptes mange* (*Sarcoptes scabiei*) increases  
31 diurnal activity of bare-nosed wombats (*Vombatus ursinus*) in an agricultural riparian  
32 environment. Mamm Biol. 77(4):244–248. doi:10.1016/j.mambio.2012.04.004.
- 33 Bornstein S, Zakrisson G. 1993. Clinical picture and antibody response in pigs infected by  
34 *Sarcoptes scabiei* var. *suis*. Vet Dermatol. 4(3):123–131. doi:10.1111/j.1365-  
35 3164.1993.tb00205.x.
- 36 Bornstein S, Zakrisson G, Thebo P. 1995. Clinical picture and antibody response to  
37 experimental *Sarcoptes scabiei* var. *vulpes* infection in red foxes (*Vulpes vulpes*). Acta  
38 Vet Scand. 36(4):509–519.
- 39 Bornstein S, Mörner T, Samuel WM. 2001. *Sarcoptes scabiei* and sarcoptic mange. In: Samuel  
40 WM, Pybus MJ, Kocan AA, editors. Parasitic diseases of wild mammals. p. 107–116.
- 41 Bornstein S, Frössling J, Näslund K, Zakrisson G, Mörner T. 2006. Evaluation of a serological  
42 test (indirect ELISA) for the diagnosis of sarcoptic mange in red foxes (*Vulpes vulpes*).  
43 Vet Dermatol. 17(6):411–416. doi:10.1111/j.1365-3164.2006.00548.x.
- 44 Bouvresse S, Chosidow O. 2010. Scabies in healthcare settings. Curr Opin Infect Dis.  
45 23(2):111–118. doi:10.1097/QCO.0b013e328336821b.

- 1 Bowman DD. 2014. *Sarcoptes*. In: Bowman DD, editor. Geogis' Parasitology for Veterinarians.  
2 10th ed. St Louis, Missouri: Elsevier. p. 68.
- 3 Brewster K, Henke SE, Hilton C, Ortega-S. A. 2017. Use of remote cameras to monitor the  
4 potential prevalence of sarcoptic mange in southern Texas, USA. *J Wildl Dis.*  
5 53(2):377–381. doi:10.7589/2016-08-180.
- 6 Brites C, Weyll M, Pedroso C, Badaro R. 2002. Severe and Norwegian scabies are strongly  
7 associated with retroviral (HIV-1/HTLV-1) infection in Bahia, Brazil. *AIDS.* 16:1292–  
8 1293. doi:10.1097/00002030-200206140-00015.
- 9 Burnham KP, Anderson DR. 2002. Model selection and multimodel inference: a practical  
10 information-theoretic approach. 2nd ed. New York: Springer-Verlag.
- 11 Cabral MJ, Almeida J, Almeida PR, Dellinger T, Ferrand de Almeida N, Oliveira ME, Palmeirim  
12 JM, Queirós AI, Rogado L, Santos-Reis M. 2005. Lobo. In: Livro Vermelho dos  
13 Vertebrados de Portugal. ICNF. p. 517–518.  
14 <http://www2.icnf.pt/portal/pn/biodiversidade/patrinatur/lvv/resource/doc/mam/can-lup>.
- 15 Carricondo-Sanchez D, Odden M, Linnell JDC, Odden J. 2017. The range of the mange:  
16 spatiotemporal patterns of sarcoptic mange in red foxes (*Vulpes vulpes*) as revealed  
17 by camera trapping. *PLoS One.* 12(4):e0176200. doi:10.1371/journal.pone.0176200.
- 18 Casais R, Prieto M, Balseiro A, Solano P, Parra F, Martín Alonso JM. 2007. Identification and  
19 heterologous expression of a *Sarcoptes scabiei* cDNA encoding a structural antigen  
20 with immunodiagnostic potential. *Vet Res.* 38(3):435–450.  
21 doi:10.1051/vetres:2007007.
- 22 CDC. 2010. Scabies. [accessed 2020 Mar 24].  
23 <https://www.cdc.gov/parasites/scabies/index.html>.
- 24 Chambert T, Staszewski V, Lobato E, Choquet R, Carrie C, Mccoy KD, Tveraa T, Boulinier T.  
25 2012. Exposure of black-legged kittiwakes to Lyme disease spirochetes: dynamics of  
26 the immune status of adult hosts and effects on their survival. *J Anim Ecol.* 81(5):986–  
27 995. doi:10.1111/j.1365-2656.2012.01979.x.
- 28 Choquet R. 2008. Automatic generation of multistate capture-recapture models. *Can J Stat.*  
29 36(1):43–57. doi:10.1002/cjs.5550360106.
- 30 Choquet R, Lebreton JD, Gimenez O, Reboulet AM, Pradel R. 2009. U-CARE: utilities for  
31 performing goodness of fit tests and manipulating CAPTURE-RECAPTURE data. *Ecography*  
32 (Cop). 32(6):1071–1074. doi:10.1111/j.1600-0587.2009.05968.x.
- 33 Choquet R, Rouan L, Pradel R. 2009. Program E-SURGE: a software application for fitting  
34 multievent models. In: Thomson DL, Cooch EG, Conroy MJ, editors. Modeling  
35 demographic processes in marked populations. Environmental and ecological statistics  
36 series. Vol. 3. New York: Springer-Verlag. p. 845–865.
- 37 Cross PC, Almberg ES, Haase CG, Hudson PJ, Maloney SK, Metz MC, Munn AJ, Nugent P,  
38 Putzeys O, Stahler DR, et al. 2016. Energetic costs of mange in wolves estimated from  
39 infrared thermography. *Ecology.* 97(8):1938–1948. doi:10.1890/15-1346.1.
- 40 Currier RW, Ceilley RI. 2010. Scabies. In: Rabinowitz PM, Conti LA, editors. Human-Animal  
41 Medicine. p. 254–260.
- 42 Currier RW, Walton SF, Currie BJ. 2011. Scabies in animals and humans: history, evolutionary  
43 perspectives, and modern clinical management. *Ann N Y Acad Sci.* 1230(1):50–60.  
44 doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06364.x.
- 45 Curtis CF. 2004. Current trends in the treatment of *Sarcoptes*, *Cheyletiella* and *Otodectes* mite

- 1 infestations in dogs and cats. *Vet Dermatol.* 15(2):108–114. doi:10.1111/j.1365-  
2 3164.2004.00362.x.
- 3 Davidson RK, Bornstein S, Handeland K. 2008. Long-term study of *Sarcoptes scabiei* infection  
4 in Norwegian red foxes (*Vulpes vulpes*) indicating host/parasite adaptation. *Vet*  
5 *Parasitol.* 156(3–4):277–283. doi:10.1016/j.vetpar.2008.05.019.
- 6 Davis DP, Moon RD. 1990. Dynamics of swine mange: a critical review of the literature. *J Med*  
7 *Entomol.* 27(5):727–737. doi:10.1093/jmedent/27.5.727.
- 8 Decandia AL, Leverett KN, Vonholdt BM. 2019. Of microbes and mange: consistent changes  
9 in the skin microbiome of three canid species infected with *Sarcoptes scabiei* mites.  
10 *Parasites and Vectors.* 12(1):488. doi:10.1186/s13071-019-3724-0.
- 11 DPIPWE. 2018. Mange treatment protocols and euthanasia guidance. For the application of  
12 moxidectin (Cydectin) to treat sarcoptic mange in wild wombats (*Vombatus ursinus*) in  
13 Tasmania. Version 2.
- 14 Devenish-Nelson ES, Richards SA, Harris S, Soulsbury C, Stephens PA. 2014. Demonstrating  
15 frequency-dependent transmission of sarcoptic mange in red foxes. *Biol Lett.*  
16 10:20140524. doi:10.1098/rsbl.2014.0524.
- 17 Eggermann J, da Costa GF, Guerra AM, Kirchner WH, Petrucci-Fonseca F. 2011. Presence  
18 of Iberian wolf (*Canis lupus signatus*) in relation to land cover, livestock and human  
19 influence in Portugal. *Mamm Biol.* 76(2):217–221. doi:10.1016/j.mambio.2010.10.010.
- 20 Elbers ARW, Rambags PGM, van der Hoiden HMJF, Hunneman WA. 2000. Production  
21 performance and pruritic behaviour of pigs naturally infected by *Sarcoptes scabiei* var.  
22 *suis* in a contact transmission experiment. *Vet Q.* 22(3):145–149.  
23 doi:10.1080/01652176.2000.9695044.
- 24 Elsheikha H, Wright I. 2015. Biology, diagnosis and management of sarcoptic mange. *Vet*  
25 *Nurse.* 6(5):260–265. doi:10.12968/vetn.2015.6.5.260.
- 26 Elston CA, Elston DM. 2014. *Demodex* mites. *Clin Dermatol.* 32(6):739–743.  
27 doi:10.1016/j.clindermatol.2014.02.012.
- 28 Engelman D, Kiang K, Chosidow O, McCarthy J, Fuller C, Lammie P, Hay R, Steer A. 2013.  
29 Toward the global control of human scabies: introducing the International Alliance for  
30 the Control of Scabies. *PLoS Negl Trop Dis.* 7(8):e2167.  
31 doi:10.1371/journal.pntd.0002167.
- 32 Espinosa J, Ráez-Bravo A, López-Olvera JR, Pérez JM, Lavín S, Tvarijonaviciute A, Cano-  
33 Manuel FJ, Fandos P, Soriguer RC, Granados JE, et al. 2017. Histopathology,  
34 microbiology and the inflammatory process associated with *Sarcoptes scabiei* infection  
35 in the Iberian ibex, *Capra pyrenaica*. *Parasites and Vectors.* 10(1):596.  
36 doi:10.1186/s13071-017-2542-5.
- 37 Fain A. 1968. Etude de la variabilite de *Sarcoptes scabiei* avec une revision des Sarcoptidae.  
38 In: *Acta Zool. Pathol. Antverp.* Vol. 47. p. 1–196.
- 39 Fain A. 1978. Epidemiological problems of scabies. *Int J Dermatol.* 17:20–30.
- 40 Ferroglio E, Rossi L, Gennero S. 2000. Lung-tissue extract as an alternative to serum for  
41 surveillance for brucellosis in chamois. *Prev Vet Med.* 43(2):117–122.  
42 doi:10.1016/S0167-5877(99)00090-2.
- 43 Fitzgerald SD, Cooley TM, Cosgrove MK. 2008. Sarcoptic mange and *Pelodera dermatitis* in  
44 an American black bear (*Ursus americanus*). *J Zoo Wildl Med.* 39(2):257–259.  
45 doi:10.1638/2007-0071r.1.

- 1 Fox DL. 2007. *Vulpes vulpes*. Animal Diversity Web. [accessed 2020 Mar 31].  
2 [https://animaldiversity.org/accounts/Vulpes\\_vulpes/#93eafc5d068e76b00a07c978204](https://animaldiversity.org/accounts/Vulpes_vulpes/#93eafc5d068e76b00a07c978204)  
3 11797.
- 4 Fraser TA, Carver S, Martin AM, Mounsey K, Polkinghorne A, Jelocnik M. 2018. A *Sarcoptes*  
5 *scabiei* specific isothermal amplification assay for detection of this important  
6 ectoparasite of wombats and other animals. PeerJ. 6:e5291. doi:10.7717/peerj.5291.
- 7 Fraser TA, Martin A, Polkinghorne A, Carver S. 2018. Comparative diagnostics reveals PCR  
8 assays on skin scrapings is the most reliable method to detect *Sarcoptes scabiei*  
9 infestations. Vet Parasitol. 251:119–124. doi:10.1016/j.vetpar.2018.01.007.
- 10 Fthenakis GC, Karagiannidis A, Alexopoulos C, Brozos C, Papadopoulos E. 2001. Effects of  
11 sarcoptic mange on the reproductive performance of ewes and transmission of  
12 *Sarcoptes scabiei* to newborn lambs. Vet Parasitol. 95(1):63–71. doi:10.1016/S0304-  
13 4017(00)00417-9.
- 14 Fuchs B, Zimmermann B, Wabakken P, Bornstein S, Månsson J, Evans AL, Liberg O, Sand  
15 H, Kindberg J, Ågren EO, et al. 2016. Sarcoptic mange in the Scandinavian wolf *Canis*  
16 *lupus* population. BMC Vet Res. 12(1):156. doi:10.1186/s12917-016-0780-y.
- 17 Gakuya F, Rossi L, Ombui J, Maingi N, Muchemi G, Ogara W, Soriguer RC, Alasaad S. 2011.  
18 The curse of the prey: *Sarcoptes* mite molecular analysis reveals potential prey-to-  
19 predator parasitic infestation in wild animals from Masai Mara, Kenya. Parasites and  
20 Vectors. 4(1):193. doi:10.1186/1756-3305-4-193.
- 21 Gakuya F, Ombui J, Maingi N, Muchemi G, Ogara W, Soriguer RC, Alasaad S. 2012. Sarcoptic  
22 mange and cheetah conservation in Masai Mara (Kenya): epidemiological study in a  
23 wildlife/livestock system. Parasitology. 139(12):1587–1595.  
24 doi:10.1017/S0031182012000935.
- 25 Galaverni M, Palumbo D, Fabbri E, Caniglia R, Greco C, Randi E. 2012. Monitoring wolves  
26 (*Canis lupus*) by non-invasive genetics and camera trapping: a small-scale pilot study.  
27 Eur J Wildl Res. 58(1):47–58. doi:10.1007/s10344-011-0539-5.
- 28 Genovart M, Pradel R. 2019. Transience effect in capture-recapture studies: the importance  
29 of its biological meaning. PLoS One. 14(9):e0222241.  
30 doi:10.1371/journal.pone.0222241.
- 31 Gerloff U, Schlotterer C, Rassmann K, Rambold I, Hohmann G, Fruth B, Tautz D. 1995.  
32 Amplification of hypervariable simple sequence repeats (microsatellites) from  
33 excremental DNA of wild living bonobos (*Pan paniscus*). Mol Ecol. 4:515–518.
- 34 Godinho R, López-Bao JV, Castro D, Llaneza L, Lopes S, Silva P, Ferrand N. 2015. Real-time  
35 assessment of hybridization between wolves and dogs: combining noninvasive  
36 samples with ancestry informative markers. Mol Ecol Resour. 15(2):317–328.  
37 doi:10.1111/1755-0998.12313.
- 38 Grupo Lobo. 2016. O Lobo-Ibérico em Portugal - Situação no Leste da Beira Interior. Projeto  
39 Med-Wolf.
- 40 Haas C, Origi FC, Rossi S, López-Olvera JR, Rossi L, Castillo-Contreras R, Malmsten A,  
41 Dalin AM, Orusa R, Robetto S, et al. 2018. Serological survey in wild boar (*Sus scrofa*)  
42 in Switzerland and other European countries: *Sarcoptes scabiei* may be more widely  
43 distributed than previously thought. BMC Vet Res. 14(1):117. doi:10.1186/s12917-018-  
44 1430-3.
- 45 Hay RJ, Steer AC, Engelman D, Walton S. 2012. Scabies in the developing world-its  
46 prevalence, complications, and management. Clin Microbiol Infect. 18(4):313–323.  
47 doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03798.x.

- 1 Head ES, Macdonald EM, Ewert A, Apisarnthanarax P. 1990. *Sarcoptes scabiei* in  
2 histopathologic sections of skin in Human scabies. Arch Dermatol. 126(11):1475–1477.  
3 doi:10.1001/archderm.1990.01670350089015.
- 4 Hengge UR, Currie BJ, Jäger G, Lupi O, Schwartz RA. 2006. Scabies: a ubiquitous neglected  
5 skin disease. Lancet Infect Dis. 6(12):769–779. doi:10.1016/S1473-3099(06)70654-5.
- 6 Hoffmann M, Sillero-Zubiri C. 2016. *Vulpes vulpes*. IUCN Red List Threat Species  
7 2016.:e.T23062A4. doi:10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T23062A46190249.en.
- 8 Iliopoulos Y, Youlatos D, Sgardelis S. 2014. Wolf pack rendezvous site selection in Greece is  
9 mainly affected by anthropogenic landscape features. Eur J Wildl Res. 60(1):23–34.  
10 doi:10.1007/s10344-013-0746-3.
- 11 ICN. 2006a. *Canis lupus*. Plano Sectorial da Rede Natura 2000. (Fauna, mamíferos).
- 12 ICN. 2006b. Corno do Bico. Plano Sectorial da Rede Natura 2000. (SIC).
- 13 INE. 2013. Instituto Nacional de Estatística-Statistics Portugal. Available online.  
14 <http://www.ine.pt>.
- 15 IPMA. 2012. Normas climatológicas 1981-2010. Instituto Português do Mar e da Atmosfera.  
16 Available online. <http://www.ipma.pt/pt/oclima/normais.clima/>.
- 17 Jakubek EB, Mattsson R, Mörner T, Mattsson JG, Gavier-Widén D. 2012. Potential application  
18 of serological tests on fluids from carcasses: detection of antibodies against  
19 *Toxoplasma gondii* and *Sarcoptes scabiei* in red foxes (*Vulpes vulpes*). Acta Vet  
20 Scand. 54(1):13. doi:10.1186/1751-0147-54-13.
- 21 Jimenez MD, Bangs EE, Drew M, Nadeau S, Asher V, Sime C. 2010. Dog lice (*Trichodectes*  
22 *canis*) found on wolves (*Canis lupus*) in Montana and Idaho. Northwest Nat. 91:331–  
23 333. doi:10.1898/NWN09-43.1.
- 24 Jimenez MD, Bangs EE, Sime C, Asher VJ. 2010. Sarcoptic mange found in wolves in the  
25 Rocky Mountains in Western United States. J Wildl Dis. 46(4):1120–1125.  
26 doi:10.7589/0090-3558-46.4.1120.
- 27 Kessler E, Matthes HF, Schein E, Wendt M. 2003. Detection of antibodies in sera of weaned  
28 pigs after contact infection with *Sarcoptes scabiei* var. *suis* and after treatment with an  
29 antiparasitic agent by three different indirect ELISAs. Vet Parasitol. 114(1):63–73.  
30 doi:10.1016/S0304-4017(03)00098-0.
- 31 Khalil S, Abbas O, Kibbi AG, Kurban M. 2017. Scabies in the age of increasing drug resistance.  
32 PLoS Negl Trop Dis. 11(11):e0005920. doi:10.1371/journal.pntd.0005920.
- 33 Kido N, Kamegaya C, Omiya T, Wada Y, Takahashi M, Yamamoto Y. 2011. Hematology and  
34 serum biochemistry in debilitated, free-ranging raccoon dogs (*Nyctereutes*  
35 *procyonoides*) infested with sarcoptic mange. Parasitol Int. 60(4):425–428.  
36 doi:10.1016/j.parint.2011.06.023.
- 37 Klein SL. 2004. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in  
38 parasite infection. Parasite Immunol. 26(6–7):247–264. doi:10.1111/j.0141-  
39 9838.2004.00710.x.
- 40 Knowles JE, Frederick C. 2016. merTools: tools for analyzing mixed effect regression models.  
41 R package version 0.2.1. <https://cran.r-project.org/package=merTools>.
- 42 Kołodziej-Sobocińska M, Zalewski A, Kowalczyk R. 2014. Sarcoptic mange vulnerability in  
43 carnivores of the Białowieża Primeval Forest, Poland: underlying determinant factors.  
44 Ecol Res. 29(2):237–244. doi:10.1007/s11284-013-1118-x.

- 1 Kraabøl M, Gundersen V, Fangel K, Olstad K. 2015. The taxonomy, life cycle and pathology  
2 of *Sarcoptes scabiei* and *Notoedres cati* (Acarina, Sarcoptidae): a review in a  
3 fennoscandian wildlife perspective. *Fauna Nor.* 35(21):21–33.  
4 doi:10.5324/fn.v35i0.1652.
- 5 Kuznetsova A, Brockhoff PB, Christensen RH. 2017. ImerTest package: tests in linear mixed  
6 effects models. *J Stat Softw.* 82(13):1–26. doi:10.18637/jss.v082.i13.
- 7 Lachish S, Knowles SCL, Alves R, Wood MJ, Sheldon BC. 2011. Infection dynamics of  
8 endemic malaria in a wild bird population: parasite species-dependent drivers of spatial  
9 and temporal variation in transmission rates. *J Anim Ecol.* 80(6):1207–1216.  
10 doi:10.1111/j.1365-2656.2011.01893.x.
- 11 Lastuti NDR, Yuniarti WM, Hastutiek P, Suwanti LT, Chrismanto D. 2018. Humoral and cellular  
12 immune response induced by antigenic protein of *Sarcoptes scabiei* var. *caprae*. *Vet*  
13 *World.* 11(6):819–823. doi:10.14202/vetworld.2018.819-823.
- 14 Lee K, Heresi G, Al Hammoud R. 2019. Norwegian scabies in a patient with down syndrome.  
15 *J Pediatr.* 209:253-253.e1. doi:10.1016/j.jpeds.2019.01.057.
- 16 Little SE, Davidson WR, Rakich PM, Nixon TL, Bounous DI, Nettles VF. 1998. Responses of  
17 red foxes to first and second infection with *Sarcoptes scabiei*. *J Wildl Dis.* 34(3):600–  
18 611. doi:10.7589/0090-3558-34.3.600.
- 19 Lopez-Raton M, Rodriguez-Alvarez MX, Cadarso-Suarez C, Gude-Sampedro F. 2014.  
20 OptimalCutpoints: an R package for selecting optimal cutpoints in diagnostic tests. *J*  
21 *Stat Softw.* 61(8):1–36.
- 22 Lower KS, Medleau LM, Hnilica K, Bigler B. 2001. Evaluation of an enzyme-linked  
23 immunosorbant assay (ELISA) for the serological diagnosis of sarcoptic mange in dogs.  
24 *Vet Dermatol.* 12(6):315–320. doi:10.1046/j.0959-4493.2001.00265.x.
- 25 Macdonald D W, Reynolds JC. 2004. Red fox. In: Sillero-Zubiri C, Hoffmann M, Macdonald  
26 David W., editors. *Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs. Status survey and*  
27 *Conservation Action Plan.* Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN/SSC Canid  
28 Specialist Group. p. 129–136.
- 29 Martin AM, Burrige CP, Ingram J, Fraser TA, Carver S. 2018. Invasive pathogen drives host  
30 population collapse: effects of a travelling wave of sarcoptic mange on bare-nosed  
31 wombats. *J Appl Ecol.* 55(1):331–341. doi:10.1111/1365-2664.12968.
- 32 Martin AM, Fraser TA, Lesku JA, Simpson K, Roberts GL, Garvey J, Polkinghorne A, Burrige  
33 CP, Carver S. 2018. The cascading pathogenic consequences of *Sarcoptes scabiei*  
34 infection that manifest in host disease. *R Soc Open Sci.* 5(4):180018.  
35 doi:10.1098/rsos.180018.
- 36 Martin AM, Richards SA, Fraser TA, Polkinghorne A, Burrige CP, Carver S. 2019. Population-  
37 scale treatment informs solutions for control of environmentally transmitted wildlife  
38 disease. *J Appl Ecol.* 56(10):2363–2375. doi:10.1111/1365-2664.13467.
- 39 Martinez IZ, Oleaga A, Sojo I, García-Iglesias MJ, Pérez-Martinez C, Marín JFG, Balseiro A.  
40 2020. Immunohistochemical assessment of immune response in the dermis of  
41 *Sarcoptes scabiei* - infested wild carnivores (wolf and fox) and ruminants (chamois and  
42 red deer). *Animals.* 10(7):1146. doi:10.3390/ani10071146.
- 43 Matsuyama R, Yabusaki T, Senjyu N, Okano T, Baba M, Tsuji-Matsukane T, Yokoyama M,  
44 Kido N, Kadosaka T, Kato T, et al. 2019. Possible transmission of *Sarcoptes scabiei*  
45 between herbivorous Japanese serows and omnivorous Caniformia in Japan: a cryptic  
46 transmission and persistence?. *Parasites and Vectors.* 12(1):389. doi:10.1186/s13071-  
47 019-3630-5.

- 1 Mech LD, Boitani L. 2004. Grey wolf. In: Sillero-Zubiri C, Hoffmann M, Macdonald DW, editors.  
2 Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs. Status survey and Conservation Plan.  
3 Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN/SSC Canid Specialist Group. p. 124–  
4 129.
- 5 Meek PD, Ballard G, Claridge A, Kays R, Moseby K, O'Brien T, O'Connell A, Sanderson J,  
6 Swann DE, Tobler M, et al. 2014. Recommended guiding principles for reporting on  
7 camera trapping research. *Biodivers Conserv.* 23(9):2321–2343. doi:10.1007/s10531-  
8 014-0712-8.
- 9 Montecino-Latorre D, Cypher BL, Rudd JL, Clifford DL, Mazet JAK, Foley JE. 2019. Assessing  
10 the role of dens in the spread, establishment and persistence of sarcoptic mange in an  
11 endangered canid. *Epidemics.* 27:28–40. doi:10.1016/j.epidem.2019.01.001.
- 12 Mörner T. 1992. Sarcoptic mange in Swedish wildlife. *Rev Sci Tech.* 11(4):1115–1121.  
13 doi:10.20506/rst.11.4.658.
- 14 Mörner T, Christensson D. 1984. Experimental infection of red foxes (*Vulpes vulpes*) with  
15 *Sarcoptes scabiei* var. *vulpes*. 15:159–164.
- 16 Mörner T, Sandström G, Mattsson R. 1988. Comparison animals of serum and lung extracts  
17 for surveys of wild animals for antibodies to *Francisella tularensis* biovar *palaeartica*.  
18 *J Wildl Dis.* 24(1):10–14.
- 19 Mounsey KE, McCarthy JS, Walton SF. 2013. Scratching the itch: new tools to advance  
20 understanding of scabies. *Trends Parasitol.* 29(1):35–42. doi:10.1016/j.pt.2012.09.006.
- 21 Mueller RS, Bettenay S V, Shipstone M. 2001. Value of the pinnal-pedal reflex in the diagnosis  
22 of canine scabies. *Vet Rec.* 148(20):621–623. doi:10.1136/vr.148.20.621.
- 23 Mullen GR, O'Connor BM. 2019. Mites (Acari). In: Mullen GR, Durden L, editors. *Medical and*  
24 *Veterinary Entomology.* 3rd ed. Academic Press. p. 533–602.
- 25 Müller A, Silva E, Santos N, Thompson G. 2011. Domestic dog origin of canine distemper virus  
26 in free-ranging wolves in Portugal as revealed by hemagglutinin gene characterization.  
27 *J Wildl Dis.* 47(3):725–729. doi:10.7589/0090-3558-47.3.725.
- 28 Murray M, Edwards MA, Abercrombie B, St. Clair CC. 2015. Poor health is associated with  
29 use of anthropogenic resources in an urban carnivore. *Proc R Soc B Biol Sci.*  
30 282:20150009. doi:10.1098/rspb.2015.0009.
- 31 Nakamura M, Godinho R, Rio-Maior H, Roque S, Kaliontzopoulou A, Bernardo J, Castro D,  
32 Lopes S, Petrucci-Fonseca F, Álvares F. 2017. Evaluating the predictive power of field  
33 variables for species and individual molecular identification on wolf noninvasive  
34 samples. *Eur J Wildl Res.* 63(3):1–10. doi:10.1007/s10344-017-1112-7.
- 35 Newman TJ, Baker PJ, Harris S. 2002. Nutritional condition and survival of red foxes with  
36 sarcoptic mange. *Can J Zool.* 80(1):154–161. doi:10.1139/z01-216.
- 37 Niedringhaus KD, Brown JD, Sweeley KM, Yabsley MJ. 2019. A review of sarcoptic mange in  
38 North American wildlife. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 9(April):285–297.  
39 doi:10.1016/j.ijppaw.2019.06.003.
- 40 Niedringhaus KD, Brown JD, Ternent MA, Peltier SK, Yabsley MJ. 2019. Effects of temperature  
41 on the survival of *Sarcoptes scabiei* of black bear (*Ursus americanus*) origin. *Parasitol*  
42 *Res.* 118(10):2767–2772. doi:10.1007/s00436-019-06387-7.
- 43 Nimmervoll H, Hoby S, Robert N, Lommano E, Welle M, Ryser-Degiorgis MP. 2013. Pathology  
44 of sarcoptic mange in red foxes (*Vulpes vulpes*): macroscopic and histologic  
45 characterization of three disease stages. *J Wildl Dis.* 49(1):91–102. doi:10.7589/2010-

- 1 11-316.
- 2 Oleaga A, Casais R, Balseiro A, Espí A, Llaneza L, Hartasánchez A, Gortázar C. 2011. New  
3 techniques for an old disease: sarcoptic mange in the Iberian wolf. *Vet Parasitol.*  
4 181(2–4):255–266. doi:10.1016/j.vetpar.2011.04.036.
- 5 Oleaga A, Casais R, Prieto JM, Gortázar C, Balseiro A. 2012. Comparative pathological and  
6 immunohistochemical features of sarcoptic mange in five sympatric wildlife species in  
7 Northern Spain. *Eur J Wildl Res.* 58(6):997–1000. doi:10.1007/s10344-012-0662-y.
- 8 Oleaga A, Alasaad S, Rossi L, Casais R, Vicente J, Maione S, Soriguer RC, Gortázar C. 2013.  
9 Genetic epidemiology of *Sarcoptes scabiei* in the Iberian wolf in Asturias, Spain. *Vet*  
10 *Parasitol.* 196(3–4):453–459. doi:10.1016/j.vetpar.2013.04.016.
- 11 Oliveira T, Carmo P. 2000. Distribuição das principais presas selvagens do lobo ibérico (*Canis*  
12 *lupus* Cabrera, 1907) a norte do Rio Douro. *Galemys: Boletín Informativo de la*  
13 *Sociedad Española para la Conservación y Estudio de los mamíferos.* 12(1):257–268.
- 14 Peltier SK, Brown JD, Ternent MA, Fenton H, Niedringhaus KD, Yabsley MJ. 2018. Assays for  
15 detection and identification of the causative agent of mange in free-ranging black bears  
16 (*Ursus americanus*). *J Wildl Dis.* 54(3):471–479. doi:10.7589/2017-06-148.
- 17 Pence DB, Windberg LA, Pence BC, Sprowls R. 1983. The epizootiology and pathology of  
18 sarcoptic mange in coyotes, *Canis latrans*, from South Texas. *J Parasitol.* 69(6):1100–  
19 1115.
- 20 Pence DB, Ueckermann E. 2002. Sarcoptic mange in wildlife. *OIE Rev Sci Tech.* 21(2):385–  
21 398. doi:10.20506/rst.21.2.1335.
- 22 Pérez JM, Castro I, Granados JE, Cano-Manuel FJ, Fandos P, Espinosa J, Soriguer RC. 2017.  
23 Does *Sarcoptes scabiei* synchronize its breeding cycle with that of the Iberian Ibex,  
24 *Capra pyrenaica*?. *Int J Acarol.* 43(3):199–203. doi:10.1080/01647954.2016.1272634.
- 25 Petrucci-Fonseca F. 1990. O lobo (*Canis lupus signatus* Cabrera, 1907) em Portugal.  
26 Problemática da sua conservação. Universidade de Lisboa, Lisboa.
- 27 Pimenta V, Álvares F, Correia J, Ferrão da Costa G, Moreira L, Nascimento J, Petrucci-  
28 Fonseca F, Roque S, Santos E. 2005. Situação populacional do Lobo em Portugal:  
29 resultados do Censo Nacional 2002/2003. Instituto da Conservação da  
30 Natureza/Grupo Lobo Lisboa. Technical report. 158pp.
- 31 Pires JPE. 2001. Ecologia alimentar da raposa [*Vulpes vulpes* (Linnaeus 1758)] no Parque  
32 Natural da Serra da Estrela. Porto: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- 33 Pisano SRR, Ryser-Degiorgis MP, Rossi L, Peano A, Keckeis K, Roosje P. 2019. Sarcoptic  
34 mange of fox origin in multiple farm animals and scabies in humans, Switzerland, 2018.  
35 *Emerg Infect Dis.* 25(6):1235–1238. doi:10.3201/eid2506.181891.
- 36 Pradel R. 2005. Multievent: an extension of multistate capture-recapture models to uncertain  
37 states. *Biometrics.* 61(2):442–447. doi:10.1111/j.1541-0420.2005.00318.x.
- 38 QGIS Development Team. 2019. QGIS Geographic Information System. <http://qgis.osgeo.org>.
- 39 Rasero R, Rossi L, Soglia D, Maione S, Sacchi P, Rambozzi L, Sartore S, Soriguer RC,  
40 Spalenza V, Alasaad S. 2010. Host taxon-derived *Sarcoptes* mite in European wild  
41 animals revealed by microsatellite markers. *Biol Conserv.* 143(5):1269–1277.  
42 doi:10.1016/j.biocon.2010.03.001.
- 43 Rehbein S, Visser M, Winter R, Trommer B, Matthes HF, Maciel AE, Marley SE. 2003.  
44 Productivity effects of bovine mange and control with ivermectin. *Vet Parasitol.*  
45 114(4):267–284. doi:10.1016/S0304-4017(03)00140-7.

- 1 Rentería-Solís Z, Min AM, Alasaad S, Müller K, Michler FU, Schmäscke R, Wittstatt U, Rossi  
2 L, Wibbelt G. 2014. Genetic epidemiology and pathology of raccoon-derived *Sarcoptes*  
3 mites from urban areas of Germany. *Med Vet Entomol.* 28(Suppl.1):98–103.  
4 doi:10.1111/mve.12079.
- 5 Rio-Maior H, Godinho R, Álvares F. 2008. Projecto de Investigação e Conservação do lobo no  
6 Noroeste de Portugal - Ano I. Relatório Técnico Anual Veranda/CIBIO.95pp.
- 7 Rio-Maior H, Nakamura M, Álvares F, Beja P. 2019. Designing the landscape of coexistence:  
8 integrating risk avoidance, habitat selection and functional connectivity to inform large  
9 carnivore conservation. *Biol Conserv.* 235(2019):178–188.  
10 doi:10.1016/j.biocon.2019.04.021.
- 11 Rocha RG, Magalhães V, López-Bao J V, Van Der Loo W, Llaneza L, Alvares F, Esteves PJ,  
12 Godinho R. 2019. Alternated selection mechanisms maintain adaptive diversity in  
13 different demographic scenarios of a large carnivore. *BMC Evol Biol.* 19(1):90.  
14 doi:10.1186/s12862-019-1420-5.
- 15 Romero C, Heredia R, Pineda J, Serrano JA, Mendoza GD, Trápala P, Cordero AM. 2016.  
16 Efficacy of fluralaner in 17 dogs with sarcoptic mange. *Vet Dermatol.* 27(5):353.  
17 doi:10.1111/vde.12363.
- 18 Roncalli RA. 1987. The history of scabies in veterinary and human medicine from biblical to  
19 modern times. *Vet Herit.* 25(1):193–198.
- 20 Rowcliffe JM, Kays R, Kranstauber B, Carbone C, Jansen PA. 2014. Quantifying levels of  
21 animal activity using camera trap data. *Methods Ecol Evol.* 5(11):1170–1179.  
22 doi:10.1111/2041-210x.12278.
- 23 Rowcliffe M. 2019. Activity: animal activity statistics. [https://cran.r-](https://cran.r-project.org/package=activity)  
24 [project.org/package=activity](https://cran.r-project.org/package=activity).
- 25 Rowe ML, Whiteley PL, Carver S. 2019. The treatment of sarcoptic mange in wildlife: a  
26 systematic review. *Parasites and Vectors.* 12(1):99. doi:10.1186/s13071-019-3340-z.
- 27 RStudio Team. 2019. RStudio: Integrated Development for R. <http://www.rstudio.com/>.
- 28 Samuel WM. 1981. Attempted experimental transfer of sarcoptic mange (*Sarcoptes scabiei*,  
29 *Acarina: Sarcoptidae*) among red fox, coyote, wolf and dog. *J Wildl Dis.* 17(3):343–347.
- 30 Santos N, Carvalho H, Rio-Maior H, Nakamura M, Álvares F. 2012. Padrões espacio-  
31 temporais da sarna sarcóptica em canídeos selvagens e domésticos no Parque  
32 Nacional da Peneda-Gerês. In: III Iberian Wolf Congress. p. 22.
- 33 Santos N, Rio-Maior H, Nakamura M, Roque S, Brandão R, Álvares F. 2017. Characterization  
34 and minimization of the stress response to trapping in free-ranging wolves (*Canis*  
35 *lupus*): insights from physiology and behavior. *Stress.* 20(5):513–522.  
36 doi:10.1080/10253890.2017.1368487.
- 37 Sarasa M, Serrano E, Soriguer RC, Granados JE, Fandos P, Gonzalez G, Joachim J, Pérez  
38 JM. 2011. Negative effect of the arthropod parasite, *Sarcoptes scabiei*, on testes mass  
39 in Iberian ibex, *Capra pyrenaica*. *Vet Parasitol.* 175(3–4):306–312.  
40 doi:10.1016/j.vetpar.2010.10.024.
- 41 Schipper J, Chanson JS, Chiozza F, Cox N a, Hoffmann M, Katariya V, Lamoreux J, Rodrigues  
42 ASL, Stuart SN, Temple HJ, et al. 2008. The status of the world's land and marine  
43 mammals: diversity, threat, and knowledge. *Science.* 322:225–230.  
44 doi:10.1126/science.1165115.
- 45 Schwensow N, Fietz J, Dausmann KH, Sommer S. 2007. Neutral versus adaptive genetic

- 1 variation in parasite resistance: importance of major histocompatibility complex  
2 supertypes in a free-ranging primate. *Heredity* (Edinb). 99(3):265–277.  
3 doi:10.1038/sj.hdy.6800993.
- 4 Shelley DP, Gehring TM. 2002. Behavioral modification of gray wolves, *Canis lupus*, suffering  
5 from sarcoptic mange: importance of sequential monitoring. *Can Field-Naturalist*.  
6 116(4):648–650.
- 7 Skerratt LF. 2003. Cellular response in the dermis of common wombats (*Vombatus ursinus*)  
8 infected with *Sarcoptes scabiei* var. *wombati*. *J Wildl Dis*. 39(1):179–192.  
9 doi:10.7589/0090-3558-39.1.179.
- 10 Skerratt LF, Middleton D, Beveridge I. 1999. Distribution of life cycle stages of *Sarcoptes*  
11 *scabiei* var. *wombati* and effects of severe mange on common wombats in Victoria. *J*  
12 *Wildl Dis*. 35(4):633–646. doi:10.7589/0090-3558-35.4.633.
- 13 Skerratt L, Campbell N, Murrell A, Walton S, Kemp D, Barker S. 2002. The mitochondrial 12S  
14 gene is a suitable marker of populations of *Sarcoptes scabiei* from wombats, dogs and  
15 humans in Australia. *Parasitol Res*. 88(4):376–379. doi:10.1007/s00436-001-0556-5.
- 16 Skerratt LF, Skerratt JHL, Martin R, Handasyde K. 2004. The effects of sarcoptic mange on  
17 the behaviour of wild common wombats (*Vombatus ursinus*). *Aust J Zool*. 52(3):331–  
18 339. doi:10.1071/ZO02062.
- 19 Smith J. 2002. *Canis lupus*. *Animal Diversity Web*. [accessed 2020 Apr 1].  
20 [https://animaldiversity.org/accounts/Canis\\_lupus/](https://animaldiversity.org/accounts/Canis_lupus/).
- 21 Soglia D, Rasero R, Rossi L, Sartore S, Sacchi P, Maione S. 2007. Microsatellites as markers  
22 for comparison among different populations of *Sarcoptes scabiei*. *Ital J Anim Sci*.  
23 6(Suppl. 1):214–216. doi:10.4081/ijas.2007.1s.214.
- 24 Sorensen A, van Beest FM, Brook RK. 2014. Impacts of wildlife baiting and supplemental  
25 feeding on infectious disease transmission risk: a synthesis of knowledge. *Prev Vet*  
26 *Med*. 113(4):356–363. doi:10.1016/j.prevetmed.2013.11.010.
- 27 Soulsbury CD, Iossa G, Baker PJ, Cole NC, Funk SM, Harris S. 2007. The impact of sarcoptic  
28 mange *Sarcoptes scabiei* on the British fox *Vulpes vulpes* population. *Mamm Rev*.  
29 37(4):278–296. doi:10.1111/j.1365-2907.2007.00101.x.
- 30 Stephenson N, Clifford D, Worth SJ, Serieys LEK, Foley J. 2013. Development and validation  
31 of a fecal PCR assay for *Notoedres cati* and application to notoedric mange cases in  
32 bobcats (*Lynx rufus*) in Northern California, USA. *J Wildl Dis*. 49(2):303–311.  
33 doi:10.7589/2012-05-136.
- 34 Süld K, Valdmann H, Laurimaa L, Soe E, Davison J, Saarma U. 2014. An invasive vector of  
35 zoonotic disease sustained by anthropogenic resources: the raccoon dog in Northern  
36 Europe. *PLoS One*. 9(5):e96358. doi:10.1371/journal.pone.0096358.
- 37 Süld K, Tammeleht E, Valdmann H, Saarma U. 2017. Severe impact of sarcoptic mange on  
38 the movements and space use for one of its most important vector species, the raccoon  
39 dog. *Vet Parasitol*. 243:67–70. doi:10.1016/j.vetpar.2017.05.029.
- 40 Tanner E, White A, Acevedo P, Balseiro A, Marcos J, Gortázar C. 2019. Wolves contribute to  
41 disease control in a multi-host system. *Sci Rep*. 9(1):7940. doi:10.1038/s41598-019-  
42 44148-9.
- 43 Trainer DO, Hale JB. 1969. Sarcoptic mange in red foxes and coyotes of Wisconsin. *Wildl Dis*.  
44 5(4):387–391. doi:10.7589/0090-3558-5.4.387.
- 45 Tsutsumi M, Nishiura H, Kobayashi T. 2005. Dementia-specific risks of scabies: retrospective

- 1 epidemiologic analysis of an unveiled nosocomial outbreak in Japan from 1989-90.  
2 BMC Infect Dis. 5:85. doi:10.1186/1471-2334-5-85.
- 3 Walker ED, Stachecki JA. 2002. Livestock pest management: a training manual for commercial  
4 pesticide applicators. p. 45–59.
- 5 Walton SF, Currie BJ. 2007. Problems in diagnosing scabies, a global disease in human and  
6 animal populations. Clin Microbiol Rev. 20(2):268–279. doi:10.1128/CMR.00042-06.
- 7 WHO. Scabies. [accessed 2020 Mar 17]. [https://www.who.int/westernpacific/health-](https://www.who.int/westernpacific/health-topics/scabies)  
8 [topics/scabies](https://www.who.int/westernpacific/health-topics/scabies).
- 9 Van Wick M, Hashem B. 2019. Treatment of sarcoptic mange in an american black bear (*Ursus*  
10 *americanus*) with a single oral dose of fluralaner. J Wildl Dis. 55(1):250–253.  
11 doi:10.7589/2017-12-310.
- 12 Wong SSY, Poon RWS, Chau S, Wong SCY, To KKW, Cheng VCC, Fung KSC, Yuen KY.  
13 2015. Development of conventional and real-time quantitative PCR assays for  
14 diagnosis and monitoring of scabies. J Clin Microbiol. 53(7):2095–2102.  
15 doi:10.1128/JCM.00073-15.
- 16 Zahler M, Essig A, Gothe R, Rinder H. 1999. Molecular analyses suggest monospecificity of  
17 the genus *Sarcoptes* (Acari: Sarcoptidae). Int J Parasitol. 29(5):759–766.  
18 doi:10.1016/s0020-7519(99)00034-x.
- 19 Zuk M. 2009. The sicker sex. PLoS Pathog. 5(1):e1000267. doi:10.1371/journal.ppat.1000267.
- 20 Zumpt F, Ledger JA. 1973. Present epidemiological problems of sarcoptic mange in wild and  
21 domestic animal. South African J Wildl Res. 3(2):119–120.
- 22



1 Tabela A2 Parametrizações do melhor modelo e modelos com  $\Delta AICc < 4$ . As diferenças em relação ao melhor modelo são destacadas em negrito.

#	Parametrização dos modelos					nP	Desvio	AICc	$\Delta AICc$
	Sobrevivência	Transição entre estados	Deteção	Teste para a sarna	Atribuição de estado				
1	Idade 1: constante Idade 2: constante  GEMACO: a (1) +a (2)	Prob. S+ para S- constante  Prob. S- para S+ covariável temporal - seroprevalência do mesmo ano  GEMACO: f (1) .to (2) +f (2) .to (1) . [i+t*x]	Constante  GEMACO: firste+nexte	Prob. não ser testado = 0,247  GEMACO: i IVFV: f ([2:3]) .to (4) =0.247	Prob. S- testar positivo = 0  GEMACO: f IVFV: f (3) .to (3) =0	8	1,097.96	1,114.40	0
2	Idade 1: constante <b>Idade 2: efeito da sarna</b>  GEMACO: a (1) +a (2) .f	Prob. S+ para S- constante  Prob. S- para S+ covariável temporal - seroprevalência do mesmo ano  GEMACO: f (1) .to (2) +f (2) .to (1) . [i+t*x]	Constante  GEMACO: firste+nexte	Prob. não ser testado = 0,247  GEMACO: i IVFV: f ([2:3]) .to (4) =0.247	Prob. S- testar positivo = 0  GEMACO: f IVFV: f (3) .to (3) =0	9	1,096.33	1,114.88	0.48
3	Idade 1: constante <b>Idade 2: efeito da sarna e do sexo</b>  GEMACO: a (1) +a (2) . [f (1) .to (1) .g (1,2) +f (2) .to (2) ]	Prob. S+ para S- constante  Prob. S- para S+ covariável temporal - seroprevalência do mesmo ano  GEMACO: f (1) .to (2) +f (2) .to (1) . [i+t*x]	Constante  GEMACO: firste+nexte	Prob. não ser testado = 0,247  GEMACO: i IVFV: f ([2:3]) .to (4) =0.247	Prob. S- testar positivo = 0  GEMACO: f IVFV: f (3) .to (3) =0	10	1,095.20	1,115.87	1.47

4	<p>Idade 1: constante Idade 2: constante</p> <p>GEMACO: <math>a(1) + a(2)</math></p>	<p>Prob. S+ para S- constante</p> <p>Prob. S- para S+ covariável temporal - seroprevalência do mesmo ano</p> <p>GEMACO: <math>f(1) \cdot \text{to}(2) + f(2) \cdot \text{to}(1) \cdot [i+t*x]</math></p>	<p>Constante</p> <p>GEMACO: <math>\text{firste} + \text{nexte}</math></p>	<p>Prob. não ser testado = 0,247</p> <p>GEMACO: <math>i</math></p> <p>IVFV: <math>f([2:3]) \cdot \text{to}(4) = 0.247</math></p>	<p><b>Sem restrições</b></p> <p>GEMACO: <math>f</math></p>	9	1,097.96	1,116.51	2.11
5	<p><b>Idade 1: efeito da sarna</b> <b>Idade 2: efeito da sarna</b></p> <p>GEMACO: <math>a(1) \cdot f + a(2) \cdot f</math></p>	<p>Prob. S+ para S- constante</p> <p>Prob. S- para S+ covariável temporal - seroprevalência do mesmo ano</p> <p>GEMACO: <math>f(1) \cdot \text{to}(2) + f(2) \cdot \text{to}(1) \cdot [i+t*x]</math></p>	<p>Constante</p> <p>GEMACO: <math>\text{firste} + \text{nexte}</math></p>	<p>Prob. não ser testado = 0,247</p> <p>GEMACO: <math>i</math></p> <p>IVFV: <math>f([2:3]) \cdot \text{to}(4) = 0.247</math></p>	<p>Prob. S- testar positivo = 0</p> <p>GEMACO: <math>f</math></p> <p>IVFV: <math>f(3) \cdot \text{to}(3) = 0</math></p>	10	1,096.22	1,116.90	2.50

1

**Legenda:** nP - número de parâmetros estimados;  $\Delta\text{AICc}$  - diferença entre o AICc do modelo actual e o do melhor modelo

## Anexo 2. Abstract Scientific Reports

Novel method for non-invasive molecular survey of sarcoptic mange in wildlife: diagnostic performance in wolves evaluated by multievent capture-recapture models

Corresponding Author: Julieta Rousseau

*Scientific Reports*

c301133d-ea3d-4cb5-8414-daf5d4af0ff1 | v.1.0

### **Novel method for non-invasive molecular survey of sarcoptic mange in wildlife: diagnostic performance in wolves evaluated by multievent capture-recapture models**

**Julieta Rousseau<sup>1,2,\*</sup>, Mónica Nakamura<sup>2,3</sup>, Helena Rio-Maior<sup>2</sup>, Francisco Álvares<sup>2</sup>, Rémi Choquet<sup>4</sup>, Luís Madeira de Carvalho<sup>1,\*</sup>, Raquel Godinho<sup>2,3</sup>, Nuno Santos<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> CIISA – Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon, Avenida da Universidade Técnica, 1300-477 Lisbon, Portugal.

<sup>2</sup> CIBIO/InBIO – Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Universidade do Porto, Campus de Vairão, 4485-661 Vairão, Portugal.

<sup>3</sup> Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Porto, 4169-007 Porto, Portugal.

<sup>4</sup> CEFE – Centre d'Écologie Fonctionnelle et Évolutive, UMR 5175, CNRS, University of Montpellier, 1919 Route de Mende, FR-34293 Montpellier cedex 5, France.

#### **ABSTRACT**

Sarcoptic mange is globally enzootic and non-invasive methods for its surveillance in wildlife with high diagnostic specificity are lacking. We describe the molecular detection of *S. scabiei* in non-invasively collected faecal samples, targeting the 16S rDNA gene. We apply this method to 843 wolf *Canis lupus* faecal samples collected from 2006-2018 in north-western Portugal. We integrate this data with wolf and red fox *Vulpes vulpes* serological data (81 samples from 1997-2019) in multievent capture-recapture models. Mean predicted prevalence in wolves by non-invasive molecular analysis from 2006-2018 was 7.2% (CI<sub>95</sub> 5.0-9.4%; range: 2.6-11.7%), highest in 2009. The mean predicted seroprevalence in wolves was 45.4% (CI<sub>95</sub> 30.3-60.5%; range: 11.6-94.8%), peaking in 2006-2009. Multievent capture-recapture models estimated moderate diagnostic sensitivity (34.0%, CI<sub>95</sub> 15.9-58.4%) and no false positive results for the molecular method. Individually identified wolves infected with sarcoptic mange showed a tendency for higher mortality compared to uninfected wolves ( $\Delta$ Mortality 0.184, CI<sub>95</sub> -0.152-0.496). Long-term serology data highlights the endemicity of sarcoptic mange in wild canids but uncovers multi-year epidemics. This study developed and evaluated a novel method for surveying sarcoptic mange in wildlife populations by the molecular detection of *S. scabiei* in faecal samples, standing out for its high specificity and non-invasive character.

# 1 Anexo 3. Abstract Jornadas de Dermatologia de Paris

2



## Maladies infectieuses

JDP2020-ABS-701

### Efficacité d'une forte dose d'ivermectine et d'une dose unique de moxidectine dans un modèle porcin de gale

Charlotte Gary<sup>1,2</sup>, Amaury Briand<sup>2,3</sup>, Anne Lespine<sup>4</sup>, Ludwig S. Aho<sup>5</sup>, Amaud Jannic<sup>1</sup>, Julieta Rousseau<sup>2</sup>, Lucy Foucher<sup>6</sup>, Thomas Lillin<sup>6</sup>, Françoise Botterel<sup>2,7</sup>, Olivier Chosidow<sup>1</sup>, Jacques Guillot<sup>2,3</sup>, Charlotte Bernigaud<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dermatologie, AP-HP, Hôpital Henri Mondor, Faculté de Santé, UPEC, Créteil, <sup>2</sup>EA 7380, DYNAMYC, Université Paris-Est Créteil, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, USC Anses, <sup>3</sup>Parasitologie, Mycologie et Dermatologie, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, <sup>4</sup>INTHERES, Université de Toulouse, INRA, ENVT, Toulouse, <sup>5</sup>Epidémiologie et hygiène hospitalière, CHU Le Bocage, Dijon, <sup>6</sup>Centre de recherche biomédicale (CRBM), Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, <sup>7</sup>Microbiologie, Parasitologie et Mycologie, AP-HP, Hôpital Henri Mondor, Faculté de Santé, UPEC, Créteil, France

**Choix du type de présentation:** Indifférent (Communication orale ou poster)

**Si votre abstract est refusé aux Journées Dermatologiques de Paris, acceptez-vous de le présenter lors d'une séance des jeudis de la Société Française de Dermatologie?:** Oui

**Introduction:** L'arsenal thérapeutique de la gale reste limité. L'ivermectine (IVM), disponible par voie orale, a une efficacité limitée et est possiblement utilisée sous-dosée à 200µg/kg. Aucune étude n'a évalué la dose efficace chez l'homme pour la gale. Son usage à une forte dose de 400µg/kg a montré la preuve de son efficacité pour d'autres ectoparasitoses (*i.e.* poux de tête). La moxidectine (MOX) en dose unique de 300µg/kg a montré une activité acaricide supérieure et plus rapide que l'IVM 200µg/kg dans le modèle porcin et est en cours de développement chez l'homme. L'objectif de notre étude était de comparer l'efficacité de l'IVM forte dose et de la MOX par rapport à l'IVM dose standard dans le modèle porcin de gale.

**Matériel et Méthodes:** Des porcs ont été expérimentalement infestés par *Sarcoptes scabiei* var. *suis*, après avis éthique. A S11 postinfestation, 12 porcs ont été randomisés en 4 groupes de 3 et traités à l'insu des observateurs. Le 1<sup>er</sup> groupe a reçu l'IVM orale (Ivermectine®) à la dose de 400µg/kg (J0 et J8), le 2<sup>ème</sup> la MOX orale (Equest®) à 300µg/kg (J0), le 3<sup>ème</sup> l'IVM orale (Ivermectine®) à 200µg/kg (J0 et J8) et le 4<sup>ème</sup> groupe, non traité, a servi de contrôle. Pour suivre l'infestation, les sarcoptes ont été comptés dans des raclages cutanés ; des scores cliniques et de prurit ont été utilisés. Le critère de jugement principal était l'absence de sarcoptes à J8. Le critère secondaire était la diminution du score clinique et du prurit analysée par un modèle de régression non linéaire.

**Résultats:** A J8, aucun sarcopte n'a pu être mis en évidence dans les raclages provenant des porcs des groupes IVM 400µg/kg et MOX alors qu'un des 3 porcs du groupe IVM 200µg/kg était encore parasité (différences NS). Le score clinique a diminué pour les porcs des 3 groupes traités alors qu'il est resté élevé chez les contrôles, de façon significativement plus importante pour le groupe MOX que pour les groupes IVM 200µg/kg ( $p=0,001$ ) et IVM 400µg/kg ( $p=0,011$ ). Aucun effet secondaire n'a été observé.

**Discussion:** Les résultats montrent l'absence de sarcoptes à J8 chez les porcs traités par une forte dose d'IVM et une seule dose de MOX et la présence d'un faible nombre chez 1/3 des porcs traités par une dose standard d'IVM. La pharmacocinétique de ces 2 lactones macrocycliques diffère : la MOX plus lipophile, a une absorption rapide et une demi-vie plasmatique et cutanée longue ; l'IVM administrée à une forte dose est aussi efficace, possiblement par accumulation dans le *stratum corneum*. Cette hypothèse est en cours de vérification par une étude pharmacologique.

**Conclusion :** Cette étude permet de justifier des nouvelles alternatives pour optimiser le traitement de la gale : une forte dose d'IVM est en cours d'évaluation pour les gales sévères (NCT02841215) et la MOX est en cours d'évaluation chez l'homme dans une étude de phase II (NCT03905265).

3

4

5

1 **Anexo 4. Declaração de apresentação oral**  
2



Établissement d'enseignement  
supérieur et de recherche du  
Ministère de l'agriculture et de l'alimentation  
**PORTEUR D'HISTOIRE  
ACTEUR D'AVENIR**

**Unité de Parasitologie, Mycologie, Dermatologie**

**Enseignants-chercheurs**

- Dr Radu **BLAGA\***  
Maître de Conférences en Parasitologie  
01 43 96 72 15  
radu.blaga@vet-alfort.fr
- Dr Amaury **BRIAND\*\***, DPL, ECVB  
Assistant d'enseignement et de recherche  
contractuel en Dermatologie  
01 43 96 72 01  
amaury.briand@vet-alfort.fr
- Pr Jacques **GUILLOT**, DPL, INVPC  
Professeur en Parasitologie  
01 43 96 72 02  
jacques.guilLOT@vet-alfort.fr  
Responsable de l'Unité
- Dr Bruno **POLACK**  
Maître de Conférences en Parasitologie  
01 43 96 72 03  
bruno.polack@vet-alfort.fr
- Dr Verónica **RISCO-CASTILLO**  
Maître de Conférences en Parasitologie  
01 43 96 72 19  
veronica.risco-castillo@vet-alfort.fr
- Consultants en Dermatologie**
- Dr Noëlle **COCHET FAIVRE\*\***, DPL, ECVB  
Praticien hospitalier  
01 43 96 72 08  
noelle.cochet-faivre@vet-alfort.fr
- Dr Odile **CROSAZ\*\***  
Praticien hospitalier adjoint  
01 43 96 72 08  
odile.crosaz@vet-alfort.fr
- Dr Hélène **DROPSY\*\***  
Assistant hospitalier  
01 43 96 72 08  
helene.dropsy@vet-alfort.fr

Rattaché au Département des Productions Animales et  
à Santé Publique (DPA/SP)

\* Rattachés au Département d'Élevage et de Pathologie  
des Équines et des Canines (DEPEC)

**Cliniques de Dermatologie et  
Parasitologie**

Rendez-vous des cliniques du Centre  
Hospitalier Universitaire Vétérinaire  
d'Alfort (CHUVA)

**Laboratoire BioPôle Alfort**

Secteur Parasitologie-Mycologie

**Recherche**

Unité mixte de recherche BIPAR, EnvA,  
Anses, INRA, équipe Parasit

Équipe d'accueil Dynamyc, UPEC, EnvA,  
USC Anses, Faculté de Médecine de  
Orléans

École nationale vétérinaire d'Alfort  
7, avenue du général de Gaulle  
94 704 Maisons-Alfort Cedex  
01 43 96 71 00  
vet-alfort.fr

Alfort, 28 July 2020

**Attestation of presentation by Julietta ROUSSEAU**

I, undersigned Professor Jacques GUILLOT, head of the Parasitology dept of the Veterinary College of Alfort (EnvA), certify that Julietta ROUSSEAU made a presentation entitled "New methodologies for the study of sarcoptic mange epidemiology in wild carnivores" on 17 February 2020. This presentation was made during her traineeship in EnvA. The presentation and the subsequent discussion were highly appreciated by all the participants (the members of the research unit Dynamyc).

