

Universidade de Lisboa

Faculdade de Medicina de Lisboa



**Estudo da Prevalência de Doenças Associadas a  
Vectores em Canídeos Domésticos  
do Distrito de Bragança**

Candidata: Teresa Catarina Dias Figueiredo

Mestrado em Microbiologia Clínica

Ano 2007



**A impressão desta dissertação foi aprovada pela Comissão  
Coordenadora do Conselho Científico da Faculdade de  
Medicina de Lisboa em reunião de 15 de Janeiro de 2008**



Universidade de Lisboa

Faculdade de Medicina de Lisboa



**Estudo da Prevalência de Doenças Associadas a  
Vectores em Canídeos Domésticos  
do Distrito de Bragança**

Candidata: Teresa Catarina Dias Figueiredo

Mestrado em Microbiologia Clínica

Dissertação orientada pela Doutora Sofia Núncio  
e pelo Prof. Doutor Pedro Simas.

Todas as informações efectuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade da sua autora, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina de Lisboa pelos conteúdos nele apresentados.

## Resumo

Foi realizado um rastreio serológico de doenças associadas a vectores efectuado a 473 canídeos de seis concelhos do distrito de Bragança. Foram recolhidos e estudados 135 ixodídeos de 6 espécies a parasitar os canídeos, em que 14,07% (19/135) estavam infectados, tendo-se estimado por PCR uma taxa de infecção de 2,2% para *Ehrlichia (E.) canis*, 5,9% para *Francisella (F.) tularensis* e 5,9% para *Rickettsia conorii*. A sequenciação dos produtos de PCR confirmou a presença de *E. canis* em 3 *Rhipicephalus (R.) sanguineus*, *Francisella* endosymbiont de *Dermacentor (D.) variabilis* em 1 *D. reticulatus*, *Rickettsia conorii* em 1 *R. sanguineus*, *Rickettsia slovacica* em 1 *D. marginatus* e *Rickettsia bar29* em 3 *R. sanguineus*. As doenças investigadas por imunofluorescência indirecta foram anaplasmoze granulocítica canina, borreliose de Lyme, erlichiose monocítica canina, febre botonosa canina; tularémia por aglutinação em placa, e babesiose e hepatozoonose canina por observação de esfregaço de sangue periférico. Apenas 16,3% dos canídeos apresentavam sinais clínicos compatíveis com estas patologias. Dos resultados serológicos 65% dos cães apresentaram anticorpos para as doenças em estudo: 17,6%±0,045 de anaplasmoze granulocítica canina, 12,7%±0,039 para borreliose de Lyme, 14,8%±0,042 para erlichiose monocítica canina, 55,3%±0,059 para febre botonosa canina e 2,5%±0,019 para tularémia. Em 2,1% (10/473) dos esfregaços foi possível observar formas de *Hepatozoon canis* e não foram identificadas formas de *Babesia canis*. Por PCR estimou-se uma prevalência de infecção nos canídeos de 0,85% para *E. canis*, 0,2% para *F. tularensis*, e 1,7% para *R. conorii*. A sequenciação dos resultados positivos por PCR confirmou a presença, em canídeos sintomáticos, de *E. canis* em 4 canídeos e de *Rickettsia sp.* em 8 canídeos. Foram determinados, estatisticamente, factores de risco, que variaram consoante as doenças em estudo.

Palavras-chave: Doenças por vectores, canídeos, serologia, PCR, Portugal.

## Abstract

A serological survey for vector-borne diseases was made in 473 domestic dogs from Bragança district of Portugal. Of the 135 ticks collected, 19 (14,07%) had some kind of parasite and an infection prevalence was estimated of 2,2% for *Ehrlichia (E.) canis*, 5,9% for *Francisella (F.) tularensis* and 5,9% for *Rickettsia conorii*. Sequence analysis of the positive PCR samples confirmed the presence of *E. canis* in 3 *R. sanguineus*, *Francisella* endosymbiont of *Dermacentor variabilis* in 1 *D. reticulatus*, *Rickettsia conorii*, in 1 *R. sanguineus*, *Rickettsia slovaca* in 1 *D. marginatus* and *Rickettsia bar29* in 3 *R. sanguineus*. An indirect fluorescent-antibody test was used to study the seroprevalence of canine granulocytic anaplasmosis, Lyme borreliosis, canine monocytic ehrlichiosis and mediterranean spotted fever. Tularemia was studied by plate agglutination, canine babesiosis and canine hepatozoonosis was studied by peripheral blood smears. Only 16,3% of the dogs showed clinical signs possibly associated with these pathologies. *Hepatozoon canis* was found in 2,1% (10/473) of the blood smears but no *Babesia canis* were found. The results revealed that 65% of the dogs showed some serologic positive result with a total seroprevalence of  $17,6\% \pm 0,045$  for canine granulocytic anaplasmosis,  $12,7\% \pm 0,039$  for Lyme borreliosis,  $14,8\% \pm 0,042$  for canine monocytic ehrlichiosis,  $55,3\% \pm 0,059$  for mediterranean spotted fever and  $2,5\% \pm 0,019$  for tularemia. The dogs were also studied by PCR and an infection prevalence was estimated of 0,85% for *E. canis*, 0,2% for *F. tularensis* and 1,7% for *R. conorii*. Sequence analysis of the positive PCR samples, in symptomatic dogs, confirmed the presence of *E. canis* in 4 dogs and the presence of *Rickettsia sp.* in 8 dogs. Several risk factors were determined, by statistical tests, for each disease, with different results for each one.

Keywords: vector-borne diseases, dogs, serological survey, PCR, Portugal.

## **Agradecimentos**

Embora uma dissertação seja, por definição, um trabalho individual, existiram contributos de natureza diversa sem os quais o presente trabalho não teria sido possível realizar. Assim, aproveito a oportunidade para expressar:

À Doutora Maria Sofia Nuncio, não apenas por ter aceite ser minha orientadora, mas pelos inestimáveis contributos da sua exigente orientação e, principalmente, pela sua amizade e permanente disponibilidade;

Ao Professor Doutor J. Pedro Simas, por ter aceite ser meu co-orientador e pelo incentivo e entusiasmo que transmitiu desde o primeiro momento;

Ao Professor Doutor Manuel D'Orey Cancela D'Abreu, cuja compreensão e amizade tornaram possível a realização do presente mestrado, quer na parte curricular quer na elaboração da dissertação;

À Professora Doutora Ludovina Padre pelo apoio incondicional e pela disponibilização das instalações e equipamentos do Laboratório de Parasitologia “Vitor Caeiro”;

Ao Professor Doutor Vitor Caeiro pela disponibilidade e pelo apoio prestado na análise das questões técnicas;

À Maria João Vila Viçosa pela colaboração inexcedível na coloração dos esfregaços sanguíneos e pelo estímulo constante que sempre me transmitiu;

Ao Dr. Paulo Ferreira pela sua inestimável contribuição para o tratamento estatístico dos dados recolhidos;

Aos colegas veterinários, sem os quais o trabalho de campo teria sido impossível e que me acolheram de forma entusiástica e amigável, nomeadamente o Dr. Duarte Diz Lopes, Dr.

Luís Afonso, Dra. Elisabete Gonçalves, Dr. Manuel Godinho, Dr. Afonso Pimentel e Dr. João Gonçalves;

A todos os investigadores e funcionários do CEVDI que me receberam e apoiaram de forma inexprimível, nomeadamente a Dra. Ana Sofia Santos, Dr. Hugo Osório, Dra. Isabel Lopes de Carvalho, Dra. Líbia Zé-Zé, Dra. Natasha Milhano, Dra. Rita Sousa, Dra. Teresa Luz e Sr. Paulo Parreira;

Ao Dr. Nuno Alexandre pelos seus esclarecimentos e pela disponibilização dos dados da sua tese de dissertação;

À Merial, pela pessoa do Dr. Pedro Fabrica, pelo contributo relevante na obtenção dos reagentes necessários à realização dos ensaios laboratoriais;

À Euroveterinária, pela pessoa da Dra. Maria Sarabia, pela facilidade no fornecimento das lâminas comerciais de *E. canis*;

Aos funcionários das Câmaras Municipais e ADS que me prestaram um auxílio incansável nas colheitas de amostras;

À minha família e amigos, por todo o apoio e compreensão nestes tempos trabalhosos,

Muito Obrigada.

## Índice geral

Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Agradecimentos.....	viii
Índice geral.....	x
Índice de figuras.....	xiii
Índice de tabelas.....	xv
Lista de abreviaturas e siglas.....	xvi
I. Introdução.....	1
1.1 Ixodídeos.....	2
1.1.1 <i>Dermacentor marginatus</i> .....	4
1.1.2 <i>Dermacentor reticulatus</i> .....	5
1.1.3 <i>Ixodes ricinus</i> .....	6
1.1.4 <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .....	8
1.2 Diagnóstico etiológico laboratorial das doenças associadas a vectores.....	10
1.2.1 Diagnóstico directo.....	10
1.2.1.1 Microscopia óptica.....	10
1.2.1.2 Cultura.....	11
1.2.1.3 Métodos moleculares: PCR (Polymerase Chain Reaction)..	11
1.2.2 Diagnóstico indirecto.....	12
1.2.2.1 Imunofluorescência indirecta (IFI) .....	13
1.2.2.2 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) .....	14
1.2.2.3 Immunoblot.....	14
1.3 Anaplasmosse granulocítica canina.....	15
Etiologia.....	15
Vector e Ciclo de vida.....	16
Patogénese.....	17
Sinais clínicos.....	18
Diagnóstico .....	19
Tratamento.....	21
1.4 Babesiose canina.....	22
Etiologia.....	22
Vector e Ciclo de vida.....	23
Patogénese.....	25
Sinais clínicos .....	27
Diagnóstico.....	29
Tratamento.....	30
1.5 Borreliose de Lyme canina.....	32
Etiologia.....	32
Vector e Ciclo de vida.....	33
Patogénese.....	35
Sinais clínicos .....	37
Diagnóstico.....	38
Tratamento.....	40

1.6 Erlichiose monocítica canina.....	42
Etiologia.....	42
Vector e Ciclo de vida.....	43
Patogénese.....	44
Sinais clínicos .....	47
Diagnóstico.....	49
Tratamento.....	52
1.7 Febre botonosa canina.....	55
Etiologia.....	55
Vector e Ciclo de vida.....	56
Patogénese.....	58
Sinais clínicos .....	59
Diagnóstico.....	59
Tratamento.....	62
1.8 Hepatozoonose canina.....	63
Etiologia.....	63
Vector e Ciclo de vida.....	64
Patogénese.....	65
Sinais clínicos .....	66
Diagnóstico.....	67
Tratamento.....	68
1.9 Tularémia canina.....	70
Etiologia.....	70
Vector e Ciclo de vida.....	71
Patogénese.....	73
Sinais clínicos .....	75
Diagnóstico.....	76
Tratamento.....	78
II. Objectivos.....	81
III. Materiais e Métodos.....	82
1. Enquadramento geográfico da área de estudo .....	82
1.1. Concelho de Bragança.....	82
1.2. Concelho de Carrazeda de Ansiães.....	83
1.3. Concelho de Miranda do Douro.....	84
1.4. Concelho de Vimioso.....	85
1.5. Concelho de Vinhais.....	86
2. Ixodídeos.....	87
2.1. Colheitas.....	87
2.2. Extracção de ADN.....	87
3. Canídeos.....	88
3.1. Amostra.....	88
3.2. Colheitas.....	89
3.3. Esfregaços de sangue periférico.....	90
3.4. Imunofluorescência indirecta.....	90
3.5. Aglutinação em placa.....	92

4. Biologia molecular.....	93
4.1 Extracção de ADN do sangue.....	93
4.2. PCR.....	93
4.3. Purificação e sequenciação dos produtos de PCR.....	98
5. Métodos estatísticos.....	99
IV. Resultados.....	101
1. Ixodídeos.....	101
1.1. Espécies e sexo.....	101
1.2. Biologia molecular.....	103
1.2.1 PCR.....	103
1.2.2. Purificação e sequenciação dos produtos de PCR.....	105
2. Canídeos.....	106
2.1. Inquéritos epidemiológicos.....	106
2.2. Exame clínico.....	112
2.3. Esfregaços de sangue periférico.....	113
2.4. Serologia.....	115
2.4.1. Imunofluorescência indirecta.....	115
2.4.2. Aglutinação em placa.....	117
2.5. Biologia molecular.....	117
2.5.1. PCR.....	117
2.5.2 Purificação e sequenciação dos produtos de PCR.....	119
2.6. Comparação dos resultados obtidos por PCR com os obtidos por esfregaço de sangue periférico dos canídeos.....	120
2.7. Resultados estatísticos.....	121
V. Discussão.....	124
VI. Conclusões.....	140
VII. Direcções futuras.....	144
VIII. Referências bibliográficas.....	146
IX. Anexos.....	177

## Índice de figuras

Fig. 1 – Os concelhos do distrito de Bragança sob estudo assinalados com circunferência.....	82
Fig. 2 – As freguesias do concelho de Bragança.....	82
Fig. 3 – As freguesias do concelho de Carrazeda de Ansiães.....	83
Fig. 4 – As freguesias do concelho de Miranda do Douro.....	84
Fig. 5– As freguesias do concelho de Vimioso.....	85
Fig. 6 – As freguesias do concelho de Vinhais.....	86
Fig. 7 - Distribuição das espécies de ixodídeos colhidos.....	102
Fig. 8 - <i>D. marginatus</i> : fêmea .....	102
Fig. 9 - <i>D. marginatus</i> : macho .....	102
Fig. 10 - <i>D. reticulatus</i> : fêmea - rostro .....	102
Fig. 11 - <i>D. reticulatus</i> : macho.....	102
Fig. 12 - <i>I. hexagonus</i> : fêmea .....	102
Fig. 13 - <i>I. ricinus</i> : fêmea engorgitada .....	102
Fig. 14 - <i>R. pusillus</i> : fêmea engorgitada.....	103
Fig. 15 - <i>R. pusillus</i> : macho.....	103
Fig. 16 - <i>R. sanguineus</i> : ninfa .....	103
Fig. 17 - <i>R. sanguineus</i> : ninfa vs macho .....	103
Fig. 18 – <i>R. sanguineus</i> : fêmea .....	103
Fig. 19 – <i>R. sanguineus</i> : macho .....	103
Fig. 20 - Gel de agarose com amplicons de ADN de <i>F. tularensis</i> amplificados por PCR...	104
Fig. 21 – Gamonte de <i>H. canis</i> (Giemsa, 1000×).....	114
Fig. 22 – IFI positiva a <i>A. phagocytophilum</i> (400×) .....	116
Fig. 23 – IFI positiva a <i>B. burgdorferi</i> s.l. (400×).....	116

Fig. 24 – IFI positiva a <i>E. canis</i> (400×) .....	116
Fig. 25 – IFI positiva a <i>R. conorii</i> (400×) .....	116
Fig. 26 – Reacção positiva de aglutinação para <i>F. tularensis</i> (canto superior esquerdo). .....	117
Fig. 27 - Gel de agarose com amplicons de ADN de <i>E. canis</i> , <i>R. conorii</i> e <i>A. phagocytophilum</i> amplificados por PCR. ....	119
Fig. 28 – Formação tipo mórula (seta branca) no interior de um monócito (Giemsa, 1000×).....	121

## Índice de tabelas

Tabela 1– Determinação dos valores da amostra por concelho .....	89
Tabela 2 – Os ixodídeos capturados em canídeos por concelho: espécies, sexo e estágio evolutivo.....	101
Tabela 3- Resultados diferenciados da sequenciação dos ixodídeos .....	106
Tabela 4 – Sexo e idade dos canídeos intervencionados.....	107
Tabela 5 – Área de residência dos canídeos.....	108
Tabela 6 – Aptidões dos animais intervencionados .....	109
Tabela 7 – Contactos dos canídeos com outros animais .....	109
Tabela 8 – Acesso dos canídeos ao exterior.....	109
Tabela 9 – Contactos dos canídeos com peças de caça.....	110
Tabela 10 – Acesso dos canídeos a Espanha.....	111
Tabela 11 – Profilaxia para ixodídeos.....	112
Tabela 12 – Alterações ao exame clínico.....	113
Tabela 13 – Resultados diferenciados dos esfregaços de sangue periférico .....	114
Tabela 14 - Valores das prevalências serológicas dos agentes em estudo .....	116
Tabela 15- Resultados das sequenciações dos ADN microbianos detectados nos canídeos em estudo .....	120
Tabela 16 - Resultados do teste de qui-quadrado e teste de Fisher entre as doenças em estudo e a dependência de factores .....	123

## Lista de abreviaturas e siglas

ACVIM: Colégio Americano de Veterinários de Medicina Interna.

ADN: Ácido desoxiribonucleico.

AGC.: anaplasrose granulocítica canina.

BID: duas vezes ao dia, geralmente de 12 em 12 horas.

BLC: borreliose de Lyme canina.

bp: pares de bases.

BSK II: meio de Barbour, Stoenner, Kelly II.

CEVDI: Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas.

DAAP: Dermatite alérgica à picada da pulga.

EDTA: Ácido etileno-diamino-tetra-acético.

ELISA: “Enzyme-linked immunosorbent-assay”.

EMC: ehrlichiose monocítica canina.

ERIC-PCR: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence PCR

EUA: Estados Unidos da América.

FBC: febre botonosa canina.

FIV: vírus da imunodeficiência felina.

g: grama.

*gtlA*: gene da citrato sintetase.

ha: hectare.

HC: hepatozoonose canina.

HL-60: linha celular “Human promyelocytic leukaemia”.

IFI: imunofluorescência indirecta.

IFN- $\gamma$ : interferon-gamma.

IgG, IgM: imunoglobulina G e M.

IL-2, IL-8: interleucina 2 e 8.

IM: intramuscular.

IOE: *Ixodes ovatus* Ehrlichia.

IV: intravenosa.

KDa: kilo-dalton.

Kg: quilograma.

mA: miliampere.

MAP2: “Major antigen protein”.

mg: miligrama.

NK: células “natural killer”.

OmpA, OmpB: “Outer membrane protein” A, B.

OspA, OspC, OspF: “Outer surface protein” A, C, F.

PBS: tampão fosfato salino.

PCR: “Polymerase chain reaction”.

PO: *per os*, por via oral.

rpm: rotações por minuto.

rRNA: “ribossomal ribonucleic acid”.

SC: via subcutânea.

SID: uma vez ao dia, de 24 em 24 horas.

s.l.: *sensu lato*.

s.s.: *sensu stricto*.

RAPD-PCR: “Random Amplified Polymorphic DNA-PCR”

REP-PCR: “Repetitive Extragenic Palindromic Element PCR”

TC: tularémia canina.

TBE: Tris-Borato 0,045 M, EDTA 0,001 M.

TID: três vezes ao dia, de 8 em 8 horas.

TNF- $\alpha$ : factor de necrose tumoral-alfa.

VlsE: “Variable major protein-like sequence expressed”.

*vs*: versus.

UI: unidades internacionais.

## I. Introdução

Os recentes relatos da presença de novos patógenos no território nacional, como a *Francisella tularensis* e *Anaplasma phagocytophilum*, tanto em vectores como em hospedeiros humanos, tornam com que o assunto das doenças associadas a vectores, em Portugal, seja emergente. Assim, este estudo foi elaborado, no intuito de poder contribuir para o estudo das doenças associadas a vectores em canídeos domésticos.

Na presente dissertação, na primeira parte, segue-se uma descrição geral das principais espécies de ixodídeos presentes em Portugal com maior importância em Medicina Veterinária, nomeadamente em medicina de animais de companhia, quer pela frequência com se encontram a parasitar os canídeos, quer pelo seu poder vectorial e reservatório de agentes patogénicos. De igual modo, será reservado um capítulo acerca do diagnóstico laboratorial das doenças associadas a vectores, direccionado às patologias em estudo, com destaque para as vantagens e limitações gerais das técnicas laboratoriais. Por último, na revisão bibliográfica, serão descritas as doenças em estudo que apresentam como elo comum, o facto de serem doenças bacterianas transmitidas por ixodídeos sendo a maioria classificada como antropozoonoses.

Na segunda parte da dissertação será descrito o trabalho experimental, juntamente com os seus resultados, discussão, conclusões e direcções futuras.

## 1.1 Ixodídeos

Os ixodídeos, vulgarmente designados por carraças encontram-se entre os vectores de agentes etiológicos mais importantes para o Homem e para os animais, capazes de pôr em perigo a sua vida<sup>(197)</sup>. São artrópodes hematófagos obrigatórios e pertencem ao Filo Arthropoda, Classe Arachnida, Subclasse Acari, Ordem Acarina, Subordem Ixodida e Superfamília Ixodoidea<sup>(157,197)</sup>. Conhecem-se cerca de 850 espécies, subdivididas em 2 grandes famílias: as carraças de corpo duro ou Ixodidae (ixodídeos), assim denominadas por possuírem um escudo dorsal esclerotizado e as carraças de corpo mole ou Argasidae (argasídeos), que possuem uma cutícula flexível, mole<sup>(197)</sup>. A família Ixodidae caracteriza-se pelo seu escudo proeminente duro, esclerótico, que cobre a totalidade do dorso nos machos e apenas a porção anterior do dorso nas formas imaturas e nas fêmeas, de modo a permitir as refeições sanguíneas<sup>(197)</sup>. A lenta ingestão dos ixodídeos obriga-os a permanecer vários dias fixados nos seus hospedeiros, de modo a completarem a sua alimentação<sup>(73)</sup>. A família Ixodidae divide-se nos géneros *Ixodes*, *Aponomma*, *Haemaphysalis*, *Anomalohimalya*, *Cosmiomma*, *Nosomma*, *Hyalomma*, *Amblyomma*, *Margaropus*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Rhipicentor*<sup>(197)</sup>.

A duração do ciclo de vida dos ixodídeos varia de espécie para espécie, geralmente de um a três anos<sup>(73)</sup>, mas dependendo das condições ambientais, pode ser concluído em seis meses a seis anos<sup>(157)</sup>. O volume de consumo de sangue é grande, podendo atingir até 5 ml por vector e a produção de ovos é elevada, podendo chegar aos 24.000 ovos por postura e por fêmea, que morre no final do processo<sup>(197)</sup>. O ciclo de vida dos ixodídeos compreende quatro fases de desenvolvimento: o ovo, a larva, a ninfa e o adulto, e entre os três últimos estádios é necessária uma refeição sanguínea para terminar a metamorfose<sup>(73)</sup>. Após a refeição, o ixodídeo destaca-se para o solo para digerir a mesma, após o que se transforma no estádio

seguinte, no caso dos ixodídeos de três hospedeiros, ou entra em diapausa, uma fase de metabolismo e desenvolvimento reduzido<sup>(157)</sup>. Os ixodídeos apresentam maioritariamente, um ciclo de vida de três hospedeiros, em que cada estágio necessita de um determinado hospedeiro<sup>(73)</sup>. Os ixodídeos adultos são os únicos com diferenciação sexual<sup>(73)</sup> e a cópula ocorre geralmente no hospedeiro<sup>(157)</sup>. Quando não se encontram num hospedeiro, os ixodídeos estão dependentes das condições ambientais, sendo a sua mortalidade condicionada pela existência de uma baixa humidade relativa e uma temperatura elevada<sup>(73)</sup>. Dependendo da espécie, quando surgem as condições ideais de temperatura, humidade e luminosidade, os vectores trepam para a vegetação circundante onde esperam passivamente pelo seu hospedeiro<sup>(73)</sup>, numa estratégia de emboscada<sup>(157)</sup>. A estratégia predadora, em que os ixodídeos atacam os hospedeiros, emergindo dos seus habitats e indo de encontro aos mesmos, também é utilizada<sup>(157)</sup>. Por fim, há ainda a estratégia das espécies endofílicas, que vivem nos habitats dos hospedeiros (covas, buracos e ninhos) esperando que os mesmos cheguem<sup>(157)</sup>.

O clima é um determinante importante na distribuição espacial e temporal dos vectores e agentes patogénicos, verificando-se que as alterações climáticas têm um impacto importante na ecologia das populações dos vectores, provocando uma variação na incidência e uma alteração da sazonalidade das doenças associadas a vectores<sup>(65)</sup>.

Os ixodídeos podem actuar, não apenas como vectores, mas também como reservatórios de bactérias patogénicas<sup>(157)</sup>. Podem transmitir uma grande variedade de agentes infecciosos para o Homem e para os animais, domésticos e silvestres, causando também várias condições tóxicas como a paralisia, irritação, alergia à sua picada e espoliação sanguínea<sup>(197)</sup>. Disseminam protozoários, rickettsias, vírus, bactérias e até fungos em várias espécies silvestres e de produção animal na maior parte dos países do Mundo<sup>(197)</sup>. Entre os

vectores, os agentes patogénicos podem ser transmitidos de forma transtadial (entre estádios) e transovárica (pelos ovos)<sup>(157)</sup>.

Durante as primeiras 24-36 horas, após a ligação ao hospedeiro, não há praticamente ingestão de sangue, sendo a penetração a sua principal actividade<sup>(157)</sup>. As secreções salivares produzidas incluem um cimento, que fixa as peças bucais à pele do hospedeiro, bem como enzimas e substâncias vasodilatadoras, anti-inflamatórias, anti-hemostáticas, imunossupressoras e anestésicas, que facilitam a hematofagia<sup>(157)</sup>. No caso das formas adultas, a um período inicial de alimentação lenta (três a quatro dias), segue-se um período de engorgitamento rápido (um a três dias), altura em que as fêmeas podem aumentar o seu peso até 120 vezes<sup>(157)</sup>. É através da refeição sanguínea nos hospedeiros, que a maioria dos ixodídeos transmite os agentes aos hospedeiros susceptíveis<sup>(73)</sup>.

As reacções cutâneas adversas às picadas podem caracterizar-se por zonas de eritema (2-3 mm de diâmetro), com um nódulo bastante volumoso e de contornos bem definidos, que podem atingir os 4mm, mas cuja resolução é espontânea, ao fim de quatro a cinco dias, após a eliminação do vector<sup>(73)</sup>. Podem surgir reacções de hipersensibilidade em cães, previamente expostos a grandes populações de parasitas, cujos sinais clínicos incluem eritema, alopecia, descamação, crostas e prurido intenso que pode levar a dermatites secundárias por contaminação bacteriana<sup>(73)</sup>.

### **1.1.1 *Dermacentor marginatus***

É conhecida como a carraça ornamentada da ovelha, em que ambos os sexos e todos os estádios apresentam uma ornamentação do escudo dorsal<sup>(74)</sup>. A sua distribuição geográfica engloba Marrocos, a Espanha, França, Europa Central e Ásia central<sup>(157)</sup>. Tem sido recolhida frequentemente em Portugal<sup>(63,80,184,213)</sup>.

Esta espécie apresenta necessidades termofílicas, pelo que é encontrada nas partes mais frias e húmidas da região Mediterrânica<sup>(74)</sup>. A actividade dos adultos inicia-se no fim do Outono e prossegue durante todo o Inverno<sup>(74)</sup>, enquanto as larvas e as ninfas são activas na Primavera e Verão<sup>(190)</sup>. Nas regiões mais frias, a actividade sazonal dos adultos pode iniciar-se mais cedo e apresentar-se inactiva a meio do Inverno<sup>(74)</sup>. Na Europa, a sua presença está restrita a regiões com vegetação densa e cobertas por árvores, comum em áreas de carvalho e pinhal<sup>(74)</sup>. Contudo, os relatos da presença desta espécie no Alentejo, poderá indicar uma adaptação da espécie às condições ambientais do Sul de Portugal<sup>(213)</sup>.

É um ixodídeo de três hospedeiros e o seu ciclo de vida pode ser concluído no espaço de um ano, com posturas que podem chegar aos 7000 ovos<sup>(74,190)</sup>. Na região Mediterrânea, os ixodídeos também parasitam bovinos (os seus hospedeiros preferenciais)<sup>(190)</sup>, ovinos e caprinos, sendo os javalis importantes reservatórios silvestres<sup>(74)</sup>. Os adultos parasitam os canídeos, enquanto que as formas imaturas podem parasitar, frequentemente, os humanos, tal como pequenos mamíferos, carnívoros de porte médio e aves<sup>(74,87)</sup>.

Através das suas secreções salivares e fezes, esta espécie pode transmitir o protozoário *Babesia (B.) canis* aos canídeos, a bactéria *Francisella (F.) tularensis* e a bactéria *Rickettsia (R.) slovaca* aos humanos<sup>(74,157,213)</sup>.

### **1.1.2 *Dermacentor reticulatus***

Vulgarmente conhecida como carraça ornamentada do cão<sup>(74)</sup>, esta espécie, é relativamente grande (0,6-0,8 cm) e possui um padrão evidente, de manchas claras alternadas com zonas escuras, no escudo dorsal dos estados adultos<sup>(197)</sup>. Na Europa é um ixodídeo de canídeos domésticos e silvestres, mas pode ser encontrado em ungulados<sup>(74)</sup>. É localizado desde a Europa até à Ásia<sup>(157)</sup> e em Portugal circunscreve-se às zonas mais húmidas do país,

zonas Norte e Este, como os distritos de Bragança, Viana do Castelo, Vila Real e Guarda<sup>(73,184)</sup>.

Este ixodídeo prefere humidades relativas elevadas e baixas temperaturas, podendo ser encontrado nos cães domésticos a partir de Outubro e, se o Inverno for suave e as temperaturas não baixarem além dos 5°C, pode permanecer activo durante toda a época de Inverno<sup>(73)</sup>. Prefere áreas abertas, sem vegetação de porte arbóreo abundante, do tipo charneca ou pastagens<sup>(73,157)</sup>. Pode ser comum em antigas áreas agrícolas abandonadas, que rodeiem os núcleos de população<sup>(73)</sup>. São, também, abundantes em pequenos bosques de folha caduca, onde os carnívoros silvestres representam uma parte importante da fauna local, juntamente com roedores, os quais são necessários para a manutenção das fases imaturas<sup>(73)</sup>.

É um ixodídeo de três hospedeiros, podendo o seu ciclo de vida ser completado num ano, mas geralmente leva três anos a completar-se<sup>(74)</sup>. Pode parasitar os humanos em espaços rurais ou peri-urbanos<sup>(87)</sup>, mas os adultos parasitam principalmente carnívoros (domésticos ou silvestres)<sup>(190)</sup> e, excepcionalmente, ruminantes (bovinos)<sup>(73)</sup>. No nordeste transmontano era-lhe reconhecido um hospedeiro, *Canis lupus*, tendo recentemente sido associado a *Canis familiaris*<sup>(184)</sup>.

É o vector principal do agente da babesiose canina (*B. canis canis*), mas pode também transmitir as bactérias *F. tularensis* e *Coxiella burnetti*, através das suas secreções salivares e fezes<sup>(157)</sup>.

### **1.1.3 *Ixodes ricinus***

O ixodídeo da ovelha, como é conhecido, é relativamente pequeno e de cor escura, encontrando-se abundantemente desde a Europa Ocidental até à Ásia Central e Norte de África<sup>(157)</sup>. É um dos ixodídeos mais comuns da Europa temperada, descrito em Portugal em

todo o território nacional continental e na ilha da Madeira<sup>(73,80,183)</sup>. É muito sensível à baixa humidade relativa do ar, morrendo rapidamente se esta alcança valores abaixo dos adequados, pelo que prefere zonas frescas, incluindo neve, com elevada humidade<sup>(73)</sup>. As populações no Sudoeste de Portugal parecem, no entanto, ter-se adaptado às condições diferentes aí existentes<sup>(73)</sup>.

É um ixodídeo que evidencia o conceito de sazonalidade, em que geralmente as larvas podem aparecer entre Maio e Junho e as ninfas aparecem na Primavera, havendo uma sobreposição das mesmas<sup>(73)</sup>. As larvas provêm de adultos alimentados no ano anterior, que realizaram a postura dos ovos que se desenvolvem durante o Inverno e a Primavera<sup>(73)</sup>. Os adultos podem permanecer activos durante todo o ano, embora nas zonas com Verões relativamente secos ou Invernos frios, os mesmos possam suspender temporariamente a sua actividade, face às condições climáticas inadequadas<sup>(73)</sup>. A duração do seu ciclo de vida varia muito consoante a localização geográfica, mas geralmente é de dois a seis anos<sup>(197)</sup>.

É um ixodídeo de três hospedeiros<sup>(74)</sup> que apresenta uma grande capacidade de adaptação a vários hospedeiros. Nas formas imaturas prefere roedores, aves e mamíferos pequenos ou de tamanho médio, enquanto que na forma adulta, por necessitar de uma grande ingestão de sangue, parasita geralmente ruminantes domésticos (bovinos ou ovinos) ou silvestres (cervídeos)<sup>(73)</sup>. O parasitismo humano parece ser frequente<sup>(87)</sup>.

No Norte de Africa, é o vector de *Borrelia (B.) lusitaniae* e *B. garinii* e na Tunísia é o vector de *B. divergens*, um agente da babesiose bovina<sup>(74)</sup>. Na Europa, é o vector da doença viral TBE (encefalite transmitida por ixodídeos), da espiroqueta *B. burgdorferi sensu lato* (s.l.), das bactérias *F. tularensis*, *R. helvetica*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma (A.) phagocytophilum* e do piroplasma *B. bigemina*<sup>(47,74)</sup>. Na Bulgária, 40% de *I. ricinus* colhidos, apresentavam-se infectados por *B. burgdorferi* s.l., e 35% por espécies de *Ehrlichia* e

*Anaplasma*<sup>(47)</sup>. Assim, e uma vez que os ixodídeos podem estar infectados por múltiplos patogéneos, existe a hipótese considerável de ocorrer inoculação simultânea de vários organismos numa única picada<sup>(47)</sup>.

#### **1.1.4 *Rhipicephalus sanguineus***

Em Portugal, é a denominada “carraça comum do cão” ou “carraça parda do cão”, devido à sua abundância em canídeos e à sua cor<sup>(73)</sup>. É muito comum nos canídeos domésticos, em zonas como a Europa meridional e norte de África<sup>(73)</sup>. Encontra-se ausente no Norte da Europa, excepto em casas ou canis, onde consegue sobreviver<sup>(157)</sup>. É uma das espécies de maior importância em Portugal, encontrando-se frequentemente de norte a sul do país e pode encontrar-se activo durante todo o ano<sup>(2,8,10,63,80,190)</sup>.

É uma espécie antropófila, uma vez que tem preferência por construções humanas e pelas zonas citadinas onde exista um mínimo de vegetação, como parques públicos e jardins privados, onde habitem ou passem cães<sup>(73)</sup>. Os ixodídeos podem colonizar canis e casas, desenvolvendo populações estáveis e permanentes<sup>(73)</sup>, as quais não parecem interessar-se muito pelo parasitismo humano, apresentando uma clara afinidade pelos canídeos<sup>(87)</sup>. Curiosamente, num estudo realizado nos Estados Unidos da América (E.U.A.) num total de 756 *R. sanguineus* recolhidos, 15 exemplares adultos foram colhidos de nove militares, levando a supor a existência de uma estirpe melhor adaptada ao Homem<sup>(88)</sup>. De igual modo, registos recentes no Brasil identificaram quatro casos de parasitismo, por formas adultas de *R. sanguineus*, em proprietários de cães<sup>(54)</sup>.

Os ixodídeos do género *Rhipicephalus* encontram-se em lugares relativamente secos ou, de forma geral, em formações do tipo da estepe Mediterrânea<sup>(73)</sup>. A maioria é activa durante a Primavera, com uma ligeira diminuição da actividade no Verão, surgindo

novamente no Outono<sup>(73)</sup>. Durante o Inverno, permanecem inactivos devido às baixas temperaturas<sup>(73)</sup>. No entanto, em condições de humidade e temperatura propícias, existentes no interior dos canis ou em determinadas zonas da costa mediterrânica, os ixodídeos podem permanecer activos durante todo o Inverno<sup>(73)</sup>. Os climas tropicais, como o do Brasil, revelam-se óptimos para o desenvolvimento desta espécie, facilitando o desenvolvimento de até quatro gerações por ano<sup>(53)</sup>.

Os ixodídeos *R. sanguineus* são vectores do agente da babesiose canina, ehrlichiose canina e da febre botonosa canina<sup>(73)</sup>.

## **1.2 Diagnóstico etiológico laboratorial das doenças associadas a vectores**

Dada a ausência de sinais patognomónicos dos quadros clínicos das doenças em estudo, bem como a possibilidade de co-infecção por múltiplos agentes etiológicos, o diagnóstico laboratorial assume um maior relevo em relação ao diagnóstico clínico, de forma a obter-se um diagnóstico definitivo<sup>(2)</sup>. De seguida referem-se as características comuns das técnicas laboratoriais face às doenças em estudo na presente dissertação, focando as suas vantagens e limitações gerais.

### **1.2.1 Diagnóstico directo**

As técnicas de diagnóstico directo são as que se baseiam na presença do organismo, nomeadamente a microscopia, a cultura e a detecção de ácidos nucleicos<sup>(199)</sup>. Apresentam a vantagem de permitirem a identificação do organismo, obtendo-se, dessa forma, um diagnóstico definitivo, devido ao elevado valor predictivo positivo que se obtém dos resultados destas técnicas<sup>(2)</sup>. Os testes directos são bastante úteis nas fases agudas das doenças antes de se ter iniciado a terapêutica antimicrobiana<sup>(180)</sup>.

#### **1.2.1.1 Microscopia óptica**

A visualização do agente, no caso da anaplasnose granulocítica canina, babesiose canina, ehrlichiose monocítica canina e hepatozoonose canina, será diagnóstica. Se no caso da babesiose e hepatozoonose canina, a observação deverá ser feita em esfregaço de sangue capilar<sup>(27)</sup>, nas restantes doenças, é aconselhado a técnica de concentração leucocitária, em esfregaço de “buffy coat” de sangue periférico, corado com Giemsa, o que aumenta a sensibilidade da técnica, dado que os parasitas se encontram nos leucócitos<sup>(15,173)</sup>. É um método rápido, económico, de registo permanente e em que os casos positivos têm um

diagnóstico definitivo<sup>(173)</sup>. A observação de esfregaços sanguíneos é um método muito utilizado em Medicina Veterinária, pela sua facilidade de execução e baixo custo<sup>(153)</sup>. Contudo, pode ser um método moroso e de baixa sensibilidade<sup>(153)</sup>, podendo ser necessária a análise de várias lâminas até se atingir um diagnóstico<sup>(46)</sup>. De igual forma, a microscopia implica erros subjectivos, o que origina falsos positivos (ao validar artefactos) e negativos (em caso de enquistamento, parasitémia intermitente, número reduzido de parasitas ou na fase subaguda de doença<sup>(71,102,154,173)</sup>) pelo que um esfregaço sanguíneo negativo à microscopia não elimina a doença como diagnóstico diferencial<sup>(26)</sup>.

### **1.2.1.2 Cultura**

Em determinadas doenças, a cultura é o método de referência do diagnóstico laboratorial<sup>(77,107,157)</sup>. As amostras sujeitas a cultura e isolamento da bactéria podem ser sangue, plasma, expectoração, líquido cefalo-raquidiano, tecidos, biópsias de escaras de inoculação ou de linfonodos regionais<sup>(7,77,157)</sup>. Para o isolamento do agente, a amostra deve ser colhida antes do início da antibioticoterapia, mantida refrigerada e submetida ao isolamento no menor intervalo de tempo possível<sup>(7)</sup>.

A hemocultura exige grandes volumes de sangue e atenção cuidada<sup>(204)</sup>, mas revela-se essencial na obtenção das quantidades de organismos necessárias para a pesquisa molecular e para o desenvolvimento de vacinas<sup>(173)</sup>. São necessárias instalações próprias e pessoal técnico treinado e especializado<sup>(77)</sup>.

### **1.2.1.3 Métodos moleculares: PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Os métodos moleculares apresentam como grande vantagem a sua elevada sensibilidade e especificidade tanto nos animais como nos vectores, evitando a manipulação

directa dos agentes quando estes apresentam um elevado potencial infeccioso<sup>(51,153)</sup>. Possibilita também a análise filogenética das estirpes, preferencialmente através de marcadores genéticos conservados ao longo do ciclo de vida do organismo<sup>(59)</sup>.

O PCR apresenta como algumas limitações o facto de ser dispendioso, difícil de colocar em prática e não provar, mesmo com resultados positivos, que o organismo está vivo, podendo ser um fragmento de ADN não viável<sup>(128)</sup>. A técnica implica a presença de equipamento laboratorial e técnicos especializados<sup>(53,123)</sup>. A qualidade da amostra pode influenciar na sensibilidade do PCR, uma vez que as amostras de sangue podem conter substâncias inibidoras, sendo necessário processar a amostra de modo a eliminar possíveis inibidores<sup>(1,70)</sup>. Também numa fase crónica da doença, a sensibilidade pode ser menor uma vez que o número de microrganismos presente é reduzido<sup>(1)</sup>. Por outro lado, a falta de uniformização entre os laboratórios existentes e a insuficiência dos controlos de qualidade podem originar resultados falsos positivos e falsos negativos<sup>(1)</sup>.

### **1.2.2 Diagnóstico indirecto**

Os métodos aplicados neste tipo de diagnóstico laboratorial baseiam-se na detecção de anticorpos específicos em fluidos orgânicos, produzidos pelo indivíduo como resposta à infecção. As técnicas de diagnóstico indirecto mais comuns são as serológicas, como a imunofluorescência indirecta, ELISA (Enzyme-linked immunosorbent-assay) e Immunoblot<sup>(2)</sup>. Pelas suas características, são técnicas muito úteis quando os organismos são de difícil cultivo, na ausência de técnicas como as de biologia molecular<sup>(2)</sup> ou quando a manipulação directa do organismo representa um risco profissional<sup>(77)</sup>. O facto do manuseamento das amostras não ser tão crítico como no caso das amostras para o diagnóstico directo e os elevados níveis de especificidade e sensibilidade exigidos na fase de

padronização, contribuem para que as técnicas indirectas sejam eleitas em estudos cujo objectivo é determinar prevalências de infecção em populações numerosas.

Apesar da testagem serológica das populações de canídeos facultar informações epidemiológicas importantes, do ponto de vista clínico, a mesma fornece pouca informação no caso de indivíduos clinicamente saudáveis, mesmo que expostos a ixodídeos<sup>(85)</sup>. Assim, os testes serológicos apresentam como limitação o facto de uma resposta humoral positiva num cão não ser suficiente para diferenciar uma exposição ou uma infecção activa<sup>(71)</sup> não sendo prova causal de doença clínica<sup>(128)</sup>. Desta forma, a avaliação de resultados positivos à serologia (de IgG), em cães sem sinais clínicos, deve ser interpretada com precaução<sup>(85,109)</sup>.

#### **1.2.2.1 Imunofluorescência indirecta (IFI)**

A IFI é uma técnica serológica considerada de referência para algumas das doenças em estudo pela sua sensibilidade e especificidade<sup>(7,23)</sup>. Permite a detecção e a titulação de imunoglobulinas IgG e IgM ou ambas, em que a identificação e a titulação de anticorpos IgM específicos para as espécies em questão, indica infecção recente<sup>(2)</sup>. Uma das suas maiores vantagens é reportar os resultados de uma forma quantitativa<sup>(152)</sup>.

Apresenta as desvantagens de só poder ser realizada em laboratórios especializados com recurso ao microscópio de imunofluorescência<sup>(23)</sup> e ter implícita alguma subjectividade ao ser influenciada pela sensibilidade visual do técnico<sup>(3,107)</sup>. Como outra limitação da IFI, surge o facto de, frequentemente, existirem seronegativos na fase aguda da doença pelo que as colheitas devem ser realizadas na fase aguda e 14 a 20 dias mais tarde<sup>(24,71,91,118,223)</sup>. Se não for possível realizar análises emparelhadas não será possível definir se um título alto representa uma exposição antiga ou uma infecção presente<sup>(71)</sup>. Também no caso de cães jovens ou cachorros, podem surgir falsos negativos associados a um período de latência<sup>(24)</sup>. Por outro

lado, após o tratamento os cães podem permanecer seropositivos, pelo que o valor diagnóstico deste teste serológico é limitado na ausência de sinais clínicos<sup>(53)</sup>. De uma maneira geral, entre os vários laboratórios, existe uma falta de uniformidade e padronização o que implica variações nos procedimentos, nomeadamente na qualidade e quantidade de antigénio utilizado para as lâminas de IFI, na própria subjectividade ligada à leitura dos resultados<sup>(148)</sup>.

### **1.2.2.2 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent-assay)**

A técnica de ELISA pode ser utilizada para detectar anticorpos ou para detectar o antigénio se se optar por uma “ELISA-sandwich”<sup>(2)</sup>. As técnicas à base de ELISA são menos dependentes do operador e ao serem métodos automatizados ou semi-automatizados, permitem processar um elevado número de amostras em pouco tempo. Existem comercializados no mercado testes “dot-ELISA” que utilizam antigénios, com a vantagem de poderem ser utilizados pelo Médico Veterinário na própria clínica, efectuando-se a leitura em poucos minutos, sendo inclusive, fáceis de ler por técnicos não especializados<sup>(32)</sup>.

### **1.2.2.3 Immunoblot**

Dada a sua elevada especificidade, esta técnica é utilizada para confirmação de diagnósticos serológicos obtidos por IFI<sup>(2)</sup>. É útil para diferenciar entre falsos positivos, originados por reacções serológicas cruzadas<sup>(150)</sup>. Como desvantagens, é mais dispendioso, laborioso e moroso, quando comparado com a IFI<sup>(107)</sup>, pelo que não tem sido utilizado no diagnóstico laboratorial de rotina em Medicina Veterinária, tendo-se restringido o seu uso a estudos sero-epidemiológicos<sup>(2)</sup>.

### 1.3 Anaplasmosse granulocítica canina

#### Etiologia

A infecção por *Anaplasma* (*A.*) *phagocytophilum* é uma doença generalizada em canídeos<sup>(118)</sup>, em que os alvos primários são os neutrófilos e ocasionalmente os eosinófilos<sup>(166)</sup>. A infecção está bem estabelecida como uma doença veterinária e é considerada uma zoonose emergente<sup>(183)</sup>.

Até 2001, a espécie pertencia ao género que englobava *Ehrlichia phagocytophila*, (agente da febre da carraça em bovinos, cabras e ovelhas), *Ehrlichia equi* (agente da ehrlichiose granulocítica equina) e o agente da ehrlichiose granulocítica humana (HGE)<sup>(67)</sup>. Estes três agentes foram englobados numa única espécie denominada *A. phagocytophilum* pertencente à ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae, onde todos os membros são bactérias intracelulares obrigatórias, pleomórficas, que se replicam em vacúolos membranares de células eucarióticas<sup>(67,173)</sup>. A bactéria multiplica-se por divisão binária e forma grandes corpos de inclusão (morulae ou mórulas)<sup>(26)</sup>.

A bactéria foi identificada em canídeos na Europa, nomeadamente Espanha<sup>(195)</sup>, Suécia<sup>(109,110)</sup>, Suíça<sup>(167)</sup> e Reino Unido<sup>(189)</sup>. Dados de um estudo serológico em canídeos no Noroeste de Espanha apontam valores de seroprevalência de 10,3%<sup>(195)</sup>. Na Europa, há também diversos relatos de doença atribuída à bactéria em outras espécies de animais domésticos como gatos<sup>(193,189)</sup>, bovinos<sup>(71,200)</sup>, ovinos<sup>(201,220)</sup> e equinos<sup>(59,166)</sup> e cervídeos silvestres como renas, alces e cervos<sup>(202)</sup> e aves como o melro e estorninho<sup>(206)</sup>.

Em Portugal, já foi identificada, através das técnicas de IFI e Immunoblot, a exposição humana a *A. phagocytophilum*, em doentes com borreliose de Lyme, estes mais prováveis de contactar com este microrganismo, uma vez que ambas as bactérias partilham o mesmo

vector<sup>(181)</sup>. Não existem dados publicados, até ao momento, de exposição de canídeos à bactéria, em Portugal.

### **Vector e Ciclo de vida**

Os roedores bem como os ruminantes domésticos (ovelhas, veados e gamos) e silvestres têm sido implicados como reservatórios naturais de *A. phagocytophilum* na Europa<sup>(26)</sup>. Dependendo do habitat, o reservatório animal poderá variar<sup>(26)</sup>. Para além dos mamíferos, também as aves persistentemente infectadas, poderão ser reservatórios naturais de infecção bem como os ixodídeos, estes também os seus vectores biológicos<sup>(67)</sup>. Há evidências de que, para além de ixodídeos, a bactéria parasita também outros ectoparasitas obrigatórios permanentes como os ácaros da família *Syringophilidae*<sup>(206)</sup>. Dado que a espécie *I. ricinus* parasita um leque vasto de hospedeiros vertebrados, a infecção pode ocorrer em várias espécies<sup>(26)</sup>.

Os vectores implicados na transmissão da doença na maioria das regiões europeias do Norte, Centro e Sul pertencem à espécie *I. ricinus*<sup>(21,124,162,165,167)</sup>. Em outros países como nos E.U.A. têm sido implicadas outras espécies como *I. scapularis*, *I. pacificus* e *I. spinipalpis*<sup>(30)</sup>; no Reino Unido foi sugerida a espécie *I. trianguliceps*<sup>(183)</sup> e na Rússia e parte Leste da Ásia, a espécie *I. persulcatus*<sup>(43)</sup>. Um estudo na Alemanha indicou que 2,2% dos ixodídeos *I. ricinus* colhidos apresentavam ADN de *A. phagocytophilum*<sup>(21)</sup>. A bactéria já foi identificada nas espécies *I. ricinus* e *I. ventalloi* colhidos em Portugal Continental e na ilha da Madeira<sup>(183)</sup>.

A maioria das larvas de *I. scapularis* adquire a infecção 24-48 h após a engorgitação, aquando da sua refeição num mamífero infectado, surgindo a replicação do agente após a metamorfose para ninfa, transtadialmente<sup>(103)</sup>. Um estudo revelou que a prevalência da infecção aumenta 4,5 a 10,6 vezes da fase de ninfa para a adulta<sup>(125)</sup>. Efectivamente, o número

de organismos que uma larva obtém da alimentação sanguínea é relativamente baixo, pelo que, de forma a obter-se um número suficiente de microrganismos infectantes, o agente tem de depender da replicação no vector, em vez de no hospedeiro para potencializar a eficácia da transmissão do agente pelo vector<sup>(103)</sup>. Assim, as ninfas e os adultos serão os vectores passíveis de transmitir a doença ao Homem<sup>(103)</sup>. Apesar de haver um estudo que coloca a hipótese de transmissão transovárica de *A. phagocytophilum* em *I. spinipalpis*<sup>(30)</sup>, a transmissão transovárica do agente não está ainda comprovada<sup>(103)</sup>. Pensa-se que a transmissão da bactéria do vector para o hospedeiro ocorre num espaço de tempo entre as 40 e as 48 horas<sup>(26)</sup>.

### **Patogénese**

A patogénese da doença não está ainda devidamente esclarecida<sup>(26)</sup>. Sabe-se que a bactéria entra na derme após a picada do vector e dissemina-se através do sangue e/ou da linfa<sup>(26)</sup>. Dez a 14 dias após a infecção experimental em canídeos, surgem as inclusões citoplasmáticas nos granulócitos do sangue periférico, tendo sido demonstrada a presença da bactéria nos fagócitos de órgãos como o baço, fígado e pulmões<sup>(26)</sup>. Existem dados que sugerem que a infecção será dependente da dose, em que a quantidade de mórulas nos granulócitos do sangue periférico, estará correlacionada com a dose de inócuo<sup>(103)</sup>. Também a imunossupressão poderá desempenhar um papel na patogénese da doença<sup>(166)</sup>, nomeadamente na destruição ou na menor produção de plaquetas e leucócitos<sup>(167)</sup>.

Ensaio que utilizaram borregos como modelo animal, demonstraram que diferentes variantes genóticas de *A. phagocytophilum*, que podem, inclusive, estar presentes em simultâneo no mesmo rebanho, estão associadas a diferentes manifestações clínicas,

hematológicas e serológicas<sup>(201)</sup> o que pode explicar os diferentes síndromes em diferentes animais.

A seroprevalência aumenta significativamente com a idade, nomeadamente nos cães mais idosos (oito anos como idade média à infecção), com uma aparente predisposição para as raças puras, e para o sexo feminino<sup>(94,109)</sup>. Outro estudo relaciona o porte médio a grande dos canídeos como possível factor de risco, uma vez que os cães de raça grande, ao possuírem uma superfície corporal maior, ficarão mais expostos aos vectores<sup>(69)</sup>. Além disso, os cães de maior porte, poderão passar mais tempo no exterior em comparação com os de raça pequena<sup>(69)</sup>. Também a mobilidade da sociedade e o facto dos canídeos viajarem com os seus proprietários serão razões prováveis porque, nos últimos anos, a infecção por *A. phagocytophilum* tem aumentado na incidência e na importância clínica<sup>(118)</sup>.

### **Sinais clínicos**

O leque de manifestações clínicas causadas por *A. phagocytophilum* é variado<sup>(26)</sup>, mas, geralmente, a doença apresenta um curso subclínico ou moderado<sup>(167)</sup>.

Na fase aguda da doença, nos canídeos, observa-se febre (até 41°C), depressão e anorexia<sup>(71)</sup>. Contudo, podem surgir outros sinais clínicos não específicos como emése, anemia, epistaxis, petéquias, hemorragia gengival, ataxia, poliartrite, esplenomegália, hepatomegália e adenomegália e comprometimento do sistema nervoso central, o qual parece não ser comum<sup>(69,71,94,109,118,167,189)</sup>. Um estudo serológico demonstrou que 1% dos cães, com evidências de trombocitopénia e poliartrite, continha anticorpos para *A. phagocytophilum*<sup>(82)</sup>.

As alterações hematológicas incluem leucopenia, ocasionalmente leucocitose, anemia normocrómica, normocítica e uma trombocitopénia moderada mas, na maioria dos casos surge uma trombocitopénia severa<sup>(118,167)</sup>. Contudo, podem não haver alterações no

hemograma<sup>(118)</sup>. Num estudo sueco todos os cães com trombocitopénia apresentavam inclusões nos granulócitos<sup>(69)</sup>. Outro estudo, este serológico demonstrou que 5% dos cães com evidências de trombocitopénia e poliartrite continham anticorpos para *A. phagocytophilum*<sup>(82)</sup>. Podem surgir também linfopenia e monocitopenia<sup>(167)</sup>. As transaminases, como a fosfatase alcalina e a amilase, podem estar aumentadas, tal como pode surgir hipoproteinémia e hipoalbuminémia<sup>(94)</sup>. A urinanálise pode revelar proteinúria não associada a doença de doença de trato urinário e hiperbilirubinúria<sup>(94)</sup>.

## Diagnóstico

O diagnóstico baseia-se na anamnese, como a residência do animal em área endémica, a estação do ano em que o vector está mais activo, a presença de ixodídeos, os sinais clínicos, as alterações hematológicas, a identificação do agente nos neutrófilos ou eosinófilos circulantes (na fase aguda da doença), a seroconversão detectada por IFI e identificação do agente por biologia molecular<sup>(71,91,104,110,167,173)</sup>. Em muitos casos, o diagnóstico definitivo é difícil, uma vez que os sinais clínicos não são patognómicos, os corpos de inclusão, se estiverem em número reduzido, podem não ser identificados à microscopia<sup>(71,118)</sup> e mesmo a serologia, geralmente utilizada no diagnóstico, só por si não pode ser a base do diagnóstico definitivo<sup>(173)</sup>. O diagnóstico pode ser complicado se houver uma co-infecção com *B. burgdorferi* s.l.<sup>(91)</sup>, frequente<sup>(94)</sup> uma vez que o vector é o mesmo, tal como acontece com *E. canis*<sup>(43,118,124,182)</sup>.

Na fase aguda da doença é possível verificar ao microscópio óptico as mórulas características nos granulócitos (neutrófilos e eosinófilos) no sangue periférico, em esfregaços corados com Giemsa ou com acridina-laranja<sup>(71,167)</sup>. A detecção da bactéria ao microscópio pode ser difícil de detectar<sup>(26)</sup> e alguns artefactos podem ser confundidos com corpos de

inclusão<sup>(71)</sup>. Ainda em relação ao diagnóstico directo, é possível fazer a cultura do agente numa linha celular HL60, precursores mielóides semelhantes aos da medula óssea humana, que possuem as características dos neutrófilos, incluindo a fagocitose, verificando-se o efeito citopático com lise das células da linha HL60 em 12-14 dias após a inoculação<sup>(91)</sup>.

A tecnologia PCR, sobretudo na variante PCR “nested“ é também um método adequado para detecção de microrganismos de crescimento fastidioso como *A. phagocytophilum*<sup>(71,166)</sup>, tanto nos animais como nos vectores<sup>(18)</sup>. No entanto, o PCR apresenta a possibilidade de reacções cruzadas com *A. platys*, o agente da trombocitopénia cíclica canina e será sempre de considerar a presença de inibidores nas reacções de PCR, o que induzirá falsos negativos<sup>(71,110)</sup>. Na bactéria *A. phagocytophilum* os genes conservados mais utilizados, como alvo pelos métodos de biologia molecular, para caracterização das estirpes são *p44* (também *mSP2*) e *mSP4*<sup>(59,126)</sup>.

Contudo, o diagnóstico laboratorial tradicional baseia-se, nas técnicas indirectas, na detecção de anticorpos, principalmente pela técnica de IFI<sup>(110)</sup>. De uma forma geral, a técnica de IFI, é o teste mais sensível para confirmar o diagnóstico de doença, na fase aguda e na convalescente, a partir de amostras emparelhadas (colhidas com um intervalo de duas a quatro semanas)<sup>(180)</sup>. O critério diagnóstico mais frequente é a seroconversão ou um aumento de quatro vezes no título de anticorpos<sup>(26,180)</sup>. Como limitações, numa fase inicial pode haver falsos negativos, por ainda não haver anticorpos detectáveis<sup>(180)</sup>. Podem haver também resultados falsos positivos, através de reacções cruzadas entre os epítomos de *A. phagocytophilum* e *E. chaffensis*, pelo que será aconselhável fazer uma testagem simultânea para os dois agentes, nas regiões onde ambos estão presentes<sup>(180)</sup>. Pelos motivos supracitados, serão necessárias técnicas laboratoriais adicionais para comprovar o diagnóstico de doença activa por *A. phagocytophilum*, como o Immunoblot<sup>(180)</sup>. Outra desvantagem é a ausência de

uniformização entre laboratórios. Por exemplo, no que concerne ao estabelecimento de um valor limite de positividade (“cut-off”) em canídeos, o mais preconizado é 1:40<sup>(69,71,109)</sup>, mas existem laboratórios que consideram valores como 1:80<sup>(118)</sup> e 1:320<sup>(94)</sup>.

## **Tratamento**

*A. phagocytophilum* é susceptível a vários antibióticos *in vitro*<sup>(26)</sup>. Contudo, *in vivo*, os antibióticos mais eficazes são as tetraciclinas e em menor extensão a rifampicina e o cloranfenicol<sup>(26)</sup>. Nos canídeos está recomendada a doxiciclina 5 a 10mg/kg/dia, durante 3 semanas, como tratamento da infecção mas as formas mais graves requerem tratamentos mais prolongados<sup>(26,69)</sup>.

## 1.4 Babesiose canina

### Etiologia

A babesiose canina é considerada a doença parasitária com maior impacto<sup>(53)</sup> dos canídeos domésticos e silvestres<sup>(86)</sup> (chacais e lobos<sup>(130)</sup>), sendo provocada pelo protozoário intraeritrocitário do género *Babesia* (*B.*) e transmitida por ixodídeos de vários géneros e espécies<sup>(53)</sup>. Tradicionalmente, a identificação da espécie baseava-se na especificidade do hospedeiro e na morfologia e tamanho das formas intraeritrocitárias (os piroplasmas)<sup>(31)</sup>, sendo classificados como grandes piroplasmas (*B. canis*) e pequenos piroplasmas (*B. gibsoni*)<sup>(86)</sup>. *B. canis* e *B. gibsoni* eram, até à pouco, as únicas espécies reconhecidas como causadoras da doença nos canídeos<sup>(31)</sup>, mas os métodos moleculares permitiram identificar um novo piroplasma, *Theileria annae*<sup>(225)</sup>. Este é um piroplasma endémico na população canina no nordeste espanhol<sup>(36)</sup>, de pequeno tamanho, localizado centralmente ou em posição paracentral, semelhante a *B. gibsoni* e de curso clínico mais grave do o associado a *B. canis*<sup>(86)</sup>. Existem, também, relatos de outro piroplasma, *B. equi*, isolado num canídeo sintomático em Espanha<sup>(50)</sup>. A sequenciação genética permitiu ainda o reconhecimento de três subespécies de *B. canis*: *B. canis canis*, *B. canis vogeli* e *B. canis rossi*, com base na distribuição geográfica dos vectores, nas propriedades antigénicas e nas diferentes manifestações clínicas<sup>(16,31,86,153)</sup>. Recentemente, foi descoberta uma nova subespécie, *B. canis presentii*, isolada em Israel a partir de gatos domésticos coabitantes, um sintomático e outro assintomático, cuja patogenecidade está ainda por determinar, podendo estar associada à imunossupressão como a induzida pelo retrovírus da imunodeficiência felina (FIV)<sup>(16)</sup>. Um canídeo pode estar infectado, simultaneamente, por mais do que uma subespécie de *Babesia*<sup>(153)</sup>.

Os organismos *Babesia*, protozoários do filo Apicomplexa e da ordem Piroplasmida, são parasitas intracelulares obrigatórios dos eritrócitos<sup>(75)</sup>. *B. canis* apresenta uma forma piriforme, é relativamente grande (2,5-3µm×5µm) e geralmente encontra-se mais de que um merozoito num eritrócito<sup>(86)</sup> enquanto que *B. gibsoni* é pequena (1,2-2 µm× 3-4µm), pleomórfica e surge geralmente em formas individuais<sup>(36)</sup>.

A infecção por *B. canis* é endêmica nas regiões tropicais e subtropicais<sup>(86)</sup>, enquanto que *B. gibsoni* é endêmica na Ásia<sup>(205)</sup>, África<sup>(138)</sup> e América do Norte<sup>(25)</sup>, aparecendo na Europa como resultado da introdução de animais infectados desses continentes<sup>(36)</sup>. *B. canis* encontra-se descrita em canídeos do Brasil<sup>(53,210)</sup>, E.U.A.<sup>(25)</sup>, África<sup>(31,153,186)</sup>, Portugal<sup>(2,132)</sup>, Espanha<sup>(50)</sup>, Polónia<sup>(228)</sup> e República Eslovaca<sup>(46)</sup>. A presença de *B. canis vogeli* no Brasil é atribuída à introdução dos ixodídeos *R. sanguineus*, originários das regiões tropicais africanas, durante a colonização portuguesa<sup>(53)</sup>. *B. canis rossi* é prevalente na África do Sul<sup>(31)</sup>. Já na Europa, a doença encontra-se disseminada predominantemente na região Mediterrânea<sup>(46)</sup>, com as formas *B. canis canis* e *B. canis vogeli*, sendo a primeira a mais prevalente<sup>(31,50,75)</sup>. Em Portugal, há vários relatos clínicos da hemoparasitose em canídeos, especialmente no Nordeste Transmontano, tendo inclusive vindo a aumentar a sua incidência<sup>(131,132)</sup>.

### **Vector e Ciclo de vida**

Os principais vectores da babesiose canina são os ixodídeos *D. reticulatus*, *R. sanguineus* e *Haemaphysalis (H.) leachi*<sup>(46)</sup>, tendo cada subespécie de *B. canis* patogénese e vectores próprios<sup>(153)</sup>. Assim, *B. canis rossi* é transmitida pelos ixodídeos *H. leachi*, *R. sanguineus*, *R. evertsi evertsi* ou *Amblyomma lepidum*, enquanto *B. canis vogeli* é transmitida pelo *R. sanguineus*<sup>(153)</sup> e *B. canis canis* tem como vectores, a espécie *R. sanguineus*, nas regiões amenas, e *D. reticulatus* nas regiões mais frias<sup>(75)</sup>.

Dada a presença do vector *R. sanguineus* ser mais frequente nas alturas de Verão, a incidência da doença aumenta significativamente neste período<sup>(46,53)</sup>, existindo, no entanto, relatos de babesiose em cães durante meses de Invernos amenos<sup>(46)</sup>, como no Nordeste Transmontano, com registo de casos clínicos no mês de Novembro, associado à maior actividade de *D. reticulatus*<sup>(132)</sup>. De facto, em Trás-os-Montes foi sugerida a espécie *D. reticulatus* como vector principal da doença, estando contudo ainda por averiguar o seu real papel na epidemiologia da doença na região<sup>(131,132)</sup>. Na Europa, esta espécie é reconhecida como um dos vectores mais importantes de babesiose canina<sup>(130)</sup> apesar de, num estudo efectuado na Eslováquia, apenas 1% dos ixodídeos *D. reticulatus* estava infectado por *B. canis canis*<sup>(66)</sup>. Este resultado foi questionado pelo número reduzido da amostra, por se ter efectuado a testagem exclusiva de adultos e pela possibilidade da presença de parasitas ser em quantidade demasiado pequena para permitir a sua identificação por PCR<sup>(66)</sup>.

Os ixodídeos ficam infectados aquando da hematofagia num cão infectado<sup>(75)</sup>. A fêmea adulta é a mais importante na transmissão, mas as ninfas e as larvas são também passíveis de infecção<sup>(75)</sup>. A esquizogonia ocorre nas células epiteliais do intestino do ixodídeo adulto e resulta na formação de grandes merozoitos<sup>(130)</sup>. Estes, por sua vez, incorrem em sucessivos ciclos de esquizogonia em vários tipos celulares, como as glândulas salivares, os ovários e oócitos, que podem permanecer infecciosos por várias gerações<sup>(130)</sup>. Dois a três dias após o ixodídeo se ter ligado ao hospedeiro canino<sup>(75)</sup>, os merozoitos presentes na saliva do ixodídeo penetram nos eritrócitos caninos, onde se transformam em trofozoitos, a partir dos quais se desenvolvem merozoitos adicionais através de um processo de merogonia<sup>(130)</sup>. Após a sua divisão, os merozoitos abandonam a célula e penetram noutros eritrócitos<sup>(130)</sup>. A transmissão dos parasitas pode ser também transtadial, através de transfusões sanguíneas ou contacto sanguíneo<sup>(25,53,75)</sup>, o qual pode ocorrer de diversos modos, como a transmissão sanguínea

durante lutas de cães, conforme estudo realizado nos E.U.A. em canídeos PCR positivos para *B. gibsoni*, dos quais 93% pertenciam à raça “American Pit Bull Terrier”<sup>(25)</sup>.

## Patogénese

A base da patogénese da babesiose canina parece ser a resposta imune<sup>(228)</sup>. O protozoário está associado a hemólise, destruição do endotélio vascular, acidose, hipoxia, estase vascular, choque e possivelmente um estado endotóxico que predispõe os doentes para a coagulação intravascular disseminada<sup>(130)</sup>. Os microrganismos *Babesia* sp. despoletam um mecanismo citotóxico de eritrólise, mediado por autoanticorpos dirigidos contra as membranas dos eritrócitos (parasitados ou não), provocando uma hemólise intra e extravascular que leva a anemia e hemoglobinémia<sup>(228)</sup>. A hemólise extravascular dos eritrócitos revestidos por anticorpos dá-se no baço e no fígado e a intravascular, no interior dos vasos sanguíneos, resulta da ligação do complemento à membrana do eritrócito através de uma reacção antigénio-anticorpo<sup>(228)</sup>. Possíveis consequências da anemia são o desenvolvimento de acidose metabólica e hipoxia nos tecidos<sup>(75)</sup>.

Cada subespécie de *B. canis* apresenta uma patogénese própria<sup>(153)</sup>. A subespécie *B. canis rossi* é a mais patogénica, com uma síndrome hemolítica (possivelmente imuno-mediada) ou uma resposta inflamatória aguda desproporcionada<sup>(31)</sup>, enquanto *B. canis vogeli*, comparativamente, é a menos patogénica das três subespécies<sup>(153)</sup>. *B. canis rossi* acumula-se preferencialmente nos capilares, enquanto que no caso de *B. canis vogeli* a parasitémia venosa é a mais prevalente<sup>(27)</sup>. A infecção por *B. canis canis* resulta numa parasitémia transitória, com sinais clínicos associados à congestão dos órgãos<sup>(31)</sup>. Qualquer mecanismo que retarde o fluxo capilar irá favorecer a multiplicação dos parasitas, com consequente aumento da parasitémia nos capilares<sup>(27)</sup>. A elevada detecção de parasitas nos capilares poderá ser

resultado de uma maior rigidez da membrana dos eritrócitos parasitados, com consequente redução da sua velocidade<sup>(27)</sup>. Foi ainda estabelecida uma relação entre o grau de parasitemia com a gravidade da doença, em que cães com colapso circulatório apresentaram parasitémias significativamente mais elevadas do que aqueles com circulação normal<sup>(27)</sup>. Contudo, a parasitemia elevada não pode explicar, só por si, o despoletar do colapso circulatório, podendo estar também envolvidos o tipo de resposta inflamatória ou imune, o grau de hipovolémia e a diminuição da função cardíaca<sup>(27)</sup>. No caso de *B. canis rossi*, os casos mais graves, incluindo com a morte dos canídeos, estão também associados à hipoglicémia e hiperlactatémia<sup>(149)</sup>, ao comprometimento cerebral, pulmonar e renal juntamente com os níveis elevados de cortisol e da hormona adrenocorticotrópica e níveis diminuídos da tiroxina e tiroxina livre<sup>(186)</sup>. Estes parâmetros poderão servir como base clínica para fundamentar prognósticos em infecções por *B. canis rossi*<sup>(186)</sup>.

*B. canis* pode infectar cães de todas as idades<sup>(130)</sup>, mas nas áreas endémicas a doença tende a manifestar-se nos canídeos de idade inferior a um ano<sup>(75)</sup>. No entanto, existem estudos no Brasil que apontam como factores de risco a idade superior a dois anos, apesar de serem também frequentes casos de cachorros aquando do primeiro contacto com os vectores<sup>(53)</sup>. Os cachorros com idade inferior a dois meses estarão protegidos pela imunidade colostrar mas, após o contacto com o parasita, tornar-se-ão portadores, pelo que, embora clinicamente saudáveis, serão um reservatório de piroplasmas para os vectores e para outros animais susceptíveis<sup>(75)</sup>. O aumento da mobilidade humana, juntamente com os seus animais de estimação caninos, para regiões endémicas, é também um factor de risco<sup>(31,75,187,225)</sup>. Em alguns países europeus tem vindo a aumentar os casos de babesiose canina, dada a mobilidade dos turistas que levam os seus canídeos para destinos endémicos<sup>(75)</sup>. Estudos realizados no Reino Unido, em canídeos que entraram no País acompanhando os seus proprietários,

permitiram identificar a babesiose canina como a doença exótica mais prevalente nos canídeos analisados, principalmente nos originários de França<sup>(188)</sup>. Fica assim exacerbado o risco potencial de disseminação da doença em países não endémicos, com extensão à população canina doméstica e silvestre local<sup>(188)</sup>. O mesmo se aplica à introdução dos ixodídeos infectados, nomeadamente *R. sanguineus*, vector não só de *B. canis*, mas como de outros patogéneos como *E. canis*<sup>(105)</sup>. Existem ainda relatos de cães italianos infectados após viagens a França e à Polónia<sup>(31)</sup> e de cães alemães infectados após viagem a Espanha<sup>(225)</sup>. Quanto às raças dos cães, para além da já mencionada “American Pit Bull Terrier”<sup>(25)</sup> associada às lutas de cães, parece também haver uma predisposição do “Yorshire Terrier”<sup>(194)</sup> para a infecção por *B. canis* e do Geyhound ou galgo inglês para *B. canis vogeli*<sup>(25)</sup>. No caso das prevalências elevadas em Greyhounds, enquanto cães de corridas, foram-lhe associadas as viagens frequentes e o contacto com diversos cães, tendo-se verificado, no caso particular da América do Norte, uma maior dispersão da doença após os cães terem sido adoptados, após a sua retirada das corridas, em lares espalhados por todo o país<sup>(25)</sup>. Existem também evidências de que, geograficamente, as espécies e subespécies de *Babesia* se encontram em mutação, como é o exemplo dos E.U.A., onde actualmente a espécie *B. gibsoni* é predominante, quando era rara antes de 1999 e a *B. canis vogeli* era a subespécie mais prevalente<sup>(25)</sup>. Em Portugal, foram identificados como factores de risco para a infecção por *B. canis* no Nordeste Transmontano, o período decorrente do Outono e Inverno em canídeos de aptidão de caça<sup>(131)</sup>.

### **Sinais clínicos**

Os sinais clínicos dependem da virulência da espécie e subespécie, da idade e estado imunitário do cão, da fase da doença, das possíveis complicações causadas por outros patogéneos, bem como do grau de anemia e da rapidez com que surge<sup>(75)</sup>. O período de

incubação, após a picada pelo ixodídeo infectado, é de 10 a 21 dias<sup>(130)</sup>. A forma hiperaguda, caracterizada por anemia hemolítica intravascular, choque hipotensivo, hipóxia e morte rápida, ocorre principalmente em cães sem imunidade introduzidos em áreas endêmicas<sup>(75)</sup>. Na forma aguda os sinais clínicos são decorrentes dos órgãos afectados e do grau de anemia<sup>(75)</sup>, incluindo os sinais clínicos febre, anemia, mucosas pálidas, icterícia e hemoglobinúria<sup>(46,86,137)</sup>. Na forma crónica surge febre intermitente, diminuição do apetite, perda da condição corporal, esplenomegália e icterícia, resultantes de hemólise persistente, predominantemente extravascular<sup>(75)</sup>.

A babesiose canina pode ser classificada clinicamente como não complicada (sem outra doença que não a babesiose) ou complicada<sup>(130)</sup>. A babesiose não complicada é caracterizada pela hemólise intra e extravascular<sup>(75)</sup>, sendo dividida em ligeira, moderada ou grave, dependendo da gravidade da anemia<sup>(130)</sup>. A forma ligeira pode progredir para a forma grave, onde o grau de anemia pode colocar em risco a vida do animal (com hematócrito inferior a 15% e por vezes 5%)<sup>(130)</sup>. A babesiose complicada envolve manifestações clínicas não relacionadas com a hemólise<sup>(130)</sup>, como a falência de múltiplos órgãos, seguida da síndrome inflamatória sistémica pela excessiva libertação de mediadores inflamatórios<sup>(75)</sup>. As complicações mais comuns são a insuficiência renal aguda, as coagulopatias, hepatopatias, a icterícia, a anemia hemolítica imuno-mediada, a síndrome respiratória aguda, a hemoconcentração, o choque e a babesiose cerebral<sup>(130)</sup>. Esta pode resultar de uma acumulação de eritrócitos parasitados nos vasos cerebrais ou de um desarranjo metabólico<sup>(130)</sup>, com mioclonias, incoordenação, perda de consciência e nistagmus<sup>(75)</sup>.

As alterações hematológicas reportam anemia hemolítica regenerativa (de gravidade variável), diminuição do hematócrito e trombocitopénia, enquanto a urinanálise indica proteinúria e hemoglobinúria<sup>(53,75)</sup>. O valor dos leucócitos pode apresentar-se aumentado ou

diminuído<sup>(53)</sup>. Quanto ao hematócrito, existem autores que verificaram não haver associação estatística entre as alterações deste e a infecção por *Babesia* sp.<sup>(149)</sup>, enquanto que outros afirmam que, na prática clínica, o hematócrito, nomeadamente o critério  $\leq 30\%$ , será indicativo de infecção devendo ser realizados outros testes complementares de diagnóstico<sup>(24)</sup>.

## Diagnóstico

O diagnóstico é baseado no exame clínico, na anamnese, na exposição ao vector e na detecção do agente patogénico em esfregaços capilares<sup>(27)</sup> corados com Giemsa ao microscópio<sup>(153)</sup>. O diagnóstico clínico pode ser um desafio, uma vez que não existe qualquer critério de referência<sup>(25)</sup>.

Nos métodos de diagnóstico directo, a microscopia é o mais utilizado pelo baixo custo, e facilidade de execução e em que os casos positivos têm um diagnóstico definitivo<sup>(153,173)</sup>. Contudo, revela-se laborioso, moroso e de baixa sensibilidade<sup>(153)</sup>, podendo ser necessária a análise de várias lâminas até se atingir um diagnóstico<sup>(46)</sup>. Nos casos atípicos ou crónicos, a detecção microscópica dos parasitas pode ser difícil devido à escassa parasitémia<sup>(24)</sup>.

O uso dos métodos moleculares pode levar a uma identificação correcta dos piroplasmas, uma vez que morfológicamente as espécies são muito semelhantes<sup>(50)</sup>. Contudo, dado que as diferentes espécies e subespécies de *Babesia* resultam em diferentes graus de parasitémia durante a fase aguda e a crónica, será improvável que a sensibilidade do teste PCR seja a mesma para todas as espécies e subespécies<sup>(25)</sup>.

Existe, também, um método de detecção de eritrócitos infectados por *B. canis* em amostras de sangue periférico, por citometria de fluxo, com hidroetidina, um composto que se liga a células viáveis sendo convertido para brometo de etídio, o fluorocromo que intercala com moléculas de ADN<sup>(24)</sup>. Assim, é possível monitorizar a viabilidade das células infectadas

e o desenvolvimento das formas de *B. canis* em eritrócitos viáveis, tanto na fase aguda como crónica<sup>(24)</sup>. Este método é mais sensível que a microscopia, é rápido (duas a três horas) e reprodutível, mas implica meios laboratoriais apropriados<sup>(24)</sup>.

As técnicas de diagnóstico indirectas como a serologia, nomeadamente a IFI, são úteis para identificar os portadores assintomáticos e para diagnosticar as infecções crónicas, nos quais o baixo nível de parasitemia, ou nula, pode não ser detectável nos esfregaços de sangue periférico<sup>(53,223)</sup>. A IFI é considerada muito sensível, mas moderadamente específica, uma vez que há reacções cruzadas com várias espécies *Babesia* sp.<sup>(53,223)</sup>. Um teste IFI para *B. gibsoni* definiu como limiar de positividade 1:320 para o diagnóstico em canídeos sintomáticos e o valor de 1:280 para estudos epidemiológicos<sup>(223)</sup>. O teste ELISA é também considerado como muito sensível e moderadamente específico, não foi ainda devidamente padronizado<sup>(53)</sup>.

Todos os testes laboratoriais, como a serologia, PCR e exame microscópico de esfregaços, apresentam limitações pelo que a melhor abordagem, nos casos suspeitos, será integrar várias técnicas<sup>(25)</sup>. Assim, em cães com anemia hemolítica aguda, o exame dos esfregaços sanguíneos deve acompanhar a testagem serológica para *Babesia*<sup>(223)</sup>. Como diagnósticos diferenciais, devem ser consideradas as parasitoses massivas, intoxicações por rodenticidas, anemia hemolítica imuno-mediada<sup>(75)</sup> e em caso de hemorragias, a infecção por *E. canis*<sup>(53)</sup>.

## **Tratamento**

Os objectivos terapêuticos primários são eliminar ou suprimir o parasita e reverter a anemia passível de colocar a vida do canídeo em risco<sup>(130)</sup>. Na forma não complicada da doença, os casos ligeiros ou moderados requerem apenas um tratamento antibabesial e os casos graves implicam um tratamento antibabesial e transfusões, enquanto que todas as

formas de babesiose complicada requerem terapias adicionais<sup>(130)</sup>. Os esquemas terapêuticos variam consoante a disponibilidade dos princípios activos, pelo que, no Brasil, a terapêutica de eleição passa pelo diaceturato de diminazeno 2,5-3,5 mg/kg SC ou IM, numa dose única, e pelo dipropionato de imidocarb 5-7 mg/kg SC ou IM, num intervalo de duas semanas<sup>(53)</sup> (este disponível em Portugal). Ambos os fármacos têm associados efeitos secundários, podendo a administração de atropina 0,04 mg/kg, 10 minutos antes da aplicação do imidocarb, prevenir os seus sinais colinérgicos adversos<sup>(53)</sup>. Outro dos esquemas terapêuticos utilizados descreve a utilização de isetionato de fenamidina (15 mg/kg SC, em duas doses em 24h) e o azul de tripano (10 mg/kg numa solução 1% IV)<sup>(75)</sup>. Todos os fármacos indicados possibilitam uma recuperação clínica, mas não a erradicação completa dos parasitas no sangue, pelo que os cães permanecem portadores, podendo, em situações de stress, surgir a recorrência dos sinais clínicos<sup>(75)</sup>.

De acordo com a gravidade da doença, poderá ser equacionada terapia de suporte, como fluidoterapia e transfusões sanguíneas, quando o hematócrito for inferior a 15% sendo obrigatório quando atinge valores inferiores a 10%<sup>(53)</sup>. Também a presença de taquicardia, taquipneia, pulso filiforme, fraqueza e colapso serão indicadores para uma transfusão sanguínea<sup>(53)</sup>. Em certos casos, o uso de prednisolona 1-2 mg/kg/dia durante uma semana poderá ser benéfico, uma vez que irá inibir os fenómenos imunopatológicos que induzem ou acentuam possíveis glomerulonefrites<sup>(53)</sup>.

Os casos suspeitos de babesiose canina, com uma história de exposição recente a ixodídeos, devem ser tratados mesmo na ausência da confirmação laboratorial<sup>(53)</sup>. Também os portadores assintomáticos deverão ser tratados, pois a ausência de tratamento potencia o risco dos parasitas poderem condicionar a capacidade do organismo animal de reagir perante outros patógenos<sup>(75)</sup>.

## 1.5 Borreliose de Lyme canina

### Etiologia

A borreliose de Lyme é provocada pela espiroqueta do género *Borrelia*, capaz de infectar o Homem, os animais domésticos e silvestres com morbidades significativas<sup>(35,85,189)</sup>.

O género *Borrelia* (*B.*) pertence à ordem Spirochetetae, que também engloba os géneros *Leptospira* e *Treponema*, agentes da leptospirose e sífilis, respectivamente<sup>(85)</sup>. O género *Borrelia* caracteriza-se por incluir espiroquetas microaerófilas, Gram negativas, de forma espiral e de membrana exterior com endofibras<sup>(157)</sup>. A espécie *B. burgdorferi* sensu lato (s.l.) caracteriza-se por ser longa e delgada (20-30µm×0,2-0,3µm), conter várias lipoproteínas de superfície (como as OspA e OspF), possuir um pequeno flagelo e um único cromossoma (com plasmídeos circulares e lineares adicionais) e um ciclo de vida que inclui hospedeiros vertebrados e invertebrados<sup>(85,157)</sup>. *B. burgdorferi* s.l. foi dividida em genoespécies, das quais três foram associadas à doença: *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.), *B. afzelii* e *B. garinii*<sup>(47)</sup>. A *B. garinii* e a *B. afzelii* ocorrem na Europa e na Ásia enquanto que a *B. burgdorferi* s.s. é a única genoespécie que ocorre em simultâneo nos E.U.A. e na Europa<sup>(85,157,198)</sup>. Na Europa e na Ásia foi, ainda, identificada a *B. valaisiana* e em Portugal Continental foi isolada *B. lusitaniae*, cujas acções patogénicas para os canídeos não foram ainda esclarecidas<sup>(61,151,157)</sup>, embora exista um estudo inglês que atribuía a *B. valaisiana* a etiologia da borreliose de Lyme canina<sup>(189)</sup>.

Nas populações caninas a prevalência da doença varia geograficamente<sup>(128)</sup>, apesar de ser mais prevalente no Hemisfério Norte<sup>(47)</sup>. Nos E.U.A., as seroprevalências em cães assintomáticos variam consoante os estados, desde 53% no estado de Wisconsin a 8% no estado de Michigan<sup>(95)</sup>. Dados de estudos serológicos em canídeos no Noroeste e Centro de

Espanha apontam valores de seroprevalência que variam entre 0,6%<sup>(195)</sup> e 11,6%<sup>(145)</sup> respectivamente, enquanto em Portugal variam entre os 9%<sup>(151)</sup> e os 2,25%<sup>(2)</sup>. A espiroqueta já foi identificada em canídeos na América<sup>(85,95,128)</sup>, Ásia<sup>(6)</sup> e Europa, nomeadamente Bélgica<sup>(141)</sup>, Espanha<sup>(83,145)</sup>, Portugal<sup>(2,150)</sup>, Suíça<sup>(198)</sup>, Suécia<sup>(109)</sup>, Holanda<sup>(92)</sup>, Bulgária<sup>(47)</sup> e Reino Unido<sup>(139,189)</sup>.

Dada a capacidade dos cães em transportar os vectores para a proximidade humana, pela frequente exposição ao exterior e constantes deslocações, incluindo viagens, e devido ao facto de produzirem anticorpos para *B. burgdorferi* s.l. detectáveis por mais de dois anos<sup>(92)</sup>, foi proposto que os canídeos poderiam servir como sentinelas para programas de vigilância para borreliose de Lyme<sup>(95,145)</sup>. De facto, um estudo efectuado com caçadores e cães de caça indicou que a seroprevalência em ambos foi semelhante, confirmando a utilidade dos canídeos como sentinelas da infecção em humanos<sup>(92)</sup>. Contudo, uma vez que em Portugal o vector é encontrado em número reduzido nos canídeos, estes serão pouco eficazes como animais sentinela para borreliose de Lyme<sup>(151)</sup>.

## **Vector e Ciclo de vida**

*B. burgdorferi* s.l. é mantida na Natureza num ciclo que envolve ixodídeos, do género *Ixodes*, como vectores em que as suas formas imaturas parasitam pequenos mamíferos, roedores ou aves (os reservatórios) durante dois a quatro dias, tempo suficiente para completar a refeição sanguínea e assegurar a transmissão da bactéria<sup>(85)</sup>. Na fase adulta, os ixodídeos sobem ao topo da vegetação e esperam por um mamífero de grande porte para o parasitar, necessitando nesta fase de cinco a sete dias para completar a hematofagia<sup>(85)</sup>. A transmissão da bactéria é essencialmente transtadial<sup>(85)</sup>, onde a bactéria se multiplica activamente nas

glândulas salivares<sup>(157)</sup>, sendo a transmissão transovárica rara e pouco eficiente<sup>(85)</sup>, pelo que os ixodídeos não são considerados reservatórios de *B. burgdorferi*<sup>(157)</sup>.

O vector varia consoante a localização geográfica e as genoespécies presentes. *B. burgdorferi* s.s. e *B. afzelli* estão associadas aos pequenos roedores e *B. garinii* a aves<sup>(85)</sup>.

No Nordeste e Noroeste dos E.U.A. o vector associado é o ixodídeo *I. scapularis* (a carraça do veado), enquanto que na costa Oeste o vector é o *I. pacificus*<sup>(85)</sup>. No Japão, o vector principal é o *I. persulcatus*<sup>(6)</sup>, verificando-se no Oeste europeu que a bactéria é transmitida pelos ixodídeos *I. ricinus*<sup>(47)</sup>. Um estudo na Alemanha indicou que 21,8% dos ixodídeos *I. ricinus* colhidos apresentavam ADN de *B. burgdorferi*<sup>(21)</sup>. Em Portugal, as densidades do vector *I. ricinus* são relativamente baixas<sup>(151)</sup>, mas um estudo por PCR revelou que 75% dos ixodídeos *I. ricinus*, colhidos a sul de Lisboa, apresentavam infecção por *B. burgdorferi* s.l.<sup>(95)</sup>.

No Nordeste dos E.U.A., as formas imaturas do vector principal, o artrópode *I. scapularis*, alimentam-se do roedor *Peromyscus leucopus* (reservatório amplificador de *B. burgdorferi* s.s.)<sup>(125)</sup>, enquanto que as formas adultas preferem o veado *Odocoileus virginianus*, o qual não é um reservatório da bactéria, mantendo apenas a população de ixodídeos<sup>(85)</sup>. Na costa Oeste americana, o vector principal, *I. pacificus*, não se encontra envolvido directamente na manutenção do patogéneo, uma vez que o artrópode prefere parasitar o lagarto *Sceloporus occidentalis*, o qual contém um factor borrelícida que elimina a bactéria do seu organismo<sup>(85)</sup>. Neste caso, a espiroqueta é mantida por um ciclo enzoótico independente, que envolve o ixodídeo *I. spinipalpis* que parasita os roedores *Neotoma fuscipes* e *Dipodomys californicus*, os reservatórios da bactéria<sup>(85)</sup>. O vector *I. pacificus* fica então infectado quando se alimenta dos roedores reservatórios<sup>(85)</sup>.

Na Europa, os reservatórios mais importantes de *B. burgdorferi* s.s. e *B. afzelii* pertencem às espécies *Apodemus (A.) sylvaticus* (incluindo em Portugal Continental<sup>(150)</sup>), *A. agrarius* e *Clethrionomys glareolus*, tendo sido também implicadas aves como faisões, tordos e melros<sup>(76,157)</sup>. Em relação aos animais domésticos, foi comprovado experimentalmente que o cão é capaz de infectar estádios imaturos do vector, sendo considerado um reservatório competente e do ponto de vista da doença humana, é o mais importante<sup>(135,145)</sup>. Assim, os canídeos infectados com *B. burgdorferi* s.l., quando expostos aos vectores imaturos podem potencialmente introduzi-los em áreas que não são consideradas, tradicionalmente, como seus biótopos, como os jardins e espaços peri-urbanos<sup>(135)</sup>.

### **Patogénese**

O genoma da espiroqueta codifica 150 lipoproteínas, das quais algumas são fundamentais para a capacidade da bactéria se adaptar aos diferentes hospedeiros, como as lipoproteínas na superfície exterior, as Osp<sup>(85)</sup>. Cada ambiente implica a expressão de um gene específico, que permitirá que a bactéria sintetize os produtos necessários para a sua multiplicação e sobrevivência em cada hospedeiro<sup>(208)</sup>. No intestino do vector a espiroqueta expressa principalmente OspA, mudando para OspC aquando da refeição sanguínea no mamífero<sup>(85)</sup>, alteração necessária para que a infecção do hospedeiro vertebrado<sup>(76)</sup> ocorra nas primeiras 48 horas<sup>(208)</sup>. Autores acreditam que a OspC inibe a fagocitose da bactéria, possivelmente ao limitar a opsonização pelo complemento, permitindo que a bactéria escape à eliminação por parte do hospedeiro<sup>(208)</sup>. Estudos em ratinhos mostraram que, 19 dias após a infecção, a protecção mediada por OspC cessa, podendo outros produtos análogos, como as proteínas variáveis de superfície (VlsE), assumir o papel que OspC desempenhava até então

ou podendo, em alternativa, a espiroqueta manipular o ambiente do hospedeiro para evitar que seja eliminada<sup>(208)</sup>.

As pessoas que têm actividades de trabalho ou lazer ao ar livre apresentam um risco acrescido de contrair a doença<sup>(141)</sup>. Nos cães, vários estudos também indicaram como factores de risco a permanência prolongada no exterior, em actividades como a caça e o pastoreio, em contraste com os cães de companhia que, por terem menos acesso ao exterior, seriam menos susceptíveis à infecção<sup>(95,145)</sup>. Contudo, um estudo holandês, com homens caçadores, cães de caça e cães de companhia, não permitiu estabelecer uma correlação directa entre a seropositividade humana e a canina, tendo determinado que o risco de um caçador contrair ixodídeos a partir do seu cão não é significativo<sup>(92)</sup>. Em Portugal, foi também determinada uma associação entre cães de caça e a seropositividade para borreliose de Lyme, em canídeos da região do Algarve<sup>(2)</sup>. Quanto a considerar a idade como um factor de risco, o caso não é consensual, existindo um estudo que indica o aumento da seroprevalência até aos 24 meses de idade dos canídeos, a partir da qual não se verificam aumentos significativos na seroprevalência<sup>(92)</sup>, em divergência com um outro estudo que não verifica qualquer relação entre a seroprevalência e a idade dos canídeos<sup>(109)</sup>, bem como com um terceiro, realizado em cães sintomáticos, que evidencia que os sinais clínicos surgiram em canídeos de idade superior a quatro anos<sup>(6)</sup>. Outros estudos indicam ainda como maior predisposição para o contacto com a bactéria, a idade superior a um ano, pois os cães jovens terão menos tempo de possível exposição ao vector, ou a sua imunidade não estará ainda suficientemente desenvolvida para apresentar níveis de anticorpos detectáveis pelas técnicas serológicas<sup>(4,145)</sup>. A maioria dos casos de doença parece surgir em cães de raça de grande porte, sem predisposição de sexo ou raça<sup>(177)</sup>, associada à picada das formas imaturas do vector, mais

activas no final da Primavera e Verão<sup>(85)</sup>. O risco de transmissão da espiroqueta será directamente proporcional ao tempo que o vector permanece ligado ao hospedeiro<sup>(157)</sup>.

### **Sinais clínicos**

Apenas 5% dos cães expostos manifestam a doença<sup>(76,128)</sup> e os sinais clínicos da mesma são inespecíficos, surgindo cerca de dois a cinco meses após a infecção e podem ser confundidos com doenças auto-imunes, traumatismos e rickettsioses<sup>(85,127,128)</sup>.

Em cães infectados experimentalmente, observou-se ausência de sinais clínicos, claudicação e ligeiro aumento na temperatura corporal, mas estes dados são condicionados pelo facto de, até à data não ter sido possível reproduzir a infecção em cães, em termos experimentais, da mesma forma que ocorre na Natureza<sup>(35,93,199)</sup>. As razões porque tal ocorre são atribuídas às diferentes predisposições de raças, diferentes estirpes da bactéria infectante, pela possibilidade de exposição crónica (resultado de exposições repetidas a ixodídeos infectados ou de uma infecção persistente nos canídeos<sup>(93)</sup>) e pela presença de co-infecções<sup>(128)</sup>. De facto, tal como já foi referido, uma vez que o vector é o mesmo, são frequentes as infecções mistas por *B. burgdorferi* e *A. phagocytophilum*, o que complica o quadro clínico e o diagnóstico<sup>(109)</sup>.

Os sinais clínicos afectos à infecção natural são inespecíficos como perda de peso, anorexia, letargia, icterícia, esplenomegália, febre, astasia, convulsões, anorexia, fadiga, prostração, diarreia, vómitos, opacidade corneana, conjuntivite, linfadenomegália, tumefacção articular e claudicação<sup>(6,76,83,139,141,177,189)</sup>. Apesar desta última poder resolver espontaneamente em 4 dias, um terço dos animais recidivam noutra articulação<sup>(76)</sup>, existindo ainda um estudo nos E.U.A. que implica a infecção como causa de poliartropatia séptica em cães<sup>(177)</sup>. Tal como na doença humana, o quadro clínico pode evidenciar a disseminação por

espiroquetemia para o coração, meninges, líquido cefalorraquidiano, fígado e rins, esta denominada nefrite canina de Lyme<sup>(6,76)</sup>. A nível do sistema nervoso estão descritos casos com sinais de paralisia dos nervos V, VII, IX e X, com consequente disfagia e paralisia dos músculos mandibulares<sup>(141)</sup>. Outros autores implicaram a bactéria num caso clínico de polineuropatia, ou seja, neuroborreliose, num cão seropositivo<sup>(109)</sup>. Contudo, estudos serológicos em cães com desordens neurológicas, realizados na Suécia, indicam que a neuroborreliose não é comum<sup>(109)</sup>.

Em relação a alterações hematológicas e bioquímicas, encontra-se descrita leucocitose com desvio à esquerda, anemia regenerativa e trombocitopenia<sup>(83,139)</sup>, bem como níveis elevados de creatinina, que sugerem que a insuficiência renal poderá ser uma consequência da doença<sup>(6)</sup>.

## **Diagnóstico**

O Colégio Americano de Veterinários de Medicina Interna (ACVIM) estabeleceu, como critérios clínicos para o diagnóstico de borreliose de Lyme canina, a evidência de exposição à bactéria, sinais clínicos compatíveis com a doença, ausência de outros diagnósticos diferenciais e resposta ao tratamento<sup>(128)</sup>. Na prática, o diagnóstico de borreliose de Lyme é geralmente baseado nos sinais clínicos e na detecção dos anticorpos contra *B. burgdorferi*, apesar das limitações que esta apresenta<sup>(212)</sup>. A borreliose de Lyme canina pode ser sub-diagnosticada pelos clínicos, verificando-se a recuperação clínica de cães possivelmente infectados com a espiroqueta, sem que a causa da doença tenha sido determinada, como resultado da prescrição frequente de antibióticos a que a bactéria é sensível, na maioria dos casos de febre<sup>(6)</sup>.

Há autores que afirmam que, até ao momento, não existe nenhum teste que prove em definitivo a presença de doença pela infecção de *B. burgdorferi*, pelo que uma resposta positiva, mesmo em canídeos sintomáticos, não constituirá uma prova suficientemente forte de que esses sinais clínicos se devam à infecção por *B. burgdorferi*<sup>(58)</sup>. Contraditoriamente, um estudo, realizado em cães infectados experimentalmente, permitiu concluir que a presença de anticorpos direccionados contra o isolado de 50772 de *B. burgdorferi* é indicativa de doença<sup>(35)</sup>.

Em termos laboratoriais, a bactéria apresenta um crescimento óptimo a 33°C num meio líquido, o BSK (Barbour, Stoenner, Kelly) II, podendo também ocorrer em meio sólido, mas de forma lenta e difícil<sup>(157)</sup>. Para além do organismo ser difícil de cultivar, são necessárias colorações especiais (acridinina laranja ou prata) ou microscópio de fundo negro para visualizar as espiroquetas<sup>(128)</sup>. Contudo, a falha em isolar a bactéria não exclui o diagnóstico de borreliose de Lyme<sup>(139)</sup>.

Em relação à técnica directa de detecção de ácidos nucleicos, em canídeos, a sua utilização continua mais restrita à investigação, pelo que o uso como método de diagnóstico de rotina não ainda está estabelecido<sup>(2)</sup>.

Dadas as características de difícil cultivo da bactéria, os testes laboratoriais mais comuns são os serológicos por ELISA, IFI e Immunoblot<sup>(128)</sup>. As IgG e as IgM podem ser detectadas por ELISA e IFI, mas parece não haver vantagem no doseamento de IgM, uma vez que os canídeos desenvolvem tardiamente os sinais da doença e não numa fase inicial, quando as IgM estão presentes<sup>(128)</sup>. Adicionalmente, novas IgM podem ser direccionadas contra novos antígenos decorrentes da alteração antigénica da espiroqueta, pelo que neste caso, a presença de IgM, não prova necessariamente a presença de uma exposição recente<sup>(128)</sup>. Os testes ELISA podem ser à base de células íntegras de *B. burgdorferi* s.s., tendo-se verificado que a inclusão

de antígenos recombinantes, como as proteínas de superfície Osp ou p41-G (um fragmento da flagelina), permite aumentar a especificidade do teste<sup>(133)</sup>. Um ensaio comparando IFI, ELISA e Immunoblot revelou que a ELISA foi significativamente mais sensível que a IFI, embora ambas tenham sido igualmente específicas, tendo-se utilizado os resultados por Immunoblot como referência<sup>(127)</sup>. Contudo, uma vez que se usaram soros reactivos como referência de positividade e negatividade, tal não poderá ser considerado como um verdadeiro teste de referência<sup>(92)</sup>. No entanto, existem autores que defendem que os resultados positivos deverão ser sempre correlacionados com os sinais clínicos para estabelecer um diagnóstico, dado que *B. burgdorferi* se apresenta muitas vezes como uma infecção silenciosa<sup>(139)</sup>. Outra das limitações do diagnóstico laboratorial é a falta de homogeneidade e padronização entre laboratórios, visível no que concerne ao estabelecimento de limiares de positividade, que variam consoante os autores, onde por exemplo para a IFI, podem ir de 1:64<sup>(141)</sup>, 1:80<sup>(109)</sup> a 1:128<sup>(2,127,151)</sup>. A magnitude do título não estará associada à presença ou ausência de doença<sup>(6,128)</sup>, embora num estudo com cães de raça Beagle, infectados experimentalmente, o título de anticorpos tenha aumentado consoante a duração e a gravidade da doença<sup>(35)</sup>. A possibilidade de reacções cruzadas, com outros organismos semelhantes, é outra limitação comprovada pela revelação de que a presença de espiroquetas, do género *Treponema*, em doença periodontal canina, pode induzir falsos positivos nos testes serológicos, contribuindo para valores elevados de seroprevalências<sup>(212)</sup>.

## **Tratamento**

Tendo por referência a antibioticoterapia de eleição na doença humana (doxiciclina 200 mg/dia, em 20-30 dias<sup>(157)</sup>), extrapolou-se o seu uso para a Medicina Veterinária mas, dada a variedade de estirpes na natureza e a dificuldade de reproduzir experimentalmente a

doença nos canídeos, desconhecem-se quais os fármacos ideais e a duração óptima do tratamento<sup>(128)</sup>. Membros do ACVIM recomendam a administração de doxiciclina 10 mg/kg PO, SID, no mínimo durante um mês<sup>(128)</sup>. A doxiciclina é recomendada por ser barata, possuir propriedades anti-inflamatórias e ser eficaz contra rickettsioses, anaplasmose, ehrlichiose e leptospirose, em casos de co-infecções<sup>(128)</sup>. Todavia, um estudo com 18 canídeos infectados experimentalmente, sujeitos a tratamento com 10 mg/kg de doxiciclina, BID e 20 mg/kg amoxiciclina, BID e TID, durante 30 dias, revelou que, embora tendo eliminado as lesões articulares, as espiroquetas persistiram após a antibioticoterapia, mantendo a infecção persistente<sup>(199)</sup>. No caso do tratamento de animais jovens, a amoxiciclina (20mg/kg, TID, PO, 30 dias) revelou ser a melhor escolha<sup>(76)</sup>. Quanto às formas neurológicas, artríticas ou cardíacas, as mesmas poderão ser tratadas por via endovenosa, com penicilina G (20.000 UI/kg, TID) ou ceftriaxona (20 mg/kg, BID)<sup>(76)</sup>, estando também preconizado um tratamento à base de tetraciclina 22mg/kg, TID, durante 14 dias, com evidências de recuperação clínica entre o terceiro e o quarto dia<sup>(83)</sup>.

A poliartropatia pode ser de origem imunomediada, pelo que poderá melhorar com a administração de glucocorticóides<sup>(128)</sup>. Os cães com presumível nefropatia podem necessitar de mais tempo de antibioticoterapia e beneficiar de adjuvantes terapêuticos como os inibidores do enzima conversor de angiotensina, ácido acetilsalicílico, ácidos gordos ómega-3, dieta e, caso indicado, terapia hipertensiva e fluidoterapia<sup>(128)</sup>.

O tratamento raramente é indicado para cães assintomáticos mas com reacção positiva à serologia<sup>(85)</sup>.

## 1.6 Ehrlichiose monocítica canina

### Etiologia

A ehrlichiose monocítica canina é uma doença potencialmente fatal para os canídeos, transmitida pelo vector *R. sanguineus* e cujo agente, *Ehrlichia (E.) canis*, é uma bactéria com tropismo para os monócitos e macrófagos caninos<sup>(3,211)</sup>. A doença adquiriu um destaque especial durante a Guerra do Vietname, onde centenas de cães militares americanos morreram vítimas de infecção por *E. canis*<sup>(173)</sup>. A noção de que *E. canis* apenas infectava a família *Canidae*<sup>(173)</sup> revelou-se incorrecta, pois, após o primeiro isolamento de *E. canis* num humano assintomático na Venezuela<sup>(159)</sup>, ficou realçada a ideia que o Homem também está em risco de ser infectado com o agente<sup>(159,211)</sup>. Tal facto ficou comprovado, com diagnósticos posteriores em humanos sintomáticos, com base na amplificação da porção 16S rRNA de *E. canis* por PCR<sup>(158)</sup>. Com efeito, os proprietários dos cães parasitados com ixodídeos, que interagem frequentemente com os seus animais, encontram-se em maior risco de serem picados por ixodídeos e ficarem eles próprios parasitados<sup>(210)</sup>.

As espécies do género *Ehrlichia*, tal como do género *Anaplasma*, pertencem à família Anaplasmataceae<sup>(67)</sup>, caracterizando-se por serem organismos pequenos (0,5-1,5µm), Gram negativos, pleomórficos, parasitas obrigatórios que crescem e replicam-se em vacúolos membranários das células eucarióticas<sup>(140)</sup>. Em termos laboratoriais, a bactéria cora de azul a púrpura, com a coloração de Romanowsky<sup>(173)</sup>. Os organismos encontram-se em vacúolos citoplasmáticos dos monócitos e macrófagos infectados, numa margem citoplasmática, onde, por divisão binária<sup>(157)</sup>, originam um aglomerado de múltiplos pontos escuros, redondos e pequenos (morulae ou mórulas) no citoplasma, que podem conter mais de 100 organismos por vacúolo<sup>(57,173)</sup>. O género *Ehrlichia*, para além de *E. canis*, compreende também as espécies *E. chaffensis*, *E. muris*, *E. ewingii*, *E. ruminatum* e uma espécie denominada IOE (*Ixodes ovatus*

*Ehrlichia*)<sup>(224)</sup>. Encontram-se descritas várias estirpes, consoante as suas localizações geográficas, mas a sua sequência do gene 16S rRNA é bastante semelhante, apresentando pouco polimorfismo entre as várias estirpes<sup>(1)</sup>. As diferentes seroprevalências, nos diferentes países, podem dever-se à distribuição do vector, ao comportamento animal e à média de idades dos grupos em estudo<sup>(176)</sup>.

Este microrganismo encontra-se disseminado mundialmente<sup>(173)</sup>, reflectindo a presença do seu vector<sup>(211)</sup>. Está presente em canídeos domésticos na Europa<sup>(2,20,122,147)</sup>, Médio Oriente<sup>(17,116,216)</sup>, América<sup>(52,142,176,210,211)</sup>, África<sup>(138)</sup> e Ásia<sup>(203,204,205)</sup>. Em 1990, foi identificada e isolada, pela primeira vez em Portugal e na Europa, *E. canis* na hemolinfa dos ixodídeos *R. sanguineus* recolhidos no distrito de Setúbal<sup>(79,80)</sup>. Os dados de seroprevalência em canídeos portugueses variam entre os 44,26%<sup>(191)</sup> e 50%<sup>(8)</sup> em canídeos errantes da região de Setúbal e 5,25% em canídeos de populações medicamente assistidas da região do Algarve<sup>(2)</sup>.

### **Vector e Ciclo de vida**

Nos ixodídeos infectados por *E. canis*, a bactéria multiplica-se nos hemócitos e nas glândulas salivares, entrando eventualmente no trato digestivo e daí infectando o epitélio intestinal<sup>(173)</sup>. Após a picada no hospedeiro, a atracção das células mononucleares ao local inflamado e às secreções salivares pode acelerar a infecção dos monócitos com *E. canis*<sup>(173)</sup>. Um *R. sanguineus* adulto pode transmitir *E. canis* até 155 dias após o destacamento do hospedeiro<sup>(173)</sup>, apesar de não ser um verdadeiro reservatório para *E. canis*, sendo necessária a presença de canídeos infectados para manter o parasita na população de ixodídeos<sup>(210)</sup>. Foi demonstrado experimentalmente que outras espécies de ixodídeos, como *D. variabilis*, podem

transmitir transtadialmente o patógeno<sup>(111)</sup>. O diagnóstico da doença surge mais frequentemente nos meses de Verão, sendo compatível com a maior actividade do vector<sup>(116)</sup>.

Acreditava-se que a transmissão de *E. canis*, pelos adultos *R. sanguineus*, ocorreria apenas com a infecção das formas imaturas, enquanto larvas ou ninfas<sup>(111)</sup>, mas um estudo comprovou, em condições experimentais, a capacidade do *R. sanguineus* de transmitir *E. canis* de forma intrastadial e transtadial<sup>(29)</sup>. Os machos adultos, expostos à bactéria, são susceptíveis de transmitir o patógeno a vários hospedeiros, não sendo necessária a presença de uma fêmea, nem da prática da cópula, para que a transmissão seja eficaz<sup>(29)</sup>. Um estudo em canídeos da região do Algarve indicou 2,2% como valor de infecção em ixodídeos *R. sanguineus*<sup>(2)</sup>.

Para além de canídeos domésticos, a bactéria infecta também canídeos silvestres, os quais podem persistir assintomáticos até cinco anos<sup>(81,173)</sup>. Apesar dos recentes relatos de infecção em humanos<sup>(14,23)</sup> e indícios de infecção em gatos<sup>(28)</sup>, *E. canis* demonstra especificidade de hospedeiros em relação à família Canidae, em que os canídeos silvestres como a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), a raposa cinzenta (*Urocyon cinereoargenteus*), o coiote (*Canis latrans*), o chacal de dorso prateado (*Canis aureus*), o chacal de dorso negro (*Canis mesomelas*), o lobo (*Canis lupus*) e o cão doméstico são considerados reservatórios naturais<sup>(81,173,179)</sup>.

## **Patogénese**

A patogénese da doença mantém-se desconhecida, uma vez que existem cães (provavelmente imunocompetentes) que, após a infecção com quantidades reduzidas de *E. canis*, conseguem eliminar o parasita e recuperar da doença sem tratamento médico<sup>(102,173)</sup>. Só

com elevada parasitémia surge a doença, motivo porque se acredita ser a mesma também dependente da dose infectante ou da estirpe de *E. canis*<sup>(29,173)</sup>.

Em alguns estudos foi sugerido que uma disfunção imunológica, com sede nos linfonodos e baço, estaria na génese da doença<sup>(57)</sup>, havendo evidências que indicam que, durante a recuperação do canídeo na forma subclínica, o baço poderá ser o último local a alojar a bactéria<sup>(102)</sup>. De igual modo, existem outros estudos que indicam que as populações de IgG e IgM são responsáveis, pelo menos em parte, pelas alterações morfológicas observadas nos linfonodos e baço<sup>(57)</sup>. A gravidade das lesões nos animais infectados, na presença de actividade imunitária intensa, sugere também a presença de mecanismos imuno-mediados na génese dessas lesões, tal como por outro lado, o facto de cães com ehrlichiose crónica apresentarem uma diminuição de células T helper CD4+, é indicativa de disfunção imunológica<sup>(57)</sup>. A bactéria apresenta um tropismo para a microvasculatura dos pulmões, rins e meninges dos cães<sup>(173)</sup> e induz uma vasculite imuno-mediada, a qual poderá desempenhar um papel central na patogénese da ehrlichiose canina e explicar a maior parte das lesões observadas nos órgãos e tecidos infectados<sup>(57)</sup>.

A anemia e leucopénia serão explicadas pela supressão transitória da actividade da medula óssea, devida à infecção por *E. canis*<sup>(57)</sup>. A trombocitopénia é atribuída a diferentes mecanismos, consoante a fase clínica da doença<sup>(101)</sup>. A redução do número de plaquetas, mas o aumento do seu tamanho é uma alteração hematológica constante na fase subclínica, sugerindo trombopoiese activa e uma medula óssea activa em resposta a uma redução patológica do número de plaquetas circulantes<sup>(216)</sup>. Na fase aguda, a trombocitopénia será devida a um aumento do consumo das plaquetas, devido à inflamação no endotélio vascular, ao aumento do sequestro esplénico de plaquetas e à destruição imunológica resultante numa redução do tempo de vida plaquetário<sup>(101)</sup>. Apesar da trombocitopénia ser uma alteração

constante nos cães infectados experimental ou naturalmente<sup>(215)</sup>, um estudo hospitalar não conseguiu demonstrar que cães seropositivos a *E. canis* estão mais predispostos a hemorragias<sup>(210)</sup>. De facto num outro estudo, realizado numa população canina hospitalar no Sul do Brasil, verificou-se que a ehrlichiose não era a principal causa de trombocitopénia nos canídeos<sup>(52)</sup>.

Na fase aguda da doença, a presença de hemorragias, tal como petéquias, equimoses e hifema, dever-se-á a uma possível disfunção plaquetária<sup>(100)</sup> (e não pela trombocitopénia) bem como a um aumento da viscosidade sanguínea, vasculite e aumento da pressão oncótica<sup>(99)</sup>. Com efeito, resultados de infecções experimentais em canídeos mostraram uma inibição significativa da agregação plaquetária nos animais infectados<sup>(100)</sup>. Esta disfunção plaquetária contribuirá para a presença de hemorragias, uma vez que não se formará o rolhão hemostático, a principal função das plaquetas<sup>(100)</sup>. De igual modo, a inibição da agregação plaquetária poderá devida à presença de anticorpos anti-plaquetas presentes no soro dos cães infectados, os quais ao interagir com as glicoproteínas membranárias das plaquetas evitarão a agregação das mesmas<sup>(100)</sup>.

Outro estudo comprovou que a infecção por *E. canis* provoca um aumento das proteínas sintetizadas, na fase aguda de situações como infecção, inflamação ou trauma, nomeadamente a proteína C-reactiva e o ácido- $\alpha$ 1 glicoproteico<sup>(175)</sup>. De facto, num caso de cegueira aguda por *E. canis* foi implicada a presença de gamopatia mononuclear na patogénese da sintomatologia ocular<sup>(99)</sup>. Também em infecções experimentais, canídeos avaliados na fase subaguda da infecção mostraram aumentos significativos das gamma-globulinas, em comparação com cães não infectados<sup>(216)</sup>.

À fase subclínica da doença pode suceder a crónica, possivelmente letal, de origem ainda desconhecida<sup>(102)</sup>. Acredita-se poder estar relacionada com a raça, estado imune do

animal, stress, co-infecções, estirpe do parasita e localização geográfica<sup>(102)</sup>. Por exemplo, a raça Pastor Alemão parece ser mais susceptível à infecção<sup>(98)</sup>, uma vez que apresenta uma imunidade celular deprimida face a *E. canis*, tendo a doença um curso mais grave com um prognóstico mais desfavorável, incluindo risco de vida para o animal<sup>(215)</sup>.

Embora diversos autores não estabeleçam qualquer factor de risco, estudos indicaram como factores de risco associados à seropositividade a *E. canis* idades superiores a dois anos<sup>(176)</sup>. Existem outros autores que indicam, como factores de risco para a seroprevalência, os canídeos de aptidão caça e a sua presença em áreas rurais, pela maior exposição aos vectores e seus biótopos<sup>(2)</sup>.

### **Sinais clínicos**

A ehrlichiose monocítica canina caracteriza-se por um período de incubação de uma a três semanas e surge em três fases consequentes: aguda, subaguda e crónica<sup>(102,173,216)</sup>.

A maioria dos sinais clínicos varia geograficamente, consoante as estirpes presentes e os hospedeiros, pois nos canídeos silvestres, a infecção por *E. canis* apresenta um quadro clínico mais benigno do que no cão doméstico<sup>(52,179)</sup>. Uma vez que *R. sanguineus* é vector de outros agentes para além da ehrlichiose canina surgem frequentemente no mesmo animal co-infecções com *B. canis*, *Hepatozoon canis*, *A. platys* e *A. phagocytophilum*, que influenciam o curso clínico da doença, contribuindo para a deterioração da condição do animal<sup>(147,204,210)</sup>.

Os sinais clínicos da fase aguda não são específicos<sup>(176)</sup>. Após a picada de um ixodídeo infectado, e após um período de 10<sup>(108)</sup> a 14 dias, a doença manifesta-se geralmente por febre, depressão, mucosas pálidas, letargia, dispneia, anorexia, linfadenomegália, perda de peso e hemorragias como petéquias e epistaxis<sup>(17,99,101,147,173)</sup>. Estão descritos também esplenomegália, hepatomegália, emaciação e aumento da queda do pêlo<sup>(57)</sup>, bem como

cegueira aguda com uveíte anterior, edema da córnea bilateral, hifema, hemorragias subretinais e intraretinais e deslocamento da retina<sup>(99)</sup>. As principais alterações hematológicas observadas são a trombocitopénia, anemia moderada e leucopénia moderada que se pode manter durante alguns meses<sup>(57,99,101,108,173,211)</sup>. As alterações bioquímicas principais incluem a hipoalbuminémia, hiperglobulinémia, hipergamaglobulinémia e aumento dos níveis séricos do enzima lactato desidrogenase e creatinaquinase<sup>(99,101,108,173,211)</sup>.

Após a infecção, os hospedeiros afectados iniciam uma recuperação parcial de 20-30 dias pós-infecção<sup>(29)</sup>, seguindo-se a fase subaguda ou subclínica, da infecção persistente, que pode manter-se até 40-120 meses, em que os canídeos se apresentam clinicamente saudáveis, sendo portadores da bactéria<sup>(102)</sup>. Acredita-se ser este o estado de portador durante o qual os vectores conseguem adquirir e disseminar o patógeno para outros hospedeiros<sup>(29)</sup>. Esta fase manifesta-se por trombocitopénia moderada<sup>(101,102,173)</sup> (por vezes a única alteração)<sup>(216)</sup> e uma diminuição dos valores de leucócitos em função do decréscimo do número de neutrófilos, embora não chegue a haver uma leucopénia, neutropénia e anemia efectiva<sup>(29,216)</sup>. Estão também associados sinais clínicos neurológicos e claudicação à infecção por *E. canis*<sup>(210)</sup>. Nesta fase, os títulos de anticorpos mantêm-se elevados durante seis meses, variando de 1:2560 a 1:20480, compatível com uma infecção prolongada ou uma estimulação antigénica crónica<sup>(216)</sup>.

A grave fase crónica é caracterizada por hemorragias, epistaxis, edema periférico, emaciação e choque hipotensivo, que levam à morte do canídeo<sup>(173)</sup>, sinais clínicos estes muitas vezes complicados por co-infecções<sup>(147,211)</sup>. A epistaxis é secundária às hemorragias pulmonares ou nasais<sup>(153)</sup>. A alteração hematológica principal na fase crónica grave é a pancitopénia, que resulta da hipoplasia ou aplasia de todas as linhas celulares precursoras da medula óssea e a anemia é de tipo não regenerativa, normocrómica e normocítica<sup>(101,173)</sup>.

Um estudo indicou como factores clínicos de mau prognóstico à infecção a presença de anemia e leucopénia grave, pancitopénia, hemorragias (especialmente epistaxis) e o facto do canídeo pertencer à raça Pastor Alemão<sup>(98)</sup>.

## **Diagnóstico**

A infecção com *E. canis* resulta no desenvolvimento de anticorpos específicos, a base do diagnóstico serológico<sup>(215)</sup>. Canídeos infectados experimentalmente com *E. canis* seroconvertem 15 dias pós-inoculação, com um aumento progressivo do título de anticorpos durante os primeiros cinco meses pós-infecção, mantendo-se elevados durante mais 11 meses e diminuindo em seguida, sugerindo uma estimulação antigénica contínua<sup>(102)</sup>. A IFI é sensível<sup>(107)</sup> e é o método mais utilizado para diagnosticar a infecção por *E. canis*, na presença de seroconversão<sup>(191)</sup>, sendo considerado o método de referência<sup>(23,203)</sup>. Quando os sinais clínicos são consistentes com a doença, juntamente com um resultado serológico positivo, o diagnóstico clínico presuntivo será de ehrlichiose canina<sup>(148)</sup>. As recomendações, para a confirmação serológica de doença, incluem a demonstração de seroconversão, ou seja, um aumento ou diminuição de quatro vezes no título ou a presença de IgM específicas<sup>(173)</sup> passadas uma a duas semanas<sup>(215)</sup>.

Diferentes laboratórios utilizam diferentes valores de “cut-off”, para diferenciar os resultados positivos dos negativos. O ACVIM indica o valor de 1:80 como suspeito de infecção, devendo realizar-se uma segunda análise 15 a 21 dias depois, devendo ser consideradas outras técnicas como o Immunoblot e o PCR, para confirmação dos resultados<sup>(148)</sup>. Outros autores afirmam que, quando surgem títulos de IgG maiores ou iguais a 1:64 deverá suspeitar-se de exposição a *E. canis*<sup>(215)</sup>. Um diagnóstico provável será aquele com sinais clínicos e hematológicos compatíveis com a doença e uma IFI de título de IgG de

1:64 ou 1:128<sup>(215)</sup> e o diagnóstico definitivo surgirá com o aparecimento de sinais clínicos, alterações hematológicas sugestivas de ehrlichiose monocítica canina e um de título, à IFI, de IgG  $\geq$ 1:256<sup>(215)</sup>. Por outro lado, há autores que afirmam que um título elevado ( $\geq$  320) será indicativo de um contacto com *E. canis* e um título baixo ( $\leq$  160) pode resultar de uma fraca resposta imunitária à infecção por *E. canis* ou pode ser o resultado de uma infecção por *Ehrlichia spp.* em lugar de *E. canis*<sup>(152)</sup>.

Perante um resultado positivo à IFI deve considerar-se a possibilidade de reacções cruzadas com outras espécies, como a *E. chaffeensis* e a *Neorickettsia helminthoeca*<sup>(215)</sup>, embora as reacções cruzadas sejam limitadas e variáveis. Nos casos subclínicos a IFI, mesmo com um resultado positivo, não é um indicador fiável do estado de portador, pois canídeos que apresentam anticorpos anti-*E. canis* podem já não transportar o parasita<sup>(102)</sup>. É provável que estes anticorpos sejam remanescentes da estimulação antigénica, que ocorreu quando o cão era portador da bactéria<sup>(102)</sup>. Nas áreas endémicas os resultados de IFI terão de ser cuidadosamente interpretados, uma vez que os cães seropositivos a *E. canis* podem sê-lo apenas por múltiplas exposições à bactéria<sup>(217)</sup>.

Foi proposto um teste ELISA à base da proteína recombinante MAP2 de *E. canis*, que demonstrou uma concordância geral de 97,2% com a IFI, mas que apresentou mais falsos positivos, provavelmente pela presença de proteínas contaminantes de *Escherichia coli* ou por anticorpos que reagiram de forma cruzada<sup>(3)</sup>. Outros autores compararam a IFI com 4 testes serológicos comerciais à base de ELISA<sup>(23)</sup>, concluindo que, tal como a IFI, os testes não permitem a distinção entre infecção activa e exposição antiga, nem entre as espécies *E. canis*, *E. chaffeensis* e *E. ewingii*<sup>(23)</sup>. Os testes que utilizam células íntegras de *E. canis* apresentam sensibilidade de 100%, mas pouca especificidade, uma vez que há uma grande percentagem de falsos positivos<sup>(23)</sup>.

Em áreas endémicas de leishmaniose canina, face às semelhanças clínicas e laboratoriais entre a leishmaniose e a ehrlichiose, pela necessidade do diagnóstico diferencial entre as duas doenças<sup>(1)</sup>, foi proposto um teste misto de IFI para detectar simultaneamente anticorpos anti-*E. canis* e *Leishmania infantum*, com a vantagem de ser um teste rápido (resultados em apenas alguns minutos), simples e económico<sup>(129)</sup>.

O Immunoblot é quase tão sensível como a IFI, no diagnóstico da infecção por *E. canis*, sendo a leitura de resultados mais objectiva<sup>(107)</sup> e permitindo a diferenciação da espécie *E. canis* de outras semelhantes, como a *E. chaffeensis*<sup>(174)</sup> e a *E. ewingii*<sup>(148)</sup>.

Através das técnicas de diagnóstico directo, é possível identificar as mórulas intracitoplasmáticas de *E. canis* nos monócitos 12 dias após uma infecção experimental<sup>(57)</sup>, em esfregaço de “buffy coat” periférico corado com Giemsa<sup>(173)</sup>. As mórulas apresentam-se como pequenos pontos ou ainda sob a forma de cachos no citoplasma dos monócitos<sup>(191)</sup>. Porém, as inclusões só são observáveis se os esfregaços forem efectuados durante a fase aguda da doença e sobretudo quando os animais apresentam febre<sup>(191)</sup>. Assim, a microscopia óptica na fase subclínica da doença, pelo número demasiado pequeno de parasitas circulantes, será menos sensível, sendo frequentes os falsos negativos<sup>(102,173)</sup>. É também possível observar as inclusões em amostras *post-mortem* de canídeos doentes, especialmente fígado, baço, rim e pulmão<sup>(191)</sup>.

Ficou demonstrado, num ensaio que comparou o uso de PCR, IFI, Immunoblot e cultura, numa fase inicial da doença, que o teste mais sensível e definitivo foi a cultura<sup>(107)</sup>. Um resultado positivo à cultura de células é conclusivo em termos de diagnóstico<sup>(191)</sup>. No entanto, a sua morosidade (os resultados surgem em 14 a 34 dias, mas podem ir até às 8 semanas<sup>(148)</sup>), os requisitos de instalações aptas a técnicas de cultura celular e os elevados custos implicam, inerentemente, que se adoptem outras técnicas, como o PCR<sup>(107)</sup>.

Cumulativamente, a cultura exige grandes volumes de sangue e atenção cuidada<sup>(204)</sup>. De igual modo, os resultados negativos à cultura de células não indicam a ausência de infecção<sup>(191)</sup>.

O teste PCR, nomeadamente a amplificação do gene 16S rRNA, permite a distinção entre *E. canis*, *E. ewingii* e *E. chaffensis*<sup>(158)</sup>. Na fase subclínica, o PCR de aspirados esplênicos será o método mais indicado para diagnosticar o estado de portador de *E. canis*<sup>(102)</sup>. O PCR “nested”, com “primers” específicos para *E. canis*, é um método específico e sensível<sup>(217)</sup>. Uma comparação do PCR “nested” com a IFI demonstrou que a técnica de biologia molecular é específica para *E. canis*, obtendo resultados positivos mais precocemente do que com a IFI, quando ainda não ocorreu seroconversão<sup>(217)</sup>. No entanto, quando temos resultados positivos à IFI e negativos ao PCR<sup>(147)</sup> tal poderá dever-se a anticorpos residuais ou, em regiões endémicas, a múltiplas exposições ao antigénio, mas sem infecção, ou ainda ao facto dos canídeos poderem estar infectados com *E. chaffensis*, *E. ewingii* ou outras variantes de *E. canis*, que originam reacções cruzadas daí serem negativos ao PCR<sup>(217)</sup>. Os casos de IFI negativa e PCR positivo (que podem ir de 2,8% em regiões endémicas a 17% em regiões não endémicas) podem ser o resultado de imunossupressão, de níveis baixos de IgG numa fase inicial da doença ou da presença de uma nova espécie *Ehrlichia* sp..<sup>(217)</sup>

Pelo exposto, o PCR é um instrumento útil para o diagnóstico e para confirmação do sucesso terapêutico em conjunto com a IFI<sup>(217)</sup>, verificando-se que resultados simultaneamente positivos ou negativos, por PCR e IFI, representam canídeos infectados ou não infectados, respectivamente<sup>(217)</sup>.

## **Tratamento**

Durante mais de 20 anos foi recomendado o dipropionato de imidicarb 5mg/kg, IM, em duas aplicações num espaço de duas a três semanas<sup>(148)</sup>. O mesmo apresentava como

vantagem adicional sobre as tetraciclina (outro fármaco eficaz) a sua eficácia sobre a babesiose em caso de co-infecção<sup>(163)</sup>. Contudo, havia evidências que o imidocarb não seria totalmente eficaz<sup>(163)</sup>, o que foi comprovado por um estudo recente em cães infectados experimentalmente<sup>(68)</sup>. Neste, ficou evidente que o fármaco administrado na dose de 6,6mg/kg, IM, em duas administrações em 15 dias, mostrou não ser eficaz, uma vez que não houve eliminação de *E. canis* na medula óssea, sangue e baço, apesar de terem havido melhorias nos sinais clínicos e na contagem plaquetária<sup>(68)</sup>. Com o imidocarb, os títulos à IFI irão diminuir seis a nove meses após o tratamento, pelo que a serologia não poderá ser utilizada como monitorização do sucesso terapêutico<sup>(68)</sup>.

O tratamento recomendado actualmente é à base de doxiciclina 10 mg/kg, BID, por via oral, durante duas a três semanas, seguido de IFI, duas semanas após o fim do tratamento<sup>(108)</sup>. Na fase aguda da doença ou na crónica moderada, cerca de 24-48 horas após o início da antibioticoterapia, deverá surgir uma melhoria notória na condição clínica dos canídeos<sup>(148)</sup>. Nos casos crónicos graves pode haver falha terapêutica com consequente morte do animal<sup>(203)</sup>. Se, após o fim do tratamento, o título de IFI não diminuir significativamente (14 a 16 vezes), o tratamento deverá ser continuado<sup>(108)</sup>. Como terapêutica coadjuvante a epinefrina intranasal, fenilepinefrina ou outros vasoconstritores podem ajudar a controlar a hemorragia intranasal<sup>(173)</sup>.

O doseamento das proteínas da fase aguda da inflamação, como a proteína C-reactiva e o ácido- $\alpha$ 1 glicoproteico, ao indicar o grau de lesão dos órgãos envolvidos, poderá ser útil para se equacionar o uso de anti-inflamatórios<sup>(175)</sup>.

Um resultado negativo à IFI não deverá ser o objectivo após o tratamento, uma vez que, em infecções naturais e experimentais, após tratamento por doxiciclina, os anticorpos persistem<sup>(108,215,217)</sup>. Se o resultado da IFI for positivo e o de PCR negativo, as recomendações

vão no sentido de interromper a antibioticoterapia e voltar a testar os cães 2 meses mais tarde, por IFI e PCR<sup>(217)</sup>. Se os animais se mantiverem assintomáticos e o título de IFI descer mais de 14 a 16 vezes, mantendo-se negativo ao PCR, a infecção estará provavelmente debelada<sup>(108,217)</sup>. Se os cães forem positivos ao PCR mas negativos à IFI, o tratamento é recomendado até que fiquem negativos por PCR<sup>(217)</sup>.

Os canídeos deverão ser rastreados periodicamente para a ehrlichiose monocítica canina, nomeadamente as raças mais susceptíveis a desenvolverem a forma crónica, como a raça Pastor Alemão, e não deverá ser usado o sangue, de cães clinicamente saudáveis mas seropositivos, em transfusões sanguíneas<sup>(102)</sup>. Os cães que se confirme estarem na fase subclínica deverão ser tratados, logo que possível, de modo a aumentar as hipóteses de sucesso do tratamento, antes dos mesmos entrarem na fase crónica<sup>(102,173,216)</sup>.

## 1.7 Febre botonosa canina

### Etiologia

A febre botonosa, também denominada por febre escaro-nodular ou “mediterranean spotted fever”, é uma zoonose cujo bactéria pertencente ao complexo *Rickettsia (R.) conorii* subspécie *conorii*, é transmitido pela picada de um ixodídeo<sup>(72)</sup>. O complexo *R. conorii* pertence à família Rickettsiaceae que engloba a ordem Rickettsiales, em que suas espécies são bactérias intracelulares obrigatórias que crescem livremente no citoplasma das células eucarióticas<sup>(67)</sup>.

O complexo *R. conorii* subs. *conorii* inclui as estirpes #7 ou Malish (a mais frequente em França, Portugal e norte de África), Kenyan e a Morocoon<sup>(156)</sup>. Em Portugal foi também identificada a estirpe *R. conorii* subsp. *israeli*<sup>(10,184)</sup>. Estas diferentes estirpes isoladas de humanos e de ixodídeos, apesar das diferenças fenotípicas e genotípicas, são consideradas como uma única espécie<sup>(64)</sup>.

A doença é endémica nos canídeos da região Mediterrânica tendo sido identificada em Portugal<sup>(2,8,151)</sup>, Espanha<sup>(72,187)</sup>, França<sup>(169)</sup>, Itália<sup>(134)</sup>, Croácia<sup>(164)</sup>, Egipto<sup>(196)</sup>, Israel<sup>(115)</sup> e em África (Zimbabué)<sup>(114)</sup>. Em Espanha, foram determinados valores de seroprevalência em cães saudáveis, de 48,6% e de 56,4% em canídeos doentes<sup>(195)</sup>. As diferenças encontradas nas seroprevalências nos canídeos surgirão consoante se trata de uma área rural (onde as prevalências são superiores) ou urbanas<sup>(163)</sup>. Em Portugal, os dados de seroprevalência em canídeos variam entre os 85%<sup>(151)</sup> e os 38,5%<sup>(2)</sup>. Os valores elevados podem ser explicados pela duração dos anticorpos em circulação ou por uma estimulação antigénica repetida por re-infecções pelo vector<sup>(151)</sup>.

Em Portugal a doença humana é endémica<sup>(9)</sup>, sendo a única Rickettsiose conhecida com impacto em Saúde Pública<sup>(184)</sup>, com cerca de 1000 novos casos declarados

anualmente<sup>(10)</sup>. No entanto, estima-se que existam sete vezes mais casos que os notificados anualmente<sup>(64)</sup>. É o distrito de Bragança que apresenta o valor mais elevado de incidência (56,8 por 10<sup>5</sup> habitantes)<sup>(64)</sup>, sendo considerada a principal doença associada a ixodídeos em humanos em Portugal<sup>(190)</sup>.

### **Vector e Ciclo de vida**

A bactéria é transmitida pela picada do principal vector e reservatório na área Mediterrânica, o ixodídeo *R. sanguineus*<sup>(72)</sup>. Contudo, a taxa de infecção de *R. sanguineus* com rickettsias do grupo exantémica é geralmente inferior a 10%<sup>(10,156)</sup>. Uma vez que o vector é mais activo durante o fim da Primavera e no Verão, a maioria dos casos ocorre durante estes meses<sup>(10,64,156,186)</sup>. Contudo, as actuais alterações climáticas em Portugal, com Invernos menos chuvosos e menos frios, poderão implicar uma maior sobrevivência do vector durante mais tempo e desta forma, a febre botonosa poderá deixar de ser considerada uma doença sazonal, devendo ser considerada como diagnóstico diferencial perante uma síndrome tipo gripal no Outono e Inverno<sup>(65)</sup>.

No distrito de Bragança estão associados à transmissão da doença os ixodídeos *D. reticulatus*, bem como *R. sanguineus* e *D. marginatus*<sup>(184)</sup>. Na região do Algarve, 22,2% dos ixodídeos *R. sanguineus* colhidos apresentaram bactérias pertencentes ao género *Rickettsia*<sup>(2)</sup>. No distrito de Setúbal, a bactéria foi identificada na hemolinfa de exemplares de *R. pusillus*, *R. bursa*, *I. ricinus*, *Hyalomma marginatum*, *Hyalomma lusitanicum* e *R. annulatus*<sup>(80)</sup>.

O ciclo de vida da bactéria não é conhecido na sua totalidade<sup>(156)</sup>. A bactéria *R. conorii* manter-se-á na área Mediterrânica através da transmissão transtadial e transovárica nas populações do seu vector<sup>(134)</sup>, apesar desta última não estar demonstrada inequivocamente em *R. sanguineus*<sup>(156)</sup>. Assim, o artrópode é não apenas o vector mas também o reservatório da

bactéria<sup>(157)</sup>. O parasita encontra-se nas glândulas salivares<sup>(170)</sup> do artrópode sendo transmitido ao hospedeiro enquanto o ixodídeo faz a sua refeição sanguínea<sup>(64)</sup>. Considera-se que será necessário haver um período de fixação de 20 horas do vector ao hospedeiro para que se dê a transmissão efectiva da bactéria ao hospedeiro<sup>(115)</sup>. Todas as formas evolutivas do *R. sanguineus* são susceptíveis de transmitir o agente infeccioso<sup>(64)</sup>. Os adultos apresentam grande especificidade pelo canídeo doméstico, raramente parasitando o Homem, ao contrário das formas imaturas muito menos específicas<sup>(87)</sup> e provavelmente responsáveis pela transmissão da doença aos humanos<sup>(134)</sup>. Em Portugal, a faixa etária mais afectada, pertence às crianças provavelmente por manterem uma relação mais estreita com os animais domésticos possivelmente parasitados com o vector como o cão e por terem um contacto mais contacto com o solo ou locais infestados com os vectores<sup>(64)</sup>.

Os hospedeiros vertebrados são essenciais para o ciclo de vida do parasita, uma vez que fornecem as refeições aos vectores, mas o seu papel no ciclo de transmissão da bactéria está ainda por determinar<sup>(134)</sup>. Pensa-se que, embora o cão possa servir ocasionalmente de reservatório da bactéria, dada a bacteriémia transitória após a infecção, o seu principal papel será o de transportar os vectores infectados, nomeadamente para a proximidade dos humanos<sup>(72,114,151)</sup>. Tem sido referido o papel do cão como sentinela da infecção no Homem, pois a prevalência de anticorpos anti-*R. conorii*, em cães, pode ser um critério para indicar a presença de ixodídeos infectados e desta forma, a possibilidade de transmissão da doença ao Homem, informação útil para a prevenção da infecção humana<sup>(115,134)</sup>. De facto, dados indicam que existe uma correlação directa entre a prevalência de anticorpos para *R. conorii* em canídeos e a prevalência da infecção no Homem<sup>(115)</sup> e a exposição com os canídeos parasitados com o vector parece ser um factor predisponente para o desenvolvimento da doença nos humanos<sup>(169)</sup>. Os bons hábitos de higiene favorecem uma remoção mais precoce

dos ixodídeos nos humanos, levando a crer que as condições socio-económicas possam ser também condicionantes na epidemiologia da doença, tanto nos canídeos como no Homem<sup>(169)</sup>.

## **Patogénese**

As células endoteliais são o alvo primário de *R. conorii*<sup>(122)</sup>. Após a fagocitose, o vacúolo fagocitado é autolisado e a rickettsia escapa à digestão fagocitária e multiplica-se livremente no núcleo e citoplasma da célula hospedeira<sup>(186)</sup>. As rickettsias podem mover-se livremente de célula para célula através da mobilização da actina, tendo sido identificada em *R. conorii* a proteína de superfície RickA, que *in vitro* activa o complexo Arp2/3, essencial para a polimerização da actina<sup>(156)</sup>. Utilizando o ratinho como modelo animal ficou demonstrado que as citocinas sintetizadas pelos linfócitos T, macrófagos e pelas células “natural killer” (NK), nomeadamente o interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e o factor de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) são necessários para a eliminação da bactéria nas células endoteliais e quando os factores em causa estão diminuídos ou ausentes surgem os casos mortais<sup>(78)</sup>. O mecanismo de acção do IFN- $\gamma$  e do TNF- $\gamma$  será sinérgico através da estimulação da síntese do óxido nítrico na maioria das células endoteliais infectadas<sup>(78)</sup>.

A inoculação experimental da bactéria em cachorros traduziu-se em dermatite e vasculite modesta a moderada, sub-aguda a aguda com tumefacção endotelial, edema perivascular e infiltração linfocítica e plasmocítica<sup>(114)</sup>.

Foram identificados como factores de risco associados à seropositividade em canídeos, o sexo feminino, a idade superior a dois anos e a presença de pêlo curto ou médio, indicativo de maior exposição aos vectores e seus biótopos<sup>(2)</sup>.

## **Sinais clínicos**

A inoculação experimental de cachorros de cinco a sete meses com uma estirpe de *R. conorii*, permitiu evidenciar uma rickettsiemia persistente por dois a dez dias em que os únicos sinais clínicos traduziram-se na observação de placas eritematosas e edemaciadas nos locais da inoculação e linfadenomegália regional três a sete dias após a infecção experimental<sup>(114)</sup>. Desta forma, a infecção por *R. conorii* será assintomática<sup>(114)</sup>, mas contraditoriamente, dados recentes implicaram a presença do género *Rickettsia*, em Portugal, em cães com doença clínica, nomeadamente com febre, anorexia e petéquias<sup>(2,194,195)</sup>. Também na Sicília, em dois cães machos de raça “Yorkshire Terrier”, anteriormente expostos a ixodídeos, surgiram com anorexia, letargia, vômitos, claudicação intermitente e vômitos tendo sido identificada no sangue dos canídeos por PCR e sequenciação, ADN de *R. conorii*<sup>(194)</sup>. Em Espanha, também foi estabelecida uma associação entre cães com anemia e seroreactivos a *R. conorii* realçando a possibilidade da bactéria estar implicada em doença clínica<sup>(195)</sup>. Em termos hematológicos e bioquímicos as alterações registaram-se por trombocitopénia, anemia, leucopénia, hipoalbuminémia e aumentos moderados das transaminases<sup>(2,194)</sup>. Um dos animais apresentava também títulos de anticorpos para *A. phagocytophilum* e *B. burgdorferi* o que pode ter contribuído para a exacerbação dos sinais clínicos<sup>(194)</sup>. Será necessária mais investigação para averiguar se o eventual desenvolvimento clínico de doença no cão será devido a uma alteração metabólica ou imunológica<sup>(194)</sup>.

## **Diagnóstico**

O diagnóstico de febre botonosa baseia-se nos dados clínicos e no diagnóstico laboratorial directo ou indirecto.

Podem ser também utilizadas técnicas de diagnóstico directo por detecção do agente em isolamento em cultura de células, por visualização em biópsias da escara ou exantema, por métodos histoquímicos e pela detecção do genoma por métodos de biologia molecular<sup>(7)</sup>. Para o isolamento do agente, a amostra (sangue, plasma, tecidos necrosados ou biópsias) deve ser colhida antes do início da antibioticoterapia, mantida refrigerada e submetida ao isolamento no menor intervalo de tempo possível<sup>(7)</sup>. O método mais utilizado é o “shell vial”, podendo detectar *Rickettsiae* em amostras sanguíneas ou de biópsias dois a três dias após a recepção das amostras<sup>(170)</sup>. Nesta técnica, a centrifugação após a inoculação é um passo considerado crítico para a sensibilidade da técnica, uma vez que aumenta a ligação e penetração das rickettsias nas células<sup>(123)</sup>. Como limitação apresenta a necessidade de instalações próprias<sup>(123)</sup>. Outro método descrito é a detecção de *R. conorii* nas células endoteliais circulantes, a qual permite um diagnóstico ao fim de 3 horas, mas a sensibilidade deste método (cerca de 50%) é condicionada pelo número de células endoteliais disponíveis para o teste<sup>(122)</sup>. A técnica de imunohistoquímica implica que os cortes histológicos de pele ou de outros tecidos sejam submetidos à acção de anticorpos anti-rickettsia (monoclonais ou policlonais) produzidos em animais de laboratório e a sua ligação ao antigénio pode ser visualizada por coloração ou fluorescência<sup>(7)</sup>. A imunofluorescência directa da pele, em biópsias é um teste específico e sensível se for executado antes do início da antibioticoterapia e antes do 10º dia da doença<sup>(122)</sup>. Contudo, é moroso, requer um patologista experiente e é difícil de aplicar em rotina<sup>(122)</sup>.

As técnicas de biologia molecular, nomeadamente a detecção do genoma por PCR, baseia-se na amplificação de um segmento do genoma comum a todas as rickettsias que codifica a enzima citrato sintetase (*gtfA*)<sup>(171)</sup>, responsável pela metilação no ciclo do ácido

cítrico e ainda na amplificação de segmentos de genes que codificam proteínas de superfície de membrana (*Omp*) existentes nas rickettsias do grupo das febres exantémicas<sup>(7)</sup>.

O diagnóstico laboratorial usual tem por base o uso de técnicas indirectas serológicas, nomeadamente ELISA, o Immunoblot e a IFI, a prova de referência<sup>(7)</sup>. As proteínas antigénicas de elevado peso molecular de superfície, *OmpA*, *OmpB* e *PS120*, contêm os epítomos específicos da espécie que constituem a base do diagnóstico serológico<sup>(156)</sup>.

A prova serológica de ELISA, tal como a IFI, também permite a diferenciação de IgM e IgG<sup>(115,123)</sup>. O Immunoblot é considerado mais sensível que a IFI, uma vez que consegue detectar as IgM mais cedo, e será mais específico, sendo aconselhada a sua utilização em epidemiologia, mas apresenta como limitação a morosidade, bem como a quantidade e a pureza de antígeno<sup>(7)</sup>. A técnica de IFI para *Rickettsia* foi adaptada a um formato “micro”, sendo denominada por microimunofluorescência indirecta, em que, podem ser detectados simultaneamente anticorpos contra nove espécies de *Rickettsia* (no máximo) com o mesmo soro num único poço que contém os vários antígenos<sup>(123)</sup>. Como limitações, o método pode ser inibido pelo factor reumatóide e o diagnóstico pode não ser alcançado, devido ao factor prozona<sup>(123)</sup>. Como alternativa à IFI foi ainda proposto um teste à base de imunoperoxidase, que substitui a fluoresceína pela peroxidase, tendo como vantagens a possibilidade de ser lida ao microscópio óptico e as lâminas serem permanentes<sup>(123)</sup>.

O diagnóstico serológico em canídeos não discrimina as diferentes rickettsioses<sup>(7)</sup>. De facto, as bactérias pertencentes ao grupo “spotted fever” como a *R. conorii*, *R. slovaca*, *R. sibirica* e *R. helvetica* são morfologicamente semelhantes e partilham alguns determinantes antigénicos que podem originar reacções antigénicas cruzadas<sup>(9)</sup>. Com efeito, um estudo em Portugal revelou que de 30 isolados de *Rickettsia* spp. em ixodídeos, apenas um era de facto, *R. conorii*, confirmando não ser o genótipo predominante nos ixodídeos<sup>(9)</sup>. Também algumas

preparações para IFI (com células L929 ou Vero) podem resultar num aumento de falsos positivos<sup>(169)</sup>. Igualmente, os valores limite (“cut-off”), para estabelecimento do limiar de positividade não são consensuais entre laboratórios. Diferentes autores indicam como valor para IgG 1:20<sup>(196)</sup>, 1:40<sup>(72,115,163,186)</sup>, 1:64<sup>(195)</sup> ou valores mais elevados como 1:128<sup>(2,151)</sup> ou 1:160 para reduzir os falsos positivos<sup>(134)</sup>.

## **Tratamento**

Uma vez que a febre botonosa não é considerada uma entidade clínica no cão, o seu tratamento não está preconizado<sup>(2,168)</sup>. No entanto, em relatos recentes de doença clínica associada a *R. conorii* em dois canídeos, num caso foi utilizado um tratamento à base de doxiciclina, com resolução dos sinais clínicos dois dias após o início da antibioticoterapia e noutro caso foi utilizada a ceftriaxona, que não apresenta eficácia conhecida anti-rickettsial<sup>(156)</sup>, apesar da recuperação do animal ter ocorrido em quatro dias, o que leva a supor uma recuperação imunitária espontânea<sup>(194)</sup>.

## 1.8 Hepatozoonose canina

### Etiologia

A hepatozoonose canina é uma doença parasitária, na qual um protozoário parasita leucócitos, músculos e órgãos parenquimatosos caninos<sup>(12)</sup>. Até 1997, pensava-se que apenas a espécie *Hepatozoon (H.) canis*, ligado à presença do vector e hospedeiro definitivo, o ixodídeo *R. sanguineus*, era responsável pela doença<sup>(49)</sup>. Contudo, no golfo do Texas, nos E.U.A., verificou-se ser outra espécie a parasitar os canídeos, *H. americanum*, através do vector *Amblyomma maculatum*<sup>(14,49,136)</sup>. Recentemente, através do emprego da biologia molecular, têm surgido evidências de que poderão existir duas possíveis subespécies de *H. canis*<sup>(106)</sup> com vectores distintos: *R. sanguineus* e *A. ovale*<sup>(84)</sup> ou *Haemaphysalis*<sup>(106)</sup> podendo inclusive existir co-infecções no mesmo cão<sup>(51)</sup>.

Os parasitas do género *Hepatozoon* são protozoários, classificados na família Hepatozoidae, subordem Adeleorina, filo Apicomplexa, e são aparentados com as espécies do género *Plasmodium* e piroplasmas<sup>(15)</sup>. Há também a suspeita de que a espécie *H. canis* é a responsável pela infecção em gatos, podendo os felídeos ser infectados pelos vectores associados à doença<sup>(178)</sup>. Um cão pode estar infectado por mais do que uma espécie de *Hepatozoon*<sup>(153)</sup>.

A doença é prevalente na Europa<sup>(48,51,112,117,214)</sup>, África<sup>(153)</sup>, Médio Oriente<sup>(12)</sup>, Ásia<sup>(51,106)</sup> e América do Sul<sup>(89,154)</sup>. Em Portugal, dados seroepidemiológicos publicados em 1988 indicam como valores de prevalência (em esfregaços de sangue periférico) 3% em canídeos domésticos e 48% em raposas (*Vulpes vulpes silacea*)<sup>(48)</sup>. Dados recentes identificaram como prevalência de infecção em cães doentes, 1,8% de *H. canis* em esfregaço sanguíneo, na região do Algarve<sup>(2)</sup>. Um estudo em raposas em Espanha evidenciou que todas as raposas estudadas (10/10) continham o parasita<sup>(50)</sup>.

## Vector e Ciclo de vida

O ciclo de vida de *H. canis* inclui um desenvolvimento sexual e esporogonia num hospedeiro definitivo invertebrado hematófago (um ixodídeo) e merogonia seguida de gamontogonia num hospedeiro vertebrado intermediário (canídeo)<sup>(15)</sup>. Ao contrário da maior parte dos patogéneos transmitidos por ixodídeos, em que a transmissão ocorre através das glândulas salivares, a transmissão de *Hepatozoon* spp. implica a ingestão do hospedeiro definitivo pelo hospedeiro intermediário<sup>(15)</sup>. A transferência do parasita por via salivar não foi, até ao momento, documentada<sup>(15)</sup>. Presume-se que os cães ficam infectados ao ingerir os ixodídeos presentes na sua pelagem ou através da ingestão de ervas infestadas com os vectores<sup>(15)</sup>. A ingestão do ixodídeo provoca a libertação dos esporozoitos no trato gastrointestinal do cão<sup>(89)</sup>. Os esporozoitos penetram na parede intestinal e são transportados por via hemática ou linfática para o fígado, baço, rins, medula óssea, linfonodos e músculos, onde ocorre a esquizogonia (formação de esquizontes)<sup>(89)</sup>. Após a ruptura dos esquizontes ocorre a libertação dos merozoitos que invadem os neutrófilos, nos quais se desenvolvem em gametócitos (são os gamontes) e depois circulam no sangue periférico<sup>(15)</sup>. Quando um ixodídeo ingere sangue de um cão infectado, os gametócitos são libertados no intestino do ixodídeo, os quais se associam em pares e unem-se de forma a formar o zigoto (fase sexual) que penetra na parede do intestino e entra no hemocélio<sup>(49)</sup>. Aqui desenvolve-se num oocisto que contém 30 a 50 esporocistos, cada um contendo cerca de 16 esporozoitos e o ciclo continua<sup>(49)</sup>. Experimentalmente verifica-se que a doença pode também ser transmitida verticalmente aos canídeos, à ninhada, através de uma cadela gestante infectada<sup>(84)</sup>. O facto de haver gamontes em monócitos e neutrófilos sugere que o parasita deverá entrar na membrana celular algures na medula óssea, num precursor comum destas duas células sanguíneas<sup>(11)</sup>.

Os canídeos silvestres como as raposas podem servir de reservatórios para os canídeos domésticos e outras espécies silvestres<sup>(81)</sup>. O facto dos canídeos silvestres apresentarem frequentemente o parasita poderá dever-se aos seus hábitos alimentares, uma vez que a sua dieta faz-se à base de presas, havendo a maior probabilidade de ingerir em conjunto os ixodídeos parasitados<sup>(50)</sup>.

### **Patogénese**

Não há consenso acerca da patogenecidade do agente havendo casos de diagnóstico accidental ou não-patogénico mas há dados que revelam que o grau de parasitémia deve ser sempre um factor clínico a considerar<sup>(12)</sup>. A gravidade das manifestações clínicas surge em função do nível de parasitémia, em que o parasitismo extenso de órgãos como o fígado, pulmões e rins, implica o desenvolvimento de hepatite, pneumonia e glomerulonefrite, respectivamente<sup>(12)</sup>. Os canídeos com uma elevada proporção de neutrófilos parasitados estão em maior risco de desenvolver septicemia<sup>(12)</sup>.

Os factores predisponentes para o desenvolvimento clínico da doença serão as infecções concomitantes como a ehrlichiose monocítica canina<sup>(11,12,147)</sup>, em que o vector é o mesmo e a parvovirose canina, provavelmente pela imunossupressão<sup>(12)</sup>. No entanto, a importância do papel das doenças concomitantes à hepatozoonose canina não é consensual, uma vez que há casos diagnosticados sem qualquer outra patologia associada<sup>(214)</sup>. Quando há outra doença presente, a hepatozoonose canina poderá ser um achado diagnóstico accidental ou poderá ser o resultado de uma reactivação dos esquizontes que estavam acantonados nos tecidos após uma imunossupressão induzida por um agente infeccioso ou quimioterapia<sup>(15)</sup>. Há a hipótese de que infecções concomitantes de patogéneos do sistema hemolinfático possam actuar de forma sinérgica e causem uma maior deterioração da condição clínica do cão

infectado<sup>(147)</sup>. Em casos de imunossupressão verifica-se um aumento do número de gametócitos de *H. canis* no sangue, provavelmente por um aumento na libertação de merozoítos dos esquizontes tecidulares seguidos da entrada dos parasitas nos neutrófilos ou pela diminuição da eliminação dos neutrófilos parasitados da corrente sanguínea, o que lhes permitirá terminar o seu ciclo de vida<sup>(12,90)</sup>. Contraditoriamente, há um relato de um cão infectado recebendo terapia imunossupressora esteróide que não manifestou parasitémia<sup>(90)</sup>.

### **Sinais clínicos**

A infecção por *H. canis* varia desde a forma assintomática em cães aparentemente saudáveis até à doença severa com extrema letargia, caquécia e anemia<sup>(15)</sup> e morte<sup>(12)</sup>. O parasita pode ficar latente e persistir por longos períodos sobrevivendo no seu hospedeiro intermediário sem se manifestar clinicamente<sup>(12)</sup>. A forma moderada é a apresentação mais comum e está geralmente associada a um nível baixo de parasitémia (1 a 5% de neutrófilos infectados), estando as formas mais graves associadas a níveis mais elevados de parasitémia (70-90%)<sup>(11,15)</sup>. De facto, níveis elevados de parasitémia levam a uma maior depleção de nutrientes, levando a grandes perdas de peso e caquécia<sup>(15)</sup>. A parasitémia é calculada pela multiplicação da percentagem dos neutrófilos parasitados nos esfregaços pelo número de neutrófilos totais à contagem no hemograma<sup>(154)</sup>.

Os sinais clínicos atribuídos à infecção são a febre, depressão, letargia, corrimento ocular, linfadenomegália, perda de peso, palidez das mucosas e anorexia<sup>(11,147,154)</sup>. Há também registo de alopecia pruriginosa e crostas, associada a caquécia<sup>(214)</sup>. Nos casos em que estão presentes outras infecções a variabilidade de sinais clínicos pode ser atribuída às outras patologias em curso<sup>(89)</sup>.

As alterações hematológicas mais significativas são a anemia normocrômica, normocítica, eosinofilia e basofilia e os eosinófilos apresentam grânulos superiores em alguns esfregaços<sup>(154)</sup>. Poderá também estar presente trombocitopenia<sup>(214)</sup>.

## Diagnóstico

O diagnóstico clínico é difícil, uma vez que as infecções subclínicas estão muitas vezes presentes, apenas com os sinais inespecíficos de anemia e letargia<sup>(15)</sup>.

O diagnóstico definitivo surge com a visualização ao microscópio óptico dos gamontes intracelulares de *H. canis* nos neutrófilos e raramente em monócitos<sup>(89)</sup>, em esfregaços de sangue periférico corados com Giemsa<sup>(15)</sup>. Os gamontes apresentam dimensões variáveis de 11×4 μm<sup>(90)</sup> a 6,8×4μm a 7,5×4,5μm e apresentam uma forma elíptica<sup>(89)</sup>. Nos tecidos, os merontes maduros de *H. canis*, contém merozoitos alongados em círculo, em forma de roda<sup>(15)</sup>, sendo detectados por citologia ou histopatologia dos órgãos hemolinfáticos infectados<sup>(90)</sup>. As amostras de baço são mais susceptíveis de conter o parasita do que as amostras sanguíneas<sup>(50)</sup>. De facto, é possível haver falsos negativos nos esfregaços de sangue, uma vez que os gametócitos podem estar enquistados, a parasitemia pode ser intermitente, ou em tão baixo número que os gamontes podem escapar da observação<sup>(154)</sup>.

Recentemente as técnicas moleculares, como PCR e a sequenciação, têm sido utilizadas para o diagnóstico da infecção e a especificação dos seus isolados, especialmente quando as técnicas serológicas não permitem a distinção de espécies<sup>(14,51,106,178)</sup>.

Após a infecção, a seroconversão ocorre entre uma a quatro semanas, atingindo o pico da produção de anticorpos entre as sete e as nove semanas, após o que decrescem mas mantém-se detectáveis por cinco a sete meses<sup>(90)</sup>. Assim, as técnicas de diagnóstico serológico utilizadas são a identificação de anticorpos através da IFI, em que detecta os anticorpos

reactivos com antigénios presentes na membrana externa dos parasitas, o Immunoblot e o teste ELISA que detecta anticorpos para os antigénios solúveis dos parasitas<sup>(90)</sup>. O teste ELISA é sensível e específico para a detecção de anticorpos anti-*H. canis* sendo fácil de realizar, rápido e mais objectivo que a IFI<sup>(90)</sup>. No entanto, há também falsos negativos, por ausência de seroconversão, em infecções crónicas com um decréscimo do nível de anticorpos abaixo do limiar de detecção do teste, e uma possível falta de resposta humoral em alguns cães infectados com *H. canis* predominantemente intracelular<sup>(90)</sup>.

Um estudo grego revelou que em apenas 4,5% dos canídeos seropositivos a *H. canis* apresentaram gamontes visíveis à microscopia óptica<sup>(147)</sup>. De facto também em Israel foi detectado um nível semelhante (6%) de parasitémia em canídeos seropositivos à bactéria<sup>(147)</sup>. A ausência de gamontes visíveis nos cães seropositivos podem indicar índices de parasitémia baixos ou intermitentes, ou o sequestro de parasitas na fase de meronte nas vísceras<sup>(147)</sup>. Também a seroconversão pode preceder o aparecimento dos gamontes ou persistir até quando a parasitémia não for mais detectável<sup>(147)</sup>.

## **Tratamento**

O tratamento é recomendado em todos os canídeos que apresentam o parasita, mesmo aqueles com níveis de parasitémia baixos, uma vez que os mesmos poderão aumentar com o tempo e os casos moderados de infecção poderão tornar-se severos<sup>(12)</sup>. O tratamento deve ser acompanhado de esfregaços de sangue periférico seriados até que os gametócitos não sejam visíveis em duas a três amostras consecutivas com 15 dias de intervalo<sup>(12)</sup>.

A terapia antiprotozoária clássica compreende o dipropionato de imidocarb 5 mg/kg IM/SC repetida 13-14 dias depois<sup>(11,12)</sup>. A eliminação dos gamontes do sangue periférico é lenta e pode requerer um tratamento periódico com dipropionato de imidocarb durante 8

semanas<sup>(15)</sup>. A associação com a doxiciclina 10 mg/kg PO, SID, por 14 dias poderá ser benéfica<sup>(11)</sup>. Outros esquemas terapêuticos incluem a associação de toltrazuril 10 mg/kg, PO, BID, durante cinco dias e sulfametoxazole-trimetropim 15 mg/kg IV, BID, em cinco dias que depois se mantém por via oral por mais 25 dias<sup>(214)</sup>. O aceturato de diminazene 3,5 mg/kg, IM, aparentemente é ineficaz para resolver a parasitemia<sup>(11)</sup>.

## Tularémia canina

### Etiologia

A tularémia é uma zoonose provocada pela bactéria *Francisella (F.) tularensis* que afecta monócitos e macrófagos de uma vasta população de animais, incluindo mais de 100 espécies de mamíferos domésticos e silvestres, aves, anfíbios e répteis, o que torna a sua erradicação impossível e a prevenção difícil<sup>(77,222)</sup>. Descrita como uma doença importante no século anterior, a tularémia emergiu recentemente em áreas onde não havia, até então, risco conhecido e re-emergiu na pesquisa e investigação face ao seu potencial como arma biológica<sup>(160)</sup>.

*F. tularensis* pertence, juntamente, com a espécie *F. philomiragia*, ao género *Francisella* e à família *Fancisellaceae*<sup>(70)</sup>. É um cocobacilo pequeno, pleomórfico, imóvel, aeróbico, parasita intracelular facultativo, Gram negativo<sup>(77,143)</sup>, identificado em 1911 em esquilos no condado de Tulare, advindo daí o seu nome<sup>(143)</sup>. Sobrevive facilmente na água, solo húmido, palha e em carcaças de animais<sup>(143)</sup>. A bactéria apresenta inúmeras vias de infecção delas dependendo os sinais clínicos bem como da estirpe ou do sub-tipo presente<sup>(143)</sup>. *F. tularensis*<sup>(143)</sup> pode ser dividida em quatro subespécies, de acordo com factores epidemiológicos, testes bioquímicos e de virulência, nomeadamente: *F. tularensis tularensis* (ou tipo A de Jellison), a forma mais virulenta para humanos e animais, endémica na América do Norte e tipicamente associada a coelhos silvestres<sup>(143)</sup>; *F. tularensis holarctica* (ou tipo B), uma forma menos virulenta, frequente na Europa e Ásia, mais associada a roedores em meios aquáticos<sup>(143,227)</sup>; *F. tularensis novicida*, a forma menos virulenta, encontra-se nos Estados Unidos<sup>(157)</sup> e *F. tularensis mediaasiatica*, localizada nas antigas repúblicas centrais da ex-União Soviética<sup>(70,209)</sup>. Foram descritos três biovars do tipo B: biovar I (sensíveis à eritromicina), biovar II (resistente à eritromicina) e biovar *japónica* (fermenta o glicerol)<sup>(209)</sup>.

A bactéria surge nos climas temperados do hemisfério Norte ao longo da América do Norte, Europa (especialmente nos países escandinavos) e Ásia (Rússia, China, Coreia e Japão)<sup>(77)</sup>. A identificação da bactéria num doente humano na Austrália, permite concluir que a bactéria não está apenas confinada ao hemisfério Norte, apresentando-se mais disseminada do que inicialmente se pensava<sup>(218)</sup>. A América do Norte é a única região onde ambos os tipos, A e B, causam doença<sup>(121)</sup>. Na Europa a bactéria já foi identificada em Espanha<sup>(19,62,146,160)</sup> (pela manipulação de lebres infectadas e de lagostins de rio), França<sup>(192)</sup>, Suécia<sup>(44)</sup>, República Checa<sup>(5,209)</sup>, Áustria<sup>(209)</sup> e muito recentemente em Portugal<sup>(56)</sup>, no distrito de Bragança, no soro de um homem assintomático com contacto frequente com lagomorfos<sup>(56)</sup>. Até ao momento não há quaisquer dados publicados associando a presença da bactéria em canídeos portugueses.

### **Vector e Ciclo de vida**

Entre os hospedeiros mamíferos existe uma grande variedade de vectores biológicos ou mecânicos implicados na transmissão de tularémia<sup>(70)</sup>, sendo os mais importantes os artrópodes hematófagos, como os ixodídeos, tabanídeos e mosquitos<sup>(77)</sup>.

Na Europa Central e do Sul<sup>(62)</sup> os vectores mais importantes são os ixodídeos das espécies *D. reticulatus* e *I. ricinus* embora na Suécia os mosquitos também estejam descritos como vectores, podendo adquirir a infecção no meio aquático<sup>(70,160)</sup>. Num estudo efectuado na Eslováquia, 1% dos ixodídeos *D. reticulatus* continha a bactéria<sup>(66)</sup>. Em Portugal foi identificada, recentemente, no distrito de Bragança, *F. tularensis holarctica* em um exemplar *D. reticulatus* de um ovino<sup>(56)</sup>. Na antiga União Soviética, a bactéria é transmitida por ixodídeos do género *Ixodes* e mosquitos dos géneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex*<sup>(70)</sup>. Nos

E.U.A., os vectores implicados são ixodídeos do género *Dermacentor* e *Amblyomma*<sup>(143)</sup> e tabanídeos<sup>(70)</sup>.

Nos ixodídeos a transmissão é transtadial e possivelmente transovárica<sup>(222)</sup> pelo que ao manterem a infecção ao longo do seu ciclo de vida, para além de vectores são também reservatórios<sup>(77)</sup>. No caso particular dos ixodídeos *D. reticulatus*, em que a transmissão ao Homem através de picada é pouco frequente, esta espécie deverá ser mais importante como reservatório e não como vector<sup>(66)</sup>.

O cão, embora raramente apresente doença clínica, pode funcionar como reservatório para o organismo ou como hospedeiro que contribui para a densidade populacional dos ixodídeos vectores<sup>(19,77,144)</sup>. Recentemente foi atribuído outro papel epidemiológico aos canídeos, ao ter sido responsável por um surto de tularémia pneumónica, em França, um cão cujo pêlo continha a bactéria e cujas partículas foram inaladas por 15 pessoas<sup>(192)</sup>. Assim, os cães podem veicular o patogéneo através da pelagem após contacto com solos infestados ou animais mortos<sup>(192)</sup>. Os cães e os gatos adquirem a infecção, geralmente, através da picada de um artrópode infectado, pela ingestão de, ou contacto directo com, tecidos infectados<sup>(77)</sup> e pela inalação de aerossóis contaminados<sup>(222)</sup>. A natureza predatória dos gatos domésticos coloca-os numa situação de risco para adquirir a doença a partir de animais silvestres<sup>(221)</sup>, podendo transmitir a bactéria aos humanos através de dentadas ou arranhadelas<sup>(222)</sup>.

Existem dois ciclos que mantêm o organismo na Natureza: um terrestre entre os lagomorfos (coelhos e lebres) que serão os hospedeiros amplificadores e em que os ixodídeos e os tabanídeos são os vectores principais e um ciclo aquático que envolve roedores e pequenos mamíferos aquáticos (ratazanas, ratos-almiscareiros e castores) que, aparentemente, excretam a bactéria para o meio ambiente aquático<sup>(143,157,160)</sup>. Um estudo em roedores na China permitiu concluir que embora, o último surto de tularémia tenha sido em 1986, a

bactéria continua presente nos reservatórios tendo sido determinada uma prevalência de infecção, por PCR, de 4,76% em várias espécies de roedores<sup>(227)</sup>. Na Europa ainda não foi devidamente demonstrado o principal reservatório animal para a tularémia<sup>(157)</sup>.

## **Patogénese**

Os animais silvestres são, usualmente, os mais afectados (como o saguim<sup>(22)</sup>, cão da pradaria<sup>(146)</sup> e lobos<sup>(226)</sup>) e só casualmente surge a infecção humana<sup>(146)</sup>, muitas vezes ocorrendo em paralelo com o ciclo silvestre<sup>(70)</sup>. Um surto ocorrido, no Texas, identificou como reservatórios, cães da pradaria silvestres que foram capturados e vendidos para lojas de animais<sup>(5)</sup>. Os animais infectados, uma vez capturados e confinados com outros animais saudáveis em espaços exíguos, ao morrerem foram alvo de canibalismo perpetuando-se a infecção para os restantes<sup>(5)</sup>. Os cães domésticos parecem ser resistentes à bactéria sendo raras as descrições de doença<sup>(144)</sup>, embora tenha sido sugerido que a infecção natural dos cães possa ocorrer sendo a manifestação da doença inaparente ou sub-clínica<sup>(77)</sup>.

A bactéria é altamente infecciosa e a transmissão aos humanos pode fazer-se de várias formas. A mais frequente é através da picada de artrópodes (ixodídeos e insectos), da manipulação directa de tecidos infectados ou fluidos<sup>(157)</sup> e da ingestão de alimentos ou água contaminados<sup>(77)</sup>. O contacto com animais infectados como cães domésticos, cães da pradaria e gatos infectados após arranhadelas, mordeduras ou inalação de aerossóis será também uma via de contágio<sup>(5,146,192)</sup>. As populações rurais de áreas endémicas, especialmente as que exercem actividades na agricultura, floresta e caça, por estarem em maior contacto com vectores e reservatórios, estarão em maior risco de contraírem tularémia na sua forma pneumónica<sup>(70)</sup>.

Após entrar no hospedeiro, a bactéria multiplica-se e dissemina-se por via hematogénea com bacteriémia, ou dissemina-se ao longo dos linfáticos superficiais e profundos originando linfadenite<sup>(222)</sup>. Se se desenvolver bacteriémia as células fagocitárias do sistema reticuloendotelial eliminam a bactéria do sangue, mas a mesma consegue sobreviver intracelularmente<sup>(222)</sup>. Na forma pneumónica, *F. tularensis* para além de se replicar nos macrófagos e nas células dendríticas, invade e replica-se nas células epiteliares alveolares tipo II<sup>(97)</sup>. Após a multiplicação intracelular, *F. tularensis* induz a morte celular por apoptose, libertando-se as bactérias que irão infectar novas células<sup>(70)</sup>. Os detritos celulares do endotélio capilar e das bactérias podem originar focos necróticos no fígado, baço, linfonodos, pulmões e medula óssea<sup>(77)</sup>. Os focos necróticos podem coalescer e formar abscessos<sup>(222)</sup>. Alguns autores acreditam que as diferentes portas de entrada do patogéneo poderão ter como único objectivo a disseminação das bactérias no organismo, a qual é a responsável pela gravidade clínica e não a multiplicação local nos órgãos primariamente afectados<sup>(119)</sup>.

Os mecanismos de defesa do hospedeiro que actuam na luta contra a infecção por *F. tularensis* não estão ainda bem esclarecidos. No entanto, já foi implicado o IFN- $\gamma$  na activação dos macrófagos<sup>(219)</sup>. Experiências em ratinhos mostram que, perante o antigénio, as células NK, co-activadas pelas interleucinas-12 (IL-12) ou 8 (IL-8) também induzem a produção de IFN- $\gamma$ <sup>(219)</sup>. Assim, levantou-se a hipótese das estirpes virulentas de *F. tularensis* poderem evadir o sistema imunitário no fígado e nos restantes órgãos ao inibir a produção de IFN- $\gamma$ <sup>(219)</sup>. Numa fase avançada da doença as células T, nomeadamente as células CD4 e CD8 também serão importantes para o controlo da doença e protecção do hospedeiro<sup>(70)</sup>.

## Sinais clínicos

Os cães podem adquirir a bactéria, apesar de a doença clínica ser mais frequente noutras espécies, como os gatos, em que todas as apresentações, com excepção da oculoglandular, já foram descritas<sup>(221,222)</sup>. Tal como em todas as outras espécies, a gravidade e a localização das lesões está dependente da via de inoculação<sup>(144)</sup>. Na maioria dos casos, a doença é autolimitante com recuperação espontânea<sup>(144)</sup>.

Estão descritos apenas dois casos de infecção natural em cães<sup>(96,144)</sup>. Um caso é de uma cadela de raça “Irish Setter”, de quatro anos, castrada, que surgiu com sinais de letargia, anorexia e fraqueza 48 horas após ter ingerido um coelho<sup>(144)</sup>. O exame clínico evidenciou febre, depressão e ligeira linfadenomegália, congestão da mucosa conjuntival e corrimento ocular bilateral mucoso<sup>(144)</sup>. As alterações hematológicas (neutrofilia e linfopenia) sugeriram um leucograma de stress e as análises bioquímicas revelaram uma hipocalcémia moderada e um ligeiro aumento da fosfatase alcalina<sup>(144)</sup>. O outro relato é de um cão de raça Pastor Alemão, de 13 meses, que surgiu com sinais agudos de anorexia, febre, linfadenomegália e amigdalite necrosante, uma semana após à ingestão de um coelho silvestre<sup>(96)</sup>.

Outros animais de companhia como os gatos, também podem permanecer assintomáticos, mas geralmente surgem sinais como febre, vômito, letargia, desidratação, anorexia e hepatomegália após ingestão de um lagomorfo infectado<sup>(221)</sup>. Os gatos jovens parecem ser mais predispostos à doença provavelmente pelos hábitos de caça<sup>(221)</sup>. Na infecção de espécies silvestres como o saguim, está descrito um quadro clínico de febre, corrimento nasal, petéquias no membro torácico e desidratação<sup>(22)</sup>. Em lebres, a infecção manifesta-se por atáxia e alopecia<sup>(226)</sup>.

## Diagnóstico

O diagnóstico definitivo de tularémia em cães é difícil e necessita da detecção de um título crescente de anticorpos ou a presença do organismo num tecido de biópsia por cultura, imunofluorescência ou PCR<sup>(144)</sup>.

Num caso descrito de tularémia canina, o diagnóstico definitivo surgiu com o isolamento da bactéria a partir de punção por agulha fina de um linfonodo aumentado<sup>(144)</sup>. A IFI não foi conclusiva pela presença de demasiada fluorescência de fundo<sup>(144)</sup>. O pico do título de anticorpos surgiu às quatro semanas e os anticorpos persistiram durante seis meses<sup>(144)</sup>. O outro caso de infecção natural num cão, o diagnóstico serológico foi definitivo com amostras seriadas em que surgiu um aumento de quatro vezes no título de anticorpos<sup>(96)</sup>.

É provável que a tularémia seja sub-diagnosticada em cães dada a natureza auto limitante da doença, os sinais inespecíficos e a dificuldade de confirmação da doença<sup>(144,221)</sup>. O diagnóstico de tularémia deverá fazer parte dos diagnósticos diferenciais de canídeos que surjam com um processo febril, com ou sem linfadenomegália numa área endémica<sup>(77)</sup>.

O teste da referência é a cultura e o isolamento da bactéria a partir de sangue, expectoração, líquido cefalo-raquidiano, biópsias de escaras de inoculação ou de linfonodos regionais<sup>(77,157)</sup>. A cultura da bactéria exige condições de segurança nível III e o seu crescimento é fastidioso, necessita de um meio de cultura suplementado com compostos sulfídricos (cisteína ou cistina) e uma temperatura óptima de 35°C<sup>(77)</sup>. As colónias surgem após dois a quatro dias<sup>(77)</sup>.

De forma a substituir as provas bioquímicas, a base da classificação das subespécies de *F. tularensis* foi desenvolvido um PCR em tempo real para identificação das subespécies *tularensis* e *holarctica* em amostras já previamente identificadas como *F. tularensis*<sup>(121)</sup>. Também estão descritos métodos de PCR para a tipificação epidemiológica de *F. tularensis*,

nomeadamente REP-PCR (“Repetitive Extragenic Palindromic element PCR”), ERIC-PCR (“Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence PCR”) e RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) os quais permitem obter resultados com elevado poder discriminatório entre as diferentes estirpes bacterianas, rápidos, custo moderado e boa (REP-PCR) ou moderada reprodutibilidade (RAPD)<sup>(62)</sup>. Uma das vantagens do PCR é que evita a manipulação directa da bactéria, face ao seu elevado potencial infeccioso<sup>(62)</sup>.

De facto, dado o risco de doença profissional através do isolamento e cultura, a técnica indirecta do diagnóstico serológico é o mais utilizado, através da detecção de anticorpos aglutinantes no soro pela técnica de aglutinação em tubo, microaglutinação<sup>(185)</sup>, hemaglutinação e ELISA<sup>(44,77)</sup>. Uma comparação entre as técnicas de aglutinação em tubo e microaglutinação permitiu evidenciar que esta última é mais fácil de realizar, mais rápida, mais económica e mais sensível e os resultados são mais fáceis de interpretar<sup>(185)</sup>. O diagnóstico definitivo serológico surge quando ocorre uma diferença de quatro vezes no título de anticorpos entre a fase aguda e a convalescente, em amostras seriadas com intervalo de duas a quatro semanas<sup>(77)</sup> sendo um dos títulos superior a 1:160 em aglutinação em tubo e 1:128 por microaglutinação<sup>(143)</sup>. Contudo, os valores limites de positividade (“cut-off”) variam consoante os laboratórios, não estando preconizados valores para diagnóstico em canídeos, estando descrito em gatos o “cut-off” de 1:20 na técnica de microaglutinação<sup>(221)</sup> e 1:20 na técnica de aglutinação em placa em lobos<sup>(226)</sup>. Como limitações da serologia, os anticorpos só são detectáveis após as duas a três semanas pós infecção<sup>(77)</sup> e existem possíveis reacções cruzadas de *F. tularensis* com as espécies dos géneros *Brucella*, *Proteus* e *Yersinia*<sup>(157)</sup>. Para além disso, um resultado serológico positivo pode reflectir uma infecção antiga, recente ou uma resposta vacinal<sup>(44)</sup> e não permite distinguir as diferentes subespécies<sup>(62)</sup>.

## Tratamento

Os tratamentos das espécies animais surgiram pela extrapolação dos tratamentos humanos<sup>(77)</sup>. Assim, os antibióticos a utilizar em cães serão a gentamicina 6,6 mg/kg, IM; IV ou SC, SID ou divididos por BID ou TID, durante 10 dias; doxiciclina 5mg/kg PO, SID ou BID, durante 14 dias; cloranfenicol 100mg/kg inicialmente depois 50mg/kg, PO ou IM, TID, durante 14 dias e enrofloxacina 2,5 mg/kg PO ou IM, BID<sup>(77)</sup>. Um caso descrito de tularémia em canídeo doméstico descreve como terapêutica doxiciclina 5mg/kg, PO, SID durante 14 dias e fluidoterapia de suporte à base de Lactato de Ringer, tendo recuperado clinicamente<sup>(144)</sup>. Noutro caso clínico relatado em canídeo doméstico, o mesmo recuperou 5 dias após tratamento de suporte sem antibioticoterapia específica<sup>(96)</sup>. Um caso descrito num saguim descreve uma falha terapêutica com gentamicina, só tendo sido resolvido com sucesso com a administração de estreptomicina<sup>(22)</sup>. Como causa, os autores indicam o facto da gentamicina não ter conseguido eliminar as formas intracelulares bacterianas<sup>(22)</sup>.

## **Segunda parte**



## II. Objectivos

Com a presente dissertação pretende-se:

1. Contribuir para a determinação da seroprevalência das zoonoses provocadas por ixodídeos em canídeos domésticos (*Canis familiaris*) no distrito de Bragança, nomeadamente os agentes da anaplasmose granulocítica canina, borreliose de Lyme, ehrlichiose monocítica canina, febre botonosa canina e tularémia canina.
2. Analisar a possível associação entre as diferentes variáveis epidemiológicas e a seropositividade à doença.
3. Identificar as espécies de ixodídeos que parasitam os canídeos da população em estudo e avaliar a prevalência de infecção dos artrópodes em amostra aleatória.
4. Analisar a possível associação da presença de ixodídeos e o desenvolvimento sintomático de doença na população em estudo.
5. Pesquisar hemoparasitas não zoonóticos (*B. canis* e *H. canis*) em esfregaço de sangue periférico, uma vez que na prática clínica as infecções mistas são frequentes.

### III. Materiais e métodos

#### 1. Enquadramento geográfico da área de estudo

O trabalho de campo decorreu no distrito de Bragança, nos concelhos de Vinhais, Bragança, Vimioso, Miranda do Douro e Carrazeda de Ansiães, durante o mês de Março de 2007 (ver Fig.1).



Fig. 1 – Os concelhos do distrito de Bragança sob estudo assinalados com circunferência

#### 1.1 Concelho de Bragança

O concelho de Bragança é um dos maiores concelhos portugueses ocupando uma área de 117.390 ha, englobando 49 freguesias (ver Fig. 2)<sup>(37)</sup>.

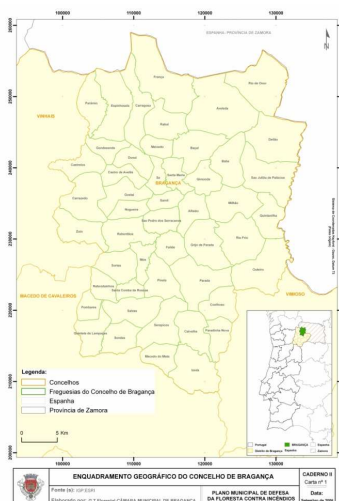


Fig. 2 – As freguesias do concelho de Bragança.

O relevo do concelho é dominado por uma linha de elevações a Ocidente, destacando-se as serras de Montesinho a Norte e a serra da Nogueira a Sul, ligadas por um planalto<sup>(37)</sup>. Os planaltos são as formas mais típicas talhados em vales em V apertado e ladeados pelos rios principais que cortam o concelho, nomeadamente o rio Sabor, rio Maçãs, rio Igrejas e rio de Onor<sup>(37)</sup>.

O concelho de Bragança encontra-se inserido na denominada Terra Fria Transmontana, uma região com condições climáticas rigorosas<sup>(37)</sup>. O clima é de carácter continental, caracterizado por Invernos longos e frios e Verões curtos e quentes, com grandes amplitudes térmicas anuais<sup>(37)</sup>.

## 1.2 Concelho de Carrazeda de Ansiães

O concelho de Carrazeda de Ansiães tem 27.925 ha de área, distribuídos por 19 freguesias<sup>(38)</sup> (ver Fig. 3).

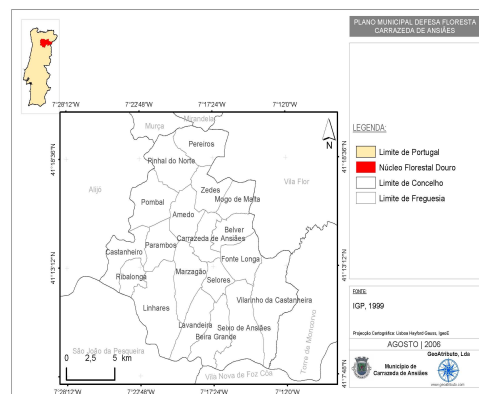


Fig. 3 – As freguesias do concelho de Carrazeda de Ansiães

O concelho está inserido numa região de transição entre a região do Douro e a Terra Quente Transmontana, sendo marcado por paisagens contrastantes onde se podem observar principalmente planaltos extensos e extensas encostas devido à passagem dos rios Tua e Douro<sup>(38)</sup>. O escoamento das águas no concelho visado segue para três bacias hidrográficas

(Douro, Tua e Sabor)<sup>(38)</sup>. A temperatura média mais elevada ocorre no mês de Agosto, enquanto a temperatura mais baixa se verifica no mês de Janeiro<sup>(38)</sup>.

### 1.3 Concelho de Miranda do Douro

O concelho de Miranda do Douro tem cerca de 49.000 ha de área, distribuídos por 17 freguesias, inserindo-se na bacia hidrográfica do Rio Douro<sup>(39)</sup>. Localiza-se na denominada Terra Fria, a região mais a Leste de Trás-os-Montes, sendo uma região planáltica<sup>(39)</sup> (ver Fig. 4).

A rede hidrográfica do concelho é constituída pelo rio Douro, o rio Fresno, afluente do rio Douro, e o rio Angueira<sup>(39)</sup>. Há ainda uma rede secundária de linhas de águas que tende a secar nos períodos mais quentes do ano<sup>(39)</sup>.

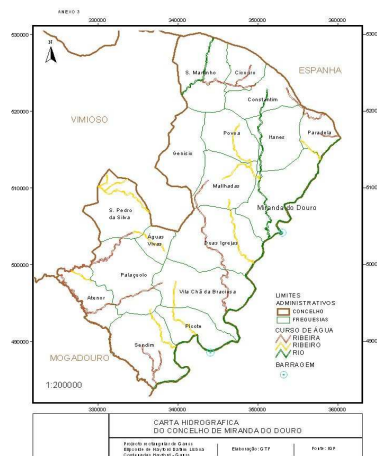


Fig. 4 – As freguesias do concelho de Miranda do Douro

As características climáticas do concelho de Miranda do Douro são do tipo mediterrâneo, com clima temperado, de Verões quentes e secos, com chuva na estação fria e um Inverno moderado<sup>(39)</sup>. As temperaturas mais elevadas surgem em Julho e Agosto e as mais baixas registam-se em Janeiro e Dezembro<sup>(39)</sup>.

#### 1.4. Concelho de Vimioso

O concelho de Vimioso tem uma área de 48.147 ha e é composto por 14 freguesias<sup>(40)</sup> (ver Fig. 5).

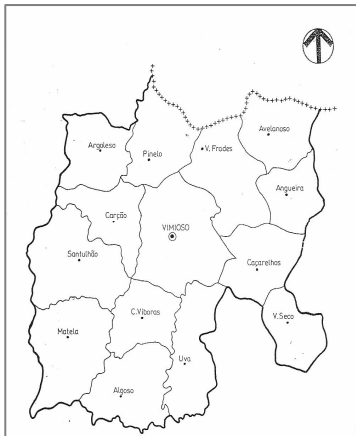


Fig. 5– As freguesias do concelho de Vimioso

Integrada na Região Hidrográfica do Douro, toda a região é drenada por um dos afluentes principais da margem direita do rio Douro, o rio Sabor, bem como pelos seus afluentes, o rio Maçãs e o rio Angueira<sup>(40)</sup>. Os vales destes rios constituem superfícies semi-planálticas, com altitudes que muito raramente ultrapassam a cota dos 700 m, valor abaixo do qual se convencionou definir a região de transição entre a Terra Fria Planáltica e a Terra Quente do Tua e Douro Superior<sup>(40)</sup>.

A área planáltica a Este do concelho engloba-se na Terra Fria de Planalto e faz parte da região Miranda/Mogadouro que, do ponto de vista climático, se caracteriza pelo facto de ser uma região subcontinental, enquanto que aos vales e as áreas de cota inferior a 700 metros pertencem à denominada Terra de Transição. A parte Oeste do concelho situa-se na região de Bornes/Sabor, a qual apresenta características climáticas dominantes de Terra de Transição<sup>(40)</sup>.

O concelho de Vimioso é caracterizado por elevadas amplitudes térmicas, com valores máximos de temperatura em Junho e mínimos em Janeiro<sup>(40)</sup>.

## 1.5 Concelho de Vinhais

O Concelho de Vinhais tem cerca de 70.000 ha de área, distribuídos por 35 freguesias<sup>(41)</sup> (ver Fig. 6).

Da densidade da rede hidrográfica destacam-se os rios principais Tuela, Rabaçal e Mente, que fluem no sentido Norte – Sul, enquanto que toda a rede secundária de linhas de água drena para os principais num sentido perpendicular a estes<sup>(41)</sup>.

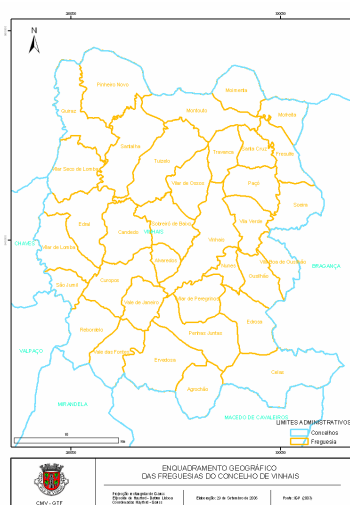


Fig. 6 – As freguesias do concelho de Vinhais

Este concelho apresenta valores climáticos bastante distintos, o que permite a identificação simultânea de climas de Terra Fria de montanha, Terra Quente e Terra de Transição<sup>(41)</sup>. Os registos mais frios e pluviosos verificam-se na zona Norte e Sudeste (zonas de montanha), ocorrendo os mais secos e quentes na zona Sudoeste (principalmente nos vales dos cursos de água principais)<sup>(41)</sup>. O comportamento climático no concelho de Vinhais acompanha de certo modo a fisiografia heterogênea e de valores extremos<sup>(41)</sup>. Deste modo, esta região está exposta a climas de influência mediterrânica e de montanha, sendo nos vales dos cursos de água principais onde o clima mediterrânico é mais acentuado<sup>(41)</sup>. Esta situação climática proporciona períodos estivais muito quentes e secos<sup>(41)</sup>.

## **2. Ixodídeos**

### **2.1. Colheitas**

Nos canídeos que apresentaram ixodídeos, os mesmos foram recolhidos de forma aleatória e colocados em tubos com plantas verdes, para manter a humidade relativa elevada, e refrigerados a 4°C. Após a recolha, procedeu-se à identificação dos vectores até à espécie, bem como o sexo e o estágio evolutivo, através das características morfológicas presentes e de acordo com as chaves de identificação taxonómica<sup>(33,197,207)</sup>. Após a identificação, todos os ixodídeos foram conservados a -20°C e aqueles cujos hospedeiros revelaram exame clínico compatível com doença, ou serologia positiva, foram posteriormente utilizados na detecção dos agentes infecciosos em estudo, através de técnica de PCR convencional ou “nested”, consoante o agente.

### **2.2 Extracção de ADN**

Os ixodídeos, após descongelação, foram lavados e desinfectados em álcool etílico a 70° e água estéril durante 3 minutos, sendo posteriormente secos com papel de filtro esterilizado e colocados em tubos “ependorf”. Seguiu-se a sua imersão em 100-200µl de solução de hidroxiamónia, obtida a partir de 1 ml de amónia a 25% e 9 ml de água destilada. Os tubos foram fervidos durante 20 minutos a 100°C, em placa de aquecimento, a que se seguiu um arrefecimento rápido em gelo picado e centrifugação a 800 rpm durante trinta segundos. Procedeu-se, então, à abertura dos tubos e à sua colocação em placa de aquecimento, no interior de câmara de modo a evaporar-se a amónia, a 90°C durante 20 minutos. O sobrenadante foi retirado e colocado em tubo “ependorf”, sendo congelado a -20°C para posterior utilização em ensaios de PCR.

### 3. Canídeos

#### 3.1 Amostra

A selecção da amostra da população canina em estudo (*Canis familiaris*) foi efectuada de forma aleatória, tendo tido como referência o número de canídeos intervencionados em campanhas antirábicas de anos anteriores, nos concelhos visados, através da utilização da fórmula estatística de Cannon e Roe<sup>(42)</sup>:

$n = [1 - (1 - a)^{1/D}] [N - (D - 1) / 2]$ , onde “n” é a dimensão da amostra a calcular, “a” é o nível de confiança, “D” é o número de animais doentes (a prevalência esperada) e “N” é a dimensão da população a estudar. O nível de confiança utilizado foi de 95% e o valor da prevalência foi determinado com base nos valores conhecidos para as diversas doenças: 3% para *H. canis*<sup>(48)</sup>, 38,5% para *R. conorii*, 5,25% para *E. canis*<sup>(2)</sup> e 2,25% para *B. burgdorferi* s.l.<sup>(2)</sup>, tendo sido considerado o valor esperado de 50% para babesiose canina, tularémia e anaplasmoze granulocítica canina, face à ausência de dados publicados de seroprevalência em Portugal. Perante a disparidade de resultados para as diferentes doenças e as implicações dos mesmos na determinação das amostras a considerar, decidiu-se não considerar os valores extremos encontrados. Assim, utilizou-se o valor de 3% indicado para a prevalência de *H. canis*<sup>(48)</sup>, para determinar os valores das amostras, por concelho, conforme tabela 1. Este é o valor de prevalência mais próximo do limite inferior supracitado que, simultaneamente, implica uma dimensão de amostra que é considerável e que, apesar de ambiciosa, se verificou ser passível de realizar.

Tabela 1– Determinação dos valores da amostra por concelho

	<b>N</b>	<b>n (3%)</b>	<b>n</b>
Bragança	3000	96,75726	97
Carrazeda	1250	94,57203	95
Miranda	1800	95,70829	96
Mogadouro	1600	95,38362	96
Vimioso	1150	94,252	95
Vinhais	2000	95,96909	96

### 3.2 Colheitas

O contacto com os proprietários dos canídeos estabeleceu-se aquando da acção de vacinação antirábica, acompanhando os veterinários municipais e executores sanitários responsáveis pelo acto profilático. A cada proprietário foi realizado um inquérito epidemiológico para averiguar os hábitos dos canídeos, como o pastoreio, a caça, a permanência no exterior, entre outros, de modo a identificar possíveis situações de risco (ver Anexo 1).

Cada um dos 473 canídeos, intervencionados no âmbito desta dissertação, foi objecto de um exame clínico que consistiu na examinação da coloração das mucosas, na determinação do tempo de repleção capilar, na verificação da existência de petéquias, de linfadenomegália dos linfonodos superficiais e condição geral. A cada canídeo efectuou-se uma colheita de cerca de 5ml de sangue, em tubo com EDTA (S-Monovette®), a partir de uma veia periférica (veia cefálica, safena ou jugular), bem como uma gota de sangue periférico (da margem auricular), empregue em esfregaço.

Após a colheita sanguínea, colocaram-se 2ml de sangue total em tubo com EDTA, sendo posteriormente congelado a -20°C para detecção dos ácidos nucleicos, por PCR convencional e/ou “nested”, no caso dos canídeos que revelaram exame clínico compatível com borreliose de Lyme, serologia positiva ou cujos ixodídeos colhidos tenham revelado *B.*

*burgdorferi* s.l.. A restante parte do sangue da colheita foi separada em soro e glóbulos vermelhos através de sedimentação e as diferentes fracções foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O soro foi utilizado para realização dos ensaios serológicos, nomeadamente as técnicas de imunofluorescência indirecta e aglutinação em placa. A fase que continha os eritrócitos foi utilizada para detecção dos ácidos nucleicos dos agentes infecciosos por PCR convencional ou “nested”, nos canídeos que revelaram exame clínico compatível com doença, serologia positiva ou cujos ixodídeos tenham revelado os agentes em estudo.

### **3.3 Esfregaços de sangue periférico**

Os esfregaços de sangue periférico foram corados segundo a coloração rápida de Giemsa. Assim, as lâminas foram fixadas em álcool metílico durante cinco minutos, secas completamente e de seguida coradas com solução de Giemsa diluída (obtida a partir de corante Giemsa filtrado e água destilada neutralizada), durante 20 minutos. Posteriormente, foram lavadas com água destilada neutralizada e secas ao ar ambiente. Procedeu-se, então, à observação das lâminas coradas em microscópio óptico, com ampliação de  $1000\times$ , para identificação de *B. canis* e *H. canis*.

### **3.4 Imunofluorescência indirecta**

O teste da IFI foi realizado com o objectivo de detectar e titular anticorpos de *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi* s.l., *E. canis* e *R. conorii*, nos soros dos canídeos sob estudo.

O antigénio utilizado na preparação das lâminas para IFI de *A. phagocytophilum* foi a estirpe Webster (gentilmente cedida pelo Prof. John Stephen Dumler, Division of Medical Microbiology, The Johns Hopkins, University School of Medicine, Baltimore, EUA), enquanto que o antigénio para as lâminas de diagnóstico de *R. conorii* foi proveniente da

estirpe PoHUR1021 (*R. conorii* Malish). O antígeno utilizado para diagnóstico de borreliose de Lyme foi *B. garinii* (estirpe VS102) foi gentilmente cedido pelo Institut Zoologie, Université Neuchâtel, Dr. Lise Gern. As lâminas de *E. canis* tiveram origem comercial (Fuller Laboratories®, California, EUA). Todas as lâminas foram congeladas a -20°C até à sua utilização.

Imediatamente antes da prova de IFI, as lâminas foram descongeladas e, após a remoção do excesso de humidade, foram fixadas em acetona durante 10 minutos. Em seguida, foram secas, tendo-se reservado, em cada lâmina, os três primeiros poços para controlo positivo (antígeno + soro testemunha positivo), branco (antígeno + PBS pH 7,4) e controlo negativo (antígeno + soro testemunha negativo) na diluição de 1:128.

Cada um dos soros dos canídeos foi diluído com PBS pH 7,4 e testado na diluição de 1:128 para os agentes em estudo, tendo o procedimento sido o seguinte: colocou-se 15µl de soro canino a testar em cada poço, de modo a cobrir todo o antígeno presente no círculo. As lâminas foram, em seguida, incubadas em câmara húmida a 37°C durante 20 minutos. Posteriormente, o excesso de soro foi removido por lavagem com PBS pH 7,4, por duas vezes durante cinco minutos cada, com agitação magnética e secagem ao ar. Colocou-se, então, 15µl de conjugado fluoresceínado (Anti-dog IgG, Sigma-Aldrich®) diluído a 1:40, com azul de Evans diluído a 1:80 com PBS (no caso da prova de *B. burgdorferi* s.l., a preparação do conjugado dispensa a utilização do azul de Evans). As lâminas foram depois incubadas em câmara húmida a 37°C durante 20 minutos, onde, após duas lavagens com PBS e nova secagem, se seguiu a montagem com lamela e glicerina tamponada com Dabco (Sigma-Aldrich®). No caso da prova de *E. canis*, foi seguido o protocolo do fabricante.

As lâminas foram observadas em microscópio Olympus® BH-2, equipado com fonte de luz ultravioleta com uma ampliação de 400×. A leitura da reacção de fluorescência foi feita

no centro dos círculos, não tendo sido considerada a fluorescência periférica. Nas lâminas utilizadas para diagnóstico de *A. phagocytophilum*, *E. canis* e *R. conorii* os resultados positivos obtiveram-se através da visualização de rickettsias e ehrlichias com fluorescência verde-maçã no interior das células de cultura e os resultados negativos surgiram como um campo escuro com as células de cultura coradas de vermelho. No caso de *B. burgdorferi* s.l., os resultados positivos surgiram através do aparecimento das espiroquetas verdes-fluorescentes num fundo escuro.

### **3.5 Aglutinação em placa**

A prova da aglutinação em placa dos soros dos canídeos foi realizada com o objectivo de detectar e titular anticorpos anti-*F. tularensis*.

O antigénio utilizado na prova de aglutinação foi de origem comercial (“BD Febrile Antigens for Febrile Antigen Agglutination Tests” Becton, Dickinson and Co, Sparks®, EUA). Foram preparadas placas de aglutinação de seis poços e, seguindo o protocolo do fabricante, reservaram-se os primeiros dois poços para o controlo positivo (soro positivo) e negativo (soro negativo). De acordo com o protocolo, foi adicionado 40µl de soro canino a testar com o correspondente antigénio comercial, correspondente à diluição 1:40, na placa e procedeu-se à agitação suave da mesma durante um minuto. Os resultados positivos à diluição 1:40 foram de seguida titulados a 1:80, tendo-se procedido, para tal, à adição de 20 µl dos soros a testar com o antigénio comercial e submetido a placa a agitação durante um minuto, fazendo a leitura da placa nesse momento.

O padrão de aglutinação foi lido tendo como título final a maior diluição com aglutinação. As amostras negativas não apresentaram qualquer tipo de reacção nos poços da

placa e as amostras positivas mostraram uma aglutinação com as células no fundo dos poços da placa. Todos os soros positivos foram posteriormente sujeitos à prova de PCR.

## **4. Biologia Molecular**

### **4.1 Extracção de ADN do sangue**

O sangue dos canídeos, num volume total de 2 ml, e após descongelação, foi submetido ao protocolo de extracção de ADN, tendo para o efeito sido utilizado o “kit” FlexiGene DNA®, Qiagen, de acordo com o protocolo do fabricante (ver Anexo 2). O ADN resultante foi conservado a 4°C e utilizado para ensaios de PCR no dia seguinte.

### **4.2 PCR**

Os canídeos que revelaram exame clínico compatível com doença associada à picada de ixodídeo, serologia positiva ou que tinham ixodídeos a parasitá-los, que apresentaram resultados positivos por PCR, foram ainda sujeitos a este teste de biologia molecular em amostras de sangue total. Em relação aos ixodídeos, foram estudados por PCR aqueles cujos hospedeiros manifestaram sinais de doença. Complementarmente, os ixodídeos pertencentes às espécies *D. reticulatus* foram analisados para borreliose de Lyme e tularémia e os exemplares de *I. ricinus* e *I. hexagonus* foram estudados para detecção dos agentes de anaplasmoze granulocítica canina, febre botonosa, borreliose de Lyme e tularémia, dado serem vectores conhecidos dos agentes em causa. Para a elaboração da “Master mix” foram utilizados os reagentes fornecidos no “kit” *Taq* PCR Master Mix Kit®, Qiagen, de acordo com as instruções do fornecedor. Todos os controlos positivos foram gentilmente cedidos pelo CEVDI.

Para detecção de ADN de *A. phagocytophilum* utilizaram-se os “primers” MSP465f: 5'-TGATGTTGTTACTGGACAGA-3' e MSP980r: 5'-CACCTAACCTTCATAAGAA-3' que amplificam um fragmento do gene *msp2*<sup>(45)</sup>. Para a elaboração da “Master mix” utilizou-se para cada amostra a testar 25µl de *Taq* PCR Master Mix Kit®, Qiagen, 2,5µl de cada primer e 10µl de ADN alvo, acertado a solução com água estéril Sigma® para um volume total de 50µl. Para a amostra de controlo positivo adicionou-se apenas 5µl de ADN da estirpe *A. phagocytophilum* Webster enquanto que o controlo negativo foi constituído por água estéril, Sigma®. Os ciclos de desnaturação, “annealing” e extensão foram realizados num termociclador T3 Thermocycler, Biometra® consistindo num pré-aquecimento de 94°C durante 2 minutos, seguido de 2 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 62°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos; 2 ciclos a: 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos; 2 ciclos a: 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos; 2 ciclos a: 94°C durante 30 segundos, 56°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos; 26 ciclos a: 94°C durante 30 segundos, 54°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos; seguidos de 5 minutos a 72°C. Foram analisados 11 ixodídeos e oito canídeos, num total de 19 reacções.

Para a detecção de ADN de *B. burgdorferi* s.l., em PCR “nested”, na primeira reacção foram utilizados os “primers” 23SN1: 5'- ACCATAGACTCTTATTACTTTGAC e 23SC1: 5'-TAAGCTGACTAATACTAATTACCC que amplificam um fragmento de 380 pares de bases (bp)<sup>(172)</sup>. Nesta primeira reacção adicionou-se, para cada amostra a testar, 5µl de água, 1,25µl de cada um dos “primers” acima mencionados e 12,5µl de *Taq* PCR Master Mix®, Qiagen, num volume final de 20µl, a que adicionou 5µl do ADN a testar. Para o controlo positivo adicionou-se 5µl de *B. burgdorferi* s.l. e para o negativo 5µl de água estéril, Sigma®. Seguiu-se a colocação das amostras no termociclador T3 Thermocycler, Biometra®, de

acordo com o protocolo: 94° durante 1 minuto, seguidos de 26 ciclos a 94° durante 30 segundos, 52° durante 30 segundos, 72° durante 1 minuto e 4° com pausa. Na segunda reacção foram utilizados os “primers” 23SN2: 5'-ACCATAGACTCTTATTACTTTGACCA e o 5SCB: 5'-biotina-GAGAGTAGGTTATTGCCAGGG que amplificam um frgmento de 225 bp<sup>(172)</sup>. Nesta segunda reacção para a “Master mix” adicionou-se 2µl de água estéril, 0,25µl de cada um dos “primers” 23SN2 e 5SCB e 2,5µl de *Taq* PCR Master Mix®, Qiagen, num volume total de 5µl, que foi adicionado ao produto da primeira reacção. Seguiu-se a colocação das amostras no termociclador T3 Thermocycler, Biometra®, de acordo com o protocolo: 94° durante 1 minuto, seguidos de 94° durante 30 segundos, 55° durante 30 segundos, 72° durante 1 minuto e 40× a 2 e 4° com pausa. Foram analisados 13 ixodídeos e seis canídeos, num total de 19 reacções.

Para a detecção de ácidos nucleicos de *E. canis*, o protocolo consistiu num PCR “nested”, utilizando na primeira reacção os “primers” ECC: 5'-AGAACGAACGCTG GCGGCAAGCC-3' e ECB: 5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA-3', e na segunda reacção o par HE3: 5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3' e HCS: 5'-CA ATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA-3'<sup>(55)</sup>. Estes primers amplificam, respectivamente, um fragmento de 480bp e 390bp do gene que codifica a sub-unidade 16S do RNA ribossómico (gene do 16S rRNA)<sup>(55)</sup>. Na primeira reacção adicionou-se, para cada amostra a testar, 10µl de água estéril, 2,5µl de cada um dos “primers” acima mencionados e 25µl de *Taq* PCR Master Mix®, Qiagen, a que adicionou 10µl do ADN a testar, num volume final de 50µl. Para o controlo positivo adicionou-se 15µl de água estéril e 5µl de ADN de *E. canis* e para o controlo negativo apenas 20µl de água estéril. Seguiu-se a colocação das amostras no termociclador T3 Thermocycler, Biometra®, de acordo com o protocolo: 94° durante 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de: 94° durante 1 minuto, 45° durante 2 minutos, 72° durante

30 segundos, ao que se seguiu 72° durante 5 minutos. Na segunda reacção, com os “primers” HE3 e HCS, para a “Master mix” adicionou-se 18µl de água estéril, Sigma®, 2,5µl de cada um dos “primers”, 25µl de *Taq* PCR Master Mix®, Qiagen e 2µl de ADN alvo resultante da primeira reacção, num volume total de 50µl. Para o controlo positivo adicionou-se 15µl de água estéril, Sigma® e 5µl da primeira reacção de PCR e para o controlo negativo adicionou-se 10µl da primeira reacção a 10µl de água estéril, Sigma®. Seguiu-se a colocação das amostras no termociclador T3 Thermocycler, Biometra®, de acordo com o protocolo: 94° durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de: 94° durante 1 minuto, 55° durante 2 minutos, 72° durante 15 segundos e 72° durante 5 minutos. Foram estudados 25 ixodídeos e 10 canídeos, num total de 35 reacções.

Para estudo de *F. tularensis* utilizaram-se os “primers”: FT393: 5'-ATGGCGAGTGATACTGCTTG-3' e o FT642: 5'-GCATCATCAGAGCCACCTAA-3', que amplificam um fragmento de 250 bp do gene de uma lipoproteína membranária de 17kDA<sup>(113)</sup>. A “Master mix” incluiu, para cada ADN alvo: 8,1µl de água estéril, Sigma®, 2µl de tampão, 1,2µl de cloreto de magnésio, 1µl de cada “primer” (20pmol) e 3,7µl de *Taq* PCR Master Mix®, Qiagen. O volume total da “Master mix” totalizou 15µl a que se adicionou 5µl do ADN alvo. Para o controlo positivo adicionou-se 5µl de *F. tularensis* e para o negativo 5µl de água estéril, Sigma®. De seguida, o programa utilizado no termociclador T3 Thermocycler, Biometra®, foi de 95° durante 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de: 95° durante 10 segundos, 54° durante 30 segundos, 72° durante 1 minuto, 72° durante 1 minuto e 4° com pausa. Foram estudados 12 ixodídeos e 12 canídeos, num total de 24 reacções.

Para o estudo de *R. conorii* foram utilizados os “primers”: *RpCS.1258n*: 5'-ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA e *RpCS.877p*: 5'-GGGGGCCTGCTCACGGCGG que amplificam um fragmento de 381 bp do gene da citrato sintetase<sup>(171)</sup>. Para a “Master mix”

utilizou-se 25µl de *Taq* PCR Master Mix Kit®, Qiagen, 1µl do “primer” 1258, 1µl do “primer” 877R e 13µl de água estéril, perfazendo um volume total de 40µl a que se adicionou 10µl do ADN alvo. Para o controlo positivo adicionou-se 3µl de *R. conorii* e 7µL de água estéril e para o negativo 10µl de água estéril, Sigma®. De seguida o programa utilizado no termociclador T3 Thermocycler, Biometra®, foi de 94° durante 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de: 94° durante 30 segundos, 58° durante 30 segundos, 72° durante 1 minuto e meio, 72° durante 7 minutos e 4° em pausa. Foram estudados 48 ixodídeos e 26 canídeos, num total de 74 reacções.

Em todos os casos, após a reacção de PCR, efectuou-se um gel de 1,5% de agarose à base de tampão TBE (tris-Borato 0,045 M, EDTA 0,001 M) TBE Running Buffer 5×, Novex, Invitrogen®, diluído a 1% em 200 ml de água bidestilada, Sigma®, com 3g de agarose Seakem® LE Agarose, Cambrex BioScience Rockland, Inc., EUA. Após a completa dissolução da agarose (em micro-ondas) e o seu arrefecimento a cerca de 37°C, adicionou-se 2µl de brometo de etídeo a 30 ml da agarose e colocou-se a mistura na tina de electroforese (Horizon 58, Life Technologies®) com pentes de 14 poços. Após a solidificação do gel, procedeu-se à imersão do mesmo com TBE a 1%, à adição de 5µl das amostras a testar com 2µl de azul de bromofenol e à respectiva colocação nos poços do gel. Reservou-se o primeiro poço para 3µl do marcador de pares de bases “Trackit™ 100bp DNA Ladder”, Invitrogen®, (com graduação de 100bp) e os dois últimos para, respectivamente, 5µl do controlo negativo e 5µl do controlo positivo. A tina foi então fechada e ligou-se o aparelho para as condições de electroforese de 30 minutos a 100 Volts e 400 mA, com uma fonte de alimentação EPS 600 (“Electroforesis Power Supply”, Pharmacia®). Decorrido este tempo, o gel foi colocado num

aparelho transiluminador (Electrophoresis Documentation and Analysis System, Kodak®) e na presença de luz ultravioleta foram verificadas e fotografadas as bandas de ADN.

### 4.3 Purificação e sequenciação dos produtos de PCR

Após as reacções de PCR, procedeu-se à purificação dos produtos positivos ao PCR seguida de sequenciação dos mesmos.

Os produtos de PCR, mantidos a 4°C, foram submetidos ao protocolo de purificação do “kit” JETquick Spin Column Technique®, Genomed, de acordo com o protocolo do fabricante (ver Anexo 3). Consoante os agentes em estudo, o volume de produto de PCR variou entre os 45µl para *R. conorii* e *E. canis*, 25µl para *B. burgdorferi* s.l. e 15µl para *F. tularensis*. O ADN purificado resultante foi conservado a -20°C. Foram purificados 16 produtos de PCR de *R. conorii*, 9 de *F. tularensis*, 7 de *E. canis* e 4 de *B. burgdorferi* s.l., usando o “kit” de sequenciação “Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems®) e as amostras foram colocadas no termociclador T3 Thermocycler, Biometra® com o programa: 25 ciclos de 30 segundos a 96°C, 15 segundos a 96°C, 1 segundo a 50°C e 4 minutos a 60°C.

Cada reacção de amplificação do ADN purificado, para posterior sequenciação para pesquisa de *R. conorii* incluiu: 2µl de “Big Dye”, 0,5µl do primer RpCS.877p, 6,5µl de água estéril e 2µl de ADN alvo, num volume final de 10µl por reacção.

Para sequenciação de *E. canis* foi utilizado um volume total de 10µl por reacção, do qual fizeram parte 2µl de “Big Dye”, 1µl de “primer” EC3, 5µl de água estéril e 2µl do ADN purificado.

Para sequenciação de *B. burgdorferi* s.l., utilizou-se um volume final de 10µl, que consistiu em 2µl de “Big Dye”, 1µl de “primer” 23SN2, 2µl de água estéril e 5µl do ADN purificado.

Para sequenciação de *F. tularensis*, utilizou-se um volume final de 10µl, que consistiu em 2µl de “Big Dye”, 1µl de “primer” FT642, 2µl de água estéril e 5µl do ADN purificado.

Os produtos finais foram analisados no sequenciador ABI 377 ADN®, na Unidade Laboratorial de Utilização Comum do Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge, tendo sido feita a procura da homologia das sequências através da análise BLASTN do GenBank.

## **5. Métodos estatísticos**

Para além do método estatístico para determinar a dimensão da amostra, já anteriormente descrito, houve necessidade de recorrer a outros métodos para determinação das prevalências e tratamento estatístico dos dados obtidos aquando dos inquéritos epidemiológicos individuais realizados aos canídeos.

A determinação das prevalências foi calculada com base na relação dos resultados seropositivos em função da totalidade da amostra em estudo, para um intervalo de confiança de 99%<sup>(161)</sup>.

Pretendeu-se também determinar possíveis factores de risco para o desenvolvimento das doenças em estudo, de acordo com os resultados das seroprevalências. Para tal, os dados epidemiológicos foram armazenados em base de dados e tratados estatisticamente pelo Programa SPSS 15 (SPSS Inc.). Assim, foi investigada a associação estatística entre as prevalências determinadas de cada doença e as variáveis: concelho, raça, sexo, idade, pelagem, aptidão, residência, acesso ao exterior, contacto com lagomorfos, contacto com javalis, contacto com cervídeos, contacto com aves venatórias, contacto com raposas, acesso a

Espanha, presença de ixodídeos, profilaxia para ectoparasitas e presença de sinais clínicos; através do teste estatístico do qui-quadrado. Utilizou-se o valor de  $p < 0,05$  como valor significativo. Sempre que houve violação do fundamento do qui-quadrado, foi utilizado o teste Fisher ou a sua generalização para tabelas de maior dimensão.

## IV. Resultados

### 1. Ixodídeos

#### 1.1 Espécies e sexo

Durante o trabalho de campo foram intervencionados 473 canídeos, dos quais 71 (15%) apresentavam-se parasitados com ixodídeos e destes 30 (6,3%) apresentavam mais do que um exemplar, o que permitiu uma recolha total de 135 ixodídeos.

Foram identificadas 6 espécies de ixodídeos a parasitar os canídeos: *R. sanguineus* com 86,7% das colheitas (117/135), *I. hexagonus* e *D. reticulatus* ambos com 3,7% (5/135), *D. marginatus* com 2,9% (4/135) e *R. pusillus* e *I. ricinus* ambos com 1,5% (2/135) (ver Fig. 7 a 19). Nos concelhos de Vimioso e Miranda do Douro registaram-se colheitas exclusivas da espécie *R. sanguineus*, tendo as restantes espécies sido colhidas nos remanescentes concelhos. A espécie *D. reticulatus* foi colhida no concelho de Vinhais, enquanto as espécies *R. pusillus* e *I. hexagonus* foram capturadas no concelho de Bragança (ver Tabela 2).

Tabela 2 – Os ixodídeos capturados em canídeos por concelho: espécies, sexo e estágio evolutivo

	Concelho					
	Vinhais (n=11)	Bragança (n=8)	Vimioso (n=10)	Miranda do Douro (n=7)	Carrazeda de Ansiães (n=35)	Total (n=71)
<i>D. marginatus</i>	1M; 2F	1F	0	0	0	4
<i>D. reticulatus</i>	4M; 1F	0	0	0	0	5
<i>I. hexagonus</i>	0	5F	0	0	0	5
<i>I. ricinus</i>	0	1F	0	0	1F	2
<i>R. sanguineus</i>	9M; 5F	6M; 5F	10M; 8F	6M; 6F	42M; 18F; 2N	117
<i>R. pusillus</i>	0	1M; 1F	0	0	0	2
<b>Total</b>	22	20	18	12	63	135

Legenda: n: número de cães parasitados, F: fêmea adulta, M: macho adulto, N: ninfa.

Foram identificados o sexo e o estágio de desenvolvimento de cada ixodídeo, havendo nas espécies de *R. sanguineus*, *D. marginatus*, *I. hexagonus* e *I. ricinus* um predomínio de

fêmeas. Pelo contrário, a espécie *D. reticulatus* apresentou um maior número de machos, enquanto que na espécie *R. pusillus* o número de fêmeas igualou o número de machos. Com exceção de duas formas imaturas (ninfas) encontradas, pertencentes à espécie *R. sanguineus*, todos os restantes exemplares eram adultos (ver Fig. 16 e 17). Não foram colhidas formas larvares de qualquer espécie (ver Tabela 2).

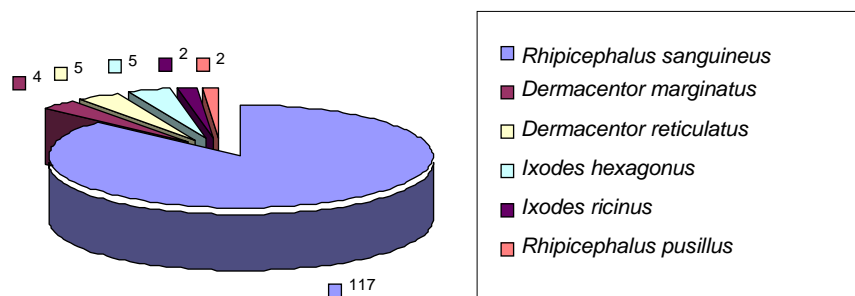


Fig. 7 - Distribuição das espécies de ixodídeos colhidos



Fig. 8 - *D. marginatus*: fêmea



Fig. 9 - *D. marginatus*: macho



Fig. 10 - *D. reticulatus*: fêmea - rostro



Fig. 11 - *D. reticulatus*: macho



Fig. 12 - *I. hexagonus*: fêmea



Fig. 13 - *I. ricinus*: fêmea engorgitada



Fig. 14 - *R. pusillus*: fêmea engorgitada



Fig. 15 - *R. pusillus*: macho



Fig. 16 - *R. sanguineus*: ninfa



Fig. 17 - *R. sanguineus*: ninfa vs macho



Fig. 18 - *R. sanguineus*: fêmea



Fig. 19 - *R. sanguineus*: macho

## 1.2. Biologia Molecular

### 1.2.1. PCR

De acordo com os critérios descritos no capítulo “Materiais e métodos”, seleccionou-se para análise de PCR um total de 48 ixodídeos, a que corresponderam 109 reacções de PCR. Dos resultados obtidos, destaca-se um total de 19 reacções positivas, que traduz uma prevalência de infecção de 39,6% nos ixodídeos analisados e de 14,1% no total de ixodídeos recolhidos.

Para detecção de ADN de *A. phagocytophilum*, foram analisados 11 ixodídeos mas não houve amplificação do segmento genético específico para a bactéria em causa.

Em relação ao agente da borreliose de Lyme, foi analisado o ADN de 13 ixodídeos, tendo em três artrópodes (*D. reticulatus*, *I. hexagonus* e *R. sanguineus*), surgido bandas

atípicas, na região pertencente a *B. burgdorferi* s.l., pelo que se consideraram como resultados negativos.

Para detecção de material genético de *E. canis*, foi analisado ADN de 25 ixodídeos, tendo-se encontrado em três ixodídeos *R. sanguineus*, dois machos e uma fêmea, resultados compatíveis com a amplificação de ADN de *E. canis*, numa prevalência de 6,2% dos ixodídeos analisados por PCR e 2,2% no total de ixodídeos colhidos. Estes artrópodes foram colhidos no concelho de Carrazeda de Ansiães, tendo a fêmea e um dos machos sido colhidos no mesmo canídeo.

Em relação ao agente da tularémia, foi analisado o material genético de 12 ixodídeos, tendo sido detectadas bandas coincidentes com a porção amplificada de *F. tularensis* em três ixodídeos machos *D. reticulatus*, quatro fêmeas *I. hexagonus* e uma fêmea *I. ricinus*. Estes oito ixodídeos positivos, que traduzem uma prevalência de infecção de 16,6% nos ixodídeos estudados por PCR e de 5,9% no total das capturas, foram recolhidos nos concelhos de Vinhais e Bragança (ver Fig. 20).

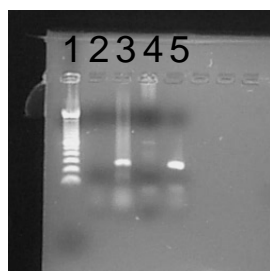


Fig. 20 - Gel de agarose com amplicons de ADN de *F. tularensis* amplificados por PCR (poço 1: marcador de bp; poço 3: fêmea *I. ricinus* com resultado positivo e poço 5: controlo positivo).

Para detecção do ADN de *R. conorii* foram analisados 48 ixodídeos, tendo surgido bandas típicas do amplicon da bactéria num total de oito ixodídeos, *R. sanguineus* e *D. marginatus*, colhidos nos concelhos de Vinhais, Bragança e Carrazeda de Ansiães. Estes resultados positivos traduzem uma prevalência calculada de 16,6% nos ixodídeos analisados por PCR e 5,9% no total dos artrópodes colhidos.

### 1.2.2. Purificação e sequenciação dos produtos de PCR

Todos os resultados positivos, acima mencionados, foram posteriormente sujeitos a sequenciação do ADN, para confirmação da presença dos agentes em estudo (ver Tabela 3).

A sequenciação das três amostras positivas por PCR, para segmentos de ADN de *E. canis*, permitiu a confirmação da presença de ADN nos três ixodídeos colhidos no concelho de Carrazeda de Ansiães.

Após a sequenciação das oito amostras que tinham revelado bandas de amplicons compatíveis com *F. tularensis*, apenas num ixodídeo *D. reticulatus*, colhido no concelho de Vinhais, se identificou *Francisella* endosymbiont de *D. variabilis*, não tendo sido confirmados os restantes resultados positivos ao PCR.

Para *R. conorii*, dos oito ixodídeos analisados, a sequenciação permitiu obter a confirmação da bactéria em 1 ixodídeo macho *R. sanguineus*, colhido no concelho de Vinhais. Ainda neste concelho, foram identificadas a espécie *R. slovaca* e a estirpe *R. bar29* em um e dois ixodídeos, respectivamente, e apenas o género *Rickettsia* sp. noutra artrópode. No concelho de Bragança foi também identificado *R. bar29* num ixodídeo.

Tabela 3- Resultados diferenciados da sequenciação dos ixodídeos

Localidade (Concelho)	Ixodídeo	Sexo	Resultado da sequenciação
Agrochão (Vinhais)	<i>R. sanguineus</i>	Macho	<i>R. bar29</i>
Agrochão (Vinhais)	<i>R. sanguineus</i>	Fêmea	<i>R. conorii</i>
Alvaredos (Vinhais)	<i>R. sanguineus</i>	Fêmea	<i>R. bar29</i>
Travanca (Vinhais)	<i>D. marginatus</i>	Fêmea	<i>R. slovacca</i>
Travanca (Vinhais)	<i>D. marginatus</i>	Fêmea	<i>Rickettsia</i> sp.
Travanca (Vinhais)	<i>D. reticulatus</i>	Macho	<i>Francisella</i> endosymbionte de <i>D. variabilis</i>
Freixedelo (Bragança)	<i>R. sanguineus</i>	Fêmea	<i>R. bar29</i>
Amedo (Ca)	<i>R. sanguineus</i>	Macho	<i>E. canis</i>
Amedo (Ca)	<i>R. sanguineus</i>	Macho	<i>E. canis</i>
Amedo (Ca)	<i>R. sanguineus</i>	Fêmea	<i>E. canis</i>

Legenda: Ca: Carrazeda de Ansiães.

## 2. Canídeos

### 2.1 Inquéritos epidemiológicos

Foram intervencionados, de forma aleatória, 473 canídeos, de forma aleatória, nos concelhos de Vinhais, Bragança, Vimioso, Miranda do Douro e Carrazeda de Ansiães. Dos inquéritos epidemiológicos realizados, individualmente, foi possível inferir das características e hábitos dos canídeos como a idade, sexo, aptidão, o tipo de área de residência, o contacto com o exterior e com outros animais, o acesso a peças de caça, o acesso a Espanha, a presença de ixodídeos, a presença de sinais clínicos e a profilaxia utilizada contra os ectoparasitas (ver Anexo 1).

Foram rastreados canídeos pertencentes a 21 raças, tendo sido a mais representada a raça indeterminada com 42,5% (201/473) dos canídeos, seguindo-se a raça Podenga Nacional com 31,5% (149/473) do total, restando 123 canídeos pertencentes a outras raças (Griffon, Perdigueiro, Beagle, Pointer, Epanheul Breton, Braque Alemão, Cão de Gado Transmontano, Podengo Ibérico, Teckel, Cão da Serra da Estrela, Fila de S. Miguel, Pastor Alemão, Rottweiler, Setter Irlandês, Setter Inglês, Caniche, Retriever do Labrador, Deutsch Drahthaar, Cão de virar e Basset Hound). A maioria dos canídeos intervencionados tinha mais de 18 meses, ou seja, pertencia à idade adulta (84,4%), era do sexo masculino (55,6%) e residia em área rural (97,9%) (ver Tabela 4 e 5). Como exceção encontrou-se o concelho de Bragança com um predomínio de fêmeas (54,7%) e a igual percentagem de sexos no concelho de Carrazeda de Ansiães (50%).

Tabela 4 – Sexo e idade dos canídeos intervencionados

<b>Concelho</b>	<b>Machos n(%)</b>	<b>Fêmeas n(%)</b>	<b>Adultos n(%)</b>	<b>Jovens n(%)</b>
Vinhais	44/78 (56,4%)	34/78 (43,6%)	71/78 (91%)	7/78 (8,9%)
Bragança	43/95 (45,3%)	52/95 (54,7%)	68/95 (71,6%)	27/95 (28,4%)
Vimioso	56/100 (56%)	44/100 (44%)	88/100 (88%)	12/100 (12%)
Miranda do Douro	70/100 (70%)	30/100 (30%)	92/100 (92%)	8/100 (8%)
Carrazeda de Ansiães	50/100 (50%)	50/100 (50%)	80/100 (80%)	20/100 (20%)
<b>Total</b>	<b>263/473 (55,6%)</b>	<b>210/473 (44,4%)</b>	<b>399/473 (84,4%)</b>	<b>74/473 (15,6%)</b>

Tabela 5 – Área de residência dos canídeos

<b>Concelho</b>	<b>Rural n(%)</b>	<b>Sub-urbana n(%)</b>	<b>Urbana n(%)</b>
Vinhais	77/78 (98,7%)	0/78 (0%)	1/78 (1,3%)
Bragança	92/95 (96,8%)	2/95 (2,1%)	1/95 (1,1%)
Vimioso	100/100 (100%)	0/100 (0%)	0/100 (0%)
Miranda do Douro	100/100 (100%)	0/100 (0%)	0/100 (0%)
Carrazeda de Ansiães	94/100 (94%)	0/100 (0%)	6/100 (6%)
<b>Total</b>	<b>463/473 (97,9%)</b>	<b>2/473 (0,4%)</b>	<b>8/473 (1,7%)</b>

As aptidões dos canídeos variaram entre a caça, o pastoreio, a guarda e companhia (ver Tabela 6). Nos concelhos estudados, com excepção de Bragança em que 74,7% dos cães apresentaram como aptidão o pastoreio, a maioria dos cães (75,5%) apresentou como aptidão a caça. Variados foram também os resultados relativos ao acesso dos cães ao exterior e ao seu contacto com outros animais como bovinos, suínos, gatos e peças de caça (ver Tabela 7 a 8), tendo-se concluído que os cães pastores contactam com outras espécies e têm um acesso diário ao exterior, enquanto que os cães de caça contactam principalmente com outros canídeos e o acesso ao exterior faz-se de forma sazonal, geralmente em época venatória (ver Tabela 8). De salientar que vários canídeos contactam em simultâneo com diferentes espécies animais coabitantes (por exemplo cães, gatos, ovelhas, bovinos), sendo por isso contabilizados em mais do que uma categoria na Tabela 7.

Tabela 6 – Aptidões dos animais intervencionados

<b>Concelho</b>	<b>Caça</b> <b>n(%)</b>	<b>Pastoreio</b> <b>n(%)</b>	<b>Guarda</b> <b>n(%)</b>	<b>Companhia</b> <b>n(%)</b>
Vinhais	60/78 (76,9%)	15/78 (19,3%)	3/78 (3,8%)	0/78 (0%)
Bragança	6/95 (6,3%)	71/95 (74,7%)	6/95 (6,3%)	12/95 (12,6%)
Vimioso	98/100 (98%)	2/100 (2%)	0/100 (0%)	0/100 (0%)
Miranda	95/100 (95%)	5/100 (5%)	0/100 (0%)	0/100 (0%)
Do Douro	98/100 (98%)	0/100 (0%)	2/100 (2%)	0/100 (0%)
Carrazeda de Ansiães	98/100 (98%)	0/100 (0%)	2/100 (2%)	0/100 (0%)
<b>Total</b>	<b>357/473</b> <b>(75,5%)</b>	<b>93/473</b> <b>(19,5%)</b>	<b>11/473</b> <b>(2,3%)</b>	<b>12/473</b> <b>(2,5%)</b>

Tabela 7 – Contactos dos canídeos com outros animais

<b>Concelho</b>	<b>Cães</b> <b>n(%)</b>	<b>Gatos</b> <b>n(%)</b>	<b>Bovinos</b> <b>n(%)</b>	<b>Ovinos</b> <b>n(%)</b>	<b>Caprinos</b> <b>n(%)</b>	<b>Suínos</b> <b>n(%)</b>	<b>Ratos</b> <b>n(%)</b>
Vinhais	78/78 (100%)	35/78 (44,9%)	31/78 (39,8%)	12/78 (15,4%)	12/78 (15,4%)	6/78 (7,7%)	13/78 (16,6%)
Bragança	94/95 (98,9%)	6/95 (6,3%)	27/95 (28,4%)	74/95 (77,9%)	29/95 (30,5%)	4/95 (4,2%)	5/95 (5,3%)
Vimioso	100/100 (100%)	0/100 (0%)	18/100 (18%)	57/100 (57%)	0/100 (0%)	0/100 (0%)	0/100 (0%)
Miranda	100/100 (100%)	0/100 (0%)	5/100 (5%)	5/100 (5%)	0/100 (0%)	0/100 (0%)	0/100 (0%)
do Douro	100/100 (100%)	0/100 (0%)	5/100 (5%)	5/100 (5%)	0/100 (0%)	0/100 (0%)	0/100 (0%)
Carrazeda de Ansiães	100/100 (100%)	14/100 (14%)	14/100 (14%)	0/100 (0%)	0/100 (0%)	0/100 (0%)	0/100 (0%)
<b>Total</b>	<b>472/473</b> <b>(99,8%)</b>	<b>55/473</b> <b>(11,6%)</b>	<b>95/473</b> <b>(20,1%)</b>	<b>148/473</b> <b>(31,3%)</b>	<b>41/473</b> <b>(8,6%)</b>	<b>10/473</b> <b>(2,1%)</b>	<b>18/473</b> <b>(3,8%)</b>

Tabela 8 – Acesso dos canídeos ao exterior

<b>Concelho</b>	<b>Nunca</b> <b>n(%)</b>	<b>Diário</b> <b>n(%)</b>	<b>Ocasional</b> <b>n(%)</b>	<b>Sazonal (caça)</b> <b>n(%)</b>
Vinhais	0/78 (0%)	24/78 (30,7%)	1/78 (1,3%)	53/78 (68%)
Bragança	0/95 (0%)	92/95 (96,8%)	1/95 (1,1%)	2/95 (2,1%)
Vimioso	0/100 (0%)	48/100 (48%)	0/100 (0%)	52/100 (52%)
Miranda	0/100 (0%)	11/100 (11%)	0/100 (0%)	89/100 (89%)
do Douro	0/100 (0%)	11/100 (11%)	0/100 (0%)	89/100 (89%)
Carrazeda de Ansiães	1/100 (1%)	17/100 (17%)	15/100 (15%)	67/100 (67%)
<b>Total</b>	<b>1/473</b> <b>(0,2%)</b>	<b>192/473</b> <b>(40,6%)</b>	<b>17/473</b> <b>(3,6%)</b>	<b>263/473</b> <b>(55,6%)</b>

Em relação aos canídeos de aptidão caça, as peças a que os mesmos tiveram acesso variaram entre a caça maior ou grossa (javali e cervídeos) e a caça menor (raposas, lagomorfos e aves) (ver Tabela 9). Houve um maior número de canídeos em contacto com javalis (61,7%), seguido dos lagomorfos silvestres (55,4%). Verificou-se uma maioria de acesso a caça menor em Vinhais, Bragança, Carrazeda de Ansiães e de caça grossa nos restantes concelhos. De salientar que vários canídeos acedem simultaneamente a diferentes peças de caça (por exemplo, coelhos, lebres, javali e aves), sendo por isso contabilizados em mais do que uma categoria na Tabela 9. Este contacto diferenciado dos canídeos é importante uma vez que diferentes espécies funcionam como reservatórios silvestres de diferentes doenças.

Tabela 9 – Contactos dos canídeos com peças de caça

<b>Concelho</b>	<b>Lagomorfos n(%)</b>	<b>Javali n(%)</b>	<b>Cervídeos n(%)</b>	<b>Aves n(%)</b>	<b>Raposa n(%)</b>
Vinhais	64/78 (82%)	34/78 (43,6%)	0/78 (0%)	5/78 (6,4%)	18/78 (23,1%)
Bragança	40/95 (42,1%)	1/95 (1,1%)	3/95 (3,2%)	2/95 (2,1%)	40/95 (42,1%)
Vimioso	52/100 (52%)	89/100 (89%)	0/100 (0%)	18/100 (18%)	9/100 (9%)
Miranda do Douro	23/100 (23%)	100/100 (100%)	47/100 (47%)	0/100 (0%)	0/100 (0%)
Carrazeda de Ansiães	88/100 (88%)	68/100 (68%)	0/100 (0%)	14/100 (14%)	0/100 (0%)
<b>Total</b>	<b>267/473 (55,4%)</b>	<b>292/473 (61,7%)</b>	<b>50/473 (10,6%)</b>	<b>39/473 (8,2%)</b>	<b>71/473 (15%)</b>

O acesso dos canídeos a Espanha será relevante no que concerne ao risco acrescido de transmissão de doenças identificadas em território espanhol, como é o caso da tularémia<sup>(19)</sup>. Nos canídeos em estudo, verificou-se uma variação entre nunca terem tido acesso à fronteira e os acessos ocasional e sazonal (na época venatória) à mesma (ver Tabela 10). Este contacto

foi influenciado pela localização geográfica dos concelhos em causa e pelas aptidões dos animais. No distrito de Bragança, dada a importância da caça enquanto actividade económica, é frequente a deslocação de cães de caça até Espanha, o que não acontece com os canídeos de pastoreio, de guarda e de companhia. Assim, a maioria dos animais apresentou um contacto fronteiriço sazonal (42,7%), sendo esse acesso mais significativo nos concelhos de Vinhais, Vimioso e Miranda do Douro. Em oposição, 40,6% dos canídeos estudados nunca tiveram acesso ao país vizinho, tendo-se verificado, também, que nenhum dos canídeos estudados teve um acesso diário ao país vizinho.

Tabela 10 – Acesso dos canídeos a Espanha

<b>Concelho</b>	<b>Nunca n(%)</b>	<b>Diário n(%)</b>	<b>Ocasional n(%)</b>	<b>Sazonal (caça) n(%)</b>
Vinhais	21/78 (26%)	0/78 (0%)	17/78 (21,8%)	40/78 (51,3%)
Bragança	74/95 (77,9%)	0/95 (0%)	16/95 (16,8%)	5/95 (5,3%)
Vimioso	13/100 (13%)	0/100 (0%)	22/100 (22%)	65/100 (65%)
Miranda do Douro	0/100 (0%)	0/100 (0%)	8/100 (8%)	92/100 (92%)
Carrazeda de Ansiães	84/100 (84%)	0/100 (0%)	16/100 (16%)	0/100 (0%)
<b>Total</b>	<b>192/473 (40,6%)</b>	<b>0/473 (0%)</b>	<b>79/473 (16,7%)</b>	<b>202/473 (42,7%)</b>

Em relação aos ectoparasitas, verificou-se que a maioria dos canídeos já fora sujeita a algum tipo de acção profiláctica, embora o número de animais sem qualquer tipo de prevenção fosse elevado (28,1%) (ver Tabela 11). De salientar que vários proprietários utilizaram nos seus canídeos, simultaneamente, diversas formas profilácticas para ixodídeos (por exemplo pipetas, sprays e banhos), pelo que esses canídeos se encontram contabilizados em mais do que uma categoria na Tabela 11.

Tabela 11 – Profilaxia para ixodídeos

<b>Concelho</b>	<b>Inexistente n(%)</b>	<b>Pipetas n(%)</b>	<b>Spray n(%)</b>	<b>Injectável n(%)</b>	<b>Coleiras n(%)</b>	<b>Banhos n(%)</b>	<b>Pó n(%)</b>
Vinhais	3/78 (3,8%)	7/78 (9%)	18/78 (23,1%)	0/78 (0%)	0/78 (0%)	43/78 (55,1%)	7/78 (9%)
Bragança	32/95 (33,7%)	38/95 (40%)	18/95 (18,9%)	21/95 (22,1%)	1/95 (1,1%)	1/95 (1,1%)	2/95 (2,1%)
Vimioso	13/100 (13%)	0/100 (0%)	6/100 (6%)	0/100 (0%)	11/100 (11%)	30/100 (30%)	40/100 (40%)
Miranda do Douro	0/100 (0%)	0/100 (0%)	22/100 (22%)	55/100 (55%)	0/100 (0%)	48/100 (48%)	23/100 (23%)
Carrazeda de Ansiães	85/100 (85%)	0/100 (0%)	0/100 (0%)	0/100 (0%)	0/100 (0%)	15/100 (15%)	9/100 (9%)
<b>Total</b>	<b>133/473 (28,1%)</b>	<b>45/473 (9,5%)</b>	<b>64/473 (13,5%)</b>	<b>76/473 (16,1%)</b>	<b>12/473 (2,5%)</b>	<b>122/473 (25,8%)</b>	<b>72/473 (15,2%)</b>

## 2.2. Exame clínico

Do exame clínico efectuado a cada canídeo, a maioria dos animais mostrou-se assintomática (ver Tabela 12). Apenas 47 dos canídeos estudados (9,9%) apresentaram sinais clínicos, de acordo com os parâmetros atrás indicados, sendo os sinais clínicos mais frequentes a linfadenomegália dos linfonodos superficiais (7,4%) e a presença de mucosas pálidas (3,4%). De salientar que vários animais apresentavam mais do que um sintoma (por exemplo caquexia e palidez das mucosas), sendo por isso contabilizados em mais do que uma categoria na Tabela 12. Como “Outros” sinais clínicos foram englobados quadros clínicos variados como desidratação, sarna, hiperplasia vaginal, dermatite alérgica à picada da pulga, tumores mamários, soluções de continuidade cutâneas, hipertricose e alopecia. O concelho que apresentou maior número de cães sintomáticos foi o de Carrazeda de Ansiães (15/47) e o com menor número de casos foi o de Miranda do Douro (3/47).

Dos 47 animais sintomáticos ao exame clínico, 14 (32,5%) apresentavam-se parasitados por ixodídeos.

Tabela 12 – Alterações ao exame clínico

Concelho	Mucosas						
	Linfoadenomegália n(%)	pálidas n(%)	Caquexia n(%)	Petéquias n(%)	Hemoptise n(%)	Epistaxis n(%)	Outros n(%)
Vinhais	6/78 (7,7%)	7/78 (9%)	3/78 (3,8%)	2/78 (2,6%)	0/78 (0%)	0/78 (0%)	0/78 (0%)
Bragança	4/95 (4,2%)	2/95 (2,1%)	0/95 (0%)	0/95 (0%)	0/95 (0%)	0/95 (0%)	0/95 (0%)
Vimioso	11/100 (11%)	2/100 (2%)	6/100 (6%)	0/100 (0%)	1/100 (1%)	0/100 (0%)	5/100 (5%)
Miranda do Douro	2/100 (2%)	0/100 (0%)	2/100 (2%)	0/100 (0%)	0/100 (0%)	1/100 (1%)	0/100 (0%)
Carrazeda de Ansiães	12/100 (12%)	5/100 (5%)	1/100 (1%)	1/100 (1%)	0/100 (0%)	0/100 (0%)	4/100 (4%)
<b>Total</b>	<b>35/473 (7,4%)</b>	<b>16/473 (3,4%)</b>	<b>12/473 (2,5%)</b>	<b>3/473 (0,6%)</b>	<b>1/473 (0,2%)</b>	<b>1/473 (0,2%)</b>	<b>9/473 (1,9%)</b>

### 2.3 Esfregaços de sangue periférico

Nos 473 esfregaços sanguíneos realizados, foram detectados gamontes de *H. canis* (ver Fig. 21) em 10 animais (2,1%) e não foram identificadas quaisquer formas de *B. canis*. O grau geral de parasitemia foi baixo, tendo-se encontrado 7 canídeos com apenas 1 parasita por lâmina e um canídeo com 3 formas parasitárias no mesmo esfregaço. Dois cães apresentaram parasitémias moderadas a elevadas, um com 17 formas parasitárias e outro com 24 formas parasitárias por lâmina. Os animais parasitados pertenciam ao concelho de Vimioso e Carrazeda de Ansiães, verificando-se coabitação em 7 dos casos e todos eles apresentaram como aptidão a caça. Apenas um canídeo, pertencente ao concelho de Carrazeda de Ansiães, apresentou sintomatologia compatível com doença, nomeadamente linfoadenomegália, mas o seu esfregaço apresentou apenas uma forma parasitária. Todos os canídeos com formas parasitárias de *H. canis* apresentaram serologia positiva a outros agentes em estudo, embora em nenhum deles tenham sido identificados os microrganismos por PCR (ver Tabela 13).

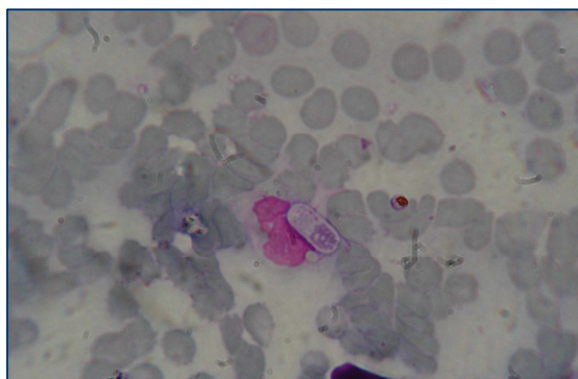


Fig. 21 – Gamonte de *H. canis* (Giemsa, 1000×)

Tabela 13 – Resultados diferenciados dos esfregaços de sangue periférico

<b>Canídeo</b>					
Localidade (Concelho)	Sexo	Raça Idade	Aptidão	Resultado IFI	Esfregaço
Vimioso	Fêmea	Indeterminada 5 anos	Caça	<i>R. conorii</i>	<i>H. canis</i>
Vimioso* <sup>1</sup>	Fêmea	Podengo 14 anos	Caça	<i>R. conorii</i>	<i>H. canis</i>
Vimioso* <sup>1</sup>	Fêmea	Podengo 2 anos	Caça	<i>R. conorii</i>	<i>H. canis</i>
Uva* <sup>2</sup> (Vm)	Fêmea	Podengo 11 anos	Caça	<i>A. phagocytophilum</i> <i>E. canis</i>	<i>H. canis</i>
Uva* <sup>2</sup> (Vm)	Macho	Indeterminada 3 anos	Caça	<i>R. conorii</i> <i>E. canis</i>	<i>H. canis</i>
Amedo* <sup>3</sup> (Ca)	Macho	Podengo 12 meses	Caça	<i>R. conorii</i> <i>A. phagocytophilum</i> <i>E. canis</i>	<i>H. canis</i>
Amedo* <sup>3</sup> (Ca)	Macho	Perdigueiro 3 anos	Caça	<i>A. phagocytophilum</i> <i>E. canis</i>	<i>H. canis</i>
Amedo* <sup>3</sup> (Ca)	Macho#	Indeterminada 3 anos	Caça	<i>A. phagocytophilum</i> <i>E. canis</i>	<i>H. canis</i>
Vila Flor	Macho	Podengo 2 anos	Caça	<i>R. conorii</i> <i>A. phagocytophilum</i> <i>E. canis</i> <i>B. burgdorferi</i> s.l.	<i>H. canis</i>
Carrazeda de Ansiães	Macho	Indeterminada 2 anos	Caça	<i>R. conorii</i> <i>A. phagocytophilum</i>	<i>H. canis</i>

Legenda: \*<sup>1</sup>: animais coabitantes entre si; \*<sup>2</sup>: animais coabitantes entre si; \*<sup>3</sup>: animais coabitantes entre si; #: animal com linfadenomegália; Vm: Vimioso; Ca: Carrazeda de Ansiães.

## 2.4 Serologia

### 2.4.1. Imunofluorescência indirecta

Os resultados serológicos dos agentes pesquisados por imunofluorescência indirecta (*A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi* s.l., *E. canis* e *R. conorii*) variaram consoante os concelhos em estudo (ver Tabela 14). Assim, para *A. phagocytophilum* (ver Fig. 22) o valor mais elevado de prevalência foi atingido no concelho de Carrazeda de Ansiães com 32% e o mais baixo em Bragança com 2,1%, com uma prevalência global de  $17,6\% \pm 0,045$ . Para o agente da borreliose de Lyme (ver Fig. 23), foram atingidos valores que oscilaram entre o máximo de 25,3% no concelho de Bragança e o mínimo de 5,2% no concelho de Vinhais, num total de  $12,7\% \pm 0,039$ . Para *E. canis* (ver Fig. 24), os valores das seroprevalências variaram entre o máximo de 33% no concelho de Vimioso e o mínimo de 1,3% no concelho de Vinhais, num total de  $14,8\% \pm 0,034$ . Em relação ao agente da febre botonosa (ver Fig. 25) o valor máximo alcançado foi de 69,5% no concelho de Bragança e o mínimo de 35% no concelho de Miranda do Douro, perfazendo um total de  $55,3\% \pm 0,059$ , na globalidade dos concelhos visados.

Na maioria dos casos, os resultados foram mistos, isto é, o mesmo canídeo apresentou anticorpos para mais que um agente em estudo. Em apenas 10 canídeos obteve-se um resultado serológico único para *A. phagocytophilum*, em 14 casos obteve-se um resultado exclusivo para *B. burgdorferi* s.l., em nove cães obteve-se unicamente o resultado positivo para *E. canis* e 124 cães surgiram exclusivamente como seropositivos a *R. conorii*. Um canídeo, morador no concelho de Carrazeda de Ansiães, apresentou seropositividade a todos os agentes em estudo. No estudo serológico das doenças conhecidas por partilharem o mesmo vector, houve apenas um cão que apresentou serologia positiva conjunta para *A.*

*phagocytophilum*, *B. burgdorferi* s.l. e *F. tularensis* enquanto 50 animais apresentaram um resultado positivo conjunto para *R. conorii* e *E. canis*.

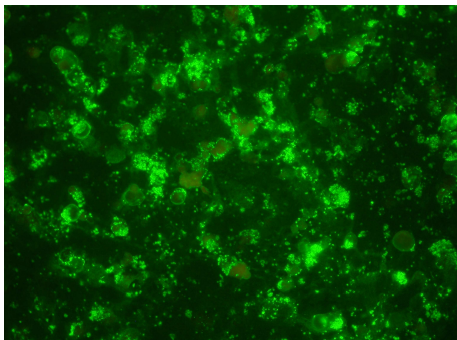


Fig. 22 – IFI positiva a *A. phagocytophilum* (400×)

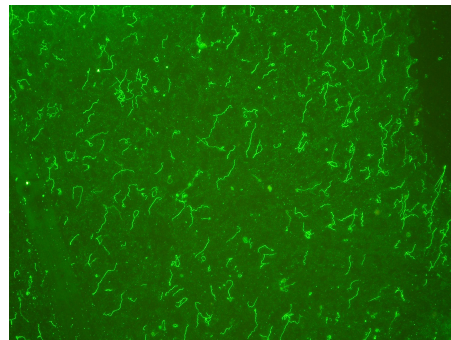


Fig. 23 – IFI positiva a *B. burgdorferi* s.l. (400×)

Tabela 14 - Valores das prevalências serológicas dos agentes em estudo

Agente em estudo	Vinhais n(%)	Bragança n(%)	Vimioso n(%)	Miranda		Total n(%)
				do Douro n(%)	Carrazeda de Ansiães n(%)	
<i>A. phagocytophilum</i>	13/78 (16,6%)	2/95 (2,10%)	27/100 (27%)	9/100 (9%)	32/100 (32%)	83/473 (17,6%±0,045)
<i>B. burgdorferi</i> s.l.	4/78 (5,1%)	24/95 (25,30%)	9/100 (9%)	6/100 (6%)	17/100 (17%)	60/473 (12,7%±0,039)
<i>E. canis</i>	1/78 (1,3%)	2/95 (2,10%)	33/100 (33%)	6/100 (6%)	28/100 (28%)	70/473 (14,8%±0,042)
<i>F. tularensis</i>	0/78 (0%)	0/95 (0%)	3/100 (3%)	6/100 (6%)	3/100 (3%)	12/473 (2,5%±0,019)
<i>R. conorii</i>	53/78 (67,9%)	66/95 (69,5%)	64/100 (64%)	35/100 (35%)	43/100 (43%)	261/473 (55,3%±0,059)

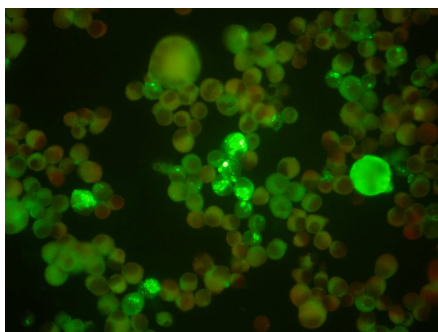


Fig. 24– IFI positiva a *E. canis* (400×)

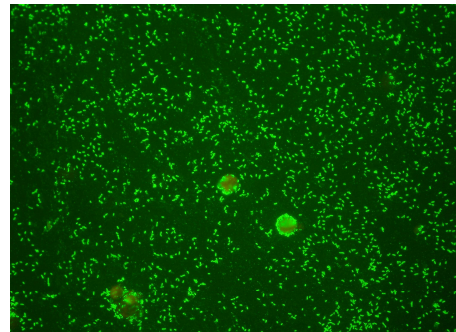


Fig. 25– IFI positiva a *R. conorii* (400×)

### 2.4.2 Aglutinação em placa

Dos 473 soros analisados pela técnica de aglutinação em placa para a pesquisa de anticorpos anti-*F. tularensis*, foram detectados pela primeira vez em Portugal, anticorpos na titulação de 1:40, nos canídeos dos concelhos de Vimioso, Miranda do Douro e Carrazeda de Ansiães num total de 12 animais ( $2,5\% \pm 0,019$ ), tendo sido o concelho de Miranda do Douro aquele que apresentou maior número de animais seropositivos (seis) (ver Fig. 26 e Tabela 14). Dos 12 canídeos reactivos, sete apresentaram como resultado único a reactividade perante o antigénio de *F. tularensis*, enquanto os restantes cinco animais também apresentaram resultados positivos para outros agentes em estudo, nomeadamente para *B. burgdorferi* s.l (2/12), *R. conorii* (4/12) e *E. canis* (2/12). Um canídeo, morador no concelho de Carrazeda de Ansiães, apresentou uma resposta serológica positiva a todos os agentes em estudo.

Não foram detectados quaisquer reacções de aglutinação na diluição de 1:80.

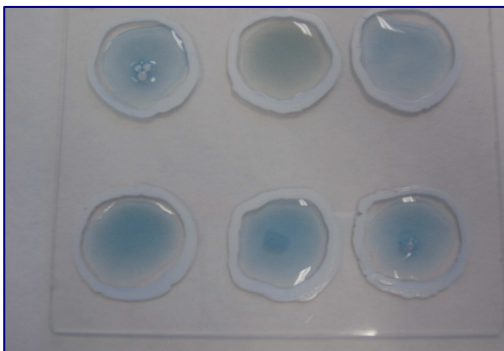


Fig. 26– Reacção positiva de aglutinação para *F. tularensis* (canto superior esquerdo).

## 2.5 Biologia molecular

### 2.5.1 PCR

De acordo com os critérios atrás definidos, foram seleccionados para análise de PCR, um total de 44 canídeos, a que correspondeu um total de 171 reacções de PCR, uma vez que alguns canídeos foram testados para mais do que um agente, de acordo com os critérios atrás

definidos. Obteve-se um total de 13 reacções positivas, numa prevalência de infecção de 29,5% nos canídeos analisados e de 2,7% no total de cães estudados.

Para detecção do ADN de *A. phagocytophilum* foram analisados oito canídeos, mas não surgiram resultados positivos ao agente em estudo.

Em relação ao estudo do agente de borreliose de Lyme, foram analisados seis canídeos, tendo um deles apresentado uma banda na região indicada como pertencente a *B. burgdorferi* s.l. mas não de forma típica, pelo que se considerou como resultado negativo.

Para detecção de material genético de *E. canis* foi analisado o material genético de 10 canídeos, tendo quatro canídeos tido resultados compatíveis com a amplificação do ADN de *E. canis*, correspondente a 9,09% nos canídeos amostrados e 0,85% no total dos canídeos em estudo. Os cães residiam no concelho de Vimioso (um canídeo) e Carrazeda de Ansiães (três).

Após análise pelo método de PCR convencional, para detecção de *F. tularensis* em 12 sangues de canídeos detectaram-se bandas coincidentes com *F. tularensis* em um canídeo residente no concelho de Miranda do Douro, correspondente a 2,3% nos canídeos amostrados e 0,2% no total dos canídeos em estudo.

Para detecção do ADN de *R. conorii* foram analisados 26 amostras de sangue de canídeos, tendo surgido bandas típicas da bactéria em oito canídeos, correspondente a 18,2% nos canídeos amostrados e 1,7% no total dos canídeos em estudo. Os canídeos positivos pertenciam ao concelho de Vinhais, com quatro cães positivos em que três deles eram coabitantes, ao concelho de Bragança (um cão), ao concelho de Vimioso (dois cães) e ao concelho de Miranda do Douro (um cão).

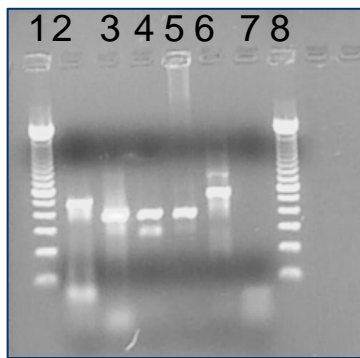


Fig. 27 - Gel de agarose com amplicons de ADN de *E. canis*, *R. conorii* e *A. phagocytophilum* amplificados por PCR (poço 1 e 8: marcador de bp; poço 2 controlo positivo para *E. canis*, poço 3: amostra positiva para *E. canis*, poço 4: controlo positivo para *R. conorii*, poço 5: amostra positiva para *R. conorii*, poço 6: controlo positivo para *A. phagocytophilum* e poço 7: amostra negativa para *A. phagocytophilum*).

### 2.5.2 Purificação e sequenciação dos produtos de PCR

Todos os resultados positivos acima mencionados foram posteriormente sujeitos a sequenciação do ADN, para confirmação da presença dos agentes em estudo. Todos os canídeos que revelaram a presença dos agentes em estudo apresentavam sinais clínicos (ver Tabela 15).

A sequenciação de quatro amostras positivas por PCR para segmentos de ADN de *E. canis*, permitiu, em todos os casos, a confirmação da presença da bactéria, nos quatro canídeos. Dois dos animais que se apresentaram infectados com *E. canis* estavam parasitados por ixodídeos, que vieram a revelar-se estarem infectados com *E. canis* (ver Tabela 15).

Foi sequenciada a amostra de um canídeo que tinha revelado bandas de amplicons compatíveis com *F. tularensis*, mas não foi confirmado o resultado positivo.

Para *R. conorii*, a sequenciação permitiu a confirmação do género *Rickettsia* sp. em sete canídeos estudados, não tendo sido possível determinar a espécie presente. Um dos animais que se apresentou infectado com *Rickettsia* sp. estava parasitado por um ixodídeo, que veio a revelar-se estar infectado com *R. bar29* (ver Tabela 15).

Tabela 15- Resultados das sequenciações dos ADN microbianos detectados nos canídeos em estudo

Localidade (Concelho)	Sexo	Raça Idade	Sinais clínicos	Resultado IFI	Resultado da sequenc.
Agrochão (Vinhais)* <sup>1</sup>	F	Indeterminada 1 ano	Anemia e petéquias	<i>R. conorii</i>	<i>Rickettsia</i> sp.
Agrochão# <sup>1</sup> (Vinhais)* <sup>1</sup>	M	Indeterminada 5 anos	Linf. e petéquias	<i>R. conorii</i>	<i>Rickettsia</i> sp.
Agrochão (Vinhais)* <sup>1</sup>	F	Indeterminada 3 anos	Linf.	<i>R. conorii</i>	<i>Rickettsia</i> sp.
Vinhais	M	Labrador 8 anos	Caquexia	<i>R. conorii</i> <i>A. phagocytophilum</i>	<i>Rickettsia</i> sp.
Uva (Vimioso)	F	Podengo 4 anos	Caquexia	<i>R. conorii</i>	<i>Rickettsia</i> sp.
Vimioso# <sup>2</sup>	M	Indeterminada 2 anos	Linf., alopecia e caquexia	<i>R. conorii</i> <i>E. canis</i>	<i>Rickettsia</i> sp. e <i>E. canis</i>
Póvoa (Mi)	M	Podengo 3 anos	Linf. e caquexia	<i>R. conorii</i>	<i>Rickettsia</i> sp.
Amedo# <sup>2</sup> (Ca)	M	Podengo 18 meses	Linf.	<i>R. conorii</i> <i>E. canis</i> <i>A. phagocytophilum</i>	<i>E. canis</i>
Vilas Boas (Ca)* <sup>2</sup>	M	Podengo 10 anos	Linf. e DAAP	<i>E. canis</i> <i>A. phagocytophilum</i>	<i>E. canis</i>
Vilas Boas (Ca)* <sup>2</sup>	M	Podengo 12 anos	Linf. e alopecia	<i>R. conorii</i> <i>E. canis</i> <i>A. phagocytophilum</i>	<i>E. canis</i>

Legenda: #<sup>1</sup>: ixodídeo com *R. bar29*; #<sup>2</sup>: ixodídeo com *E. canis*; \*<sup>1</sup>: canídeos coabitantes entre si; \*<sup>2</sup>: canídeos coabitantes entre si; M: macho, F: fêmea; DAAP: dermatite alérgica à picada da pulga; Mi: Miranda do Douro; Ca: Carrazeda de Ansiães; Linf.: linfadenomegalia; sequenc.: sequenciação.

## 2.6 Comparação dos resultados obtidos por PCR com os obtidos por esfregaço de sangue periférico dos canídeos

Os canídeos que revelaram resultados positivos ao PCR para *E. canis*, posteriormente confirmados por sequenciação, foram sujeitos a nova observação microscópica dos esfregaços de sangue correspondentes para detecção de possíveis mórulas nos monócitos. Em apenas um caso foram registadas formas suspeitas no interior de um monócito (ver Fig. 28).

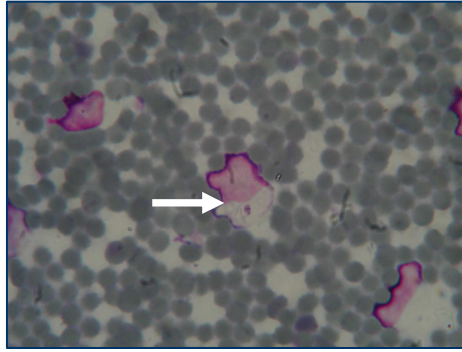


Fig. 28 – Formação tipo mórula (seta branca) no interior de um monócito (Giemsa, 1000×)

## 2.7 Resultados estatísticos

Através do teste estatístico do qui-quadrado investigou-se a associação estatística entre a seropositividade para as doenças em estudo e diversos possíveis factores de risco, atrás descritos. Utilizou-se o valor de  $p < 0,05$  como valor significativo. Sempre que houve violação do fundamento do qui-quadrado, foi utilizado o teste Fisher ou a sua generalização para tabelas de maior dimensão (ver Tabela 16).

Os resultados estatísticos permitiram demonstrar, no caso da anaplasmoose granulocítica canina, a presença de uma associação entre o concelho de Carrazeda de Ansiães e a seropositividade à doença e entre os cães de raça Podengo Nacional, de pelagem curta, aptidão caça, com acesso sazonal ao exterior, com acesso a lagomorfos silvestres, e javalis, sem acesso a raposas e em canídeos que não fazem profilaxia para ixodídeos.

No caso da borreliose de Lyme canina, foi demonstrada a associação entre o concelho de Bragança e a seropositividade à doença e entre os cães de residência sub-urbana, com acesso a javalis, sem acesso a cervídeos, sem contacto fronteiriço e que não fazem profilaxia para ectoparasitas.

Em relação à ehrlichiose monocítica canina, o concelho de Vimioso demonstrou estar associado à seropositividade da doença, bem como os canídeos de raça Podengo Nacional, de

pelagem curta, de caça, com acesso a javali e aves, mas sem contacto com raposas e que apresentam ixodídeos a parasitá-los.

No caso da febre botonosa canina, foi demonstrada a associação estatística entre o conelho de Vinhais e a seropositividade da doença, bem como os canídeos de raça indeterminada, de idade superior a 2 anos, de aptidão guarda, com acesso diário ao exterior e sem contacto com cervídeos.

Para a hepatozoonose canina os conelhos de Vimioso e Carrazeda de Ansiães ficaram demonstrados como estando associados estatisticamente à presença do parasita nos canídeos.

Para a tularémia canina, estabeleceu-se uma associação estatística entre o conelho de Miranda do Douro e entre os canídeos da raça Podengo Nacional, com acesso a peças de caça maior: cervídeos e javalis.

Tabela 16 - Resultados do teste de qui-quadrado e teste de Fisher entre as doenças em estudo e a dependência de factores

	AGC	BLC	EMC	FBC	HC	TC
Concelho	p<0,001 (Carrazeda de Ansiães)	p<0,001 (Bragança)	p<0,001 (Vimioso)	p<0,001 (Vinhais)	p<0,001* (Vimioso e Carrazeda de Ansiães)	p<0,001* (Miranda do Douro)
Raça	p=0,025 (podengo)	p=0,771	p=0,005 (podengo)	p=0,05 (indeterminada)	p=0,573*	p=0,039* (podengo)
Idade	p=0,545	p=0,987	p=0,215	p<0,001 (idade >2 anos)	p=0,607*	p=0,123*
Sexo	p=0,535	p=0,350	p=0,288	p=0,851	p=1*	p=0,692
Pelagem	p=0,015* (curta)	p=0,565*	p=0,003* (curta)	p=0,503	p=1*	p=0,613
Aptidão	p<0,001* (caça)	p=0,059*	p<0,001* (caça)	p=0,015* (guarda)	P=0,5*	p=272*
Residência	p=0,545*	p=0,007* (sub-urbana)	p=0,546*	p=0,216*	p=1*	p=0,229*
Exterior	p<0,001* (acesso sazonal)	p=0,089*	p=0,235*	p=0,04* (diário)	p=0,817*	p=0,62*
Lagomorfos	p=0,001 (sim)	p=0,580	p=0,117	p=0,515	P=0,084	p=0,380
Javali	p=0,002 (sim)	p<0,001 (sim)	p=0,007 (sim)	p=0,091	p=0,163*	p=0,035* (sim)
Cervídeos	p=0,891	p=0,019 (não)	p=0,547	p=0,013 (não)	p=0,607*	p=0,029* (sim)
Aves	p=0,055	p=0,804*	p<0,001 (sim)	p=0,581	p=1*	p=0,611*
Raposas	p=0,048 (não)	p=0,584	p=0,002 (não)	p=0,180	p=0,367*	p=0,228
Espanha	p=0,175	p<0,001 (nunca)	p=0,439	p=0,087	p=0,743*	p=0,494*
Profilaxia	p=0,004 (não)	p<0,001 (não)	p=0,598	p=0,374	p=0,399*	p=1
Carraças	p=0,335	p=0,053	p=0,002 (sim)	p=0,419	p=0,139*	p=0,228*
Sinais clínicos	p=0,351	p=0,632	p=0,651	p=0,820	p=1*	p=0,339*

Legenda: \* - teste exacto de Fisher (generalizado); AGC.: anaplasmose granulocítica canina; BLC: borreliose de Lyme canina; EMC: ehrlichiose monocítica canina; FBC: febre botonosa canina; HC: hepatozoonose canina; TC: tularémia canina.

## V. Discussão

### 1. Ixodídeos

As espécies de ixodídeos recolhidas para a presente dissertação, já tinham sido identificadas, anteriormente, no distrito de Bragança como parasitas de canídeos<sup>(34,132,184)</sup>, comprovando-se a eficácia do cão doméstico enquanto hospedeiro das espécies recolhidas. Os concelhos de Vinhais e de Bragança foram os que apresentaram maior diversidade de espécies, factor que poderá estar relacionado com a heterogeneidade de relevos e climas (Terra Fria, Terra Quente e de Transição) destes concelhos, com mais presença em Vinhais<sup>γ</sup>. O facto de se ter recolhido maior número de parasitas em Carrazeda de Ansiães poderá ser explicado pelo clima (tipo Terra Quente) deste concelho ser mais propício ao desenvolvimento de *R. sanguineus*<sup>(73)</sup>, a espécie mais representada.

Os dados recolhidos nesta dissertação indicam como 14,1% o nível de infecção nos ixodídeos estudados por PCR, em relação ao total de artrópodes recolhidos, o que é cerca do dobro do valor anteriormente determinado de infecção em ixodídeos recolhidos no distrito de Setúbal (7,5%), com formas de *E. canis*, rickettsias e tripanossomas<sup>(80)</sup>.

Apesar de apenas 32,5% dos animais sintomáticos se apresentarem parasitados por ixodídeos, verificou-se que o critério “sintomatologia” foi útil no estudo por biologia molecular dos ixodídeos. Com efeito, dos ixodídeos colhidos de hospedeiros sintomáticos e posteriormente estudados por PCR, 63,6% (7/11) estavam-se infectados com alguns dos agentes em estudo.

No que concerne à espécie *D. marginatus* ficou comprovado o seu potencial enquanto vector da bactéria *R. slovaca*<sup>(9,213)</sup> que, entretanto, já foi também isolada a partir de *D. reticulatus* colhidos no Parque de Montesinho, no distrito de Bragança<sup>(184)</sup>. *R. slovaca*, é o agente etiológico da febre tibola, “tick-borne lymphadenopathy” ou linfadenopatia causada

pela picada da carraça<sup>(7)</sup>, não se conhecendo até ao momento casos clínicos humanos descritos em Portugal<sup>(190)</sup>. De igual forma, desconhece-se a implicação clínica desta bactéria nos canídeos, uma vez que o canídeo hospedeiro do ixodídeo vector se encontrava assintomático. Este canídeo, localizado no concelho de Vinhais, apresentou IFI positiva para *R. conorii*, conseqüente a um contacto anterior com a bactéria ou como resultado possível de uma reacção cruzada.

A percentagem de ixodídeos da espécie *I. ricinus* recolhidos foi de apenas 1,5%, o que se encontra em acordo com publicações anteriores que descrevem que as densidades do vector são relativamente baixas em Portugal<sup>(151)</sup>. Este é um factor importante uma vez que apesar da espécie ser um vector conhecido de algumas doenças em estudo nesta dissertação, não foi possível determinar a taxa de infecção, na mesma, da presença dos patogéneos *A. phagocytophilum* e *B. burgdorferi* s.l.

Tal como apresentado anteriormente, nos exemplares colhidos da espécie *R. sanguineus* verificou-se um predomínio de machos, o que poderá indiciar a transmissão de agentes patogéneos a vários hospedeiros enquanto a fêmea adulta realiza a ovopostura fora do hospedeiro<sup>(29)</sup>, ressaltando o seu potencial enquanto vector. Este potencial vector da espécie *R. sanguineus*, ficou comprovado ao identificar por PCR a infecção de exemplares com formas de *E. canis*, *R. conorii* e *R. bar29*, esta uma bactéria considerada não patogénica em humanos<sup>(10)</sup> e já isolada em *R. sanguineus* em Portugal<sup>(190)</sup>. Contudo, em canídeos fica por esclarecer a patogenia da bactéria, uma vez que num dos canídeos parasitado com *R. sanguineus* infectado com *R. bar29*, o mesmo apresentava linfadenomegália. Os resultados obtidos confirmam a ideia de que, numa determinada área geográfica várias espécies patogénicas distintas de Rickettsiae podem circular numa única espécie de ixodídeos<sup>(156)</sup>.

No presente trabalho obtiveram-se bandas coincidentes com a porção amplificada de *F. tularensis* em três ixodídeos machos de *D. reticulatus* e, pela primeira vez em Portugal, em quatro fêmeas de *I. hexagonus* e numa fêmea de *I. ricinus*. Estes oito ixodídeos positivos foram capturados nos concelhos de Vinhais e Bragança, representando 5,9% no total das capturas e 16,6% nos ixodídeos estudados por PCR e contabilizam 60% dos ixodídeos *D. reticulatus* recolhidos. Estes valores são superiores aos de um estudo recente, também efectuado no distrito de Bragança, que identificou a bactéria em apenas um ixodídeo *D. reticulatus*<sup>(56)</sup>, bem como a outros estudos europeus, nomeadamente um efectuado na Eslováquia que detectou em 1% dos ixodídeos *D. reticulatus* a espécie *F. tularensis*<sup>(66)</sup>. É também a primeira vez, em Portugal, que se identifica por sequenciação *Francisella* endosymbiont de *D. variabilis*. Os endosimbiontes de *Francisella* já foram identificados em várias espécies do género *Dermacentor*, mas até ao momento, não foi encontrada bibliografia descrevendo a presença deste tipo de bactérias em *D. reticulatus*. Alguns autores afirmam a necessidade de se avaliar cuidadosamente os resultados de PCR, quando se testam ixodídeos para *F. tularensis*, dada a possibilidade de reacções cruzadas entre a bactéria e os possíveis endosimbiontes presentes nas espécies de ixodídeos conhecidas como vectores de *F. tularensis*<sup>(120)</sup>. Como alternativa recomendam o uso de um PCR tipo “real time” com alvos múltiplos, direccionado para a sequência de inserção IS*Ftu2*, para o gene *tul4*, que codifica uma proteína membranária externa, e para o gene *iglC*, expresso após a infecção de macrófagos<sup>(120)</sup>. A identificação de *F. tularensis* necessitará que todos os três ADN alvo tenham resposta positiva<sup>(120)</sup>.

A prevalência de infecção por *E. canis* foi de 2,2% no total de ixodídeos colhidos e de 6,2% dos ixodídeos analisados por PCR. Este valor é superior ao valor de infecção (2,2%) determinado em ixodídeos analisados por PCR, recolhidos na região do Algarve<sup>(2)</sup>.

A prevalência de infecção por *R. conorii* na amostra de 48 ixodídeos analisados por PCR foi de 16,6% e 5,9% no total dos artrópodes colhidos. O valor de 16,6% aproxima-se do valor 22,2% obtido em ixodídeos da região do Algarve, embora se tenha considerado que este último possa não corresponder a infecção por *R. conorii* na sua totalidade, uma vez que só foi possível confirmar a presença do ADN do género *Rickettsia* e não a espécie presente<sup>(2)</sup>. Pelo contrário, na presente dissertação, a sequenciação comprovou num ixodídeo a infecção por *R. conorii* e nos restantes a presença de *R. slovaca* e *R. bar29*. Os dados obtidos confirmam que a espécie *R. conorii* não é a espécie predominante em *R. sanguineus* em Portugal, como já foi anteriormente descrito<sup>(9)</sup>.

Os ixodídeos podem estar infectados por múltiplos patógenos, pelo que existe a hipótese considerável de ocorrer a transmissão simultânea de vários organismos numa única picada<sup>(47)</sup>. Esta hipótese não foi comprovada no presente trabalho, uma vez que todos os ixodídeos que foram testados e que se encontravam infectados, apresentaram um único agente.

## **2. Canídeos**

Os valores calculados como mínimos para a amostragem significativa definida, não foram atingidos nos concelhos de Vinhais (78 animais em lugar 96) e de Bragança (95 cães amostrados em vez de 97).

No diagnóstico serológico, por IFI, utilizou-se como limite de positividade, o valor de 1:128 como “cut-off”, de modo a poder estabelecer comparações fundamentadas, uma vez que o mesmo já se encontrava descrito como diagnóstico em canídeos em Portugal<sup>(2,151)</sup>.

Na maioria dos casos, os resultados serológicos foram mistos, ou seja, um canídeo apresentou resultados positivos para mais de um agente em estudo, indicando o contacto com

mais de um patógeno e evidenciando, desta forma, o potencial dos vectores na região de Trás-os-Montes.

Os diferentes concelhos estudados revelaram diferenças estatísticas significativas, entre o factor seropositividade e o factor residência num determinado concelho, inclusive com diferenças entre doenças que partilham o mesmo vector como é o caso do vector *R. sanguineus*, comum aos agentes *E. canis*, *H. canis* e *R. conorii*. Verificou-se estatisticamente que, consoante o concelho em que os canídeos se localizam maior será o risco para o desenvolvimento das doenças supracitadas. Assim, o facto dos canídeos residirem no concelho de Vinhais será um factor de risco para o contacto com *R. conorii*, o concelho de Bragança representa um factor de risco para o contacto com *B. burgdorferi* s.l., o concelho de Vimioso é um factor de risco para o contacto com *E. canis* e *H. canis*, a moradia no concelho de Miranda do Douro aumenta o risco de contacto com *F. tularensis* e o concelho de Carrazeda de Ansiães para o contacto com *A. phagocytophilum* e *H. canis*. De realçar que os canídeos errantes, pela possibilidade de terem acesso a diferentes concelhos podem estar sujeitos a contactos múltiplos e, desta forma, terem factores de risco acrescidos.

Também a raça dos animais se revelou estatisticamente associada à seropositividade de algumas doenças verificando-se a associação estatística entre a raça Podengo Nacional e a seropositividade a *A. phagocytophilum*, *F. tularensis* e *E. canis* e a raça indeterminada para o contacto com *R. conorii*. Nas três primeiras doenças, a utilização dos cães de raça Podengo Nacional é, quase exclusivamente, para caça, factor também identificado nestas doenças, como de risco. Na actividade da caça, os canídeos percorrem áreas extensas e variadas, o que se traduzirá numa maior hipótese de serem parasitados<sup>(145)</sup>. No caso da febre botonosa canina a raça indeterminada, enquanto factor de risco, está associada à aptidão de guarda, que proprietários parecem valorizar para esta raça. De facto, os animais deverão adquirir os

vectores no decorrer da sua acção de vigilância no exterior das habitações, durante a qual, se encontram geralmente presos, ficando assim expostos apenas aos ixodídeos de afinidade peri-urbana como é o caso do vector *R. sanguineus*.

## **2.1 Anaplasrose granulocítica canina**

É a primeira vez que se detectam, em Portugal, canídeos seropositivos a *A. phagocytophilum*, os quais, apesar de não terem apresentado resultados positivos ao PCR, são indicativos de contacto prévio com o agente. O valor determinado de 17,6% é próximo do obtido num estudo em Espanha, de 10,3%<sup>(195)</sup>. Fica por determinar o papel da bactéria nos quadros clínicos nos canídeos da região, uma vez que não se encontra instituído o diagnóstico clínico dirigido para este patogéneo.

Não foi possível determinar ADN nos ixodídeos conhecidos como vectores desta zoonose, facto para o qual poderá ter contribuído o reduzido número de *Ixodes* sp. recolhidos dos canídeos. Serão necessários mais estudos para determinar as prevalências de infecção nos ixodídeos e, desta forma, identificar possíveis situações de risco tanto para os canídeos como para os humanos, de modo a estabelecer medidas profiláticas.

No presente estudo, os resultados estatísticos permitiram demonstrar, no caso da anaplasrose granulocítica canina, a presença de uma associação entre a seropositividade à doença e o facto dos canídeos residirem no concelho de Carrazeda de Ansiães, pertencerem à raça Podengo Nacional, de pelagem curta, aptidão caça, com acesso sazonal ao exterior, com acesso a lagomorfos silvestres e javalis, sem acesso a raposas e em canídeos que não fazem profilaxia para ixodídeos. Dos factores de risco determinados num estudo anterior (a raça pura, a idade de 8 anos e o sexo feminino), os resultados presentes permitiram apenas confirmar a predisposição da raça pura Podengo Nacional, como factor de risco.

A pelagem curta poderá ser um factor de risco uma vez que os ixodídeos conseguem penetrar mais facilmente na pele dos canídeos. A bactéria *A. phagocytophilum* poderá ser mantida preferencialmente num ciclo mais silvestre<sup>(180)</sup>, com os hospedeiros javalis e lagomorfos que, ao terem contacto com os cães de caça, poderão permitir a exposição dos mesmos aos vectores e seus biótopos. Também o facto dos cães de caça partilharem, aquando das épocas venatórias, os mesmos habitats dos animais acima referidos poderá ser outra explicação como factor de risco. O facto dos cães seropositivos não contactarem com raposas poderá ser explicado pela preferência do próprio vector. Com efeito, em Portugal, o vector *I. ricinus* habitualmente parasita raposas<sup>(150)</sup> e não canídeos, o que poderá representar uma preferência pelos canídeos silvestres em detrimento dos canídeos domésticos. Ficou também demonstrado estatisticamente que a ausência de acções profiláticas é um factor de risco para o contacto com os vectores realçando, desta forma, a importância da prevenção através do uso regular de acaricidas.

## **2.2 Babesiose canina**

O facto de não terem sido alcançados resultados positivos para *B. canis*, neste estudo, poderá ser explicado por nenhum dos animais estar infectado com o piroplasma. No entanto, face à existência de registos do protozoário na região<sup>(131,132)</sup>, os canídeos poderiam estar infectados mas não se encontrar numa fase febril, período em que as inclusões intraeritrocitárias de *Babesia* são facilmente encontradas<sup>(53)</sup>. Está também descrito que a microscopia óptica pode subestimar a infecção por *B. canis*<sup>(24)</sup>. Para além disso, o facto dos canídeos não demonstrarem sintomatologia poderá estar de acordo com um curso crónico ou subclínico da doença, em que poderá não ser possível obter a confirmação parasitológica<sup>(53)</sup>. É também possível que os canídeos pudessem estar parasitados com piroplasmas mais pequenos

(como a *B. gibsoni* ou a nova espécie *Theileria annae*) e tal não ter sido identificado<sup>(36)</sup>. O facto de apenas ter sido realizado um esfregaço por animal também pode ter contribuído para uma menor especificidade<sup>(46)</sup>. De igual modo, também em estudos anteriores, em canídeos portugueses, se verificou ausência de parasitismo detectado à microscopia por *B. canis*<sup>(191)</sup>.

O recurso a outros métodos diagnósticos adicionais como a IFI seria útil para a identificação de cães infectados cronicamente que apresentam poucos, se alguns, parasitas detectáveis no sangue<sup>(223)</sup>. Além disso, seria uma forma de avaliar as sensibilidades e especificidades dos diferentes métodos face aos canídeos em questão. Contudo, o objectivo proposto, neste caso, apenas se baseava na identificação microscópica dos hemoparasitas em esfregaços sanguíneos e não a seroprevalência, pelo que a mesma não foi realizada.

### **2.3 Borreliose de Lyme canina**

Tal como em estudos anteriores efectuados em canídeos portugueses, também nesta dissertação foi possível determinar canídeos seroprevalentes a *B. burgdorferi* s.l.<sup>(2,151)</sup>, não sendo possível avaliar a taxa de infecção nos canídeos<sup>(2)</sup>. A seroprevalência obtida foi de 12,7%, valor diferente dos 2,25% determinados no Algarve<sup>(2)</sup> e de 9% no distrito de Setúbal<sup>(151)</sup>, mas que se aproxima do valor de 11,6% em cães espanhóis<sup>(145)</sup>. Contudo, neste último estudo o valor de “cut-off” utilizado foi de 1:64, ao contrário do valor 1:128 utilizado nos estudos portugueses supracitados e no presente trabalho. Como explicação da discrepância de valores será o facto dos biótopos transmontanos serem mais adequados à sobrevivência e reprodução dos artrópodes vectores, favorecendo desta forma a infecção. Outra possível explicação poderá ser a presença de falsos positivos à serologia através da presença de reacções cruzadas com antigénios de outras bactérias, como o género *Treponema* da doença periodontal canina<sup>(212)</sup>.

Uma vez que o vector é comum, para além da borreliose de Lyme poderão existir infecções mistas por outros patogéneos, como *A. phagocytophilum*<sup>(109)</sup>. Esta possibilidade confirmou-se, na presente dissertação, uma vez que 11,7% (7/60) dos resultados serológicos positivos para *B. burgdorferi* s.l. revelaram serologia positiva para *A. phagocytophilum* e em apenas 23,3% (14/60) o resultado serológico para borreliose de Lyme foi o único alcançado para o canídeo em questão. No entanto, não é possível diferenciar se um canídeo com serologia positiva para mais do que um agente, contactou com esses patogéneos através da picada de um único vector, ou se foi sendo alvo de infecções seriadas ao longo do tempo. Esta última hipótese parece mais provável, uma vez que dos resultados serológicos positivos para *B. burgdorferi* s.l., 55% (33/60) dos canídeos apresentaram também seroreactividade para *R. conorii*, agente conhecido por ter um vector distinto da borreliose de Lyme.

Estudos anteriores indicaram como factores de risco, para borreliose de Lyme em cães, a idade superior a 1 ano, a permanência prolongada no exterior em actividades como a caça e o pastoreio, em contraste com os cães de companhia que, por terem menos acesso ao exterior, seriam menos susceptíveis à infecção<sup>(2,95,145)</sup>. Na presente dissertação, estes pressupostos não foram confirmados, tendo sido estabelecida uma associação estatística entre a seropositividade à doença e o concelho de Bragança, entre os cães de residência sub-urbana, com acesso a javalis, sem acesso a cervídeos, sem contacto fronteiriço e que não fazem profilaxia para ectoparasitas.

Tal como no caso da anaplasnose granulocítica canina, também aqui o factor de risco associado ao contacto com javalis, poderá ser pelo acesso aos seus ixodídeos e aos seus biótopos. De facto, uma vez que, em Portugal, entre os hospedeiros habituais de *I. ricinus* se encontra o javali<sup>(150)</sup>, o contacto favorecido com estes animais, no caso dos cães de caça, aumentará o risco de contraírem os vectores. A ausência de contacto com cervídeos, associado

à seroprevalência, poderá ser explicado pelo facto dos ixodídeos vectores *I. ricinus*, na sua forma adulta, poderem parasitar preferencialmente estes animais em detrimento dos canídeos domésticos<sup>(73)</sup>. Desta forma, os canídeos que não contactem com cervídeos poderão ser mais facilmente parasitados pelos vectores, ao contrário do que poderia suceder quando em presença destes ruminantes silvestres. Verificou-se, também, que a ausência de acções profiláticas é um factor de risco para o contacto com os vectores, realçando, novamente, a importância da prevenção através do uso regular de acaricidas.

Aparentemente, a ausência de contacto dos canídeos com a fronteira parece indicar uma predisposição para o contacto com o agente e o vector, factor possivelmente explicado por uma menor proliferação da população de vectores junto à fronteira espanhola. Tal facto terá de ser comprovado por estudos futuros.

Em relação aos canídeos que se encontram em áreas sub-urbanas terem predisposição para o contacto com *B. burgdorferi* s.l., tal poderá explicar-se, pelo facto dos cães infectados com *B. burgdorferi* s.l., poderem potencialmente introduzir vectores infectados em áreas que não são consideradas, tradicionalmente, como seus biótopos, como os jardins e quintais, potenciando, desta forma, o contacto dos artrópodes com novos hospedeiros canídeos<sup>(135)</sup>.

## **2.4 Ehrlichiose canina**

Em relação ao estudo de *E. canis*, obteve-se uma seroprevalência de 14,8%, a qual difere do valor de 5,25% em canídeos algarvios<sup>(2)</sup>, e de 44,26% em canídeos errantes do concelho de Setúbal<sup>(191)</sup>, estando mais aproximado das prevalências anteriormente determinadas em Israel, de 17,6%<sup>(17)</sup>, e no Nordeste espanhol, de 16,7%<sup>(195)</sup>. Contudo, nos estudos de Setúbal, Israel e Espanha, os valores de “cut-off” foram de 1:64, 1:20 e 1:64, respectivamente, enquanto, o valor de “cut-off” utilizado na presente dissertação e no estudo

algarvio foi de 1:128. Assim, a disparidade dos valores destes dois últimos traduzirá uma diferença real na epidemiologia da doença entre as diferentes regiões portuguesas.

Tal como anteriormente referido os canídeos na fase subclínica apresentam-se assintomáticos, sem sinais exteriores de doença<sup>(102)</sup>, o que foi comprovado com este estudo, onde a maioria dos 70 canídeos seropositivos a *E. canis*, se mostrou assintomática, e aqueles que apresentaram como sinal clínico a linfadenomegália vieram a confirmar a presença da bactéria por sequenciação, o que pressupõe uma resposta clínica à presença do microrganismo. A presença de ADN de *E. canis* no sangue dos canídeos na fase subclínica da ehrlichiose monocítica canina indica que o mesmo pode ser infeccioso, confirmando o cão como reservatório<sup>(102)</sup>. De facto, houve um caso em que surgiu um resultado simultâneo de positividade a *E. canis* no canídeo e no ixodídeo colhido, levando a pressupor uma infecção pelo vector capturado ou a infecção do vector através do canídeo, pelo seu potencial reservatório.

Um dos canídeos estudados revelou estar co-infectado por *Rickettsia* sp. e *E. canis*, o que pode ter exacerbado a sua sintomatologia, uma vez que se encontrava magro, com diminuição progressiva da sua condição geral, alopecia e linfadenomegália, sinais compatíveis com a fase crónica de ehrlichiose monocítica canina<sup>(57)</sup>. Já anteriormente foi estabelecida uma relação entre a detecção de anticorpos de *R. conorii* e *E. canis*<sup>(8)</sup>, a qual também foi confirmada no presente estudo. Esta constatação não é surpreendente uma vez que ambos os patógenos são transmitidos pelo mesmo vector<sup>(195)</sup>.

Os canídeos estudados no concelho de Vinhais não apresentaram serologia positiva para *E. canis* e houve apenas um caso positivo no concelho de Bragança, tendo nos restantes concelhos em estudo surgido os valores positivos, o que indicará a ausência de infecção nos ixodídeos dos concelhos de Vinhais e Bragança.

O facto de apenas num esfregaço de sangue periférico, em canídeos confirmados como tendo ADN de *E. canis*, ter sido possível detectar formas suspeitas de mórulas no interior de um monócito, prende-se com a sensibilidade da técnica utilizada. De facto, o esfregaço realizado foi de sangue periférico e não de “buffy coat” como é aconselhado pela maior concentração dos leucócitos o que contribui para a menor sensibilidade da microscopia em relação ao PCR. De igual modo, anteriores estudos serológicos em canídeos, também obtiveram resultados negativos à microscopia óptica<sup>(8,191)</sup>.

Em termos de associações estatísticas em relação à ehrlichiose monocítica canina, o conelho de Vimioso demonstrou estar associado à seropositividade da doença, bem como os canídeos de raça Podengo Nacional, de pelagem curta, de caça, com acesso a javali e aves, mas sem contacto com raposas e que apresentam ixodídeos a parasitá-los.

Tal como no caso da anaplasmoze granulocítica canina, a pelagem curta poderá ser um factor de risco para o contacto com *E. canis*, uma vez que os ixodídeos conseguem penetrar mais facilmente na pele e desta forma, mantém-se mais facilmente no hospedeiro. O facto dos cães de caça estarem em situação de risco vem confirmar os dados anteriormente descritos na região do Algarve<sup>(2)</sup> associado a um maior contacto com os vectores e seus biótopos, provavelmente através do contacto favorecido com javalis e aves, num possível ciclo silvático de manutenção de *E. canis*<sup>(2)</sup>. O facto dos canídeos que se apresentaram seropositivos, preferencialmente, não terem tido acesso a raposas poderá ser explicado pelo facto dos ixodídeos poderem parasitar preferencialmente estes canídeos silvestres em detrimento da presença dos canídeos domésticos. Também a associação estatística entre a presença de ixodídeos a parasitar os canídeos e a seropositividade para ehrlichiose monocítica canina, evidencia a importância da vigilância por parte dos proprietários, para os seus canídeos, como

parte da estratégia de prevenção e profilaxia para evitar as doenças associadas a vectores. Este factor de risco já foi identificado num estudo prévio<sup>(2)</sup>.

## **2.5 Febre botonosa canina**

O valor de seroprevalência determinado na presente tese é de 55,3%, distinto de 38,5% determinado num estudo epidemiológico em canídeos domésticos da região do Algarve<sup>(2)</sup>. O distrito de Bragança é considerado um foco natural de *R. conorii* dada a elevada prevalência de febre botonosa na população humana, enquanto que a região do Algarve apresenta valores inferiores de prevalência<sup>(64)</sup>. Assim, de acordo com alguns autores que afirmam existir uma correlação directa entre a prevalência de anticorpos para *R. conorii* em cães e a prevalência de infecção no Homem<sup>(115)</sup>, é possível concluir através deste estudo, que o cão poderá ser utilizado como animal sentinela para a febre botonosa em Portugal. As diferenças nas prevalências encontradas noutras regiões de Portugal Continental prender-se-ão com a distribuição geográfica do vector, o responsável principal pela disseminação do agente<sup>(163)</sup>.

A febre botonosa não está instituída como entidade clínica em canídeos, mas os presentes resultados levantam a questão da real patogenezidade da bactéria nos canídeos domésticos, tal como já descrito<sup>(2,194,195)</sup>. De facto, os canídeos que revelaram estar infectados com a bactéria mostraram sinais clínicos como a anemia, petéquias, linfadenomegália, caquexia e patologia concomitante como DAAP e alopecia. Fica por esclarecer se a sintomatologia demonstrada poderá ser devida à presença da bactéria ou a outra infecção concomitante, não diagnosticada.

No presente estudo, em termos de factores de risco, foi demonstrada a associação estatística entre o concelho de Vinhais e a seropositividade da doença, bem como os canídeos

de raça indeterminada, de idade superior a dois anos, de aptidão guarda, com acesso diário ao exterior e sem contacto com ruminantes silvestres.

O factor idade superior a dois anos encontra-se em acordo com factores de risco de seropositividade anteriormente determinados noutras regiões de Portugal, sendo possivelmente indicativo de uma maior exposição aos vectores e seus biótopos<sup>(2)</sup>. O facto dos canídeos de aptidão guarda, sem contacto com cervídeos, estarem mais susceptíveis de contactarem com o agente poderá prender-se com as características do ixodídeo vector *R. sanguineus*, uma espécie antropófila, que tem preferência pelos espaços peri-humanos e construções humanas<sup>(73)</sup>. Com efeito, os cães de guarda, não têm contacto com animais silvestres como os cervídeos, pois permanecem junto às casas de habitação dos seus proprietários, locais onde o vector prefere situar-se, não tendo contacto com animais silvestres como os cervídeos. O facto dos canídeos com acesso exterior diário estarem mais predispostos ao contacto com *R. conorii* será provavelmente pelo contacto favorecido com os vectores e seus habitats peri-urbanos. Os canídeos de aptidão guarda preenchem, mais uma vez, este requisito, pois a sua permanência no exterior é diária, estando, desta forma, mais sujeitos ao contacto dos vectores.

## 2.6 Hepatozoonose canina

Todos os casos de canídeos com gamontes de *H. canis* apresentaram serologia positiva para mais que um dos agentes de estudo, o que vem de acordo com estudos anteriores em que 65% dos canídeos seropositivos a *E. canis* apresentaram anticorpos a *H. canis*<sup>(147)</sup>.

A prevalência determinada (2,1%) está de acordo com dados anteriores (3%)<sup>(48)</sup>.

O facto dos canídeos com formas parasitárias terem sido assintomáticos coloca a questão da relativa não patogenicidade do agente, mesmo nos casos de maior parasitémia, já

anteriormente descrito<sup>(15)</sup>. Nesta dissertação, a forma moderada foi a apresentação mais comum, associada a um nível baixo de parasitémia (1-5%), mas mesmo as formas de maior parasitémia não se reflectiram em condição clínica, ao contrário do descrito por alguns autores<sup>(12)</sup>. Curiosamente, o único cão que apresentou um sinal clínico (a linfadenomegália) tinha um nível reduzido de parasitas (um gamonte), podendo o aumento de tamanho dos linfonodos superficiais, ser explicado por outra patologia em curso.

A baixa parasitémia encontrada pode indiciar um índice de infecção baixo, parasitémia intermitente ou infecção com o sequestro de parasitas na fase de meronte nas vísceras<sup>(147)</sup>. O facto de cães coabitantes apresentarem o parasita comprova a existência local do vector infectado, nomeadamente nos concelhos de Vimioso e Carrazeda de Ansiães. Tal poderá estar relacionado com as características geográficas e climáticas dos concelhos, que poderão favorecer a presença e disseminação dos vectores infectados. De facto, os concelhos de Vimioso e Carrazeda de Ansiães encontram-se associados estatisticamente à presença do parasita nos canídeos, pelo que deve ser um factor de risco a considerar pelos clínicos veterinários, nos diagnósticos diferenciais das doenças caninas associadas a vectores nos concelhos supracitados.

## **2.7 Tularémia canina**

É a primeira vez que se obtêm em Portugal, valores de seroprevalência de canídeos para tularémia comprovando o contacto dos cães com a doença, tal como foi também atestado pelo canídeo positivo ao PCR, o qual estaria infectado com a bactéria, mas não revelou sinais ao exame clínico, apesar de na sequenciação não ter sido possível identificar a *F. tularensis* como patogéneo. Para este facto poderá ter contribuído a quantidade reduzida de produto PCR utilizada para a sequenciação. Estes dados vêm ao encontro de um estudo recente que

identificou a bactéria no distrito de Bragança, num homem assintomático, tendo-se concluído que a doença apresenta uma baixa incidência em Portugal<sup>(56)</sup>.

O valor de 2,5% determinado de seroprevalência, é inferior aos 4,66% obtidos em Espanha, num estudo efectuado em raposas<sup>(19)</sup>. Ao contrário de em Espanha, que associa a tularémia num ciclo exclusivamente silvestre<sup>(19)</sup>, na região de Trás-os-Montes o ciclo poderá estar num âmbito mais doméstico.

O teste serológico utilizado na presente dissertação foi um teste de aglutinação de látex, em que se considera que títulos superiores a 1:20 são específicos e significativos<sup>(70)</sup>. Contudo, uma vez que a bibliografia não refere valores de “cut-off” para serologia em cães optou-se pelo valor 1:40, tendo sido obtidos 12 resultados positivos, mas uma vez testados a 1:80, não houve quaisquer soros reactivos, o que poderá indicar a presença de anticorpos específicos para *F. tularensis* e não a existência de reacções inespecíficas. Assim, o valor 1:40 terá sido específico, mas serão necessários estudos adicionais para comprovar esta afirmação.

Para a tularémia canina, estabeleceu-se uma associação estatística entre o concelho de Miranda do Douro e os canídeos da raça Podengo Nacional, com acesso às peças de caça maior: javalis e cervídeos.

Tal como referido para a anaplasmoze granulocítica canina, os cães de raça Podengo Nacional, são animais de aptidão de caça, que também são utilizados em matilhas, para caça a peças maiores como javalis e ruminantes silvestres. Estes, uma vez que não são alvo de profilaxias acaricidas, poderão estar frequentemente parasitados com ixodídeos vectores. De facto, os vectores de *F. tularensis*, como *D. marginatus* e *I. ricinus* encontram-se frequentemente a parasitar javalis e cervídeos, respectivamente<sup>(73)</sup>. Os animais de caça maior, estarão implicados, desta forma, na manutenção da população dos artrópodes vectores e possibilitam o seu contacto com os canídeos domésticos, em especial na época venatória.

## VI. Conclusões

Com a presente dissertação pretendeu-se contribuir globalmente para o estudo das doenças associadas a vectores nos canídeos domésticos em Portugal. Como os resultados demonstram, através da determinação, pela primeira vez em Portugal em soros de canídeos, de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* e anti-*F. tularensis*, os agentes estão presentes no território nacional. Em relação aos objectivos particulares traçados para a presente dissertação, os mesmos foram cumpridos, sendo possível obter várias conclusões dos mesmos. Assim,

1. Contribuição para a determinação da seroprevalência das zoonoses provocadas por ixodídeos em canídeos domésticos (*Canis familiaris*) no distrito de Bragança, nomeadamente os agentes da anaplasmose granulocítica canina, borreliose de Lyme, ehrlichiose monocítica canina, febre botonosa canina e tularémia canina.

Através dos resultados das serologias, foi determinado que 64,9% dos canídeos estudados apresentaram serologia positiva, pelo que se conclui que os vectores estão presentes e o contacto dos mesmos com os canídeos far-se-á de forma frequente dentro dos limites dos concelhos estudados. Face aos resultados serológicos conclui-se que todos os agentes em estudo (à excepção de *B. canis*) estão presentes e são frequentes nos canídeos domésticos do distrito de Bragança e os médicos veterinários clínicos deverão estar atentos às suas manifestações, tanto no distrito de Bragança como no restante território nacional, uma vez que os vectores e os próprios canídeos apresentam mobilidade, sendo doenças dinâmicas. Comparando os resultados obtidos em relação às seroprevalências das doenças em estudo, concluiu-se que a região de Trás-os-Montes apresenta valores superiores em relação a outras regiões do País, nomeadamente o Algarve e a Estremadura. Desta forma, as doenças em

estudo devem ser alvo de atenção reforçada tanto pelos médicos veterinários como pelos restantes agentes de Saúde Pública, na região transmontana.

2. Análise da possível associação entre as diferentes variáveis epidemiológicas e a seropositividade à doença.

Através da análise estatística dos resultados foi possível determinar diferentes factores de risco consoante as doenças em estudo, mantendo-se como factor comum de risco o local de residência, nomeadamente o concelho onde residem. O distrito de Bragança, nos concelhos estudados, como foi comprovado estatisticamente, estará numa situação privilegiada para favorecer o contacto dos canídeos com os agentes em estudo, facto importante para delinear estratégias futuras de prevenção das doenças nos canídeos e também de educação para os seus proprietários, uma vez que a maioria das doenças em estudo, trata-se de antropozoonoses. Também de um ponto de vista clínico, os médicos veterinários clínicos poderão ficar mais atentos aos possíveis quadros clínicos das doenças em estudo e desta forma, estabelecer como diagnósticos diferenciais as doenças associadas a vectores, sempre que tal se justifique, e proceder ao tratamento dos animais infectados para eliminar possíveis reservatórios. Esta informação será também benéfica, sempre que se pretender introduzir um canídeo, proveniente de outra região, no distrito de Bragança para alertar os proprietários para a importância da prevenção e profilaxia contra os vectores. De igual modo, a proveniência de canídeos do distrito deverá ser alvo de maior atenção clínica, uma vez que, consoante o concelho a que pertençam, estarão em maior situação de risco para o desenvolvimento de cada doença assinalada como de risco.

3. Identificação das espécies de ixodídeos que parasitam os canídeos da população em estudo e avaliação da prevalência de infecção dos artrópodes em amostra aleatória.

Conclui-se que, no distrito de Bragança, existem várias espécies de ixodídeos a parasitar os canídeos e que os mesmos encontram-se infectados com microrganismos patogénicos para os canídeos e para o Homem, constituindo um risco para a Saúde Pública.

Desta forma, a prevenção das doenças associadas a vectores, quer seja através do uso regular de fármacos insecticidas, através da vigilância constante dos animais, do uso profiláctico vacinal sempre que disponível ou, idealmente da conjugação de todas as estratégias enumeradas, será o método a privilegiar. Para tal, os proprietários dos animais deverão ser informados sobre os riscos que os seus canídeos e que eles próprios incorrem, uma vez que os cães trazem para a proximidade humana, os vectores de doenças, que na sua maioria são antropozoonoses.

4. Análise da possível associação da presença de ixodídeos e o desenvolvimento sintomático de doença na população em estudo.

Apenas 32,5% dos animais sintomáticos apresentaram-se parasitados por ixodídeos, mas concluiu-se que o critério “sintomatologia” foi útil no estudo por biologia molecular dos ixodídeos. Assim, dos ixodídeos estudados por PCR que foram colhidos de hospedeiros sintomáticos, a maioria estava infectada com alguns dos agentes em estudo, o que pressupõe que os sinais clínicos demonstrados tenham sido devidos à circulação dos agentes etiológicos detectados no hospedeiro.

Complementarmente, uma vez que os resultados serológicos nos canídeos foram congruentes com a distribuição dos ixodídeos vectores e com a incidência conhecida de doença humana na região conclui-se que os canídeos domésticos poderão ser utilizados como

parte do sistema de vigilância para a anaplasmose, borreliose de Lyme, febre botonosa e tularémia, para determinar o risco de contrair a doença em humanos assim como em canídeos. Estes, enquanto animais sentinela permitirão obter informações que poderão possibilitar o desenvolvimento de sistemas de prevenção e controlo para a população humana e canina.

5. Pesquisa de hemoparasitas não zoonóticos nos esfregaços de sangue periférico, *B. canis* e *H. canis*, uma vez que na prática clínica as infecções mistas são frequentes.

Concluiu-se, através dos resultados serológicos positivos simultâneos para mais do que um agente, e também no caso do diagnóstico de *H. canis*, em que se verificou que todos os animais que apresentavam formas de *H. canis* apresentaram resultados serológicos positivos para vários agentes em estudo, que os canídeos contactam com vários patogéneos ao longo do tempo, através dos vectores infectados.

## Direcções futuras

A análise dos resultados deverá permitir, futuramente, a implementação de medidas preventivas e de controlo da população de vectores, no seu ciclo silvestre e doméstico, que conjuntamente irão contribuir para a diminuição da prevalência destas zoonoses.

Contudo, face ao desconhecimento da real dimensão destas doenças nas restantes regiões do território nacional, torna-se premente a continuação dos estudos epidemiológicos, noutras regiões, para melhor caracterizar as doenças e os seus factores de risco nos canídeos em todo o território nacional.

Consequentemente aos resultados obtidos na presente dissertação, várias questões se levantaram, que implicarão futuras linhas de investigação, como:

1. Face aos resultados negativos da pesquisa de *B. canis* em esfregaço sanguíneo periférico, mas dado haver registos clínicos de babesiose canina no distrito de Bragança, será um possível rumo de investigação futuro a testagem serológica dos canídeos, por IFI e/ou ELISA e nos ixodídeos o uso das técnicas de biologia molecular para identificar a presença do piroplasma na região e avaliar a extensão do contacto do agente nos canídeos da região.

2. Face à descoberta de novas espécies de parasitas nos canídeos, através da biologia molecular, no nordeste espanhol, será também uma linha de investigação futura a averiguação da existência de outras espécies como *T. annae* nos canídeos portugueses, uma vez que não existem registos nacionais da presença do piroplasma.

3. Dado que os resultados da presente dissertação indicaram a presença de *Francisella* endosymbiont de *D. variabilis*, serão necessários estudos adicionais nos vectores para confirmarem e esclarecerem estes resultados de PCR que, aparentemente, sugerem a presença de outros microrganismos semelhantes aos que foram alvo deste estudo.

4. Será necessária mais investigação clínica para averiguar se o eventual desenvolvimento clínico de doença, por *R. conorii*, no cão será devido a uma alteração metabólica ou imunológica, uma vez que há dados clínicos contraditórios<sup>(194)</sup>.

5. De igual forma, uma vez que se desconhece a implicação clínica da bactéria *R. slovaca*, nos canídeos, será necessária mais investigação para determinar qual o papel dos cães na epidemiologia da febre tifoide, tanto em medicina veterinária como em medicina humana.

6. Será igualmente uma fonte futura de investigação, a continuação da pesquisa de outras espécies ou estirpes de *Rickettsia*, como *R. bar29*, de modo a poder responder à questão da eventual capacidade patogénica da estirpe nos canídeos.

## VIII. Referências bibliográficas

1. **Aguirre, E., A. Sainz, S. Dunner, I. Amusatogui, L. López, F. Rodríguez-Franco, I. Luaces, O. Cortés, and M. A. Tesouro.** 2004. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. *Veterinary Parasitology* **125**:365-372.
2. **Alexandre, N. M. L.** 2005. Estudo clínico e epidemiológico da febre botonosa, erlichiose canina e borreliose de Lyme numa população de canídeos domésticos do Algarve. Tese de Mestrado em Saúde Pública Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
3. **Alleman, A. R., L. J. Mcsherry, A. F. Barbet, E. B. Breitschwerdt, H. L. Sorenson, M. V. Bowie, and M. Bélanger.** 2001. Recombinant major antigenic protein 2 of *Ehrlichia canis*: a potential diagnostic tool. *Journal of Clinical Microbiology* **39**:2494-2499.
4. **Alves, A. L., R. C. Madureira, R. A. S., F. N. Corrêa, and R. C. C. M. Botteon.** 2004. Frequência de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* em cães na região metropolitana do Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **24**:203-206.
5. **Avashia, S. B., J. M. Petersen, C. M. Lindley, M. E. Schriefer, K. L. Gage, M. Cetron, T. A. DeMarcus, D. K. Kim, J. Buck, J. A. Montenieri, J. L. Lowell, M. F. Antolin, M. Y. Kosoy, L. G. Carter, M. C. Chu, K. A. Hendricks, D. T. Dennis, and J. L. Kool.** 2004. First reported prairie dog-to-human tularemia transmission, Texas, 2002. *Emerging Infectious Diseases* **10**:483-486.
6. **Azuma, Y., E. Isogai, H. Isogai, and K. Kawamura.** 1994. Canine Lyme disease: clinical and serological evaluations in 21 dogs in Japan. *The Veterinary Record* **134**:369-372.

7. **Bacellar, F., and A. R. Filipe.** 2001. Actuais metodologias aplicadas no diagnóstico laboratorial de Rickettsioses. Separata da Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas, **1-4**:34-38.
8. **Bacellar, F., J. E. Dawson, C. A. Silveira, and A. R. Filipe.** 1995. Antibodies against Rickettsiaceae in dogs of Setúbal, Portugal. Central European Journal of Public Health **2**:100-102.
9. **Bacellar, F., R. L. Regnery, M. S. Nuncio, and A. R. Filipe.** 1995. Genotypic evaluation of rickettsial isolates recovered from various species of ticks in Portugal. Epidemiology and Infection. **114**:169-178.
10. **Bacellar, F., R. Sousa, A. Santos, M. Santos-Silva, and P. Parola.** 2003. Boutonneuse fever in Portugal: 1995-2000. Data of a state laboratory. European Journal of Epidemiology **18**:275-277.
11. **Baneth, G., A. Harmelin, and B.-Z. Presentey.** 1995. *Hepatozoon canis* in two dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association **12**:1891-1894.
12. **Baneth, G., and B. Weigler.** 1997. Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. Journal of Veterinary Internal Medicine **11**:365-370.
13. **Baneth, G., I. Aroch, and B. Presentey.** 1997. *Hepatozoon canis* infection in a litter of Dalmatian dogs. Veterinary Parasitology **70**:201-206.
14. **Baneth, G., J. R. Barta, V. Shkap, D. S. Martin, D. K. Macintire, and N. Vincent-Johnson.** 2000. Genetic and antigenic evidence supports the separation of *Hepatozoon canis* and *Hepatozoon americanum* at the species level. Journal of Clinical Microbiology **38**:1298-1301.

15. **Baneth, G., J. S. Mathew, V. Shkap, D. K. Macintire, J. R. Barta, and S. A. Ewing.** 2003. Canine hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon* spp. *Trends in Parasitology* **19**:27-31.
16. **Baneth, G., M. J. Kenny, S. Tasker, Y. Anug, V. Shkap, A. Levy, and S. E. Shaw.** 2004. Infection with a proposed new subspecies of *Babesia canis*, *Babesia canis* subsp. *presentii*, in domestic cats. *Journal of Clinical Microbiology* **42**:99-105.
17. **Baneth, G., T. Waner, A. Koplak, S. Weinstein, and A. Keysary.** 1996. Survey of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Israel. *The Veterinary Record* **138**:257-259.
18. **Barlough, J. E., J. E. Madigan, E. DeRock, and L. Bigornia.** 1996. Nested polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia equi* genomic DNA in horses and ticks (*Ixodes pacificus*). *Veterinary Parasitology* **63**:319-329.
19. **Barrón, J. L. S.** 2004. Estudio en la población vulpina de la provincia de Soria como bioindicador Sanitario. Tesis Doctoral, Universidad de Alcala – Departamento de Especialidades Medicas.
20. **Batmaz, H., E. Nevo, T. Waner, S. Şentürk, Z. Yilmaz, and S. Harrus.** 2001. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Turkey. *The Veterinary Record* **148**:665-666.
21. **Baumgarten, B. U., M. Röllinghoff, and C. Bogdan.** 1999. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and granulocytic and monocytic Ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks from southern Germany. *Journal of Clinical Microbiology* **37**:3448-3451.
22. **Beckwith, C. S.** 2006. Tularemia as a cause of fever in a squirrel monkey. *Journal of American Veterinary Medical Association* **2**:269-273.
23. **Bélanger, M., H. L. Sorenson, M. K. France, M. V. Bowie, A. F. Barbet, E. B. Breitschwerdt, and A. R. Alleman.** 2002. Comparison of serological detection methods for

diagnosis of *Ehrlichia canis* infections in dogs. *Journal of Clinical Microbiology* **40**:3506-3508.

24. **Bicalho, K. A., M. F. B. Ribeiro, O. A. Martins-Filho.** 2004. Molecular fluorescent approach to assessing intraerythrocytic hemoprotozoan *Babesia canis* infection in dogs. *Veterinary Parasitology* **125**:221-235.

25. **Birkenheuer, A. J., M. T. Correa, M. G. Levy, and E. B. Breitschwerdt.** 2005. Geographic distribution of babesiosis among dogs in the United States and association with dog bites: 150 cases (2000-2003). *Journal of American Veterinary Medical Association* **227**:942-947.

26. **Bjöersdorff, A.** 2002. Canine granulocytic ehrlichiosis due to *Anaplasma phagocytophila* comb. nov. (*E. phagocytophila* genogroup), p. 123-127. In Beugnet, F. (ed.), *Guide to major vector-borne diseases of pets*. Merial, France.

27. **Böhm, M., A. L. Leisewitz, P. N. Thompson, and J. P. Schoeman.** 2006. Capillary and venous *Babesia canis rossi* parasitaemias and their association with outcome of infection and circulatory compromise. *Veterinary Parasitology* **141**:18-29.

28. **Breitschwerdt, E. B., A. C. G. Abrams-Ogg, M. R. Lappin, D. Bienzle, S. I. Hancock, S. M. Cowan, J. K. Clouten, B. C. Hegarty, and E. C. Hawkins.** 2002. Molecular evidence supporting *Ehrlichia canis*-like infection in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **16**:642-649.

29. **Bremer, W. G., J. J. Schaefer, E. R. Wagner, S. A. Ewing, Y. Rikihisa, G. R. Needham, S. Jittapalapong, D. L. Moore, and R. W. Stich.** 2005. Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology* **131**:95-105.

30. **Burkot, T. R., G. O. Maupin, B. S. Schneider, C. Denatale, C. M. Happ, J. S. Rutherford, and N. S. Zeidner.** 2001. Use of a sentinel host system to study the questing behavior of *Ixodes spinipalpis* and its role in the transmission of *Borrelia bissettii*, human granulocytic ehrlichiosis, and *Babesia microti*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **65**:293-299.
31. **Cacciò, S. M., B. Antunovic, A. Moretti, V. Mangili, A. Marinculic, R. R. Baric, S. B. Slemenda, and N. J. Pieniazek.** 2002. Molecular characterisation of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. *Veterinary Parasitology* **106**:285-292.
32. **Cadman, H. F., P. J. Kelly, L. A. Matthewman, R. Zhou, and P. R. Mason.** 1994. Comparison of the dot-blot enzyme linked immunoassay with immunofluorescence for detecting antibodies to *Ehrlichia canis*. *The Veterinary Record* **135**:362.
33. **Caeiro, V.** 1992. As carraças em Portugal: seus hospedeiros domésticos e silvestres. Ciclos vitais e preferências de vegetação e clima. *O Médico Veterinário* **28**:7-25.
34. **Caeiro, V.** 1999. General review of tick species present in Portugal. *Parassitologia* **41** (Suppl. 1):11-15.
35. **Callister, S. M., D. A. Jobe, R. F. Schell, S. D. Lovrich, K. L. Onheiber, and J. B. Korshus.** 2000. Detection of borreliacidal antibodies in dogs after challenge with *Borrelia burgdorferi*-infected *Ixodes scapularis* ticks. *Journal of Clinical Microbiology* **38**:3670-3674.
36. **Camacho, A. T., E. Pallas, J. J. Gestal, F. J. Guitián, A. S. Olmeda, H. K. Goethert, and S. R. Telford.** 2001. Infection of dogs in north-west Spain with a *Babesia microti*-like agent. *The Veterinary Record* **149**:552-555.

37. Câmara Municipal de Bragança. Plano municipal de defesa da floresta contra incêndios do concelho de Bragança. 2006. Comissão Municipal de defesa da floresta contra incêndios do concelho de Bragança. Caderno II. Informação de base p. 5-18.
38. Câmara Municipal de Carrazeda de Ansiães. Plano municipal de defesa da floresta contra incêndios do concelho de Carrazeda de Ansiães. 2006. Caderno II. Informação de base.
39. Câmara Municipal de Miranda do Douro, Plano Municipal de Defesa da Floresta contra incêndios. 2006 p. 41-56.
40. Câmara Municipal de Vimioso. Plano Director Municipal de Vimioso. 1993. Elementos Anexos, Estudos de Caracterização. Análise Biofísica, Vol. **III**:3-22.
41. Câmara Municipal de Vinhais. Plano municipal de defesa da floresta contra incêndios de Vinhais. 2006. Caderno II. Informação de base.
42. **Cannon, R. M., and R. T. Roe.** 1982. Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians. Bureau of Rural Science, Department of Primary Industry. Australian Governmentt Publishng Service, Canberra. Australia.
43. **Cao, W.-C., Q.-M. Zhao, P.-H. Zhang, J. S. Dumler, X.-T. Zhang, L.-Q. Fang, and H. Yang.** 2000. Granulocytic Ehrlichiae in *Ixodes persulcatus* ticks from an area in China where Lyme disease is endemic. *Journal of Clinical Microbiology* **38**:4208-4210.
44. **Carlsson, H. E., A. A. Lindberg, G. Lindberg, B. Hederstedt, K.-A. Karlsson, and B. O. Agell.** 1979. Enzyme-linked immunosorbent assay for immunological diagnosis of human tularemia. *Journal of Clinical Microbiology* **10**:615-621.
45. **Caspersen, K., J.-H. Park, S. Patil, and J. S. Dumler.** 2002. Genetic variability and stability of *Anaplasma phagocytophila msp2 (p44)*. *Infection and Immunity* **70**:1230-1234.
46. **Chandoga, P., M. Goldová, D. Baranová, and M. Kozák.** 2002. First cases of canine babesiosis in the Slovak Republic. *The Veterinary Record* **150**:82-84.

47. **Christova, I., J. V. de Pol, S. Yazar, E. Velo, and L. Schouls.** 2003. Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* and *Ehrlichia* species, and spotted fever group rickettsiae in ticks from southeastern Europe. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **22**:535-542.
48. **Conceição-Silva, F. M., P. Abranches, M. C. D. Silva-Pereira, and J. G. Janz.** 1988. Hepatozoonosis in foxes from Portugal. *Journal of Wildlife Diseases* **24**:344-347.
49. **Craig, T. M., J. E. Smallwood, K. W. Knauer, and J. P. McGrath.** 1978. *Hepatozoon canis* infection in dogs: clinical, radiographic, and hematologic findings. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **173**:967-972.
50. **Criado-Fornelio, A., A. Martinez-Marcos, A. Buling-Saraña, and J. C. Barba-Carretero.** 2003. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe part I. Epizootiological aspects. *Veterinary Parasitology* **113**:189-201.
51. **Criado-Fornelio, A., C. Rey-Valeiron, A. Buling, J. C. Barba-Carretero, R. Jefferies, and P. Irwin.** 2007. New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. *Veterinary Parasitology*, **144**:261-269.
52. **Dagnone, A. S., H. S. A. de Moraes, M. C. Vidotto, F. S. Jojima, and O. Vidotto.** 2003. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. *Veterinary Parasitology* **117**:285-290.
53. **Dantas-Torres, F., and L. A. Figueredo.** 2006. Canine babesiosis: a Brazilian perspective. *Veterinary Parasitology* **141**:197-2003.
54. **Dantas-Torres, F., L. A. Figueredo, and S. P. Brandão-Filho.** 2006. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **39**:64-67.

55. **Dawson, J. E., K. L. Biggie, C. K. Warner, K. S. Cookson, S. Jenkins, J. F. Levine, and J. G. Olson.** 1996. Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffensis*, an etiologic agent of human ehrlichiosis, in dogs from southern Virginia. *American Journal of Veterinary Research* **57**:1175-1179.
56. **de Carvalho, I. L., R. Escudero, C. G.-Amil, H. Falcão, P. Anda, and M. S. Nuncio.** 2007. *Francisella tularensis*, Portugal. *Emerging Infectious Diseases* **13**:666-667.
57. **de Castro, M. B., R. Z. Machado, L. P. C. T. de Aquino, A. C. Alessi, and M. T. Costa.** 2004. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Veterinary Parasitology* **119**:73-86.
58. **de Gee, A. L. W.** 1995. Canine Lyme disease. *The Veterinary Record* **136**:499-500.
59. **de la Fuente, J., A. Torina, S. Caracappa, G. Tumino, R. Furlá, C. Almazán, and K. M. Kocan.** 2005. Serologic and molecular characterization of *Anaplasma* species infection in farm animals and ticks from Sicily. *Veterinary Parasitology* **133**:357-362.
60. **de la Fuente, J., R. F. Massung, S. J. Wong, F. K. Chu, H. Lutz, M. Meli, F. D. von Loewenich, A. Grzeszczuk, A. Torina, S. Caracappa, A. J. Mangold, V. Naranjo, S. Stuen, and K. M. Kocan.** 2005. Sequence analysis of the *msp4* gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. *Journal of Clinical Microbiology* **43**:1309-1317.
61. **de Michelis, S., H.-S. Sewell, M. Collares-Pereira, M. Santos-Reis, L. M. Schouls, V. Benes, E. C. Holmes, and K. Kurtenbach.** 2000. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from mainland Portugal. *Journal of Clinical Microbiology* **38**:2128-2133.
62. **de la Puente-Redondo, V. A., N. G. del Blanco, C. B. Gutiérrez-Martín, F. J. García-Peña, and E. F. R. Ferri.** 2000. Comparison of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. *Journal of Clinical Microbiology* **38**:1016-1022.

63. **de Sousa, R., C. Barata, L. Vitorino, M. Santos-Silva, C. Carrapato, J. Torgal, D. Walker, and F. Bacellar.** 2006. *Rickettsia sibirica* isolation from a patient and detection in ticks, Portugal. *Emerging Infectious Diseases* **12**:1103-1108.
64. **de Sousa, R., and F. Bacellar.** 2004. Morbi-mortalidade por *Rickettsia conorii* em Portugal. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* **13**, suplemento 1:180-184.
65. **de Sousa, R., T. Luz, P. Parreira, M. Santos-Silva, and F. Bacellar.** 2006. Boutonneuse fever and climate variability. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1078**:162-169.
66. **Duh, D., M. Slovák, A. Saksida, K. Strašek, M. Petrovec, and T. Avšič-Županc.** 2006. Molecular detection of *Babesia canis* in *Dermacentor reticulatus* ticks collected in Slovakia. *Biologia* **61**:231-233.
67. **Dumler, J. S., A. F. Barbet, C. P. J. Bekker, G. A. Dasch, G. H. Palmer, S. C. Ray, Y. Rikihisa, and F. R. Rurangirwa.** 2001. Reorganization of the genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**:2145-2165.
68. **Eddlestone, S. M., T. M. Neer, S. D. Gaunt, R. Corstvet, A. Gill, G. Hosgood, B. Hegarty, and E. B. Breitschwerdt.** 2006. Failure of imidocarb dipropionate to clear experimentally induced *Ehrlichia canis* infection in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **20**:840-844.

69. **Egenvall, A. E., Å. A. Hedhammar, and A. I. Bjöersdorff.** 1997. Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. *The Veterinary Record* **140**:222-226.
70. **Ellis, J., P. C. F. Oyston, M. Green, and R. W. Titball.** 2002. Tularemia. *Clinical Microbiological Reviews* **15**:631-646.
71. **Engvall, E. O., B. Pettersson, M. Persson, K. Artursson, and K.-E. Johansson.** 1996. A 16S rRNA-based PCR assay for detection and identification of granulocytic *Ehrlichia* species in dogs, horses, and cattle. *Journal of Clinical Microbiology* **34**:2170-2174.
72. **Espejo, E., M. D. Alegre, B. Font, A. Font, F. Segura, and F. Bella.** 1993. Antibodies to *Rickettsia conorii* in dogs: seasonal differences. *European Journal of Epidemiology* **9**:344-346.
73. **Estrada-Peña, A.** As carraças do cão na Península Ibérica: espécies, distribuição, ecologia e controlo, p. 8-16. *In*, As carraças do cão e as doenças transmitidas na península Ibérica: uma panorâmica com aspectos zoonóticos. Virbac Saúde Animal.
74. **Estrada-Peña, A., A. Bouattour, J.-L. Camicas, and A. R. Walker.** 2004. Ticks of domestic animals in the Mediterranean region: a guide to identification of species. University of Zaragoza, Spain.
75. **Farkas, R.** 2002. Canine babesiosis caused by large *Babesia* in Europe, p. 83-91. *In* Beugnet, F. (ed.), Guide to major vector-borne diseases of pets. Merial, France.
76. **Farkas, R.** 2002. Canine borreliosis, p. 167-175. *In* Beugnet, F. (ed.), Guide to major vector-borne diseases of pets. Merial, France.
77. **Feldman, K. A.** 2003. Tularemia. *Journal of American Veterinary Medical Association* **6**:725-730.

78. **Feng, H.-M., V. L. Popov, and D. H. Walker.** 1994. Depletion of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in mice with *Rickettsia conorii*-infected endothelium: impairment of rickettsicidal nitric oxide production resulting in fatal, overwhelming rickettsial disease. *Infection and Immunity* **62**:1952-1960.
79. **Filipe, A. R., J. Řeháček, F. Bacellar, and M. S. Nuncio.** 1990. *Ehrlichia canis*. Um “novo” agente de doença presente em Portugal, com importância em Saúde Pública. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas* **4**:235-238.
80. **Filipe, A. R., J. Řeháček, F. Bacellar, and M. S. Nuncio.** 1992. Microbiologia e parasitologia da hemolinfa dos ixodídeos do distrito de Setúbal. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, **87**:46-52.
81. **Fishman, Z., L. Gonen, S. Harrus, D. Strauss-Ayali, R. King, and G. Baneth.** 2004. A serosurvey of *Hepatozoon canis* and *Ehrlichia canis* antibodies in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from Israel. *Veterinary Parasitology* **119**:21-26.
82. **Foley, J., N. Drazenovich, C. M. Leutenegger, and B. B. Chomel.** 2007. Association between polyarthritis and thrombocytopenia and increased prevalence of vectorborne pathogens in Californian dogs. *The Veterinary Record* **160**:159-162.
83. **Font, A., J. M. Closa, and J. Mascort.** 1992. Lyme disease in dogs in Spain. *The Veterinary Record* **130**:227-228.
84. **Forlano, M. D., K. R. S. Teixeira, A. Scofield, C. Elisei, K. S. C. Yotoko, K. R. Fernandes, G. F. C. Linhares, S. A. Ewing, and C. L. Massard.** 2007. Molecular characterization of *Hepatozoon* sp. from Brazilian dogs and its phylogenetic relationship with other *Hepatozoon* spp. *Veterinary Parasitology* **145**:21-30.
85. **Fritz, C. L., and A. M. Kjemtrup.** 2003. Lyme borreliosis. *Journal of American Veterinary Medical Association* **223**:1261-1270.

86. **García, A. T. C.** 2006. Piroplasma infection in dogs in northern Spain. *Veterinary Parasitology* **138**:97-102.
87. **Gilot, B and M. Marjolet.** 1982. Contribution à l'étude du parasitisme humain par les tiques (Ixodidae et Argasidae), plus particulièrement dans le sud-est de la France. *Médecine et Maladies Infectieuses* **12**:340-351.
88. **Goddard, J.** 1989. Focus of human parasitism by the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* **26**:628-629.
89. **Gondim, L. F. P., A. Kohayagawa, N. X. Alencar, A. W. Biondo, R. K. Takahira, and S. R. V. Franco.** 1998. Canine hepatozoonosis in Brasil: description of eight naturally occurring cases. *Veterinary Parasitology* **74**:319-323.
90. **Gonen, L., D. Strauss-Ayali, V. Shkap, N. Vincent-Johnson, D. K. Macintire, and G. Baneth.** 2004. An enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Hepatozoon canis*. *Veterinary Parasitology* **122**:131-139.
91. **Goodman, J. L., C. Nelson, B. Vitale, J. E. Madigan, J. S. Dumler, T. J. Kurtti, and U. G. Munderloh.** 1996. Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. *The New England Journal of Medicine* **334**:209-215.
92. **Goossens, H. A. T., A. E. V. D. Bogaard, and M. K. E. Nohlmans.** 2001. Dogs as sentinels for human Lyme borreliosis in the Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology* **39**:844-848.
93. **Greene, R. T., R. L. Walker, W. L. Nicholson, H. W. Heidner, J. F. Levine, E. C. Burgess, M. Wyand, E. B. Breitschwerdt, and H. A. Berkhoff.** 1988. Immunoblot analysis of immunoglobulin G response to the Lyme disease agent (*Borrelia burgdorferi*) in experimentally and naturally exposed dogs. *Journal of Clinical Microbiology* **26**:648-653.

94. **Greig, B., K. M. Asanovich, P. J. Armstrong, and J. S. Dumler.** 1996. Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. *Journal of Clinical Microbiology* **34**:44-48.
95. **Guerra, M. A., E. D. Walker, and U. Kitron.** 2001. Canine surveillance system for Lyme borreliosis in Wisconsin and northern Illinois: geographic distribution and risk factor analysis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **65**:546-552.
96. **Gustafson, B. W., and L. J. DeBowes.** 1996. Tularemia in a dog. *Journal of American Animal Hospital Association* **32**:339-341.
97. **Hall, J. D., R. R. Craven, J. R. Fuller, R. J. Pickles, and T. H. Kawula.** 2007. *Francisella tularensis* replicates within alveolar type II epithelial cells in vitro and in vivo following inhalation. *Infection and Immunity* **75**:1034-1039.
98. **Harrus, S., P. H. Kass, E. Klement, and T. Waner.** 1997. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *The Veterinary Record* **141**:360-363.
99. **Harrus, S., R. Ofri, I. Aizenberg, and T. Waner.** 1998. Acute blindness associated with monoclonal gammopathy induced by *Ehrlichia canis* infection. *Veterinary Parasitology* **78**:155-160.
100. **Harrus, S., T. Waner, A. Eldor, E. Zwang, and H. Bark.** 1996. Platelet dysfunction associated with experimental acute canine ehrlichiosis. *The Veterinary Record* **139**:290-293.
101. **Harrus, S., T. Waner, H. Bark, F. Jongejan, and A. W. C. A. Cornelissen.** 1999. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology* **37**:2745-2749.

102. **Harrus, S., T. Waner, I. Aizenberg, J. E. Foley, A. M. Poland, and H. Bark.** 1998. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *Journal of Clinical Microbiology* **36**:73-76.
103. **Hodzic, E., D. Fish, C. M. Maretzki, A. M. de Silva, S. Feng, and S. W. Barthold.** 1998. Acquisition and transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes scapularis* ticks. *Journal of Clinical Microbiology* **36**:3574-3578.
104. **Horowitz, H. W., E. Kilchevsky, S. Haber, M. Agüero-Rosenfeld, R. Kranwinkel, E. K. James, S. J. Wong, F. Chu, D. Liveris, and I. Schwartz.** 1998. Perinatal transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *The New England Journal of Medicine* **339**:375-378.
105. **Hoyle, D. V., A. R. Walker, P. S. Craig, and M. E. J. Woolhouse.** 2001. Survey of parasite infections not endemic to the United Kingdom in quarantined animals. *The Veterinary Record* **149**:457-458.
106. **Inokuma, H., M. Okuda, K. Ohno, K. Shimoda, and T. Onishi.** 2002. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. *Veterinary Parasitology* **106**:265-271.
107. **Iqbal, Z., W. Chaichanasiriwithaya, and Y. Rikihisa.** 1994. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology* **32**:1658-1662.
108. **Iqbal, Z., and Y. Rikihisa.** 1994. Reisolation of *Ehrlichia canis* from blood and tissues of dogs after doxycycline treatment. *Journal of Clinical Microbiology* **32**:1644-1649.
109. **Jäderlund, K. H., A. Egenvall, K. Bergström, and Å. Hedhammar.** 2007. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs with neurological signs. *The Veterinary Record* **160**:825-831.

110. **Johansson, K.-E., B. Pettersson, M. Uhlén, A. Gunnarsson, M. Malmqvist, and E. Olsson.** 1995. Identification of the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in Swedish dogs and horses by direct solid phase sequencing of PCR products from the 16S rRNA gene. *Research in Veterinary Science* **58**:109-112.
111. **Johnson, E. M., S. A. Ewing, R. W. Barker, J. C. Fox, D. W. Crow, and K. M. Kocan.** 1998. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* **74**:277-288.
112. **Karagenc, T. I., S. Pasa, G. Kirli, M. Hosgor, H. B. Bilgic, Y. H. Ozon, A. Atasoy, and H. Eren.** 2006. A parasitological, molecular and serological survey of *Hepatozoon canis* infection in dogs around the Aegean coast of Turkey. *Veterinary Parasitology* **135**:113-119.
113. **Karhukorpi, E.-K., and J. Karhukorpi.** 2001. Rapid laboratory diagnosis of ulceroglandular tularemia with polymerase chain reaction. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **33**:383-385.
114. **Kelly, P. J., L. A. Matthewman, P. R. Mason, S. Courtney, C. Katsande, and J. Rukwava.** 1992. Experimental infection of dogs with a Zimbabwean strain of *Rickettsia conorii*. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **95**:322-326.
115. **Keysary, A., D. N. Torten, E. M. Gross, and M. Torten.** 1988. Prevalence of antibodies to *Rickettsia conorii* in dogs in Israel and its relation to outbreaks in man. *Israel Journal of Veterinary Medicine* **44**:103-107.
116. **Keysary, A., T. Waner, M. Rosner, C. K. Warner, J. E. Dawson, R. Zass, K. L. Biggie, and S. Harrus.** 1996. The first isolation, in vitro propagation, and genetic characterization of *Ehrlichia canis* in Israel. *Veterinary Parasitology* **62**:331-340.

117. **Kiral, F., T. Karagenc, S. Pasa, C. Yenisey, and K. Seyrek.** 2005. Dogs with *Hepatozoon canis* respond to the oxidative stress by increased production of glutathione and nitric oxide. *Veterinary Parasitology* **131**:15-21.
118. **Kirtz, G., M. Meli, E. Leidinger, P. Ludwig, D. Thum, B. Czettel, S. Kölbl, and H. Lutz.** 2005. *Anaplasma phagocytophilum* infection in a dog: identifying the causative agent using PCR. *Journal of Small Animal Practice* **46**:300-303.
119. **KouLee, R., X. Zhao, J. Austin, G. Harris, J. W. Conlan, and W. Chen.** 2007. Mouse model of oral infection with virulent type A *Francisella tularensis*. *Infection and Immunity* **75**:1651-1660.
120. **Kugeler, K. J., N. Gurfield, J. G. Creek, K. S. Mahoney, J. L. Versage, and J. M. Petersen.** 2005. Discrimination between *Francisella tularensis* and *Francisella*-like endosymbionts when screening ticks by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:7594-7597.
121. **Kugeler, K. J., R. Pappert, Y. Zhou, and J. M. Petersen.** 2006. Real-time PCR for *Francisella tularensis* types A and B. *Emerging Infectious Diseases* **12**:1799-1801.
122. **la Scola, B., and D. Raoult.** 1996. Diagnosis of Mediterranean spotted fever by cultivation of *Rickettsia conorii* from blood and skin samples using the centrifugation-shell vial technique and by detection of *R. conorii* in circulating endothelial cells: a 6-year follow-up. *Journal of Clinical Microbiology* **43**:2722-727.
123. **la Scola, B., and D. Raoult.** 1997. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *Journal of Clinical Microbiology* **35**:2715-2727.
124. **Leutenegger, C. M., N. Pusterla, C. N. Mislin, R. Weber, and H. Lutz.** 1999. Molecular evidence of coinfection of ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and the

human granulocytic ehrlichiosis agent in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology* **37**:3390-3391.

125. **Levin, M. L., F. des Vignes, and D. Fish.** 1999. Disparity in the natural cycles of *Borrelia burgdorferi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Emerging Infectious Diseases* **5**:204-208.

126. **Lin, Q., Y. Rikihisa, S. Felek, X. Wang, R. F. Massung, and Z. Woldehiwet.** 2004. *Anaplasma phagocytophilum* has a functional *msp2* gene that is distinct from *p44*. *Infection and Immunity* **72**:3883-3889.

127. **Lindenmayer, J., M. Weber, J. Bryant, E. Marquez, and A. Onderdonk.** 1990. Comparison of indirect immunofluorescent-antibody assay, enzyme-linked immunosorbent assay, and Western immunoblot for the diagnosis of Lyme disease in dogs. *Journal of Clinical Microbiology* **28**:92-96.

128. **Littman, M. P., R. E. Goldstein, M. A. Labato, M. R. Lappin, and G. E. Moore.** 2006. ACVIM small animal consensus statement on Lyme disease in dogs: diagnosis, treatment, and prevention. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **20**:422-434.

129. **Llera, J. L. G., M. L. L. García, E. M. Reinoso, and R. De V. González.** 2002. Differential serological testing by simultaneous indirect immunofluorescent antibody test in canine leishmaniosis and ehrlichiosis. *Veterinary Parasitology* **109**:185-190.

130. **Lobetti, R. G.** 1998. Canine babesiosis. *The Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinary* **20**:418-430.

131. **Lopes, D. D, and F. T. Rodrigues.** 2007. Babesiose Canina – Estudo Epidemiológico no Nordeste Transmontano 2005/2006. Comunicação pessoal. VII Encontro da Sociedade de Epidemiologia e Medicina Veterinária Preventiva.

132. **Lopes, D. D., F. T. Rodrigues, S. Alves, and M. Santos-Silva.** 2005. Babesiose em cão de gado transmontano. *Veterinária Técnica* **6**:36.
133. **Magnarelli, L. A., R. A. Flavell, S. J. Padula, J. F. Anderson, and E. Fikrig.** 1997. Serologic diagnosis of canine and equine borreliosis: use of recombinant antigens in enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Clinical Microbiology* **35**:169-173.
134. **Mannelli, A., M. L. Mandola, P. Pedri, M. Tripoli, and P. Nebbia.** 2003. Associations between dogs that were serologically positive for *Rickettsia conorii* relative to the residences of two human cases of Mediterranean spotted fever in Piemonte (Italy). *Preventive Veterinary Medicine* **60**:13-26.
135. **Mather, T. N., D. Fish, R. T. Coughlin.** 1994. Competence of dogs as reservoirs for Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*). *Journal of American Veterinary Medical Association* **205**:186-188.
136. **Mathew, J. S., S. A. Ewing, R. J. Panciera, and J. P. Woods.** 1998. Experimental transmission of *Hepatozoon americanum* Vincent-Johnson et al., 1997 to dogs by the Gulf Coast tick, *Amblyomma maculatum* Koch. *Veterinary Parasitology* **80**:1-14.
137. **Matijatko, V., V. Mrljak, I. Kiš, N. Kučer, J. Foršek, T. Živičnjak, Ž. Romić, Z. Šimec, and J. J. Ceron.** 2007. Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Veterinary Parasitology* **144**:242-250.
138. **Matthewman, L. A., P. J. Kelly, P. A. Bobade, M. Tagwira, P. R. Mason, A. Majok, P. Brouqui, and D. Raoult.** 1993. Infections with *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in dogs in Zimbabwe. *The Veterinary Record* **133**:344-346.
139. **May, C., D. Bennett, and S. D. Carter.** 1990. Lyme disease in the dog. *The Veterinary Record* **126**:293.

140. **McQuiston, J. H., C. L. McCall, and W. L. Nicholson.** 2003. Ehrlichiosis and related infections. *Journal of American Veterinary Medical Association* **223**:1750-1756.
141. **McKenna, P., J. Clement, D. V. Dijck, M. Lauwerys, D. Carey, T. V. den Bogaard, and G. Bigaignon.** 1995. Canine Lyme disease in Belgium. *The Veterinary Record* **136**:244-247.
142. **Meneses, A.** 1995. First report of canine ehrlichiosis in Costa Rica. *The Veterinary Record* **137**:46-47.
143. **Mead, P, and J. Petersen.** 2004. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Clinician Outreach and Communication Activity (COCA). Clinician Briefing: Tularemia.
144. **Meinkoth, K. R., R. J. Morton, and J. H. Meinkoth.** 2004. Naturally occurring tularemia in a dog. *Journal of American Veterinary Medical Association* **4**:545-547.
145. **Merino, F. J., J. L. Serrano, J. V. Saz, T. Nebreda, M. Gegundez, and M. Beltran.** 2000. Epidemiological characteristics of dogs with Lyme borreliosis in the province of Soria (Spain). *European Journal of Epidemiology* **16**:97-100.
146. **Minagorre, P. J. A., A. F. Bernal, A. S. Bautista, and C. L. Ozores.** 2004. Infección por *Francisella tularensis* transmitida por un perro de las praderas. *Anales de Pediatría* **60**:583-4.
147. **Mylonakis, M. E., L. Leontides, L. Gonen, C. Billinis, A. F. Koutinas, and G. Baneth.** 2005. Anti-*Hepatozoon canis* serum antibodies and gamonts in naturally-occurring canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Parasitology* **129**:229-233.
148. **Neer, T. M., E. B. Breitschwerdt, R. T. Greene, and M. R. Lappin.** 2002. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **16**:309-315.

149. **Nel, M., R. G. Lobetti, N. Keller, and P. N. Thompson.** 2004. Prognostic value of blood lactate, blood glucose, and hematocrit in canine babesiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **18**:471-476.
150. **Núncio, M. S.** 2001. Contribuição para o estudo de borrelíias e borreliose de Lyme em Portugal. Tese de Doutoramento. Faculdade de Ciências. Universidade de Lisboa. Lisboa.
151. **Núncio, M. S., F. Bacellar, and A. Filipe.** 1999. Antibodies against *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia conorii* in dogs from Portugal. *Zentralblatt für Bakteriologie* **289**:711-716.
152. **O'Connor, T. P., J. L. Hanscom, B. C. Hegarty, R. G. Groat, and E. B. Breitschwerdt.** 2006. Comparison of an indirect immunofluorescence assay, western blot analysis, and a commercially available ELISA for detection of *Ehrlichia canis* antibodies in canine sera. *American Journal of Veterinary Research* **67**:206-210.
153. **Oyamada, M., B. Davoust, M. Boni, J. Dereure, B. Bucheton, A. Hammad, K. Itamoto, M. Okuda, and H. Inokuma.** 2005. Detection of *Babesia canis rossi*, *B. canis vogeli*, and *Hepatozoon canis* in dogs in a village of eastern Sudan by using a screening PCR and sequencing methodologies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **12**:1343-1346.
154. **Paludo, G. R., A. Dell'Porto, A. R. de C. e Trindade, C. McManus, and H. Friedman.** 2003. *Hepatozoon* spp: report of some cases in dogs in Brasília, Brazil. *Veterinary Parasitology* **118**:243-248.
155. **Parola, P.** 2004. Tick-borne rickettsial diseases: emerging risks in Europe. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* **27**:297-304.

156. **Parola, P., C. D. Paddock, and D. Raoult.** 2005. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clinical Microbiological Reviews* **18**:719-756.
157. **Parola, P., and D. Raoult.** 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clinical Infectious Diseases* **32**:897-928.
158. **Perez, M., M. Bodor, C. Zhang, Q. Xiong, and Y. Rikihisa.** 2006. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1078**:110-117.
159. **Perez, M., Y. Rikihisa, and B. Wen.** 1996. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *Journal of Clinical Microbiology* **34**:2133-2139.
160. **Petersen, J. M., and M. E. Schriefer.** 2005. Tularemia: emergence/re-emergence. *Veterinary Research* **36**:455-467.
161. **Petrie, A., and P. Watson.** 1999. p. 50-51. *In* Statistics for veterinary and animal science. Blackwell Science Ltd. Oxford. UK.
162. **Portillo, A., A. S. Santos, S. Santibáñez, L. Pérez-Martínez, J. R. Blanco, V. Ibarra, and J. A. Oteo.** 2005. Detection of a non-pathogenic variant of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* from La Rioja, Spain. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1063**:333-336.
163. **Price, J. E., and T. T. Dolan.** 1980. A comparison of the efficacy of imidocarb dipropionate and tetracycline hydrochloride in the treatment of canine ehrlichiosis. *The Veterinary Record* **107**:275-277.

164. **Punda-Polić, V., N. Bradarić, Z. Klišmanić-Nuber, V. Mrljak, and M. Giljanović.** 1995. Antibodies to spotted fever group rickettsiae in dogs in Croatia. *European Journal of Epidemiology* **11**:389-392.
165. **Pusterla, N., C. M. Leutenegger, J. B. Huder, R. Weber, U. Braun, and H. Lutz.** 1999. Evidence of the human granulocytic ehrlichiosis agent in *Ixodes ricinus* ticks in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology* **37**:1332-1334.
166. **Pusterla, N., J. B. Huder, K. Feige, and H. Lutz.** 1998. Identification of a granulocytic *Ehrlichia* strain isolated from a horse in Switzerland and comparison with other Rickettsiae of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup. *Journal of Clinical Microbiology* **36**:2035-2037.
167. **Pusterla, N., J. Huder, C. Wolfensberger, B. Litschi, A. Parvis, and H. Lutz.** 1997. Granulocytic ehrlichiosis in two dogs in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology* **35**:2307-2309.
168. **Raoult, D., and M. Drancourt.** 1991. Antimicrobial therapy of rickettsial diseases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**:2457-2462.
169. **Raoult, D., H. T. Dupont, C. Chicheportiche, O. Peter, B. Gilot, and M. Drancourt.** 1993. Mediterranean spotted fever in Marseille, France: correlation between prevalence of hospitalized patients, seroepidemiology, and prevalence of infected ticks in three different areas. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **48**:249-256.
170. **Raoul, D., and V. Roux.** 1997. Rickettsioses as paradigms of new and emerging infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews* **10**:694-719.
171. **Regnery, R. L., C. L. Spruill, and B. D. Plikaytis.** 1991. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *Journal of Bacteriology* **173**:1576-1589.

172. **Rijpkema, S. G. T., M. J. C. H. Molkenboer, L. M. Schouls, F. Jongejan, and J. F. P. Schellekens.** 1995. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *Journal of Clinical Microbiology* **33**:3091-3095.
173. **Rikihisa, Y.** 1991. The tribe *Ehrlichieae* and ehrlichial diseases. *Clinical Microbiology Reviews* **4**:286-308.
174. **Rikihisa, Y., S. A. Ewing, and J. C. Fox.** 1994. Western immunoblot analysis of *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, or *E. ewingii* infections in dogs and humans. *Journal of Clinical Microbiology* **32**:2107-2112.
175. **Rikihisa, Y., S. Yamamoto, I. Kwak, Z. Iqbal, G. Kociba, J. Mott, and W. Chichanasiriwithaya.** 1994. C-Reactive protein and  $\alpha$ 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *Journal of Clinical Microbiology* **32**:912-917.
176. **Rodriguez-Vivas, R. I., R. E. F. Albornoz, and G. M. E. Bolio.** 2005. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, México: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. *Veterinary Parasitology* **127**:75-79.
177. **Rondeau, M. P., R. M. Walton, S. Bissett, K. J. Drobatz, and R. J. Washabau.** 2005. Suppurative, nonseptic polyarthropathy in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **19**:654-662.
178. **Rubini, A. S., K. dos S. Paduan, R. R. Perez, P. E. M. Ribolla, and L. H. O'Dwyer.** 2006. Molecular characterization of feline *Hepatozoon* species from Brazil. *Veterinary Parasitology* **137**:168-171.

179. **Sainz-Rodriguez, A.** 1996. Aspectos clínicos y epizootiologicos de la ehrlichiosis canina. Estudio comparado de la eficacia terapeutica de la doxiclina y el dipropionato de imidocarb. Tese de doutoramento, Universidade Complutense de Madrid, Madrid.
180. **Santos, A. S. P.** 2007. *Anaplasma phagocytophilum* and human granulocytic anaplasmosis in Portugal. Tese de doutoramento. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.
181. **Santos, A. S., F. Bacellar, and J. S. Dumler.** 2006. Human exposure to *Anaplasma phagocytophilum* in Portugal. Annals of the New York Academy of Sciences **1078**:100-105.
- 182. Santos, A. S., F. Bacellar and J. S. Dumler.** 2005. Human exposure to *Anaplasma phagocytophilum* in Portugal. 4<sup>th</sup> International Conference on Rickettsiae and Rickettsial Diseases Proceedings:42.
- 183. Santos, A. S., M. M. Santos-Silva, V. C. Almeida, F. Bacellar, and J. S. Dumler.** 2004. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in *Ixodes* ticks (Acari: Ixodidae) from Madeira island and Setúbal district, mainland Portugal. Emerging Infectious Diseases **10**:1643-1647.
184. **Santos-Silva, M., R. Sousa, A. S. Santos, D. Lopes, E. Queijo, A. Doreta, L. Vitorino, and F. Bacellar.** 2006. Ticks and tick-borne Rickettsiae surveillance in Montesinho Natural Park, Portugal. Annals of the New York Academy of Sciences **1078**:137-142.
185. **Sato, T., H. Fujita, Y. Ohara, and M. Homma.** 1990. Microagglutination test for early and specific serodiagnosis of tularemia. Journal of Clinical Microbiology **28**:2372-2374.
186. **Schoeman, J. P., P. Rees, and M. E. Herrtage.** 2007. Endocrine predictors of mortality in canine babesiosis caused by *Babesia canis rossi*. Veterinary Parasitology **148**:75-82.
187. **Segura-Porta, F., G. Diestre-Ortin, A. Ortuño-Romero, I. Sanfeliu-Sala, B. Font-Creus, T. Muñoz-Espin, E. M. de António, and J. Casal-Fábrega.** 1998. Prevalence of

antibodies to spotted fever group rickettsiae in human beings and dogs from an endemic area of mediterranean spotted fever in Catalonia, Spain. *European Journal of Epidemiology* **14**:395-398.

188. **Shaw, S. E., A. I. Lerga, S. Williams, F. Beugnet, R. J. Birtles, M. J. Day, and M. J. Kenny.** 2003. Review of exotic infectious diseases in small animals entering the United Kingdom from abroad diagnosed by PCR. *The Veterinary Record* **152**:176-177.

189. **Shaw, S. E., S. H. Binns, R. J. Birtles, M. J. Day, R. Smithson, and M. J. Kenny.** 2005. Molecular evidence of tick-transmitted infections in dogs and cats in the United Kingdom. *The Veterinary Record* **157**:645-648.

190. **Silva, M. M., A. S. Santos, P. Formosinho, and F. Bacellar.** 2006. Carraças associadas a patologias infecciosas em Portugal. *Acta Medica Portuguesa* **19**:39-48.

191. **Silveira, C. A. P.** 1992. Ehrlichiose canina. Estudo clínico de uma população animal, na região urbana e rural de Setúbal. Implicações em Saúde Pública e Saúde Pública Veterinária. Dissertação de mestrado em Saúde Pública Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa.

192. **Siret, V., D. Barataud, M. Prat, V. Vaillant, S. Ansart, A. Le Coustumier, J. Vaissaire, F. Raffi, M. Garré, and I. Capek.** 2006. An outbreak of airborne tularemia in France, August 2004. *Eurosurveillance* **11**:58-60.

193. **Solano-Gallego, L., B. Hegarty, Y. Espada, J. Llull, and E. Breitschwerdt.** 2006. Serological and molecular evidence of exposure to arthropod-borne organisms in cats from northeastern Spain. *Veterinary Microbiology* **118**:274-277.

194. **Solano-Gallego, L., L. Kidd, M. Trotta, M. Di Marco, M. Caldin, T. Furlanello, and E. Breitschwerdt.** 2006. Febrile illness associated with *Rickettsia conorii* infection in dogs from Sicily. *Emerging Infectious Diseases* **12**:1985-1988.

195. **Solano-Gallego, L., J. Llull, M. Osso, B. Hegarty, and E. Breitschwerdt.** 2006. A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Veterinary Research* **37**:231-244.
196. **Soliman, A. K., B. A. M. Botros, T. G. Ksiazek, H. Hoogstraal, I. Helmy and J. C. Morrill.** 1989. Seroprevalence of *Rickettsia typhi* and *Rickettsia conorii* infection among rodents and dogs in Egypt. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **92**:345-349.
197. **Sonenshine, D. R.** 1991. Introduction, p. 4-12. *In*, *Biology of ticks* **1**, Oxford University Press, New York.
198. **Speck, S., B. Reiner, and M. M. Wittenbrink.** 2001. Isolation of *Borrelia afzelii* from a dog. *The Veterinary Record* **149**:19-20.
199. **Straubinger, R. K., B. A. Summers, Y.-F. Chang, and M. J. G. Appel.** 1997. Persistence of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected dogs after antibiotic treatment. *Journal of Clinical Microbiology* **35**:111-116.
200. **Stuen, S., A. S. Oppegaard, K. Bergström, and T. Moum.** 2005. *Anaplasma phagocytophilum* infection in North Norway. The first laboratory confirmed case. *Acta Veterinaria Scandinavia* **46**:167-171.
201. **Stuen, S., K. Bergström, M. Petrovec, I. V. de Pol, and L. M. Schouls.** 2003. Differences in clinical manifestations and hematological and serological responses after experimental infection with genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in sheep. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **10**:692-695.
202. **Stuen, S., T. Moum, M. Petrovec, and L. M. Schouls.** 2006. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in Norway. *International Journal of Medical Microbiology* **296**:164-166.

203. **Suto, Y., A. Suto, H. Inokuma, H. Obayashi, and T. Hayashi.** 2001. First confirmed canine case of *Ehrlichia canis* infection in Japan. *The Veterinary Record* **148**:809-811.
204. **Suksawat, J., C. Pitulle, C. Arraga-Alvarado, K. Madrigal, S. I. Hancock, and E. B. Breitschwerdt.** 2001. Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. *Journal of Clinical Microbiology* **39**:90-93.
205. **Suksawat, J., Y. Xuejie, S. I. Hancock, B. C. Hegarty, P. Nilkumhang, and E. B. Breitschwerdt.** 2001. Serologic and molecular evidence of coinfection with multiple vector-borne pathogens in dogs from Thailand. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **15**:453-462.
206. **Skoracki, M., J. Michalik, B. Skotarczak, A. Rymaszewska, B. Sikora, T. Hofman, B. Wodecka, and M. Sawczuk.** 2006. First detection of *Anaplasma phagocytophilum* in quill mites (Acari: Syringophilidae) parasitizing passerine birds. *Microbes and Infection* **8**:303-307.
207. **Tendeiro, J.** Revisão sistemática dos ixodídeos portugueses. *Bol. Pecuário* XXX(2):138.
208. **Tilly, K., A. Bestor, M. W. Jewett, and P. Rosa.** 2007. Rapid clearance of Lyme disease spirochetes lacking OspC from skin. *Infection and Immunity* **75**:1517-1519.
209. **Tomaso, H., S. A. Dahouk, E. Hofer, W. D. Splettstoesser, T. M. Treu, M. P. Dierich, and H. Neubauer.** 2005. Antimicrobial susceptibilities of Austrian *Francisella tularensis holarctica* biovar II strains. *International Journal of Antimicrobial Agents* **26**:279-284.
210. **Trapp, S. M., A. S. Dagnone, O. Vidotto, R. L. Freire, A. M. Amude, and H. S. A. de Morais.** 2006. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. *Veterinary Parasitology* **140**:223-230.

211. **Unver, A., M. Perez, N. Orellana, H. Huang, and Y. Rikihisa.** 2001. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. *Journal of Clinical Microbiology* **39**:2788-2793.
212. **Veen, T. W. S. V., A. J. Murphy, and B. Colmery.** 1993. False positive *Borrelia burgdorferi* antibody titres associated with periodontal disease in dogs. *The Veterinary Record* **132**:512.
213. **Vitorino, L., R. de Sousa, F. Bacellar, and L. Zé-Zé.** 2007. Rickettsia sp. Strain RpA4 detected in portuguese *Dermacentor marginatus* ticks. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* **7**:217-220.
214. **Voyvoda, H., S. Pasa, and A. Uner.** 2004. Clinical *Hepatozoon canis* infection in a dog in Turkey. *Journal of Small Animal Practice* **45**:613-617.
215. **Waner, T., S. Harrus, F. Jongejan, H. Bark, A. Keysary, A. W. C. A. Cornelissen.** 2001. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. *Veterinary Parasitology* **95**:1-15.
216. **Waner, T., S. Harrus, H. Bark, E. Bogin, Y. Avidar, and A. Keysary.** 1997. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. *Veterinary Parasitology* **69**:307-317.
217. **Wen, B., Y. Rikihisa, J. M. Mott, R. Greene, H.-Y. Kim, N. Zhi, G. C. Couto, A. Unver, and R. Bartsch.** 1997. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *Journal of Clinical Microbiology* **35**:1852-1855.

218. **Whipp, M. J., J. M. Davis, G. Lum, J. de Boer, Y. Zhou, S. W. Bearden, J. M. Petersen, M. C. Chu, and G. Hogg.** 2003. Characterization of a *novicida*-like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia. *Journal of Medical Microbiology* **52**:839-842.
219. **Wickstrum, J. R., K.-J. Hong, S. Bokhari, N. Reed, N. McWilliams, R. T. Horvat, and M. J. Parmely.** 2007. Coactivating signals for the hepatic lymphocyte gamma interferon response to *Francisella tularensis*. *Infection and Immunity* **75**:1335-1342.
220. **Woldehiwet, Z., and B. K. Horrocks.** 2005. Antigenicity of ovine strains of *Anaplasma phagocytophilum* grown in tick cells and ovine granulocytes. *Journal of Comparative Pathology* **132**:322-328.
221. **Woods, J. P., M. A. Crystal, R. J. Morton, and R. J. Panciera.** 1998. Tularemia in two cats. *Journal of American Veterinary Medical Association* **1**:81-83.
222. **Woods, J. P., R. J. Panciera, R. J. Morton, T. W. Lehenbauer.** 1998. Feline tularemia. *The Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinary* **20**:442-457.
223. **Yamane, I., J. W. Thomford, I. A. Gardner, J. P. Dubey, M. Levy, and P. A. Conrad.** 1993. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Babesia gibsoni* infections in dogs. *American Journal of Veterinary Research* **54**:1579-1584.
224. **Yu, X.-J., J. W. McBride, and D. H. Walker.** 2007. Restriction and expansion of *Ehrlichia* strain diversity. *Veterinary Parasitology* **143**:337-346.
225. **Zahler, M., H. Rinder, E. Schein, and R. Gothe.** 2000. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. *Veterinary Parasitology* **89**:241-248.
226. **Zarnke, R. L., J. M. V. Hoef, and R. A. DeLong.** 2004. Serologic survey for selected disease agents in wolves (*Canis lupus*) from Alaska and the Yukon territory, 1984-2000. *Journal of Wildlife Diseases* **40**:632-638.

227. **Zhang, F., W. Liu, M. C. Chu, J. He, Q. Duan, X.-M. Wu, P.-H. Zhang, Q.-M. Zhao, H. Yang, Z.-T. Xin, and W.-C. Cao.** 2006. *Francisella tularensis* in rodents, China. *Emerging Infectious Diseases* **12**:994-996.
228. **Zygner, W., O. Gójska, G. Rapacka, D. Jaros, and H. Wedrychowicz.** 2007. Hematological changes during the course of canine babesiosis caused by large *Babesia* in domestic dogs in Warsaw (Poland). *Veterinary Parasitology* **145**:146-151.

## **IX. Anexos**



Nº \_\_\_\_\_  
Data da colheita \_\_/\_\_/\_\_  
Concelho \_\_\_\_\_

## Anexo 1 - Inquérito epidemiológico

### 1. Identificação do proprietário

Nome _____
Morada _____
Freguesia _____ Concelho _____ Tel _____

### 2. Identificação do animal

Nome _____	Raça _____	Sexo: M/F
Data de nascimento __/__/__	Pelagem: Curta/ Média/ Longa; Ondulada/ Lisa/ Encaracolada	
Aptidão: <input type="checkbox"/> Companhia <input type="checkbox"/> Guarda <input type="checkbox"/> Caça <input type="checkbox"/> Pastor	Área de residência: <input type="checkbox"/> Rural <input type="checkbox"/> Urbana <input type="checkbox"/> Sub-urbana	
Contacto com o exterior: <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Diário <input type="checkbox"/> Ocasional <input type="checkbox"/> Sazonal (caça)	Contacto com outros animais: <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Cães <input type="checkbox"/> Gatos <input type="checkbox"/> Ratos	<input type="checkbox"/> Vacas <input type="checkbox"/> Ovelhas <input type="checkbox"/> Cabras <input type="checkbox"/> Porcos
Acesso a caça: <input type="checkbox"/> Coelhos/Lebres <input type="checkbox"/> Raposas <input type="checkbox"/> Gamos/veados <input type="checkbox"/> Aves	Acesso à fronteira: <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Diário <input type="checkbox"/> Ocasional <input type="checkbox"/> Sazonal (caça)	
Presença de carraças: <input type="checkbox"/> Orelhas <input type="checkbox"/> Interdigital <input type="checkbox"/> Generalizada	Profilaxia: <input type="checkbox"/> Inexistente <input type="checkbox"/> Coleiras <input type="checkbox"/> Banhos <input type="checkbox"/> Sprays <input type="checkbox"/> Pipetas	<input type="checkbox"/> Outras _____

### 3. Resultado laboratorial

Ixodídeo	Espécie: _____
<input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Positivo	Título _/____ Agente: _____ Técnica: _____
Canídeo	
<input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Positivo	Título _/____ Agente: _____ Técnica: _____

**Anexo 2 – Protocolo de extracção de ADN de 1-3 ml de sangue inteiro  
com o kit FlexiGene DNA®, Qiagen.**

**Procedimento**

1. Pipetar 5 ml de tampão FG1 (tampão de lise celular) num tubo de centrífuga e adicionar 2 ml de sangue e inverter o tubo 5 vezes.
2. Centrifuga-se 5 minutos a 2000 ×g.
3. Retira-se o sobrenadante cuidadosamente e deixa-se o tubo invertido num papel absorvente durante 2 minutos, tendo cuidado para que o “pellet” fique no tubo.
4. Adiciona-se 1 ml da mistura FG2/PROTEASE QIAGEN® (o tampão de desnaturação), fecha-se o tubo e vai ao “vortex” imediatamente até que o “pellet” esteja completamente homogeneizado. Inspeccionar o tubo para confirmar a completa homogeneização.
5. Inverter o tubo 3 vezes, colocá-lo num banho-maria e incubar a 65°C durante 10 minutos. Quando as amostras mudam de cor de vermelho para verde azeitona significa que ocorreu digestão proteica.
6. Adicionar 1 ml de isopropanol a 100% e misturar por inversão até precipitar o ADN e o mesmo ficar visível fios ou grupos.
7. Centrifugar 3 minutos a 2000 ×g.
8. Retira-se o sobrenadante cuidadosamente e deixa-se o tubo invertido num papel absorvente, garantindo que o “pellet” fique no tubo.
9. Adicionar 1 ml de etanol a 70% e vai ao “vortex” por 5 segundos.
10. Centrifugar 3 minutos a 2000 ×g.
11. Retira-se o sobrenadante cuidadosamente e deixa-se o tubo invertido num papel

absorvente, garantindo que o “pellet” fique no tubo.

12. Deixar o “pellet” de ADN secar ao ar até que o líquido tenha evaporado (pelo menos 5 minutos).
13. Adicionar 200µl de tampão FG3, vai ao “vortex” por 5 segundos a baixa velocidade e dissolve-se o ADN ao incubar 1 hora a 65°C num banho.

### **Anexo 3 - Protocolo de purificação de produto de PCR, JetQuick®, Genomed.**

#### **Procedimento**

1. A garrafa da solução H2 contém uma solução concentrada de tampão. Primeiro que tudo, adicionar etanol (96-100%) à solução H2.
2. Adicionar 200µl da solução H1 a 50µl do produto de PCR e misturar bem. É importante que o volume do produto de PCR não exceda 100µl. Fazer a mistura, em caso de várias amostras, 1 a 1.
3. Colocar uma coluna Jetquick® spin num tubo de 2 ml.
4. Colocar a mistura da etapa 1 na coluna preparada. Centrifugar a mais de 12 000 ×g durante 1 minuto.
5. Descartar o sobrenadante.
6. Re-inserir a coluna no tubo vazio e adicionar 250µl da solução H2 reconstituída. Centrifugar a mais de 12 000 ×g durante 1 minuto.
7. Descartar o sobrenadante e colocar a coluna Jetquick® novamente no tubo vazio. Centrifugar na velocidade máxima durante 1 minuto. A solução residual H2 não será completamente removida a menos que o sobrenadante seja descartado antes desta centrifugação adicional. A solução H2 contém etanol, e o etanol residual pode interferir com as reacções subsequentes. A centrifugação adicional assegura que nenhum etanol residual é transportado para a próxima etapa do protocolo.
8. Colocar a coluna Jetquick® spin num novo tubo “eppendorf” de 1,5 ml e adicionar 25µl de água estéril (ou tampão TE ou 10mM Tris/HCl, pH 8,0) directamente no centro da matriz de sílica da coluna Jequick® spin. Centrifugar a mais de 12 000 ×g durante 2 minutos. Importante: podem-se obter maiores concentrações de ADN na eluição se a mesma se fizer com apenas 30µl de tampão de eluição. Neste caso, pré-

aquecer o tampão a 65-70°C, adicioná-lo directamente no centro da matriz de sílica da coluna e deixar repousar durante 1 minuto antes da centrifugação. Assegurar que o tampão de eluição é dispensado directamente na membrana de sílica. O pré-aquecimento do tampão é recomendado quando os fragmentos de PCR a eluir, são maiores que 5 kb.

9. O ADN eluído em água deverá ser armazenado a -20°C.