

**MAFALDA CRISTINA CARQUEJA LOBATO FERREIRA  
OLIVEIRA**

**Ocorrência de infeção por *Hepatozoon canis* em  
cães nos concelhos de Abrantes e Sardoal**

**Orientadora: Professora Doutora Ana Maria Munhoz**

**Co-orientadora: Professora Joana Fonseca**

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa**

**2018**

**MAFALDA CRISTINA CARQUEJA LOBATO FERREIRA  
OLIVEIRA**

**Ocorrência de infeção por *Hepatozoon canis* em  
cães nos concelhos de Abrantes e Sardoal**

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Mestre em  
Medicina Veterinária no Curso de Mestrado em Medicina  
Veterinária Conferido pela Universidade Lusófona de  
Humanidades e Tecnologias

**Presidente:** Prof<sup>ª</sup> Doutora Laurentina Pedroso

**Arguente:** Prof<sup>ª</sup> Doutora Carla Maia (IHMT)

**Orientador:** Prof<sup>ª</sup> Doutora Ana Maria Munhoz

**Vogal:** Prof<sup>ª</sup> Doutora Margarida Alves

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa**

**2018**

## Dedicatória

*Dedico este trabalho aos meus Pais e Irmã por nunca terem desistido de mim.*

*Ao Xuqui, o meu grande amor.*

*Ao Lord, o Amigo que me acompanhou nesta longa caminhada.*

*E por fim, ao meu querido Avó Tó, a minha estrela que me guiou durante estes seis anos dando-me força para me tornar numa neta que nunca viu crescer, mas certamente estará orgulhoso por mais tarde poder cuidar daquilo que para ele era o mais precioso, os Animais.*

*Obrigado a todos!*

## Agradecimentos

*Em primeiro lugar à professora Ana Maria, minha orientadora, por toda a ajuda que me deu ao longo de todo o percurso académico, conhecimentos transmitidos, disponibilidade e amabilidade.*

*À professora Joana Fonseca, minha co-orientadora por toda a ajuda e prontidão prestada.*

*À Doutora Mónica Nunes, pelo auxílio na identificação dos ixodídeos.*

*A toda a equipa do Hospital Veterinário do Arco do Cego, local de estágio, onde durante 4 meses foram a minha segunda família.*

*À Clínica Veterinária Vetilabe, a vossa ajuda foi sem dúvida a mais gratificante até aos dias de hoje, onde aprendi que com pouco se pode fazer muito.*

*Aos meus amigos que me acompanharam neste longo percurso académico, André Miranda, Catarina Simões, Catarina Silva, Daniela Serras, Diogo Antunes, Diogo Silva, Elga Goncalves, Inês Damas, Joana Jacinto, Joana Gomes, João Catarino, Madalena Carvalho, Margarida Serras, Miguel Vieira, Nelson Bugalho, Patrícia Cidade e Paulo Silva, a todos vós um grande obrigado.*

*Aos meus colegas de casa, de quem vou ter imensas saudades, em especial ao Afonso Caçador e à Mariana Vieira, nunca vou esquecer os momentos que passámos juntos, sem dúvida os melhores momentos que levo da cidade que me formou.*

*À Sandra Fernandes, uma amiga que me acompanhou ao longo de todo o percurso académico, amizade essa que nunca esquecerei por termos sido o apoio uma da outra em muitos momentos.*

*Ao André Rodrigues, meu namorado, por todo o apoio e incentivo durante o estágio e escrita deste trabalho.*

*À Ludovina, uma amiga que me deixou muito cedo mas que contribuiu muito na minha formação. Muito obrigado, sei que estejas onde estiveres estarás sempre a olhar por mim.*

*À minha família...*

*Mãe, por nunca teres deixado de acreditar que a realização deste meu sonho era possível, por cada palavra de incentivo e acima de tudo pela dedicação que desde o primeiro ano me deste, despendendo de muito do teu tempo para me ensinares, sem a tua força e apoio eu não teria chegado até aqui.*

*Pai, o Homem da minha vida, pelo apoio incondicional, amor e dedicação que me deste ao longo de todos estes anos. Obrigada por nunca me deixares desanimar e por seres, além de tudo, o meu melhor amigo.*

*Um grande obrigado a ambos por me terem dado esta oportunidade, graças a vocês poderei ser feliz em qualquer parte do Mundo a fazer aquilo que mais Amo.*

*Mana, a minha Melhor Amiga, obrigado por toda a ajuda, cumplicidade, conselhos transmitidos e acima de tudo por estares sempre presente em todos os momentos da minha vida. Espero futuramente ser tão profissional como tu sempre foste. Gosto muito de ti.*

*Tios, um grande obrigado a vocês por tudo o que fizeram por mim desde que nasci contribuindo para a minha educação e formação. Acompanharam o meu crescimento a nível pessoal, espero que agora acompanhem igualmente todo o meu percurso profissional. E Mimi, não me esqueço da nossa ideia que futuramente vamos colocar em prática.*

*Primos, os meus melhores amigos, companheiros de muitas aventuras e viagens, espero nunca vos falhar durante todo o vosso percurso académico e pessoal como vocês nunca me falharam. Obrigado por todo o vosso apoio.*

*Avós, meus eternos protetores, não me esquecerei nunca de vocês, nem dos momentos em que o passar de uma semana longe de casa pareciam meses e o sabor das bolachas e das maçãs que vocês que me davam atenuavam as saudades de casa e diminuam a distância.*

*Teresa e José Carlos, um enorme obrigado por toda a ajuda que deram aos meus pais e por tudo o que fizeram por mim.*

*Avo Tó, onde quer que estejas espero que estejas orgulhoso de mim. Prometo lutar pelo que te prometi.*

*Aos meus amigos que fizeram parte da minha vida, Alex, Flipper, Jack, Jamón, Marta, Mafalda, Mauzi, Nico, Óscar, Poli, Riscas, Snoopy Twee, Kitty, Xuqui, espero que estejam orgulhosos da vossa dona.*

*Ao Balu, Blacky, Bernardo, Bias, Bruno, Buddy, Cacau, Channel, Doris, Gucci, Kiko, Lord, Martinho, Mel, Mumu, Natal, Prada, Rucky, Sasha, Simba, Lu, e Tobias obrigado por existirem e tornarem a minha vida melhor.*

*A todos que aqui não mencionei, mas que de alguma forma contribuíram na conclusão deste trabalho. Muito obrigada.*

## Resumo

O agente da hepatozoonose é transmitido por artrópodes, que acomete principalmente os carnívoros domésticos e silvestres. Semelhante a outras doenças transmitidas por vetores (DTV), a distribuição da hepatozoonose está dependente dos seus hospedeiros definitivos e vetores. No entanto esta é diferente na forma de transmissão, onde é necessária a ingestão de uma carraça ixodídea contendo esporozoítos infectantes.

Este estudo teve como objetivo detetar infecções por *H. canis* por meio de esfregaços sanguíneos de cães no distrito de Santarém, nomeadamente nos concelhos de Abrantes e Sardoal, assim como identificar as espécies de ixodídeos que parasitavam os hospedeiros.

Foram recolhidas 75 amostras sanguíneas para a realização de esfregaços com posterior análise microscópica, onde foi observada a prevalência de 8% de animais parasitados por *H. canis*.

Quanto à presença de ixodídeos, foram observados em 28 (37%) animais e destes, 18 (24%) apresentavam mais do que um exemplar. Foram recolhidos um total de 177 ixodídeos, onde foram identificadas 2 espécies: *Rhipicephalus sanguineus* e *Ixodes ricinus*.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, observa-se que os concelhos de Abrantes e do Sardoal apresentam condições climáticas favoráveis à presença dos vetores, assim como a disseminação de *H. canis*.

Este estudo pretende dar uma contribuição para a sensibilização dos tutores e médicos veterinários para a importância da doença e o controlo dos vetores.

**Palavras chave:** Carraças, Cães, *Hepatozoon canis*, *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus sanguineus*

## Abstract

The agent of Hepatozoonosis is transmitted by arthropods, which mainly affects domestic and wild carnivores. Similar to other vector-borne diseases (VBD), the distribution of hepatozoonosis is dependent on its definitive hosts and vectors. However, this is different in the form of transmission, where it is necessary the ingestion of an ixodidae tick containing infectious sporozoites.

This study aimed to detect *H. canis* infections through blood smears of dogs, in the Santarém district, namely in the Abrantes and Sardoal counties, as well as to identify the species of ticks that parasitized the hosts.

Seventy-five blood samples were collected for smears with subsequent microscopic analysis, where the prevalence of 8% of *H. canis* parasitized animals was observed.

As to the presence of ticks, 28 (37%) animals were parasited in witch 18 (24%) presented more than one specimen. A total of 177 ticks were collected, and 2 species were identified: *Rhipicephalus sanguineus* and *Ixodes ricinus*.

According to the results obtained in this study we can conclude that the counties of Abrantes and Sardoal provide climatic conditions favorable to the presence of the vectors, as well as the dissemination of *H. canis*.

This study aims to aware owners and veterinarians to the importance of the disease and the control of vectors

**Key words:** Ticks, Dogs, *Hepatozoon canis*, *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus sanguineus*

## Índice

Capítulo I.....	1
1. Casuística do estágio curricular .....	1
1.1 Organização do estágio curricular .....	1
1.2 Atividades desenvolvidas .....	1
1.3 Dados estatísticos da casuística observada .....	2
Capítulo II .....	5
1. Introdução.....	5
Revisão bibliográfica.....	7
2. <i>Hepatozoon canis</i> .....	7
2.1 Agente etiológico.....	7
2.2 Distribuição geográfica.....	8
2.3 Epidemiologia.....	9
Ciclo biológico .....	10
2.4 Transmissão.....	12
2.5 Patogenia.....	12
2.6 Sinais clínicos .....	14
2.7 Diagnóstico .....	15
2.8 Tratamento e profilaxia .....	17
2.9 Importância Zoonótica .....	19
3. Vetores ixodídeos .....	20
3.1 Morfologia das carraças .....	20
3.2 Taxonomia .....	23
3.3 Ciclo biológico dos ixodídeos.....	24
3.3.1 Ciclo biológico de três hospedeiros .....	26
3.3.2 Ciclo biológico de dois e um hospedeiro .....	28
3.4 Zoonoses transmitidas por carraças .....	29
3.5 Influência das condições climáticas na distribuição dos ixodídeos .....	31
3.6 Diagnóstico .....	33
3.7 Sinais clínicos .....	33
3.8 Remoção de carraças.....	34
3.9 Prevenção e controlo.....	34
4. Objetivos.....	35
5. Materiais e métodos .....	36
5.1 Área geográfica do estudo.....	36

5.1.1 Concelho de Abrantes .....	37
5.1.2 Concelho do Sardoal .....	38
5.2 Clima .....	39
5.3 Caracterização da amostra.....	40
5.4 Critérios de inclusão .....	41
5.5 Colheita e processamento das amostras.....	42
5.5.1 Realização de esfregaço sanguíneo .....	42
5.5.2 Coloração com Giemsa .....	43
5.5.3 Colheita e armazenamento das carraças ixodídeas .....	44
6 Resultados .....	45
6.1 Esfregaços sanguíneos.....	45
6.2 Outros parasitas sanguíneos observados.....	47
6.3 Parasitismo por ixodídeos .....	49
7. Discussão .....	50
8. Conclusões.....	53
9. Referências bibliográficas.....	55
10. Anexos.....	71

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Evolução de tratamento a um gato com uma dermatite causada por uma otite por ácaros.....	3
<b>Figura 2.</b> Alimentação por sonda esofágica em uma gata com Lipidose Hepática .....	4
<b>Figura 3.</b> Prolapso rectal em um gato juvenil.....	4
<b>Figura 4.</b> Distribuição geográfica de <i>Hepatozoon canis</i> .....	8
<b>Figura 5.</b> Ciclo de vida de <i>Hepatozoon</i> spp.....	11
<b>Figura 6.</b> Gamontes de <i>H. canis</i> em esfregaço sanguíneo de cão.....	15
<b>Figura 7.</b> Classificação taxonómica das carraças.....	23
<b>Figura 8.</b> Ciclo de vida de 3 hospedeiros.....	26
<b>Figura 9.</b> Ciclo de vida de 1 hospedeiro.....	28
<b>Figura 10.</b> Mapa de Portugal Continental.....	36
<b>Figura 11.</b> Concelhos do Distrito de Santarém .....	36
<b>Figura 12.</b> Freguesias do concelho de Abrantes .....	37
<b>Figura 13.</b> Freguesias do concelho do Sardoal sob estudo assinaladas com circunferências.....	38
<b>Figura 14.</b> Evolução diária da temperatura do ar de 1 a 31 de agosto.....	39
<b>Figura 15.</b> Canídeos parasitados com ixodídeos .....	41
<b>Figura 16.</b> Método de elaboração de um esfregaço sanguíneo .....	42
<b>Figura 17. (A)</b> Esfregaço sanguíneo; <b>(B)</b> Esfregaço sanguíneo corado com Giemsa.....	43
<b>Figura 18.</b> Amostras de Ixodídeos identificados e conservadas em álcool a 70% .....	44
<b>Figura 19.</b> Gamonte de <i>H. canis</i> em esfregaço sanguíneo de cão .....	45
<b>Figura 20.</b> Microfilária.....	47
<b>Figura 21. (A)</b> <i>Rhipicephalus sanguineus</i> fêmea à esquerda e macho à direita; <b>(B)</b> <i>Rhipicephalus sanguineus</i> Ninfa, notando-se a ausência do poro genital; <b>(C)</b> <i>Ixodes ricinus</i> fêmea, notando-se a abertura do poro genital junto a quarta pata e a presença de um longo sulco anal divergente.....	49

## Índice de gráficos

<b>Gráfico 1.</b> Distribuição dos casos acompanhados por espécie animal.....	2
<b>Gráfico 2.</b> Distribuição da casuística observada por especialidade em cães e gatos.....	4

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Sistemática das espécies de Ixodidae existentes em Portugal e os seus Hospedeiros preferenciais .....	32
<b>Tabela 2.</b> Dados dos animais parasitados com <i>Hepatozoon canis</i> .....	46
<b>Tabela 3.</b> Dados dos animais parasitados com Microfilárias .....	48

## Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

***B. burgdorferi*** – *Borrelia burgdorferi*

***B. burgdorferi sensu stricto*** - *Borrelia burgdorferi sensu stricto*

***D. marginatus*** – *Dermacentor marginatus*

**DAPP** - Dermatite Alérgica a picada de pulga

**DTV** – Doenças transmitidas por vetores

**CEDVI** - Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas

***E. canis*** – *Ehrlichia canis*

**FeLV** – Vírus da leucemia felina

**Fiv** – Vírus da imunodeficiência felina

***H. americanum*** – *Hepatozoon americanum*

***H. canis*** – *Hepatozoon canis*

***H. marginatum*** – *Hyalomma marginatum*

***H. punctata*** – *Haemaphysalis punctata*

**HVAC** - Hospital Veterinário do Arco do Cego

***I. ricinus*** – *Ixodes ricinus*

***R.sanguineus*** – *Rhipicephalus sanguineus*

**SIRA** – Sistema de Identificação e Recuperação Animal

## **Capítulo I**

### **1. Casuística do estágio curricular**

#### **1.1 Organização do estágio curricular**

O estágio curricular, incluído no âmbito do plano de estudos do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, foi realizado na área de Clínica de Animais de Companhia, no Hospital Veterinário do Arco do Cego (HVAC). O período de estágio teve a duração de quatro meses com início a 28 de agosto de 2017 e término a 29 de dezembro de 2017.

#### **1.2 Atividades desenvolvidas**

As atividades do estágio curricular foram desenvolvidas em três períodos diários onde foi realizado o acompanhamento sistemático destas. No período da manhã era realizada a passagem de casos dos pacientes internados, exame físico dos animais e preparação dos pacientes a serem submetidos a cirurgias onde era possível acompanhar a monitorização anestésica durante os procedimentos.

No horário intermédio, foram realizados acompanhamentos de cirurgias realizadas por especialistas e consultas médicas, sendo as mais comuns de medicina preventiva.

No horário da noite, eram realizadas actividades auxiliares de administração das medicações, monitorização dos pacientes internados, alimentação e passeio dos animais que possuíam capacidades físicas para locomoção.

O HVAC possuía uma elevada casuística sendo possível acompanhar diversos procedimentos como, a realização detalhada de exames físicos, contenção de pacientes politraumatizados, colocação de catéteres venosos centrais e intra-ósseos em neonatos, colocação de sondas nasogástricas e esofágicas, aplicação de microchips e posterior introdução dos dados no SIRA, administração de soro subcutâneo em doentes renais, colheitas de sangue, realização e interpretação de meios de diagnóstico laboratoriais (hemogramas, bioquímicas séricas, microhematócritos, leitura de tiras de urina, medição da glicémia, leitura da densidade urinária em cães e gatos) e quando se justificava preenchimento de requisições para posterior envio para outros laboratórios, aplicação de agrafos em feridas e ainda interpretação de testes rápidos de Leishmaniose, Parvovirose, FIV e FeLV e posterior discussão dos resultados e tratamentos a realizar com toda a equipa médica.

Na área laboratorial era realizada a observação por microscopia ótica de esfregaços sanguíneos, sedimentos urinários, citologias auriculares e aspirativas.

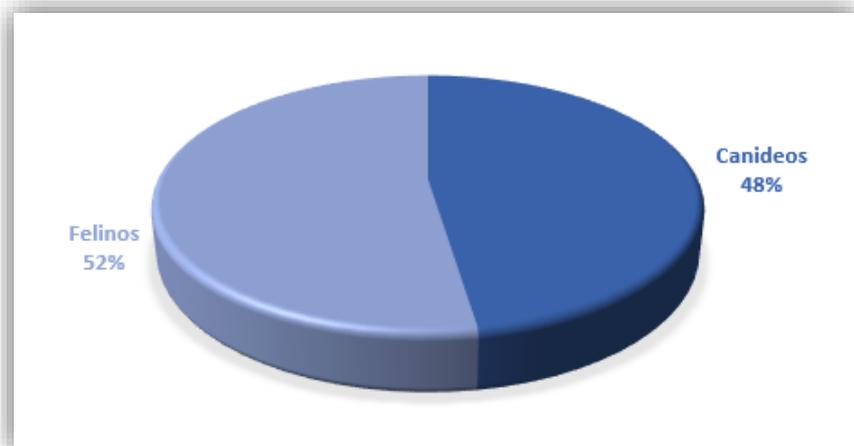
Quanto aos meios complementares de diagnóstico, foram realizadas interpretação de exames como ecografias abdominais e torácicas, radiografias digitais, ecocardiogramas e ainda exames oftalmológicos com recurso a um oftalmoscópio.

Na área da oftalmologia foi possível assistir a uma formação de produtos para animais de companhia do laboratório VAPP sobre os seus novos produtos e para que tipo de doenças se destinavam.

### 1.3 Dados estatísticos da casuística observada

Durante o estágio no Hospital Veterinário do Arco do Cego, foram observados 246 animais, sendo 52% felinos e 48% canídeos (Gráfico 1).

Esta percentagem corrobora com um estudo realizado pelo Grupo Marktest onde refere que a presença de cães e gatos nos lares nacionais têm vindo a aumentar nos últimos oito anos, onde a adoção de gatos foi a que mais cresceu, tendo sido registado um aumento de 23,8% em 2008 para 28,4 % em 2016 e ainda pelo facto do Hospital se localizar numa área urbana onde o número de prédios é superior ao número de moradias levando os residentes a adotarem com maior facilidade gatos ao invés de cães.



**Gráfico 1.** Distribuição dos casos acompanhados por espécie animal

A distribuição da casuística por especialidade nas duas espécies (Gráfico 2) revelou uma maior incidência na área da medicina preventiva, onde foram observadas 21 consultas de cães e 30 gatos, perfazendo uma frequência relativa de 21% dos casos observados (Anexo 1). A medicina preventiva, área de grande interesse na prática da Medicina Veterinária, trata-se de um ponto-chave na Saúde Animal e na Saúde Pública. Neste âmbito inclui procedimentos médicos como a imunização ativa, desparasitação interna e externa e identificação eletrónica.

A segunda área com maior incidência foi a área de gastroenterologia que corresponde a 12 % de casos observados. Nesta área, 9 foram cães e 21 foram gatos (Anexo 1), sendo que a maioria dos casos estavam relacionados com ingestão de corpos estranho, fecalomas, gastroenterites, casos de lipidose hepática (Figura 2), pancreatites e ainda um caso de prolapsos rectais por parasitismo em neonatos (Figura 3).

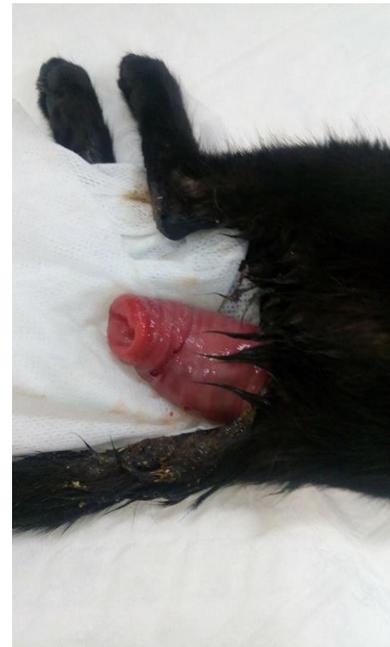
As doenças renais foram observadas em 2 cães e 18 gatos; as doenças infecciosas em 9 cães e 9 gatos e doenças dermatológicas em 11 cães e 3 gatos (Figura 1), perfazendo assim uma frequência relativa de 8%, 7% e 6%, respetivamente (Anexo 1).



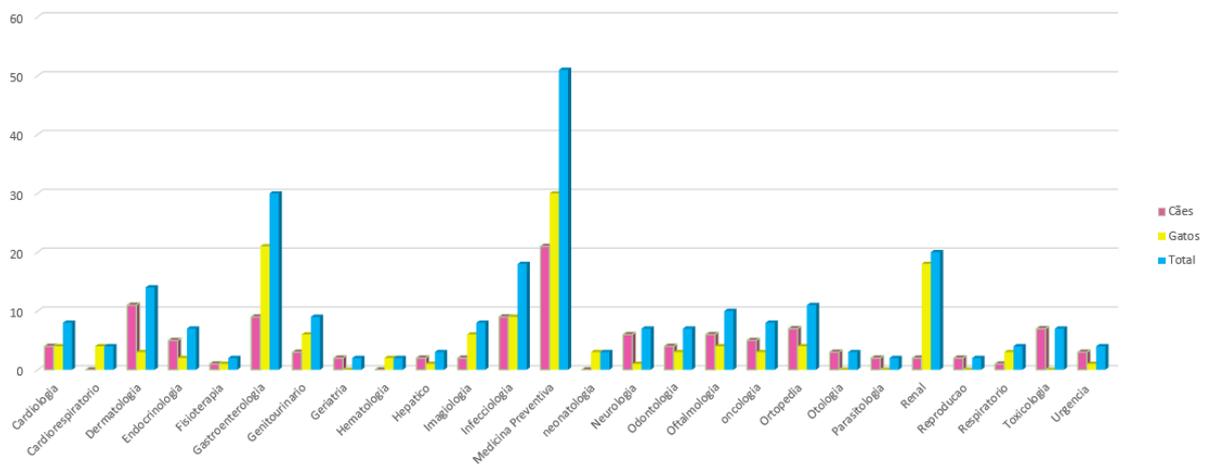
**Figura 1:** Evolução do tratamento de um gato com uma dermatite causada por uma otite por ácaros (Original do autor)



**Figura 2:** Alimentação por sonda esofágica em uma gata com Lipidose Hepática (Original do autor)



**Figura 3:** Prolapso rectal em um gato juvenil (Original do autor)



**Gráfico 2.** Distribuição da casuística observada por especialidade em cães e gatos.

## Capítulo II

### 1. Introdução

As doenças transmitidas por vetores (DTV) (carraças, flebótomos, mosquitos e pulgas) são causadas por bactérias, parasitas e vírus (Beugnet & Marié, 2009; Vilhena *et al.*, 2013). Muitos destes agentes patogénicos são emergentes e/ou reemergentes e alguns apresentam potencial zoonótico, representando também um problema de saúde pública (Beugnet & Marié, 2009; Vilhena *et al.*, 2013).

A frequência das DTV têm vindo a aumentar na Europa em consequência do aumento da densidade populacional, distribuição geográfica e capacidade vetorial de alguns artrópodes na disseminação de agentes patogénicos. Os principais fatores responsáveis por esta emergência são as alterações climáticas, as quais têm um impacto direto nas populações de artrópodes, o aumento da mobilidade do Homem e dos animais domésticos (para vários países do mundo), a criação de parques, barragens e lagos artificiais dentro de centros urbanos e ainda o aumento da prática de atividades ao ar livre, promovendo assim um maior contacto com os vetores (Shaw, 2008; Beugnet & Marié, 2009; Harrus *et al.*, 2011; Vilhena *et al.*, 2013).

Entre as DTV, a Hepatozoonose canina é uma das doenças importantes a nível mundial e com emergência em diversas partes do mundo. Assim, é essencial identificar e combater os vectores da doença nas diversas áreas geográficas, uma vez que o sucesso do tratamento depende da rapidez de ação por parte dos clínicos.

A hepatozoonose canina não possui sintomas claramente definidos, sendo as infecções por *Hepatozoon canis* difíceis de serem identificadas; as manifestações clínicas podem variar desde inaparentes a severas e a doença geralmente está associada a outras patologias imunossupressoras ou é confundida com outras hemoparasitoses.

A hepatozoonose canina é causada pelo protozoário do género *Hepatozoon* spp. que parasita os leucócitos do hospedeiro. Ao contrário da maioria das outras doenças transmitidas por carraças, o protozoário *Hepatozoon* spp. é transmitido para os hospedeiros através da ingestão de uma carraça infectada (Almosny, 2002).

Os gatos podem ser infectados com *Hepatozoon* spp., porém não há um entendimento claro até o momento das espécies envolvidas. Hepatozoonose canina não é considerada zoonose.

Em Portugal, a informação sobre a Hepatozoonose canina é escassa, sobretudo por ser a deteção de animais positivos achados ocasionais. Neste estudo, embora tenha o objectivo de identificar animais portadores apenas por realização de esfregaços sanguíneos, vem dar uma contribuição para o seu estudo em cães na região centro do país.

Sendo os vectores objecto de grande interesse, foi proposto para este trabalho verificar a ocorrência e identificação das espécies ixodídeas recolhidas em canídeos e que futuramente possam ser alvo de estudos moleculares para a pesquisa da presença deste agente etiológico e outros eventualmente presentes.

A vantagem da realização de estudos epidemiológicos sobre ixodídeos permite verificar a sua distribuição (Sonenshine, 1993; Talleklint-Eisen e Lane 2000) e avaliar a presença ou ausência de novas espécies numa determinada área, assim como prever a ocorrência de uma doença (Barral *et al* 1993; Bullova *et al.*, 2009). Também a aquisição de animais (Burridge e Simmons, 2003; Kenny *et al.*, 2004) ou a passagem de aves migratórias (Hoogstraal *et al.*, 1961; Miyamoto *et al.*, 1993; Ogden *et al.*, 2008) são fatores determinantes para a introdução de novas espécies de ixodídeos, com o conseqüente risco de aparecimento de novas doenças por eles transmitidas.

O estudo dos artrópodes e das doenças por eles transmitidas é importante também pelo facto de algumas das doenças serem importantes zoonoses como a *Borreliose*, *Rickettsiose* e *Bartonellose*. (ESCCAP, 2012).

## Revisão bibliográfica

### 2. *Hepatozoon canis*

#### 2.1 Agente etiológico

O género *Hepatozoon* pertence ao reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Conoidasida, ordem Adeleorina, família Hepatozoidae (Taylor *et al.*, 2016).

A primeira descrição do género *Hepatozoon* foi realizada por Bentley na Índia em 1905, durante um exame das células polimorfonucleares de cães. No mesmo ano, também na Índia, James observou os protozoários no citoplasma de leucócitos de sangue periférico de seis cães e classificou-os como *Leucocytozoon canis*. Em 1910, ao rever os comentários de Bentley e James, Wenyon sugeriu a substituição do género *Leucocytozoon* por *Hepatozoon* (Greene, 2006; Rahmani Amoli *et al.*, 2012).

A doença é transmitida por artrópodes e acomete principalmente os carnívoros domésticos e silvestres (Baneth *et al.*, 2000; Rubini *et al.*, 2008), porém mais de 300 espécies do género *Hepatozoon* têm sido descritas em anfíbios, répteis, pássaros, marsupiais e mamíferos. Destas, cerca de 50 espécies foram reportadas em mamíferos (Mathew *et al.*, 2000). Nos anfíbios, répteis e aves pode-se encontrar os gamotes nos eritrócitos enquanto que nos mamíferos estes são observados nos leucócitos, mais comumente nos neutrófilos e monócitos (Baneth, 2006).

Duas espécies são reconhecidas como causadoras de doenças em cães: *Hepatozoon canis* e *Hepatozoon americanum*.

*Hepatozoon canis* é um parasita que afeta cães em várias regiões tendo sido observada alta prevalência na África, Ásia e sul da Europa, enquanto *H. americanum* infecta cães no sul dos Estados Unidos (Baneth & Shkap, 2003).

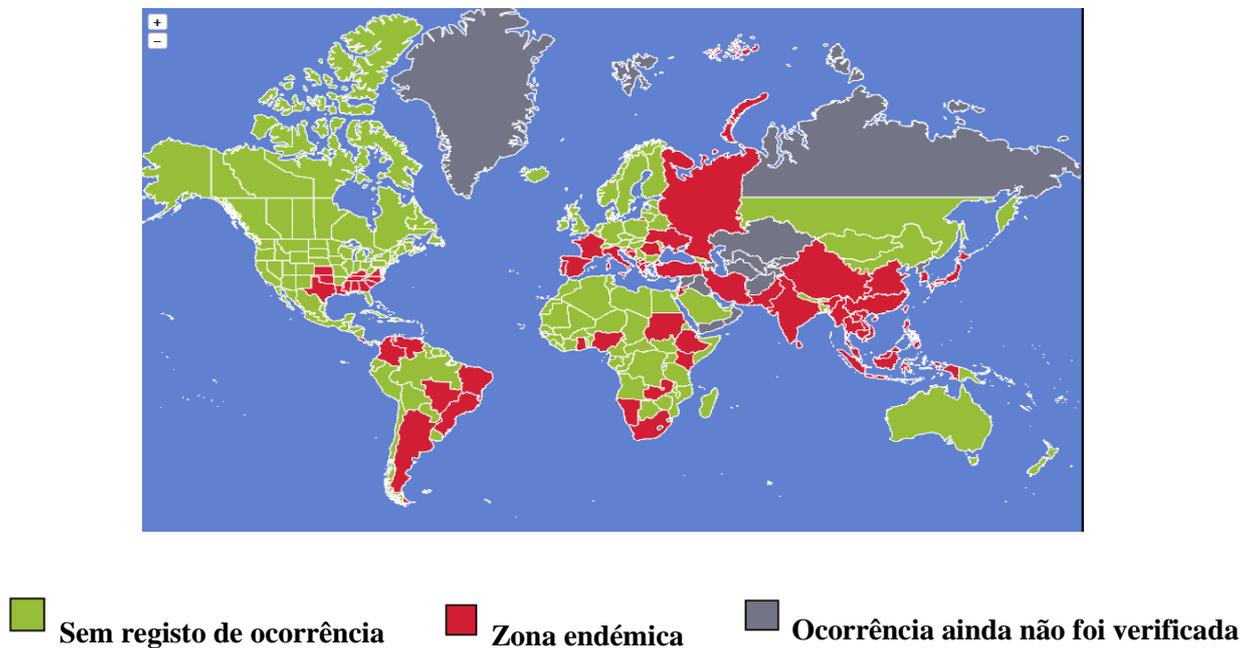
Até 1997 pensava-se que apenas o ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus* era responsável pela transmissão do protozoário *Hepatozoon canis* (Craig *et al.*, 1978); no entanto Murata e os seus colaboradores (1995) apontaram *Haemaphysalis longicornus* e *Haemaphysalis flavas* como potenciais vetores.

Contudo, no golfo do Texas nos E.U.A., verificou-se ser outra espécie a parasitar os canídeos, *Hepatozoon americanum*, transmitida pelo vector *Amblyomma maculatum* (Baneth *et al.*, 2000; Craig *et al.*, 1978; Mathew *et al.*, 1998).

## 2.2 Distribuição geográfica

Semelhante a todos os agentes patogénicos que têm como vetores os artrópodes, a distribuição da hepatozoonose está estreitamente vinculada à presença destes vetores. O principal vetor de *H. canis* é o ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus*, encontrado em regiões tropicais, subtropicais e temperadas tornando potencial a distribuição mundial deste protozoário (Baneth *et al.*, 2003).

A infecção em cães já foi descrita em países no sul da Europa como em Portugal (Conceição *et al.*, 1988; Alexandre, 2005), Grécia (Kontos & Koutinas, 1991), Itália (Gavazza *et al.*, 2003), França (Rioux *et al.*, 1964) e Espanha (Baneth, 2006); no Oriente Médio e em Israel (Voyvoda *et al.*, 2004), Egito (Baneth, 2006) e Turquia (Karagenc *et al.*, 2006); na África foi descrito na África do Sul (McCully *et al.* 1975), Nigéria (Ezekoli *et al.*, 1983) e Sudão (Oyamada *et al.*, 2005); na Ásia, Índia (Baneth, 2006), Sri Lanka, Singapura (Baneth, 2006), Malásia (Rajamanickam *et al.*, 1985), Tailândia (Jittapalapong *et al.*, 2006) e Japão (Murata *et al.*, 1991); na América do Sul, no Brasil (Massard, 1979; Gondin *et al.*, 1998) e na Argentina (Eiras *et al.*, 2007) (Figura 4).



**Figura 4.** Distribuição geográfica de *Hepatozoon canis* (Adaptado de Companion Vector-Borne Diseases [CVBD], 2018, <http://www.cvbd.org/en/occurrence-maps/world-map/>)

Existe a possibilidade de que as doenças parasitárias transmitidas estejam a ser emergentes ou introduzidas em regiões até então livres. A distribuição geográfica de alguns vetores está a expandir-se cada vez mais devido às mudanças nas condições climáticas e ecológicas, facilitando a introdução de organismos patogénicos em outras regiões (Gavazza *et al.*, 2003).

### 2.3 Epidemiologia

A prevalência de infeções por *H. canis* em diferentes regiões do mundo varia consideravelmente, sendo observada principalmente em regiões de clima temperado, tropical e subtropical, onde se encontra a maior ocorrência dos ixodídeos (Baneth, 2007; Baneth, 2011).

Em Portugal foram realizados estudos através de esfregaços de sangue periférico de canídeos e raposas onde os autores observaram a prevalência de 3% em canídeos domésticos e 48% em raposas (Conceição *et al.*, 1988). Outro estudo realizado na região do Algarve também recorrendo ao uso de esfregaços sanguíneos, os autores identificaram a prevalência da infecção em 1,8% dos cães, (Alexandre, 2005).

Com a utilização de técnicas moleculares, também em Portugal foram realizados estudos através da técnica de PCR, Figueiredo (2007) realizou um estudo onde obteve 2,1% de prevalência de cães infetados, em 2013 Vilhena e seus colaboradores obtiveram 15,6% de prevalência em gatos e em 2014, Cardoso e seus colaboradores obtiveram 75,6% de prevalência em raposas.

No Sul de Itália, foi realizado um estudo por Otranto e colaboradores (2011) onde utilizaram uma combinação de testes citológicos e moleculares onde detetaram a infecção por *H. canis* em 59% (49/83) da população canina jovem (menos de 18 meses de idade) em animais alojados num canil.

Infeções por *H. canis* já foram diagnosticadas em muitos países da América do Sul, como Argentina (Eiras *et al.*, 2007), Brasil (Massard, 1979; Mundim *et al.*, 1992; O'Dwyer *et al.*, 2001; Rubini *et al.*, 2005) e na Colômbia (Ardila *et al.*, 2007).

Massard (1979) realizou o primeiro estudo epidemiológico onde descreveu a presença de *H. canis* no Brasil, usando como método de diagnóstico os esfregaços sanguíneos, obtendo uma prevalência de infecção em 31.58% em cães que viviam em áreas rurais e 4.48% em cães que viviam em áreas urbanas.

Também no Brasil, Rubini *et al.* (2008) realizaram um estudo molecular por esfregaços sanguíneos para detecção de *H. canis* em 150 cães de áreas rurais do estado de São Paulo; através de esfregaços sanguíneos e PCR obtiveram os seguintes resultados: 17

(11,3%) foram positivos pela análise de esfregaços sanguíneos, enquanto 80 (53,3%) foram positivos pela técnica de PCR

No estado do Espírito Santo, também no Brasil, foi observada por Spolidorio *et al.* (2009) uma prevalência de *H. canis* muito significativa em animais aparentemente saudáveis (58,7% (54/92)) através de PCR. Neste estudo não houve correlação significativa ( $p > 0,05$ ) entre cães de áreas urbanas e rurais.

Os diferentes trabalhos publicados no Brasil revelaram que *H. canis* está presente em todas as regiões, sendo a sua prevalência muito variável, dependendo da região, da origem dos animais, ou seja, se os cães são de áreas rurais ou urbanas, e da metodologia de diagnóstico utilizada, se esfregaços de sangue ou PCR.

Estes estudos também indicaram que o parasita não discrimina entre os sexos ou grupos etários e está associado à infestação por carraças, sugerindo que a infecção é mais comum em cães de áreas rurais, embora alguns cães urbanos também foram encontrados infectados (O'Dwyer, 2011).

Em outras partes do mundo como África e Ásia também foram realizados estudos por meio de PCR, como na Nigéria, obtendo-se a prevalência de 22% dos cães examinados (Ezekoli *et al.*, 1983); na Malásia de 1% (Rajamanickam *et al.*, 1985); no Sudão de 42,3% (Oyamada *et al.*, 2005); na Tailândia (Bangkok) de 11,4% (Jittapalapong *et al.*, 2006), e na Turquia a prevalência de infecções por *Hepatozoon* spp. foi de 25,8% (Karagenc *et al.*, 2006).

### **Ciclo biológico**

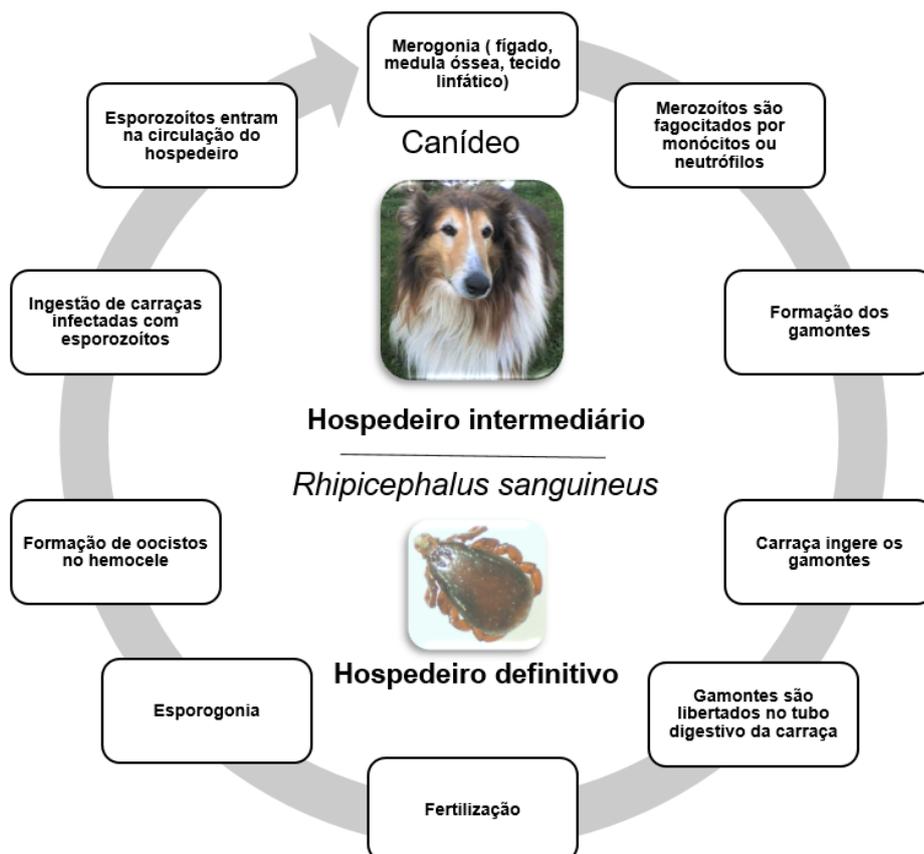
O ciclo de vida do *Hepatozoon* spp. é heteroxeno (Urquhart *et al.*, 1996; Vilcins *et al.*, 2009) e apresenta duas fases de reprodução, uma assexuada e uma sexuada. A fase assexuada ocorre no hospedeiro vertebrado que é o hospedeiro intermediário (anfíbios, mamíferos, pássaros e répteis) e inclui a merogonia seguida de gametogonia, enquanto a reprodução sexuada seguida de esporogonia ocorre no hospedeiro invertebrado (hospedeiro definitivo) ubiqüitários tais como carraças e insetos (Urquhart *et al.*, 1996; Baneth, 2011; Giannitti *et al.*, 2012).

*Hepatozoon canis* parasita neutrófilos e monócitos dos hospedeiros intermediários (Baneth, 2003). No ciclo biológico de *Hepatozoon* spp. os hospedeiros definitivos são as carraças ixodídeas dos géneros *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma* spp., nos quais ocorre a esporogonia (Baneth, 2011). Os cães e outros mamíferos são considerados hospedeiros intermediários e infetam-se pela ingestão destas carraças contendo oocistos com esporozoítos infetantes (Baneth *et al.*, 2003).

A fase assexuada inicia-se após a ingestão da carraça infetada com esporozoítos. Estas formas atravessam o epitélio do tubo digestivo do hospedeiro vertebrado e alcançam o sistema porta, chegando ao fígado, pulmões, baço, medula óssea, rins e linfonodos onde se multiplicam por esquizogonia ou merogonia. Os merozoítos formados nos tecidos são fagocitados por monócitos ou neutrófilos evoluindo até gamontes; estas formas são encontradas no sangue dos cães e são ingeridas pelas carraças, nas quais ocorre a fase sexuada do ciclo (esporogonia) (Baneth & Shkap, 2003). Os gamontes de *H. canis* são libertados no tubo digestivo da carraça, e após fertilização, ocorre a esporogonia com a formação de oocistos no hemocele ( Figura 5).

Os oocistos são grandes formas esféricas que consistem numa membrana que envolve inúmeros esporocistos com esporozoítos (Baneth,2003).

A perpetuação do ciclo do parasita ocorre quando um novo hospedeiro vertebrado ingere o vetor infetado (Baneth, 2011).



**Figura 5.** Ciclo de vida de *Hepatozoon* spp. (Original do autor)

## 2.4 Transmissão

Ao contrário da maior parte dos agentes patogénicos transmitidos por ixodídeos, em que a transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo do vetor (neste caso hospedeiro definitivo), a transmissão de *Hepatozoon* spp. para o hospedeiro vertebrado (hospedeiro intermediário) implica a ingestão do artrópode vetor.

A forma mais comum dos cães tornarem-se infetados é a ingestão dos ixodídeos presentes no pêlo ou da ingestão de ervas contendo estes vetores (Baneth *et al.*, 2003).

A transmissão de *H. canis* ocorre pela ingestão da carraça contendo oocistos maduros com esporozoítos infetantes, sendo a transmissão transplacentária menos frequente (Baneth *et al.*, 2003).

Após a ingestão das carraças infetadas, os esporozoítos invadem as células mononucleares e disseminam-se pela via sanguínea ou linfática para diferentes órgãos ou vísceras dos hospedeiros vertebrados. Os hospedeiros definitivos tornam-se infetados com gamontes de *Hepatozoon* ao ingerirem sangue com leucócitos infetados do hospedeiro vertebrado (Baneth, 2011).

Normalmente é no estadio de ninfa que *R. sanguineus* adquire os gamontes circulantes no sangue do hospedeiro vertebrado infetado e passam o parasita transestadialmente quando é feita a muda (de ninfa para a forma adulta). Até ao momento ainda não foi descrita a transmissão transovárica, ou seja, da carraça adulta fêmea para novas gerações (Baneth, 2006a).

## 2.5 Patogenia

A infecção por *Hepatozoon canis* é subclínica na maior parte dos casos, mas pode se manifestar desde uma doença leve, a debilitante e fatal. Trata-se de um agente oportunista, sendo a patogenia influenciada por situações de baixa imunidade dos hospedeiros vertebrados (Baneth, 2011).

Os esporozoítos presentes nas carraças que são ingeridas pelos canídeos, quando são libertados no intestino do hospedeiro, penetram na parede intestinal e através do sistema circulatório migram para os órgãos hemolinfáticos como o baço, a medula óssea e os linfonodos. Achados histopatológicos nos casos de elevados níveis de parasitémia incluem hepatite, pneumonia e glomerulonefrite associadas com intensiva merogonia nos tecidos hemolinfáticos (Baneth, 2003).

De acordo com O'Dwyer e colaboradores (2001), a patogenicidade e manifestações clínicas da infecção por *H. canis* varia de acordo com a idade do hospedeiro, grau de infecção

e associação com outras doenças. Enquanto a infecção por *H. canis* geralmente é subclínica, aquela causada por *H. americanum* normalmente é fatal (Rubini *et al.*, 2005).

*H. canis* é geralmente considerado um agente oportunista, sendo a patogenia da doença influenciada por situações de imunossupressão, induzida por doenças concomitantes ou por tratamentos imunossupressores em situações em que o sistema imunitário ainda é imaturo (animais jovens). A imunodepressão desempenha um papel importante na progressão da parasitemia em cães, onde o aumento do número de gamontes em circulação provavelmente reflete uma maior produção e libertação de merozoítos dos merontes teciduais seguido da entrada dos parasitas nos leucócitos, ou uma diminuição na eliminação dos parasitas por parte dos neutrófilos (Baneth *et al.*, 1997). Além disto, neutrófilos parasitados são mieloperoxidase deficientes, o que pode ser responsável por uma resposta insatisfatória por parte do hospedeiro, pois estes quando infetados perdem algumas de suas características típicas como por exemplo a presença de diversas pequenas vesículas, poucos grânulos citoplasmáticos, poucos retículos endoplasmáticos rugosos e mitocôndrias, além da perda de algumas enzimas (Murata *et al.*, 1993a). Esta disfunção dos leucócitos leva os animais a tornarem-se mais suscetíveis a infecções sistêmicas e recorrentes, que podem ser responsáveis pela febre associada à hepatozoonose (Ibrahim *et al.*, 1989). Alencar e colaboradores (1997) observaram que os neutrófilos infetados numa raposa vermelha apresentavam degeneração nuclear e dimensões maiores que os neutrófilos não parasitados.

A anemia é a alteração hematológica mais frequente; em casos de elevada parasitemia, é geralmente acompanhada por uma intensa neutrofilia. É comum ainda observar hipertermia, letargia, perda de peso, hiperproteinémia, hiperglobulinémia, hipoalbuminémia, aumento da creatinina cinase e da fosfatase alcalina, esplenomegália, hepatomegália, linfadenomegália, hepatite, pneumonia intersticial e glomerulonefrite. Ainda que raro, já foram documentadas periostite e dor muscular (Baneth, Harmelin & Presentey, 1995; Baneth & Weigler, 1997; Baneth, 2006; Marchetti, Lubas, Baneth, Modenato & Mancianti, 2009; Baneth, 2011).

A ocorrência de co-infecções com *H. canis* com outros agentes foi observada em vários estudos sendo os mais frequentes *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli*, *Babesia canis* *Anaplasma phagocytophilum* (Baneth, 2011).

Variados estudos mostraram que tanto machos como fêmeas adultas da espécie *R. sanguineus* podem abrigar oocistos de *Hepatozoon canis* e desta forma são potencialmente infetantes para os cães (Baneth *et al.*, 2001).

## 2.6 Sinais clínicos

A hepatozoonose canina não possui sinais clínicos claramente definidos. Descrições de infecções por *H. canis* em cães variam de inaparentes a severas (Assarasakorn *et al.*, 2006) e a doença geralmente é intercorrente a outras doenças imunossupressoras (O'Dwyer *et al.*, 2001; Baneth *et al.*, 2003; Gavazza *et al.*, 2003) ou outros hemoparasitas (Gavazza *et al.*, 2003; Aguiar *et al.*, 2004; Rubini *et al.*, 2005), o que dificulta a individualização dos seus sinais clínicos (Aguiar *et al.*, 2004).

Os sinais clínicos mais comumente observados são a presença de febre, depressão, letargia, corrimento ocular, linfadenomegália, perda de peso, palidez das mucosas e anorexia (Baneth *et al.* 1995; Mylonakis *et al.*, 2005; Paludo *et al.* 2003). Há também registo de alopecia pruriginosa e crostas, associada a caquexia (Voyvoda *et al.*, 2004). Na maioria dos casos relatados estavam presentes outras infecções e a variação dos sinais clínicos poderia ser atribuída às outras patologias concomitantes (Gondin *et al.*, 1998).

Numa revisão feita por Ivanov & Tsachev (2008) indica que os sinais clínicos que foram mais frequentemente observados em estudos experimentais e infecções naturais foi a presença de anemia, edemas e febre intermitente, no entanto o parasita pode ficar latente e persistir por longos períodos sobrevivendo no seu hospedeiro intermediário sem se manifestar clinicamente (Baneth & Weigler, 1997).

Algumas pesquisas sugerem que existe relação entre a severidade dos sinais clínicos e o nível de parasitémia de *H. canis* (Baneth & Weigler, 1997; Karagenc *et al.*, 2006). Desta forma, baixos níveis de parasitémia (1-5% de leucócitos infetados) têm sido associados a uma infecção assintomática ou doença ligeira (Baneth & Weigler, 1997), enquanto cães com elevada parasitémia apresentam sinais de doença debilitante crónica (Gondim *et al.*, 1998; Baneth, 2003). Segundo Karagenc e colaboradores (2006), cães com parasitémia até 3% desenvolveram doença ligeira, até 18% apresentaram doença moderada e aqueles com parasitémia até 39% desenvolveram doença severa. Parasitémia de aproximadamente 100% está associada a doença grave, marcada por uma evidente neutrofilia (> 150.000 leucócitos/mL de sangue), no entanto o mecanismo que induz uma resposta tão severa não está esclarecido (Baneth, 2003).

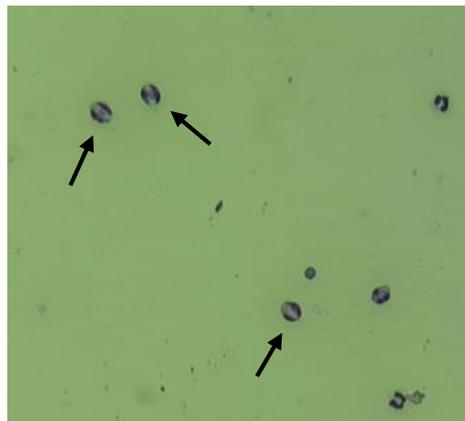
## 2.7 Diagnóstico

No diagnóstico clínico, os sintomas são inespecíficos (Baneth e Weigler, 1997). Pode-se suspeitar da doença quando os animais apresentam febre, anorexia, perda de peso, palidez de mucosas, corrimento ocular e fraqueza nos membros posteriores, no entanto estes sintomas são pouco específicos, podendo também ocorrer em outras patologias. Nestes casos o hemograma é de grande valor para a confirmação do diagnóstico (Eiras *et al.*, 2007; Lappin, 2004).

As alterações laboratoriais mais frequentemente observadas em cães infetados por *Hepatozoon* spp. são leucocitose moderada, anemia e trombocitopenia (Elias & Homans, 1988).

O diagnóstico através de esfregaço sanguíneo baseia-se principalmente na identificação dos gamontes dentro de neutrófilos (Figura 6) mas também em monócitos (Gondim *et al.*, 1998; O'Dwyer *et al.*, 2001; Aguiar *et al.*, 2004; Voyvoda *et al.*, 2004), sendo que muitas vezes o parasita é encontrado casualmente em cães sem sinais clínicos (O'Dwyer *et al.*, 2001; Forlano *et al.*, 2005; Kiral *et al.*, 2005; Oyamada *et al.*, 2005).

Os gamontes apresentam uma forma elíptica e com dimensões de aproximadamente 11x4  $\mu\text{m}$  (Taylor *et al.*, 2016). Nos tecidos, os merontes maduros de *H. canis*, contém merozoítos alongados em círculo, em forma de roda (Baneth *et al.*, 2003), sendo detetados por citologia ou histopatologia dos órgãos infetados (Gonem *et al.*, 2004).



**Figura 6.** Gamontes de *H. canis* (setas pretas) em esfregaço sanguíneo de cão (Giemsa, 400 x). (Original do autor)

Aspirados de medula óssea podem ainda revelar esquizontes em diferentes etapas de desenvolvimento permitindo o diagnóstico parasitológico ante-mortem em cães com baixa parasitemia (Baneth *et al.*, 2007). Recentemente, Otranto *et al.*, (2011) sugeriram que a observação de esfregaços feitos a partir de buffy coat é mais sensível que a avaliação através de esfregaços sanguíneos.

A observação de esfregaços sanguíneos é um método de diagnóstico fácil e prático, no entanto a morfologia dos gamontes não permite a diferenciação das espécies. Além disso, este método de diagnóstico não é sensível dado que os gamontes podem não ser detectados em casos de baixa parasitemia ou intermitente (Baneth *et al.*, 1998).

Sendo uma doença crónica, esta pode permanecer por longos períodos em remissão, só tornando possível que o protozoário seja observado durante a fase aguda da infecção, quando os gamontes são detetados mais facilmente no sangue (Gavazza *et al.*, 2003).

Os primeiros estudos moleculares sobre *Hepatozoon* começaram a ser realizados na década de 1990 em espécies que infectam cobras (Wozniak *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1999; Perkins & Keller, 2001).

Mathew *et al.*, (2000) foi o primeiro a sequenciar a região 18S do gene para RNA ribossómico do *H. americanum* e *H. canis* em cães e *Hepatozoon catesbiana* em rãs-touro, com o objetivo de esclarecer as relações filogenéticas. A sua descoberta sugere que existe um grupo que relaciona as duas espécies que infectam cães. No mesmo ano, Baneth e colaboradores (2000) utilizaram as técnicas de western immunoblotting e sequenciamento que revelaram uma diferença de 13,59% de homologia entre o *H. americanum* e *H. canis* na região 18S, assim como diferenças antigénicas, comprovando definitivamente que as espécies são diferenciadas e causam doenças também distintas.

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 (Baneth *et al.*, 2000; Tenter & Deplazes, 2006; Inokuma *et al.*, 2002; Rubini *et al.*, 2006) ou em casos em que os canídeos apresentam baixa parasitemia ou ainda quando estes foram recentemente infectados (Baneth *et al.*, 1998).

As vantagens dos métodos moleculares em relação às outras técnicas são a alta especificidade e sensibilidade na deteção dos agentes patogénicos no sangue periférico (Oyamada *et al.*, 2005; Sellon, 2003), pois os iniciadores moleculares projetados são específicos para a sequência genética do alvo, o que faz do PCR uma ferramenta de diagnóstico específica e sensível devido à sua habilidade de detetar um número muito pequeno do DNA alvo, facilitando a deteção de alguns microrganismos abaixo do ponto inicial

de deteção de culturas microbiológicas rotineiras, de citologia, histologia ou imunohistoquímica (Sellon, 2003).

Imunofluorescência indireta (IFAT), Western immunoblotting e biópsia tecidual têm sido também usadas como técnicas alternativas no diagnóstico (Aguiar *et al.*, 2004), no entanto estes métodos são trabalhosos e morosos, além de possuírem baixa especificidade (Sellon, 2003) no entanto têm sido meios importantes para a caracterização e distinção das espécies de *Hepatozoon* spp. (Rubini *et al.*, 2005; Rubini *et al.*, 2006; Eiras *et al.*, 2007; Oyamada *et al.*, 2005).

Quanto ao diagnóstico post-mortem, este é feito através de uma avaliação histopatológica ou recorendo ao uso de fragmentos de tecidos. Quando infetados, a merogonia ocorre em varios órgãos, como na medula óssea, baço e fígado, não ocorrendo nos musculos. Um estudo de O`Dwyer *et al.*, (2004) detetou em cinco canídeos infetados naturalmente sujeitos a necropsia, gamontes dentro de células polimorfonucleares e esquizontes em vários estádios s de desenvolvimento. Todos os órgãos (baço, fígado, pulmões, coração, rins, linfonodos e medula óssea), com exceção dos músculos, estavam infetados, no entanto as amostras de baço e medula óssea eram as que apresentavam um maior grau de parasitemia (O`Dwyer, 2011).

## 2.8 Tratamento e profilaxia

O tratamento é recomendado a todos os canídeos que apresentem o parasita, mesmo aqueles sem manifestação clínica da doença ou que apresentem níveis baixos de parasitemia, uma vez que o agente patogénico poderá aumentar com o tempo e os casos moderados de infecção poderão tornar-se severos (Baneth & Weigler, 1997; Gavazza *et al.*, 2003).

Muitos fármacos têm sido usados para tratar canídeos infetados com *H.canis* como o dipropionato de imidocarb, antibióticos e ainda agentes cocidiostáticos. Apesar de o fármaco de eleição para o tratamento ser o dipropionato de imidocarb os resultados dos tratamentos não têm sido consistentes (Pasa *et al.*, 2011).

Em um estudo realizado por Baneth (2003) foi observado que o tratamento mais eficaz e menos nefrotóxico através do uso de dipropionato de imidocarb 5 a 6 mg/kg (SC ou IM) a cada 14 dias, até desaparecimento dos gamontes nos esfregaços sanguíneos se mostrou satisfatório. A este tratamento foi associado doxiciclina (PO) 10 mg/kg por no mínimo 21 dias, para ajudar a combater possíveis agentes transmitidos pelo mesmo vetor.

Para o tratamento de *H. canis*, a terapia combinada de dipropionato de imidocarb e tetraciclina ou cloridrato de tetraciclina demonstrou cura clínica, no entanto, devido à eliminação muito lenta de gamontes no sangue periférico em certos casos, o dipropionato de imidocarb teve que ser administrado ao longo de oito semanas (Tenter & Deplazes, 2006). Porém em estudos realizados por Sasanelli e os seus colaboradores (2010) demonstraram que o imidocarb não é completamente eficaz a eliminar o parasita em cães tratados repetidamente com esse fármaco durante oito meses.

Toltrazuril, agente cocidiostático, foi usado também em canídeos infetados numa dose de 10 mg/kg (PO), durante seis dias, tendo sido observado a regressão dos sinais clínicos e dos parâmetros biológicos (Beaufils *et al.*, 1996). Recentemente, Pasa *et al.*, (2011), quis comprovar a eficácia do tratamento para *H. canis* recorrendo a associação de dipropionato de imidocarb subcutâneo (6 mg/kg), duas vezes por dia, com quatorze dias de intervalo e toltrazuril (10 mg/kg) uma vez por dia, durante os primeiros cinco dias de tratamento. A eficácia clínica mostrada do dipropionato de imidocarb em associação com ou sem o toltrazuril foi de 83,3% e 66,7 %, respetivamente, concluindo assim que o toltrazuril não produz qualquer efeito benéfico adicional em conjugação com o dipropionato de imidocarb.

Anti-inflamatórios não esteroides (AINES) como aspirina e fenilbutazona são também recomendados como terapia de suporte no controlo da dor, febre e inflamação (Inokuma *et al.*, 2002; Voyvoda *et al.*, 2004), bem como complexos vitamínicos que devem ser administrados como suporte do tratamento (Voyvoda *et al.*, 2004).

Até ao momento, o tratamento de canídeos infetados com *H. canis* é algo frustrante em clínica pois apesar de a recuperação ser alcançada em alguns casos, nenhum plano terapêutico foi bem sucedido na cura da infecção do parasita. É importante ainda referir que todos os fármacos usados no tratamento de *H. canis* são eficazes para eliminar outro tipo de agentes patogénicos, como *Babesia*, *Ehrlichia* e *coccidia*. Sendo assim a melhora clínica observada pelos pacientes pode ocorrer devido a eliminação de alguma infeção concomitante existente e não pela eliminação do agente de *H. canis* (O Dwyer, 2011).

Durante o período de tratamento deve ser realizado hemogramas de controlo e uma análise minuciosa dos esfregaços sanguíneos a cada 2 semanas até que os gamontes não sejam visíveis na circulação, o que pode exigir um longo período de tratamento (Baneth, 2003) (Baneth & Weigler, 1997).

Nenhum medicamento permite a eliminação completa do organismo, logo a ocorrência de recidivas é algo a ter sempre em conta (Nelson & Couto, 2015).

No caso do *Hepatozoon* spp. cujo modo de transmissão é feito através da ingestão de carraças infetadas, os tutores devem ter em especial atenção para o tratamento com acaricidas para a eliminação destas uma vez que os cães podem ingerir carraças enquanto fazem a sua própria higiene. Os animais devem ser frequentemente examinados e removidas qualquer carraça que seja observada, especialmente após a caça ou passeios ao ar livre (ESCCAP, 2017).

O prognóstico desta doença é mais favorável em adultos com menor grau de parasitémia do que em cachorros ou adultos com elevada parasitémia e imunodeprimidos (Baneth, 2012; Taylor *et al.*, 2016).

Não existem no mercado vacinas disponíveis para a prevenção de infeções por *Hepatozoon* spp. (Baneth, 2011).

## **2.9 Importância Zoonótica**

Existe apenas um registo de infecção por *Hepatozoon* spp. nas Filipinas, diagnosticado em 1971, onde o doente se apresentou unicamente com icterícia e anemia (Baneth, 2012).

O parasita foi observado num esfregaço sanguíneo, mas não foi detetado nos outros órgãos analisados, nomeadamente fígado e medula óssea.

O facto de apenas ter sido reportado um caso de infecção em seres humanos significa que ainda se desconhece a importância zoonótica deste protozoário (Baneth, 2012; Baneth *et al.*, 2015).

### **3. Vetores ixodídeos**

Os ixodídeos, vulgarmente designados por carraças, são vetores que parasitam um vasto número de animais. A sua perpetuação na natureza depende da alimentação (refeições ou repastos sanguíneos) que realizam para manter o seu ciclo de vida enquanto parasitas. As carraças podem acidentalmente parasitar o Homem e se estiverem infetadas podem transmitir os agentes infecciosos enquanto realizam a sua alimentação (Relatório REVIVE, 2013).

#### **3.1 Morfologia das carraças**

O corpo das carraças é formado pelo capítulo ou gnatosoma e pelo idiosoma. O capítulo sustém as peças bucais, incluindo as quelíceras, que são utilizados para cortar e rasgar a pele do hospedeiro, os palpos e o hipostoma que são usados para se fixarem ao hospedeiro. O idiosoma que se divide em podosoma suporta as patas e o poro genital, e pelo opistosoma, região posterior onde se encontram as placas espiraculares e a abertura anal (Sonenshine, 1991).

A parte externa do seu corpo e os seus apêndices, semelhantes aos outros artrópodes, denomina-se tegumento, constituído pela epiderme e pela cutícula, parte externa que atua como proteção primária frente à perda de água, o tegumento serve ainda como exoesqueleto, proporcionando proteção contra agressões do tipo mecânico ou físico (Sonenshine, 1991).

Diferentes estruturas, como pelos que se assemelham aos dos mamíferos e glândulas superficiais, fazem parte da cutícula. Estes estão distribuídos por todo o corpo, capítulo e patas, sendo mais abundante nas carraças adultas e em ninfas e mais escasso nas larvas. Essas estruturas têm uma função mecanosensorial termosensíveis, no entanto menos funcionais (Sonenshine, 1991).

As glândulas superficiais estão espalhadas por todo o corpo e podem ser divididas em dois tipos, o tipo I que é mais numeroso e com um tamanho de 80-100 µm em ninfas e as do tipo II, semelhante às anteriores, no entanto adquirem um enorme tamanho durante a repleção atingindo 400 µm em fêmeas engorgitadas. Estas glândulas secretam uma substância oleosa que é distribuída por toda a superfície do corpo e solidifica ao entrar em contato com a atmosfera. A excitação devido a intensa luz, calor ou irritação mecânica pode induzir a secreção destas glândulas. Esta secreção possui características de impermeabilização e protege as carraças de secarem (Sonenshine 1991).

Nos órgãos sensoriais, como o órgão de Haller, os sensores têm a forma de poros e possuem principalmente uma atividade quimiossensorial, embora também possam atuar

como mecanosensores (Sonenshine, 1991). A função principal desse órgão complexo é o olfacto, apresentando também mecanossensilas, termossensilas e sensilas gustativas (Sonenshine, 1991).

O sistema nervoso é o aparelho que regula as relações entre os organismos e o ambiente e que coordena as ações dos demais órgãos (Ivanov, 1983). Assim como nos demais aracnídeos, os gânglios que compõem o sistema nervoso central (SNC) das carraças estão condensados numa massa denominada singânglio (Binnington & Obenchain, 1982). Do singânglio partem nervos que inervam órgãos alvos como, por exemplo, as quelíceras, palpos e glândulas salivares (Sonenshine, 1991).

As carraças de corpo duro têm um escudo esclerotizado na superfície dorsal, ao qual se unem grupos importantes de músculos. Nos machos ixodídeos, o escudo cobre toda a parte traseira, e em muitas espécies também possuem lâminas escleróticas que cobrem de forma parcial ou total a superfície ventral (Sonenshine, 1991).

Nos géneros de carraças que têm olhos, eles estão localizados nas margens laterais do escudo, onde provavelmente a sua função é distinguir a luz e os movimentos, no entanto não devem ter uma perceção detalhada do meio que as rodeia (Parola & Raoult, 2001).

Larvas e ninfas não apresentam diferenciação sexual. Os machos e fêmeas têm uma abertura genital ou gonoporo, que está localizada ventralmente ao idiosoma, aproximadamente à altura do segundo par de patas (Iza, 2010)

O ânus também se encontra na zona ventral na zona posterior do corpo, atrás do quarto par de patas, sendo cercado pelo sulco anal (Sonenshine, 1991).

Outra característica importante das carraças é o seu aparelho digestivo, em grande parte intracelular. O sangue ingerido permanece no intestino durante longos períodos de tempo sem ser digerido, de modo que os agentes patogénicos adquiridos durante a ingestão não sejam expostos ao aparelho digestivo e possam penetrar nos tecidos da carraça. O sangue não digerido serve como reserva alimentar e, exceto durante períodos de postura ou ecdise, é consumido gradualmente ao longo de vários meses ou mesmo anos (Anderson e Magnarelli, 2008; Sonenshine, 1991; Sonenshine *et al.*, 2002).

Outro aspeto notável das carraças é a capacidade de produzir um número elevado de ovos. As fêmeas da maioria das espécies de ixodídeos produzem milhares de ovos, enquanto as fêmeas das espécies de Argasídeos colocam algumas centenas de ovos após a alimentação, embora sejam capazes de realizar vários ciclos de alimentação e reprodução (Anderson e Magnarelli, 2008; Sonenshine, 1991; Sonenshine *et al.*, 2002).

As carraças são artrópodes hematófagos obrigatórios que parasitam mamíferos, aves, répteis e anfíbios. Encontram-se distribuídos por quase todas as regiões do mundo. São conhecidas aproximadamente 879 espécies (Guglielmone *et al.*, 2009).

As carraças estão divididas em três famílias, Ixodidae (carraças duras), Argasidae (carraças moles) e Nuttalliellidae (monotípico). Carraças ixodídeas e argasídeas diferem na sua morfologia e biologia (Mans, 2004; Sonenshine, 1991).

Carraças ixodídeas possuem escudo dorsal esclerotizado e hipostómio apical o que lhe permite o repasto sanguíneo por períodos prolongados, podendo ingerir cem vezes mais que a sua própria massa corporal. Devido a esta diferença no escudo, fica evidente o dimorfismo sexual. Nas fêmeas, larvas e ninfas, esse escudo cobre apenas a região anterior do corpo, permitindo a dilatação do abdômen após a alimentação, já que as fêmeas se alimentam muito mais do que os machos (Mans, 2004; Sonenshine, 1991).

Carraças moles não possuem o escudo dorsal quitinoso, o hipostómio encontra-se localizado anteriormente e ventralmente. A alimentação é realizada por períodos curtos; como não possuem o escudo dorsal, o dimorfismo sexual é pouco acentuado (Mans, 2004; Sonenshine, 1991).

Existe ainda uma terceira família, Nuttalliellidae, onde se inclui uma única espécie, *Nuttalliella namaqua* que partilha várias características com as famílias de carraças duras e moles e tem sido descrito como o "elo perdido" entre as famílias de carraças (Mans, 2004; Sonenshine, 1991).

*Nuttalliella namaqua* encontra-se distribuída no sudeste e sul da África, Tanzânia, Namíbia e África do Sul (Parola y Raoult, 2001). O papel na transmissão de agentes infecciosos é ainda desconhecido (Arthur, 1962; Sonenshine, 1991).

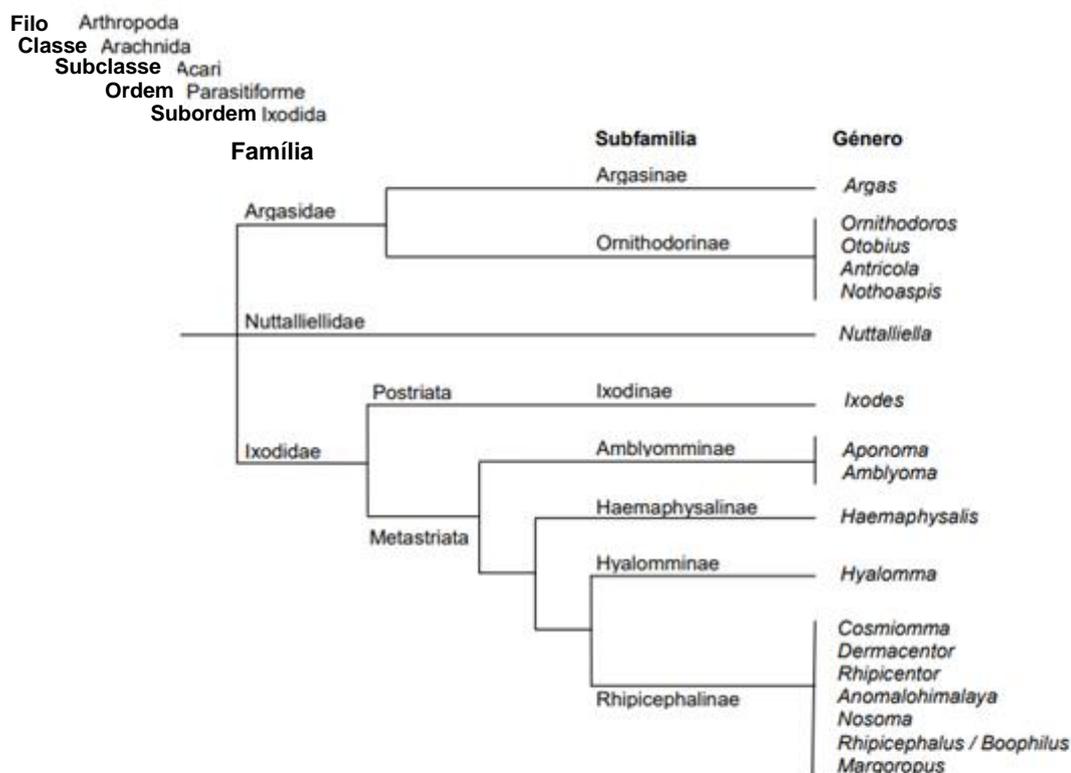
Na família Ixodidae encontram-se os géneros *Ixodes*, *Aponomma*, *Haemaphysalis*, *Anomalohimalya*, *Cosmiomma*, *Nosomma*, *Hyalomma*, *Amblyomma*, *Margaropus*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Rhipicentor* (Figura 7) (Sonenshine, 1991), reunindo uma série de características que lhes confere o potencial como vetores de agente patogénicos, nomeadamente, o facto de se alimentarem por longos períodos de tempo (vários dias), pela sua picada ser geralmente indolor, por permanecerem fortemente fixados ao hospedeiro e em cada estadio apenas se alimentarem uma vez.

Os géneros pertencentes à família Argasidae alimentam-se por breves períodos de tempo (minutos ou horas) e frequentemente em apenas um hospedeiro (Anderson e Magnarelli, 2008; Sonenshine, 1991).

Dentre as três famílias, a família *Ixodidae* é a mais numerosa e a de maior importância médica e veterinária.

### 3.2 Taxonomia

As carrças pertencem ao Filo Arthropoda, Classe Arachnida, Subclasse Acari, Ordem Parasitiformes, Subordem Ixodida (Figura 7). (Parola e Raoult, 2001).



**Figura 7.** Classificação taxonómica das carrças. (Adaptado de Estrada- Peña *et al.*, 2004a; Parola e Raoult, 2001)

Conforme já foi referido, são conhecidas três famílias de carrças. A família mais importante, no que diz respeito à transmissão de agentes infecciosos é a família Ixodidae.

A família Ixodidae ou “carrças de corpo duro”, com 692 espécies na qual são descritos 13 géneros estão agrupados em dois grupos principais: Prostriata e Metastriata (Sonenshine, 1991).

Prostriata é representado por uma única subfamília, Ixodinae que consiste em apenas um género, *Ixodes*. Em constraste, Metastriata é representada por quatro subfamílias: *Amblyomminae*, *Haemaphysalinae*, *Hyalomminae*, *Rhipicephalinae* (Black and Piesman, 1994; Klompen *et al.*, 2002).

A segunda família, Argasidae, estão descritas 186 espécies, pertencentes a 5 géneros.

A terceira família, Nuttalliellidae, é representada pela espécie *Nuttalliella namaqua* (Guglielmone, 2009).

### 3.3 Ciclo biológico dos ixodídeos

Os ixodídeos podem atuar, não apenas como vetores, mas também como reservatórios, podendo transmitir uma grande variedade de agentes infecciosos para o Homem e para os animais, domésticos e silvestres, causando várias condições tóxicas como paralisia, irritação, alergia à sua picada e espoliação sanguínea, disseminando protozoários, rickettsias, vírus, bactérias (Sonenshine, 1991).

Entre os vetores, os agentes patogénicos podem ser transmitidos de forma transtadial (entre estádios) e transovárica (pelos ovos) (Parola e Raoult, 2001).

Durante as primeiras 24-36 horas, após a ligação ao hospedeiro, não há praticamente ingestão de sangue, sendo a penetração a sua principal atividade (Parola e Raoult, 2001). No caso das formas adultas, há um período inicial de alimentação lenta (três a quatro dias), segue-se um período de engurgitamento rápido (um a três dias), altura em que as fêmeas podem aumentar o seu peso até 120 vezes (Parola e Raoult, 2001).

É através da refeição sanguínea nos hospedeiros, que a maioria dos ixodídeos transmite os agentes aos hospedeiros suscetíveis (Estrada-Peña *et al.*, 2004a).

A duração do ciclo de vida dos ixodídeos varia de espécie para espécie, geralmente de um a três anos (Estrada- Peña *et al.*, 2004a), mas dependendo das condições ambientais, pode ser concluído entre seis meses a seis anos (Parola e Raoult, 2001). O volume de consumo de sangue é grande, podendo atingir até 5 ml por specimen e a produção de ovos é elevada, podendo chegar aos 24.000 ovos por postura e por fêmea, que morre no final do processo (Sonenshine, 1991).

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 s é necessária uma refeição sanguínea para terminar a metamorfose (Estrada-Peña *et al.*, 2004a).

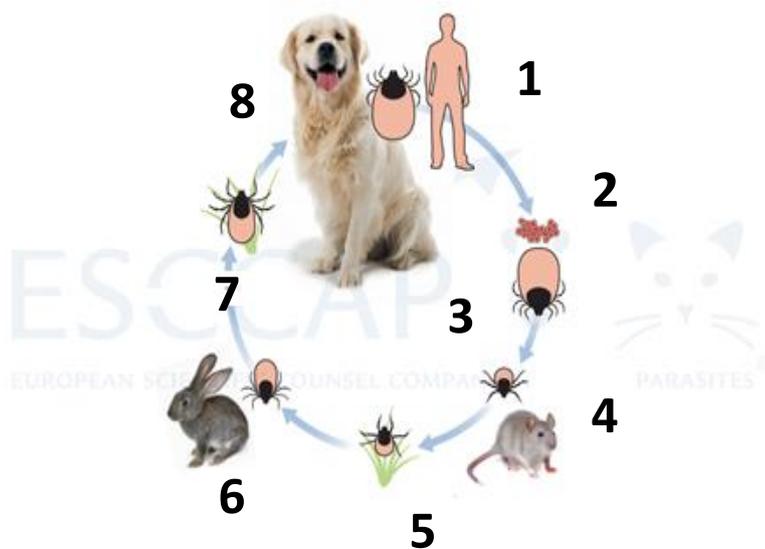
O dimorfismo sexual é evidente apenas no estadio de adulto, portanto, quando se fala em macho ou fêmea está se a referir unicamente a um indivíduo adulto. Na maioria das espécies, cada um dos estádios s ativos procura um hospedeiro, alimenta-se e desprende-se para se desenvolver no ambiente natural (ciclo biológico de 3 hospedeiros). Nos Argasídeos, o seu desenvolvimento é gradual, com múltiplos estádios s de ninfas antes de se tornar adulto (ciclo biológico de múltiplos hospedeiros), enquanto que nos Ixodídeos passam por um único estadio de ninfa (Anderson & Magnarelli, 2008; Sonenshine, 1991). Em algumas espécies, os

estádios s juvenis, uma vez alimentados, permanecem e desenvolvem-se no hospedeiro, mesmo tendo um desenvolvimento mais curto. Esses tipos de carraças são chamados de "2 hospedeiros" ou "1 hospedeiro", dependendo se um ou mais estádios s juvenis se desenvolvem dessa maneira.

O ciclo biológico das diferentes espécies de carraças ixodídeas é bastante semelhante entre si, todos têm um único estadio de ninfa, as fêmeas aumentam de tamanho durante a refeição (ocasionalmente até 120 vezes o tamanho original) e a fecundação ocorre enquanto se alimenta no hospedeiro (Anderson & Magnarelli, 2008; Sonenshine 1991). Após a fecundação, as fêmeas ingerem o sangue até ficarem engorgitadas, uma vez saciadas, estas separam-se do hospedeiro e dá-se o início da postura. A colocação de ovos é rápida, atingindo o pico de produção entre o terceiro e o quinto dia após o início da colocação onde depois há uma diminuição gradual. Em geral, a grande maioria dos ovos são depositados nos primeiros 10 dias, nos 5-10 dias seguintes, há uma redução do número de ovos, e após isto as fêmeas exaustas acabam por morrer (Sonenshine, 1991). Embora as proporções sejam diferentes entre as diferentes espécies, podemos assumir que mais de metade do peso corporal das fêmeas engorgitadas fecundadas se convertem em ovos durante este processo. Esta capacidade dos ixodídeos coloca-os entre os mais prolíficos de todos os artrópodes (Iza, 2010).

### 3.3.1 Ciclo biológico de três hospedeiros

É o ciclo biológico mais característico das carraças. Após a postura, a incubação dos ovos começa e, após a incubação, as larvas emergentes dispersam-se na vegetação à espera do hospedeiro. Aquelas que tenham êxito fixar-se-ão a um hospedeiro e irão alimentar-se lentamente por vários dias até completar a sua refeição. A larva engurgitada soltar-se-á do hospedeiro e procurará um habitat protegido onde a muda ocorrerá. A nova ninfa procurará novamente por um hospedeiro, repetindo o processo de fixação, repleção, desprendimento do hospedeiro e procura de um local adequado para completar a muda para a fase adulta. Posto isto, os adultos procurarão um novo hospedeiro, onde se irão alimentar, fecundar e as fêmeas engorgitadas realizarão a postura, completando assim o ciclo biológico (Anderson e Magnarelli, 2008; Sonenshine, 1991) (Figura 8).



**Figura 8.** Ciclo de vida de 3 hospedeiros. (Ciclo adaptado de ESCCAP, disponível em [https://www.esccap.org/uploads/docs/b3rbhl5x\\_3.2\\_Tick\\_life\\_cycle\\_WM.pdf](https://www.esccap.org/uploads/docs/b3rbhl5x_3.2_Tick_life_cycle_WM.pdf))

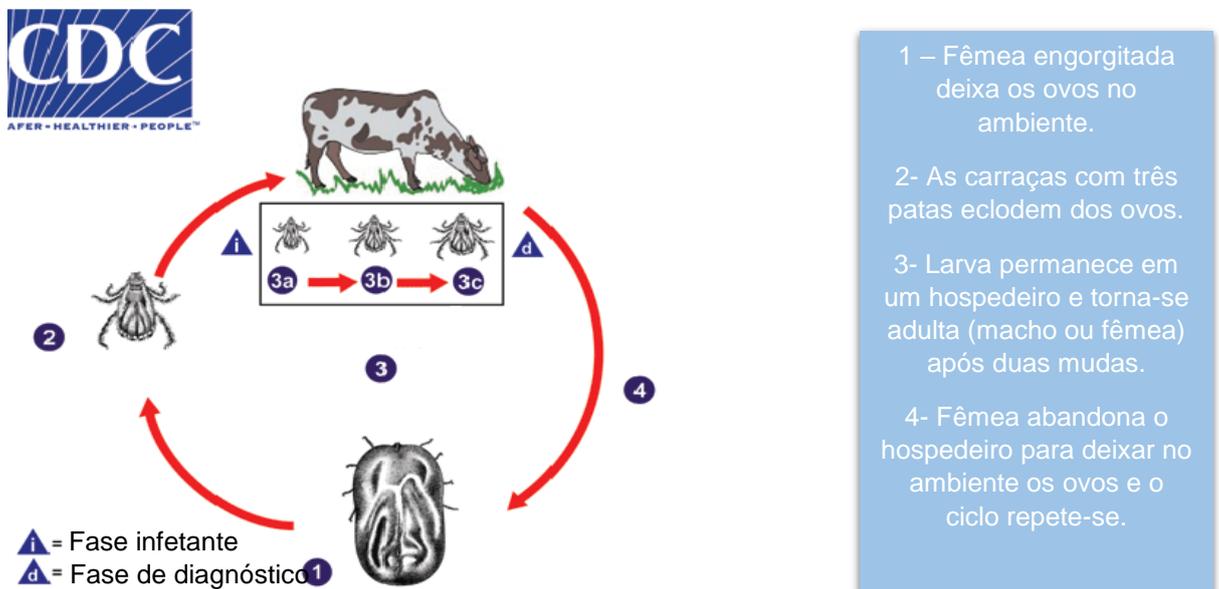
- 1 – Carraça fêmea encontra um hospedeiro mamífero onde se vai alimentar.
- 2- Carraça fêmea faz postura dos ovos no ambiente e morre.
- 3- As carraças com três patas eclodem dos ovos.
- 4- Larva alimenta-se em um novo hospedeiro.
- 5 - Larva muda para ninfa (quatro patas) no ambiente.
- 6 - Ninfa alimenta-se em um novo hospedeiro.
- 7- Ninfa muda para adulto (macho ou fêmea) no ambiente.
- 8- Adulto irá passar a maior parte do seu tempo no ambiente.

Em condições de ambiente natural favorável, o ciclo biológico de três hospedeiros pode ser finalizado em menos de um ano, no entanto as condições climáticas e diapausa podem alterar o comportamento na busca do hospedeiro ou o desenvolvimento da postura, pelo que um estadio biológico pode ser completado a cada dois anos. Essas limitações ambientais podem prolongar a duração do ciclo biológico entre 3 e 6 anos (Anderson & Magnarelli, 2008; Sonenshine, 1991).

Quando não se encontram num hospedeiro, os ixodídeos estão dependentes igualmente de condições climáticas favoráveis, sendo a sua mortalidade condicionada pela existência de uma baixa humidade relativa e uma temperatura elevada (Estrada- Peña *et al.*, 2004a). Dependendo da espécie, quando surgem as condições ideais de temperatura, humidade e luminosidade, os vetores trepam para a vegetação circundante onde esperam pelo seu hospedeiro (Estrada- Peña *et al.*, 2004a), numa estratégia de emboscada (Parola e Raoult, 2001). A estratégia predadora, em que os ixodídeos atacam os hospedeiros, emergindo dos seus habitats indo de encontro aos mesmos, também é utilizada (Parola e Raoult, 2001). Por fim, há ainda a estratégia das espécies endofílicas, que vivem nos habitats dos hospedeiros (covas, buracos e ninhos) esperando que os mesmos cheguem (Parola e Raoult, 2001).

### 3.3.2 Ciclo biológico de dois e um hospedeiro

Existem diferentes variantes em relação ao modelo geral de desenvolvimento dos ixodídeos. Em algumas espécies, as larvas alimentadas permanecem no hospedeiro, onde a muda ocorrerá no estádios de ninfa e a posterior fixação e repleção deste estágio juvenil. Somente depois de completar a sua repleção, as ninfas deixarão o hospedeiro para completar a muda. As novas carraças adultas retornarão para procurar um novo hospedeiro e completarão o ciclo biológico. Essas carraças são conhecidas como carraças de 2 hospedeiros. Nas chamadas carraças de 1 hospedeiro, o desenvolvimento de larva para adulto ocorre no mesmo hospedeiro e apenas as fêmeas fecundadas e repletas descem para realizar a colocação dos ovos no meio ambiente (Iza, 2010) (Figura 9).



**Figura 9.** Ciclo de vida de 1 hospedeiro. (Ciclo adaptado de CDC, disponível em <https://www.cdc.gov/dpdx/ticks/index.html>, 2017)

### 3.4 Zoonoses transmitidas por carraças

As carraças têm sido descritas como vetores de doenças bacterianas humanas desde o início do século XX. O maior impacto na Saúde Pública nos Estados Unidos e na Europa foi devido à descrição de um novo agente, *Borrelia burgdorferi*, agente etiológico da doença de Lyme em 1982 (Burgdorfer e cols, 1982). Desde então, foram descritas novas espécies ou subespécies patogénicas de *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma* e do complexo *B. burgdorferi* (Parola *et al.*, 2005a; Parola y Raoult, 2001). As carraças podem ser encontradas no homem em muitas partes do seu corpo, no entanto encontram-se com maior frequência em torno da cabeça, pescoço e virilha. Observou-se também que diferentes espécies de carraças têm preferência por se fixarem em certas partes do corpo (Parola e Raoult, 2001). É de salientar ainda que os ixodídeos geralmente não causam dor quando se fixam, pois produzem secreções salivares que incluem um cimento, que fixam as peças bucais à pele do hospedeiro, bem como enzimas e substâncias vasodilatadoras, anti-inflamatórias, anti-hemostáticas, imunossupressoras e anestésicas, que facilitam a hematofagia (Parola e Raoult, 2001) enquanto se alimentam. Os estádios s imaturos geralmente não são detetados nas pessoas devido ao seu reduzido tamanho, passando assim muitas vezes despercebidos. Foi demonstrado que o risco de transmitir doenças aumenta com o aumento do tempo de fixação ao hospedeiro (Raoult e Roux, 1997; Sonenshine, 1993).

Entre os fatores que influenciam o surgimento de doenças transmitidas por carraças nos últimos anos foi o maior envolvimento dos médicos, que passaram a realizar com mais detalhes a anamnese dos pacientes e a solicitar exames complementares de diagnóstico (Jongejan e Uilenberg, 2004; Parola e Raoult, 2001).

O avanço das técnicas de biologia molecular permitiu descrever com maior precisão novos patógenos emergentes e investigar a sua epidemiologia em todo o mundo (Barral e cols, 1999; Barral e cols, 2002).

Também as mudanças socioeconómicas e de estilo de vida que ocorreram nos últimos anos levaram a um aumento das atividades ao ar livre, favorecendo o aumento do turismo rural, acesso a áreas remotas até então pouco exploradas, resultando num aumento do contato com as carraças e os agentes patogénicos (Jongejan e Uilenberg, 2004; Parola e Raoult, 2001a; Telford III e Goethert, 2004).

Numerosas causas podem alterar estas associações, incluindo mudanças macroclimáticas, urbanizações e desmatamento (Lindgren *et al.*, 2000; Telford III e Goethert, 2004). A disseminação de zoonoses transmitidas por carraças requer a dispersão do vetor e / ou do hospedeiro reservatório para que um processo infeccioso seja mantido em uma nova área, o vetor ou o reservatório do agente patogénico devem estar presentes em permanência e ter

hospedeiros que sejam suscetíveis à infecção e que possam manter o organismo patogénico (Korch, 1994).

As carraças podem mover-se através da vegetação, mas apenas em pequenas distâncias que raramente excedem 50 metros, no entanto, elas podem ser disseminadas por longas distâncias pelo hospedeiro enquanto permanecem fixas, especialmente no caso de aves migratórias ou mamíferos (Ogden *et al.*, 2008; Sonenshine, 1991; Sonenshine, 1993). O homem também pode influenciar na dispersão destas através de práticas agrícolas ou modificando o habitat da carraça transportando gado em longas distâncias (Jongejan e Uilenberg, 2004). Os motivos para a distribuição de algumas doenças transmitidas por carraças ainda estão por determinar (Parola e Raoult, 2001).

Em Portugal, o número de doenças endémicas transmitida por carraças é considerado elevado, com cinco a oito doenças endémicas identificadas (Santos-Silva *et al.*, 2006), este mesmo nível é partilhado pela maioria dos países mediterrânicos, como Espanha, França, Itália, Grécia e Turquia, decrescendo para norte. Em Portugal já foram assinaladas várias infeções associadas a carraças como por exemplo a Anaplasmosse humana, Tularémia e Febre Q, no entanto, as doenças com maior impacto em saúde pública são a febre escaro nodular e a borreliose de Lyme. (Relatório REVIVE, 2013)

A febre escaro nodular (FEN) é uma doença endémica em Portugal que tem como agente etiológico responsável a bactéria *Rickettsia conorii*. Apesar de ser uma doença com características estivais, as condições climáticas em algumas regiões do nosso país permitem que o vetor se mantenha ativo durante todo o ano e possa transmitir o agente mesmo fora desta época. Apesar de ser uma doença de declaração obrigatória, continuasse a subestimar a sua verdadeira incidência devido à elevada subnotificação. (Relatório REVIVE, 2013)

Quanto à Borreliose de Lyme, é uma doença multissistémica, que pode afetar vários tecidos ou órgãos. Tem uma distribuição mundial e é causada por espiroquetas do complexo *B. burgdorferi sensu lato*, que são transmitidas por carraças antropofílicas do género *Ixodes*. Atualmente já se encontram descritas 19 genoespécies do complexo *B. burgdorferi s.l.* em todo o mundo, sendo que em Portugal já foram detetadas seis (Relatório REVIVE, 2013).

A mais prevalente é sem dúvida *B. lusitaniae* isolada pela primeira vez no CEVDI a partir de *I. ricinus* colhidos em Águas de Moura (Núncio *et al.*, 1992). Estudos recentes demonstraram que esta espécie é patogénica para o Homem (Collares-Pereira *et al.*, 2004; Carvalho IL *et al.*, 2008).

### 3.5 Influência das condições climáticas na distribuição dos ixodídeos

Portugal, a região mais ocidental da Europa, apresenta condições climáticas, ecológicas e ambientais favoráveis ao desenvolvimento de várias espécies ixodológicas. Podemos considerar o clima em Portugal como oceânico, ao longo de todo o litoral e Norte de Portugal e mediterrâneo no sul de Portugal. A temperatura média anual pode variar entre os 16 °C e os 26°C durante o Verão e os 3° C e 14°C durante o inverno. Quanto à humidade atmosférica esta está relacionada com a precipitação onde obtemos valores médios entre os 65% e os 70% podendo chegar por vezes no Inverno aos 85% (Caeiro, 1999).

Atualmente, estão identificadas 21 espécies classificadas na família Ixodidae (Tabela 1), nomeadamente, *Dermacentor marginatus* (Sulzer, 1776), *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794), *Haemaphysalis hispanica* (Gil Collado, 1938), *Haemaphysalis inermis* (Birula, 1895), *Haemaphysalis punctata* (Canestrini & Fanzago, 1878), *Hyalomma lusitanicum* (Koch, 1844), *Hyalomma marginatum* (Koch, 1844), *Ixodes acuminatus* (Neumann, 1901), *Ixodes bivari* (Dias, 1990), *Ixodes canisuga* (Johnston, 1849), *Ixodes frontalis* (Panzer, 1798), *Ixodes hexagonus* (Leach, 1815), *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758), *Ixodes simplex* (Neumann, 1906), *Ixodes ventalloi* (Gil Collado, 1936), *Ixodes vespertilionis* (Koch, 1844), *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* (Say, 1821), *Rhipicephalus bursa* (Canestrini & Fanzago, 1878), *Rhipicephalus pusillus* (Gil Collado, 1938) e *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Relatório REVIVE, 2013).

Dentre todas as principais espécies de carraças identificadas as que se encontram mais frequentemente distribuídas em Portugal são *R.sanguineus* e *H. marginatum*, com uma alta incidência na Primavera e no Verão; *Hyalomma* sp. que se encontra durante todo o ano no entanto com uma maior prevalência no final do Verão, Outono ou Inverno (Caeiro, 1999).

As espécies *Haemaphysalis punctata*, *Ixodes ricinus*, *Dermacentor marginatus* e *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* preferem temperaturas mais baixas e com maior percentual de humidade. No Anexo 2 podem ser observadas as características de algumas das espécies mais comumente encontradas em Portugal (Caeiro, 1999; Estrada- Peña *et al.*, 2004a).

Pela sua abundância e pelos agentes etiológicos que podem transmitir, as duas espécies mais importantes em termos de saúde pública são *Ixodes ricinus* e *Rhipicephalus sanguineus* (Relatório REVIVE, 2013).

**Tabela 1.** Sistemática das espécies de ixodídeos existentes em Portugal e os seus hospedeiros preferenciais (Adaptado Santos Silva *et al.*, 2006).

<b>Familia Ixodidae</b>				
<b>Género</b>				
<i>Rhipicephalus</i>	<i>Ixodes</i>	<i>Dermacentor</i>	<i>Hyalomma</i>	<i>Haemaphysalis</i>
<b>Espécie / Hospedeiro preferencial</b>				
<i>R. sanguineus</i> / Canídeos domésticos	<i>I. ricinus</i> / Mamíferos silváticos	<i>D. marginatus</i> / Bovinos	<i>H. lusitanicum</i> / Bovinos	<i>H. punctata</i> / Mamíferos domésticos e silváticos
<i>R. turanicus</i> / Ovinos	<i>I. hexagonus</i> / Mamíferos silváticos	<i>D. reticulatus</i> <sup>2</sup> / Canídeos domésticos e silváticos	<i>H.</i> <i>marginatum</i> / Bovinos	<i>H. inermis</i> / Mamíferos silváticos
<i>R. pusillus</i> / Pequenos mamíferos silváticos	<i>I. vespertilionis</i> / Quirópteros			<i>H. hispanica</i> / Pequenos mamíferos silváticos
<i>R. bursa</i> / Caprinos	<i>I. ventalloi</i> / Pequenos mamíferos silváticos			
<i>R. annulatus</i> <sup>1</sup> / Bovinos	<i>I. bivari</i> / Pequenos mamíferos silváticos			
	<i>I. canisuga</i> / Mamíferos silváticos			
	<i>I. simplex</i> / Quirópteros			
	<i>I. acuminatus</i> / Pequenos mamíferos silváticos			
	<i>I. frontalis</i> / Aves silváticas			

<sup>1</sup> Espécie também denominada por *Boophilus annulatus* <sup>2</sup> Espécie anteriormente denominada por *Dermacentor pictus*

### 3.6 Diagnóstico

O diagnóstico geralmente é realizado através da observação das carrças no animal, embora seja mais difícil observar larvas e ninfas do que os adultos, sejam machos ou fêmeas alimentadas e / ou engurgitadas. A identificação das espécies requer experiência e é realizada em laboratórios com auxílio de microscópio estereoscópico.

Reações cutâneas localizadas ou pequenos nódulos inflamatórios (microabscessos) podem ocorrer como resultado da mordida das carrças. Quando não são observadas carrças e a transmissão de agentes patogénicos tenha ocorrido, o diagnóstico pode se tornar mais difícil, uma vez que os sinais clínicos relacionados com algumas doenças vectoriais podem não ser evidentes. Nestas situações é muito importante levar em consideração uma detalhada anamnese a possibilidade de ter ocorrido infestação pelos vetores mesmo não tendo sido observados (ESCCAP, 2010).

### 3.7 Sinais clínicos

Alguns agentes patogénicos podem ser transmitidos entre gerações de carrças e / ou estádios do ciclo de vida, e outros através de cada fase do ciclo, enquanto se alimentam.

A saliva é a principal via para a transmissão de agentes patogénicos. Algo muito importante de reter é o facto de uma carrça ter a capacidade de abrigar mais de um agente patogénico, deste modo o quadro clínico não é exclusivo de um único processo (ESCCAP,2010).

As carrças podem ser encontradas em toda a superfície do corpo, mas com predileção para as áreas ventrais e áreas de pele fina, tais como o rosto, orelhas, axilas, e regiões inguinais e/ou perianais (ESCCAP,2010).

A perda de sangue em animais com grandes infestações pode desencadear anemias, muitas vezes irreversíveis.

Em casos em que a remoção das carrças é mal executada ocorre uma reação às peças bucais por estas permanecerem fixadas no hospedeiro, originando microabscessos que poderão desenvolver posteriormente uma infeção.

As reações cutâneas adversas às mordidas 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 4 mm, mas cuja resolução é espontânea, ao fim de quatro a cinco dias, após a eliminação do vetor (Estrada- Peña *et al.*, 2004a). Podem surgir reações 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 (Estrada-Pena *et al.*, 2004a).

### **3.8 Remoção de carraças**

Sempre que sejam visíveis carraças no animal é importante removê-las, o mais rápido possível de forma a evitar a transmissão de agentes patogénicos (controlo mecânico) seguida de aplicação de acaricidas (ESCAAP, 2010).

Os animais de estimação, em geral, permitem uma manipulação fácil para que as carraças possam ser facilmente retiradas, no entanto devemos ter especial atenção na remoção destas, pois devem ser removidas de forma firme, mas cuidadosa, evitando deste modo que fiquem partes da carraça ainda no hospedeiro. Devem ser usadas pinças fortes e com ponta romba, para remover adultos, ou pinças finas de ponta curvada no caso de serem larvas ou ninfas. A remoção da carraça deve ser feita o mais próximo possível da pele do animal de forma a remover todo o aparelho bucal desta. (Iza, 2010).

### **3.9 Prevenção e controlo**

Para as carraças, o tratamento com acaricidas é quase sempre impossível, uma vez que os estádios não dependem sempre de um hospedeiro para se desenvolver e se encontram amplamente distribuídos e em locais inacessíveis sendo então imprescindível tratar os locais onde os animais se encontram, como canis e casas onde a infestação foi estabelecida (ESCCAP, 2010)

A prevenção com produtos repelentes ou inseticidas presentes em coleiras, “spot-on” e “sprays” são as formas mais comuns e mais eficazes no controlo de infestação de carraças nos animais de companhia, estando disponíveis no mercado várias formulações que incluem permetrinas, amitraz, fipronil ou imidaclopride (Solano-Gallego & Baneth, 2011).

A profilaxia contra carraças deve abranger todo o período da atividade das carraças, devendo os donos evitar ou limitar o acesso dos animais de companhia a áreas com elevada densidade de carraças ou em alturas do ano em que se sabe que a atividade destas é maior, inspecionar os animais de forma a detetar carraças e remover assim que possível e recorrer ao uso frequente de acaricidas com ação residual e resistente à água (ESCCAP, 2010).

#### 4. Objetivos

O trabalho experimental realizado nesta dissertação teve como objetivos:

- ✓ Identificar a prevalência de *H.canis* em esfregaços sanguíneos de cães que se apresentavam para consultas e que eram oriundos dos concelhos de Abrantes e Sardoal.
- ✓ Identificar as espécies de ixodídeos presentes nos canídeos em estudo uma vez que eram desconhecidos quais os vetores responsáveis pela infecção nesta área geográfica.
- ✓ Analisar a possível associação entre a presença de ixodídeos e o desenvolvimento sintomático da doença ou a presença de gamontes em esfregaços sanguíneos.

## 5. Materiais e métodos

Todos os procedimentos clínicos neste estudo estão de acordo com o regulamento Português (Decreto-Lei nº 314/2003 e nº 113/2013) e com a legislação Europeia para a proteção de animais.

Todos os procedimentos para a recolha das amostras foram no âmbito de consultas clínicas realizadas pela Médica Veterinária Inês Grilo e os resultados estão disponíveis para os colaboradores deste estudo bem como para a Câmara Municipal de Abrantes.

### 5.1 Área geográfica do estudo

As amostras do estudo eram provenientes de canídeos oriundos do distrito de Santarém (Figura 10), pertencentes aos concelhos de Abrantes e Sardoal (Figura 11), abrangendo 9 das 13 freguesias de Abrantes (Figura 12) e 2 das 4 freguesias do Sardoal (Figura 13).

O estudo foi realizado durante o mês de agosto de 2017.



**Figura 10.** Mapa de Portugal Continental, distrito sob estudo assinalado com circunferência ( Mapa adaptado de <https://www.visitportugal.com/zh-hans/destinos>)



**Figura 11.** Concelhos do Distrito de Santarém, sob estudo assinalados com circunferência ( Mapa adaptado de <https://www.visitportugal.com/zh-hans/destinos>)



### 5.1.2 Concelho do Sardoal

O concelho do Sardoal ocupa uma área de aproximadamente 92 km<sup>2</sup> possui cerca de 4.000 habitantes (censos definitivos de 2011, INE) e 1353 canídeos registados (dados cedidos gentilmente por cada junta, presentes no Anexo 4) é composto por 4 freguesias (Alcaravela, Santiago de Montalegre, Sardoal e Valhascos), como representa a Figura 13.

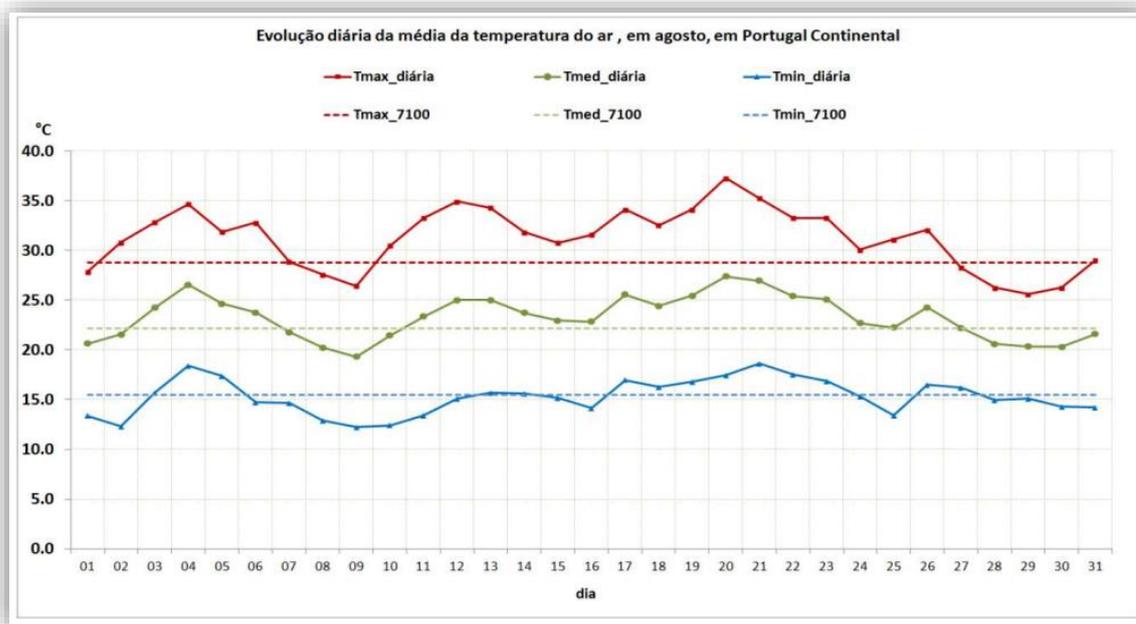
Pela sua localização geográfica encontra-se na confluência de três regiões distintas: Ribatejo, Alentejo e Beira Baixa (Câmara Municipal do Sardoal, 2018).



**Figura 13.** As freguesias do concelho do Sardoal sob estudo assinaladas com circunferências. (Mapa adaptado de <https://pt.wikipedia.org/wiki/Sardoal>)

## 5.2 Clima

Durante o período em que decorreu o estudo, agosto de 2017, foi registada, no Instituto Português do Mar e da Atmosfera, a evolução diária da temperatura do ar de 1 a 31 de agosto de 2017 em Portugal Continental (Figura14).



**Figura 14:** Evolução diária da temperatura do ar de 1 a 31 de agosto (Tmax, Tmed e Tmin designam, respetivamente, temperatura máxima, média e mínima) (IPMA,2017).

Durante quase todo o mês de agosto, o estado do tempo no território do Continente foi determinado, essencialmente, pela influência do anticiclone dos Açores quer o seu núcleo principal estivesse localizado a norte ou nordeste dos Açores, quer a oeste ou sudoeste deste arquipélago. Este anticiclone, em conjugação com a depressão térmica Ibérica, que se localizou, preferencialmente, na parte ocidental espanhola, determinaram as condições de tempo seco e quente em especial nas regiões do litoral Norte e Centro (IPMA, 2017).

O mês de agosto de 2017 foi classificado como seco, com um valor médio de precipitação em Portugal continental de 8.2 mm, o que corresponde a 60 % do valor médio. Durante este mês apenas ocorreu precipitação nos últimos dias, em particular nos dias 28 e 29 em que, nalgumas regiões, se registaram valores diários da quantidade de precipitação significativos acompanhados de queda de granizo e trovoadas. (IPMA,2017)

Como curiosidade é importante referir que o maior valor da temperatura máxima diária registada foi de 43.7 °C em Alvega, no dia 20, localidade abrangida pelo estudo e de onde foram recolhidas algumas amostras.

### 5.3 Caracterização da amostra

As amostras foram obtidas através de recolha de sangue de 75 cães no âmbito de consultas e que se destinavam à realização de análises laboratoriais.

Foram recolhidas informações sobre cada animal tais como idade, sexo, raça, estado reprodutivo, atividade a que os canídeos se destinavam e se foram sujeitos alguma vez a ações profiláticas, nomeadamente a vacinações e desparasitações e ainda há quanto tempo e a frequência com que estas foram efetuadas.

Dos animais do estudo, 38 (51%) eram fêmeas e 37 (49%) eram machos. Das 38 fêmeas, 30 (79%) não eram ovariectomizadas. Dos machos, 35 (94,6%) não eram orquiectomizados.

Quanto às aptidões, estas variaram entre a caça (20%, 15 animais), companhia (53%, 40 animais) e pastoreio (12 %, 9 animais) e 15 %, (11 animais) eram canídeos que se encontravam no Canil de Abrantes.

Relativamente aos tratamentos com ecto e endoparasiticidas, verificou-se que 33 canídeos (44%) tiveram sujeitos a algum tipo de ação profilática, porem sem se ter conhecimento da frequência que eram realizados. Os demais 42 canídeos (56%) não foram sujeitos a qualquer tipo de prevenção e os tutores afirmavam desconhecer as vantagens do uso destas.

#### 5.4 Critérios de inclusão

Neste estudo foram incluídos cães com idade superior a 1 ano provenientes do concelho de Abrantes e Sardoal e que tivessem acesso ao exterior.

A idade de alguns animais em que foram adotados pelos tutores ou encontravam-se para adoção foi estimada de acordo com a dentição, tamanho corporal, presença de pelagem branca típica de animais idosos, opacidade do cristalino dos olhos.



**Figura 15.** Canídeos parasitados com ixodídeos (Original do autor)

## 5.5. Colheita e processamento das amostras

As amostras foram obtidas através da venopunção das veia cefálica, veia femoral e/ou veia safena com seringas de 1 ml e agulhas de 25 G, colhendo-se cerca de 0,5 ml de sangue, acondicionando em tubos com EDTA, conservando-se de seguida no frigorífico a 4°C, por um período nunca superior a 48 horas até à realização do esfregaço sanguíneo.

### 5.5.1 Realização de esfregaço sanguíneo

O esfregaço sanguíneo é provavelmente o mais importante exame de rotina hematológica de qualquer espécie. Com um bom esfregaço sanguíneo podemos obter informações valiosas sobre a morfologia e distribuição dos elementos figurativos do sangue (Campbell, 1994; Fudge, 2000; Vilar *et al.*, 2003; Stelling *et al.*, 2004).

A realização de esfregaços sanguíneos corados com derivados de Romanowsky, como o corante Giemsa é o método de diagnóstico mais simples e de mais fácil execução na prática clínica veterinária (Harvey, 2001). A realização dos esfregaços sanguíneos deste estudo foi realizada de acordo com a descrição a seguir.

A técnica do esfregaço sanguíneo consiste na colocação de uma pequena gota de sangue em uma das extremidades de uma lâmina de vidro para microscopia, devendo o sangue ser distendido por uma lâmina extensora ou uma lamela, posicionada num ângulo de aproximadamente 45°, como representa a Figura 16. Posto isto, os esfregaços devem ser secos ao ar, identificados e armazenados para futuro processo de coloração (Vilar *et al.*, 2003; Stelling *et al.*, 2004).

Os esfregaços foram observados na sua totalidade para pesquisa de gamontes intracelulares de *H.canis* nos neutrófilos dos cães sob estudo.



**Figura 16.** Método de elaboração de um esfregaço sanguíneo (Samour, 2009a)

### 5.5.2 Coloração com Giemsa

Após a realização do esfregaço, as lâminas foram fixadas em álcool etílico 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 corrente para remover o excesso de corante, secas ao ar e armazenadas à temperatura ambiente para posterior observação em microscópio óptico (Objetivas x40 e x100) (Figura 17) no Laboratório de Parasitologia da FMV da ULHT.

Procedendo-se a seguir a observação das lâminas utilizando-se uma gota de óleo de imersão e observação de cada esfregaço sanguíneo com as ampliações de 400x e 1000x, sempre com início na periferia do esfregaço. Cada lâmina foi observada na sua totalidade onde cerca de 100 campos aleatórios foram percorridos para a pesquisa do agente em estudo de modo a garantir que os esfregaços fossem observados com a mesma metodologia.



**Figura 17. (A)** Esfregaço sanguíneo; **(B)** Esfregaço sanguíneo corado com Giemsa (Original do autor)

### 5.5.3 Colheita e armazenamento das carraças ixodídeas

Todas as carraças ixodídeas que se encontravam visíveis nos canídeos durante as consultas foram recolhidas (Figura 15) e conservadas em recipientes com álcool a 70 % e devidamente identificadas com o nome do canídeo e a sua localidade (Figura 18).

Após a recolha, as carraças foram encaminhadas ao laboratório para se proceder à sua identificação (género e espécie) assim como o sexo e o estágio de desenvolvimento, através das características morfológicas.

Após a identificação, todos os ixodídeos foram armazenados com o objetivo de realização de estudos futuros.



**Figura 18.** Amostras de Ixodídeos identificados e conservadas em álcool a 70% (Original do autor)

## 6 Resultados

### 6.1 Esfregaços sanguíneos

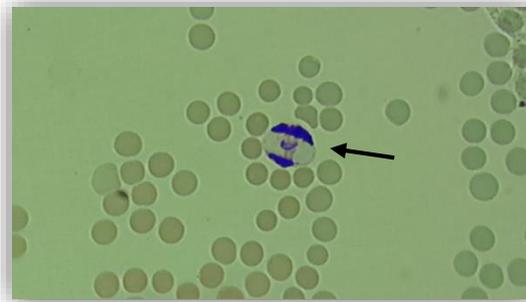
Dos 75 esfregaços sanguíneos realizados, foram detetados gamontes de *Hepatozoon canis* em 6 cães (8%) (Figura 19), não tendo sido identificado qualquer outro tipo de hemoparasita intracelular nos restantes 69 esfregaços.

Os animais parasitados eram oriundos dos concelhos de Abrantes e do Sardoal. Entre os animais positivos, 4 tinham como aptidão a caça (67%) e 2 (33%) partilhavam a mesma habitação (Tabela 2).

Um dos cães parasitados (16%) encontrava-se no canil, não se sabendo assim a sua história passada, nem a que ambiente esteve exposto.

Apenas um canídeo (16%) apresentou sintomatologia compatível com a doença, tal como mucosas pálidas, alopecia generalizada e caquexia, tendo acabado por falecer um mês depois.

Dentre os animais positivos, observou-se que na sua totalidade os cuidados básicos de higiene, como limpeza dos canis e medidas profiláticas eram deficientes ou ausentes e encontravam-se infestados por carraças.



**Figura 19.** Gamonte de *H. canis* (seta preta) em esfregaço sanguíneo de cão (Giemsa, 1000 x)  
(Original do autor)

**Tabela 2.** Dados dos animais parasitados com *Hepatozoon canis*

Localidade (Concelho e Freguesia)	Sexo	Estado reprodutivo	Raça	Aptidão	Desparasitação/ Vacinação	Espécie Ixodídea observada	Caracterização dos ixodídeos
# Sardoal – Valhascos	Macho	Não orquiectomizado	Srd	Caça	Não	R. sanguineus	4 Fêmeas 1 Macho 2 Ninfas
Abrantes – Rossio ao Sul do Tejo	Fêmea	Não ovariectomizada	Podengo	Caça	Não	R. sanguineus	1 Macho 3 Ninfas
**Abrantes	Macho	Não orquiectomizado	Srd	Pastoreio	Não	R. sanguineus	1 Ninfas
*Abrantes – Mouriscas	Fêmea	Não ovariectomizada	Srd	Pastoreio	Não	R. sanguineus	3 Fêmeas 2 Machos 3 Ninfas
*Abrantes – Mouriscas	Macho	Não orquiectomizado	Podengo	Caça	Não	R. sanguineus	3 Fêmeas 5 Ninfas
Abrantes – Mouriscas	Macho	Não orquiectomizado	Srd	Caça	Não	Ausência no hospedeiro	0

Legenda: Srd – Sem raça definida; \* Animais coabitantes entre si; \*\* Cão que se encontra no canil; # Animal que apresentava sintomatologia.

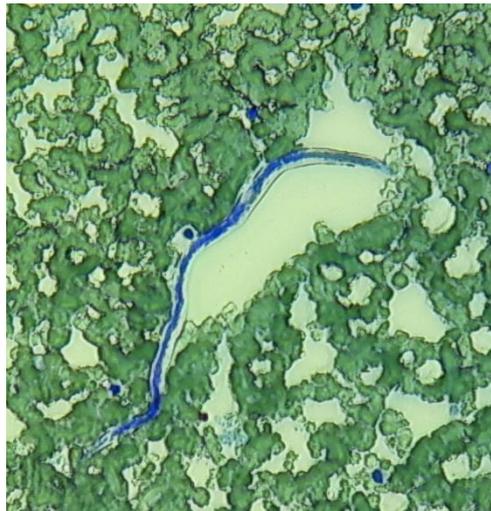
## 6.2 Outros parasitas sanguíneos observados

Dos restantes 69 esfregaços realizados em que não se observou *H. canis*, foram identificados acidentalmente microfilárias em 5 esfregaços (7,2% dos animais do estudo) (Figura 20), microfilárias essas que não foram identificadas.

Por ter sido um achado acidental não se procedeu ao teste modificado de Knott que seria um método recomendado para se observar a morfologia e a mensuração das dimensões das microfilárias possibilitando a sua diferenciação (American Heartworm Society, 2014).

Dos 5 animais (7,2 %) onde foram observadas microfilárias, 3 animais (60 %) possuíam como aptidão a caça, um cão de pastoreio (20 %) e outro de companhia (20%) (Tabela 3).

Nenhum dos canídeos que foram positivos para microfilárias, se apresentou positivo para *Hepatozoon canis*.



**Figura 20.** Microfilária (Giemsa, 40 x) (Original do autor)

**Tabela 3.** Dados dos animais parasitados com microfilárias (Original do autor)

Localidade (Concelho e Freguesia)	Sexo	Estado reprodutivo	Raça	Aptidão	Desparasitação/ Vacinação	Antiparasitário
Abrantes – Tramagal	Macho	Não orquiectomizado	Srd	Pastoreio	Sim	Praziquan (Praziquantel + Embonato de Pirantel + Fenbendazole.) Vitaminthe
*Abrantes – Rossio ao Sul do Tejo	Fêmea	Não ovariohisterctomizada	Podenga	Caça	Sim	(Niclosamida + oxibendazole)
*Abrantes – Rossio ao Sul do Tejo	Fêmea	Não ovariohisterctomizada	Srd	Caça	Sim	Vitaminthe ( Niclosamida + oxibendazole)
Sardoal – Valhascos	Macho	Não orquiectomizado	Srd	Caça	Não	—
Abrantes – Mouriscas	Fêmea	Não ovariohisterctomizada	Labrador Retriever	Companhia	Não	—

Legenda: Srd – Sem raça definida; \* Animais coabitantes entre si

### 6.3. Parasitismo por ixodídeos

Foram recolhidas 177 carraças em 28 canídeos (37%) e destes, 18 (24%) apresentavam mais do que um exemplar.

A maioria pertencia a espécie *Rhipicephalus sanguineus* (99,4%) e *Ixodes ricinus* (0,6%) (Figura 21).

No concelho de Abrantes registaram-se ambas as espécies, *R. sanguineus* e *Ixodes ricinus*, tendo no concelho do Sardoal se registado somente ixodídeos da espécie *R. sanguineus*.

Foi identificado o sexo e o estágio de desenvolvimento de cada ixodídeo, havendo na espécie *R. sanguineus* um predomínio de formas imaturas (ninfas) (40,3%), seguida de uma elevada percentagem de fêmeas (38,1 %) e com uma percentagem mais reduzida de machos (21,6 %).

Quanto à espécie *I. ricinus*, apenas foi recolhido um único exemplar, na freguesia das Mouricas, uma fêmea.

Não foram recolhidas formas larvares de qualquer uma das espécies.



**Figura 21.** (A) *Rhipicephalus sanguineus* fêmea à esquerda e macho à direita; (B) *Rhipicephalus sanguineus* ninfa, notando-se a ausência do poro genital; (C) *Ixodes ricinus* fêmea, notando-se a abertura do poro genital junto à quarta pata e a presença de um longo sulco anal dorsal. (Original do autor)

## 7. Discussão

Este estudo teve como objetivo principal determinar a prevalência de *H.canis* em esfregaços sanguíneos de cães residentes no distrito de Santarém, identificar as espécies de ixodídeos que parasitavam estes canídeos e a possível associação entre a presença de ixodídeos e o desenvolvimento sintomático da doença causada por *Hepatozoon canis*.

Sendo os esfregaços sanguíneos um método de diagnóstico económico e de rápida execução em qualquer clínica veterinária, optou-se por este método devido à sua praticidade e baixo custo.

A deteção de *Hepatozoon canis* revelou uma prevalência de 8% dos animais examinados e que pertenciam aos concelhos de Abrantes e Sardoal, não tendo sido identificado nenhum canídeo com coinfeção a qualquer outro tipo de hemoparasita transmitido por ixodídeos.

No estudo realizado por Caeiros em 2012 na pesquisa por esfregaço sanguíneo de 80 animais oriundos dos concelhos de Lisboa e Sintra revelou em dois cães (prevalência de 2,5%) a presença de formas elípticas morfológicamente semelhantes a *H. canis* embora os hemoparasitas visados inicialmente neste estudo fossem *Babesia* spp. e de outros hemoparasitas, revelando ser um achado accidental a presença de *H. canis*.

Resultados semelhantes foram também obtidos por Figueiredo (2007) onde 2,1% dos cães provenientes de Bragança apresentavam-se positivos. Em outro estudo realizado por Conceição-Silva e seus colaboradores (1988) obtiveram 3% de positividade para os animais estudados nas regiões de Lisboa e Alcácer do Sal.

Também por meio de esfregaço sanguíneo, Alexandre (2005) relatou uma prevalência de 1,8% de *H. canis* em cães com sinais compatíveis com doença transmitida por ixodídeos no Algarve.

No presente estudo os animais positivos para *Hepatozoon* spp. eram animais com acesso permanente ao exterior e maioritariamente de caça, como tal, muito expostos aos ixodídeos e conseqüentemente aos agentes por eles transmitidos. Além disso, todos os animais positivos não eram submetidos à profilaxia regular para carraças e possuíam relatos de infestações por carraças e ser notável a presença destas no momento da consulta, fatores esses que aumentaram a predisposição à infecção por *Hepatozoon canis*.

Resultados semelhantes também foram referidos por O'Dwyer (2011) em estudos realizados em diferentes regiões do Brasil onde foram examinados cães de áreas urbanas e rurais.

A baixa prevalência de infecção (8%) obtida neste estudo poderá estar relacionada com o facto de a amostragem ter sido aleatória e por ter sido utilizado somente o método de esfregaços sanguíneos como diagnóstico.

A ausência de positividade para outras hemoparasitoses, como *Babesia* spp. e *Ehrlichia canis*, pode estar relacionada com o facto do estudo ter sido realizado em cães aparentemente saudáveis e pela pesquisa direta em esfregaços sanguíneos, diferentemente do constatado por outros autores em trabalhos realizados com cães atendidos em hospitais Veterinários e utilizando técnicas moleculares (Ramos *et al.*, 2010).

A não observação microscópica de parasitas no interior dos eritrócitos pode ser justificada pela baixa e intermitente parasitémia de *Babesia* spp. e *Ehrlichia canis* em cães assintomáticos e pela possível não deteção destes hemoparasitas em esfregaços sanguíneos devido ao método ter sido realizado a partir de sangue colhido em veia periférica e não através de esfregaços sanguíneos feitos a partir de amostras de sangue de capilares sanguíneos da extremidade do pavilhão auricular, que podem proporcionar um maior número de eritrócitos infetados (Solano-Gallego & Baneth, 2011).

Cinco dos seis canídeos infetados pertenciam ao concelho de Abrantes (83%), com uma predominância para os animais sem raça definida.

Dos 6 animais positivos, quatro eram machos cujo resultado deste estudo corrobora com Gavazza *et al.*, 2003 & Mundim *et al.* 2008a, que também detetaram a infecção significativamente maior em machos, mas contradiz outros ao relatarem que a infecção pode ocorrer independente do sexo (Beaufils & Martin-granell, 1988; Gomes *et al.*, 2010). O resultado do presente estudo pode estar relacionado com a maior exposição dos machos às carraças, devido a hábitos comportamentais e ao facto de não estarem castrados aumentando consequentemente o seu comportamento exploratório.

Relativamente à associação entre a presença de infecção e a não vacinação, serviu para analisar se os animais que eram vacinados possuíam cuidados veterinários e se os proprietários tinham uma maior preocupação quanto ao acesso ao exterior e se mantinham algum esquema de desparasitação externa e interna. Observou-se neste estudo que todos os animais que estavam regularmente vacinados e desparasitados não foi diagnosticado o parasita.

O facto dos canídeos que apresentaram formas parasitárias terem sido assintomáticos, com exceção de um, reforça a observação da maioria dos resultados descritos por vários autores, onde referem a detecção acidental de *H. canis* em neutrófilos circulantes como sendo um achado comum em cães assintomáticos. Sendo este um agente com baixa patogenicidade, a sua detecção é mais frequente em co-infecções com outros agentes como *Babesia vogeli* e *Ehrlichia canis*. A parasitémia intermitente ou infecção com o

sequestro do parasita na fase de meronte nas vísceras também explica a sua baixa expressão clínica (Baneth *et al.*, 1996; Vojta *et al.*, 2009; Baneth, 2011).

Quanto aos cães parasitados que co-habitavam pode-se observar que eram oriundos da freguesia das Mouriscas (concelho de Abrantes) e que pelas suas características geográficas e climáticas como temperaturas extremamente elevadas no verão, podendo chegar as 40 °C, poderá favorecer a presença e disseminação dos vetores.

Ainda que na maioria das vezes o esfregaço sanguíneo seja o método mais utilizado para o diagnóstico deve-se proporcionar o aumento da sensibilidade do método como foi sugerido por Karagenc *et al.* (2006), que recomendaram a observação de esfregaços feitos a partir de buffy coat com o intuito de reduzir o número de falsos negativos.

Dada a elevada prevalência do vetor *R. sanguineus*, *H. canis* é relativamente comum nos países do Sul da Europa, (Baneth, 2011; Otranto *et al.*, 2011; Gianelli *et al.*, 2013; Dantas-Torres *et al.*, 2012), tendo-se obtido neste estudo uma percentagem de 99,4%.

A percentagem de ixodídeos da espécie *I. ricinus* identificados foi de 0,6%, o que se encontra de acordo com publicações anteriores que descrevem que as densidades deste vetor são relativamente baixas em Portugal (Núncio *et al.*, 1999). Este é um fator importante uma vez que apesar desta espécie ser um vetor conhecido de algumas doenças, não foi possível determinar a taxa de infeção.

Neste estudo também foram observados em 5 esfregaços sanguíneos microfilárias podendo ser explicado pelo facto de doenças como a dirofilariose e outras parasitoses pouco patogénicas e que apresentam microfilaremia possam estar presentes em áreas endémicas em Portugal.

A principal limitação deste estudo consistiu na recolha de informação detalhada dos animais visto que alguns pertenciam a um canil, onde havia um grande desconhecimento por parte dos tutores face à informações relativas dos seus animais tendo sido feitas estimativas da idade, e alguns desconheciam se estes tinham sido sujeitos a algum tipo de profilaxia, com que substância ativa e/ou há quanto tempo, para além de que alguns donos poderiam ter orientado as suas respostas para omitir a negligência existente.

Para além destas limitações, dos 6 canídeos positivos para *H. canis* apenas um tutor quis tratar o seu cão, todos os restantes rejeitaram a opção de tratamento dado as elevadas dificuldades económicas.

## 8. Conclusões

Dada a pouca informação sobre a epidemiologia da hepatozoonose canina em Portugal e pela ausência de dados epidemiológicos no distrito de Santarém, este estudo representa a primeira contribuição sobre a ocorrência desta parasitose no concelho de Santarém sendo necessários futuros estudos com um maior número de amostras e com técnicas mais sensíveis para o diagnóstico de *H. canis*.

Assim sendo, a autora recomenda que os cães que sejam levados à consulta e que sejam suspeitos de doenças transmitidas por ixodídeos sejam testados por métodos moleculares e serológicos para o maior conhecimento da ocorrência desta parasitose. Como estudo também pode-se alertar as instituições médico-veterinárias para a importância desta doença nos cães, especialmente aqueles que tenham contacto frequente com o exterior e sem proteção contra ectoparasitas e que apesar de serem infeções na maioria das vezes assintomáticas, devem ser incluídas nos diagnósticos diferenciais em todos os canídeos que tenham contado com carraças.

Deve ser efetuada na prática clínica a pesquisa rápida de hemoparasitas através de esfregaços sanguíneos sempre que os animais apresentem alterações hematológicas e/ou sinais clínicos inespecíficos, para se descartar esta parasitose.

Os planos de desparasitação e vacinação devem ser sistematicamente recomendados, embora a realidade económica da maioria dos tutores nem sempre permita a aplicação na totalidade de todas as medidas profiláticas, porém estes devem ser informados e sensibilizados para as boas práticas de prevenção de doenças.

Em Portugal, alguns vetores como as carraças e as pulgas, têm-se mostrado ativos durante todo o ano, levando os animais a estarem em risco permanente de infecção por alguns agentes como *Ehrlichia* spp. e *Bartonella* spp.. A atividade prolongada destes vetores destaca a necessidade de implementação de medidas profiláticas regulares e sensibilização dos tutores para a diminuição da circulação de agentes patogénicos.

Face ao desconhecimento da real dimensão desta doença nas restantes regiões do território nacional, torna-se premente a continuação dos estudos epidemiológicos, nas demais regiões e com um maior número de animais sob estudo de forma a definir melhor a importância clínica deste agente em cães, determinar ainda as possíveis influências das co infeções no diagnóstico, prognóstico e tratamento e por fim caracterizar melhor a doença e os seus fatores de risco nos canídeos em todo o território nacional.

Assim, é importante sensibilizar médicos veterinários, profissionais de saúde e sobretudo os proprietários que com o aumento da exposição dos cães aos vetores, devido às alterações climáticas e reaproximação das áreas verdes, torna-se indispensável um controlo

profilático regular dos animais e do meio ambiente envolvente, com o objetivo de manter os animais livres de infestações por ectoparasitas e, desta forma, evitar possíveis transmissões de agentes zoonóticos.

## 9. Referências bibliográficas

- Aguiar D.M.; Ribeiro M.G.; Silva W.B.; Dias Jr J.G.; Megid J.; Paes A.C. (2004). *Hepatozoonose canina*: achados clínico-epidemiológicos em três casos. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootécnia.56: 411-413.
- Alencar N.X.; Kohayagawa A.; Santarém V.A. (1997). *Hepatozoon canis* infection of wild carnivores in Brazil. Veterinary Parasitology. 70: 279-282.
- 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.
- Almosny, N. R. P. (2002) Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonose. Rio de Janeiro: L. F. Livros, 135 p.
- American Heartworm Society: Graham, W., Rubin, S., Boeckh, A., Buzhardt, L., Jones, S., Miller, M., Payne, P., Rehm, C., Smith-Blackmore, M., Stannard, R., Nelson, C. T., Atkins, C., Carithers, D., McCall, J. & von Simson, C. (2012b). Current Canine Guidelines for the Diagnosis, Prevention, and Management of Heartworm (*Dirofilaria immitis*). Disponível em: <http://heartwormsociety.org/veterinary-resources/canine-guidelines.html>. Acedido a 20 de fevereiro de 2018.
- Anderson, J.F. e Magnarelli, L.A. (2008). Biology of ticks. Infect Dis Clin North Am; 22:195-215.
- Ardila, A. M.; Cala, F.; Vargas, G.; Arcila Q., V.; Castellanos, V. (2007). Reporte de casos clínicos con *Hepatozoon canis* en el Centro Médico Quirúrgico Veterinario de la Universidad Cooperativa de Colombia. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, VIII (5), 1-12.
- Arthur D.R. (1962) Ticks and disease. Oxford: Pergamon Press; 445.

Assarasakorn, S.; Niwetpathomwat, A.; Techangamsuwan, S.; Suvarnavibhaja, S. (2006) A retrospective study of clinical hematology and biochemistry of canine hepatozoonosis on hospital populations in Bangkok, Thailand. *Comparative Clinical Pathology*, v.15, n.2, p.107-109.

Baneth, G., A. Harmelin, and B.-Z. Presentey. (1995). *Hepatozoon canis* in two dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 12:1891-1894.

Baneth, G., Shkap, V., Presentey, B.Z. & Pipano, E. (1996). *Hepatozoon canis*: The prevalence of antibodies and gametocytes in dogs in Israel. *Veterinary Research Communications*, 20(1), 41-46.

Baneth G.; Aroch I.; Presentey B. (1997). *Hepatozoon canis* infection in a litter of Dalmatian dogs. *Veterinary Parasitology*. 70: 201-206.

Baneth, G., and B. Weigler. (1997). Retrospective case-control study of *hepatozoonosis* in dogs in Israel. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 11:365-370.

Baneth G.; Shkap V.; Samish M.; Pipano E.; Savitsky I. (1998). Antibody response to *Hepatozoon canis* in experimentally infected dogs. *Veterinary Parasitology*, v. 74, n. 2-4, p. 299-305.

Baneth, G., Barta, J.R., Shkap, V., Martin, D.S., Macintire, D.K., Vincent-Johnson, N., (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.

Baneth G.;Samish M.;Alekseev E;Aroch I.;Shkap, V. (2001). Transmission of *Hepatozoon canis* to dogs by naturally fed or percutaneously injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Journal of Parasitology*. 87: 606-611.

Baneth G. (2003). Disease Risks from the Travelling Pets. *In Practice*. 5: 272-277.

Baneth, G.; Shkap, V. (2003) Monozoic cysts of *Hepatozoon canis*. *Journal of Parasitology*, v.89, n.2, p.379-381.

Baneth, G. (2006). Infection Disease of the Dog and Cat. In: Greene, C.E. *Hepatozoon canis* Infection. 3° ed. Missouri: Elsevier Inc. Cap.74. p. 698.

Baneth, G. (2006a). *Hepatozoonosis*. In C.E. Greene (Ed.), Infectious Diseases of Dog and Cat (3ªEd., pp. 698-705). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.

Baneth, G. (2007). Canine and feline hepatozoonosis – more than one disease [versão electrónica]. In IVIS, Proceedings of the 32nd Annual Congress of the World Small Animal Veterinary Association 2007, Sydney, Australia.

Baneth, G.; Samish, M.; Shkap, V. (2007). Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). The Journal of Parasitology, v. 93, n. 2, p. 283-299.

Baneth, G. (2011). Perspectives on canine and feline *hepatozoonosis*. Veterinary Parasitology, 181, 3-11.

Baneth, G. (2012). Infectious Disease of the Dog and cat. (C. Greene, Ed.) (4th ed.). Missouri: Elsevier Saunders.

Baneth, G., Harrus, S., Gal, A., & Aroch, I. (2015). Canine vector-borne co-infections: *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* in the same host monocytes. Vet Parasitol, 208(1-2), 30– 34.

Barral, M.; García-Pérez, A.L.; Juste, R.A. y cols. (1993) Distribución y actividad de los Ixódidos presentes en la vegetación de la Comunidad Autónoma Vasca.

Barral, M.; Benedicto, L.; Gil, H. e cols. (1999). Detection of *Ehrlichia phagocytophila* DNA in *Ixodes ricinus* from areas in the North of Spain. En "*Rickettsiae* and rickettsial diseases at the turn of the third millenium" Raoult, D and Brouqui, P Ed Elsevier; 428-431.

Barral, M.; Garcia-Perez, A.L.; Juste, R.A. y cols. (2002) Distribution of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks from the Basque Country, Spain. J Med Entomol; 39:177-184.

Beaufils, J. P.; Martin-granel, J. (1988) *L'hépatozoonose canine* première partie: étude bibliographique. *Pratique Medical et Chirurgicale l'Animal de Compagnie*, Issy-les-Moulineaux, v. 23, n. 2, p. 127-137.

Beaufils, J. P.; Martin-granel, J.; Jumelle, P. H. (1996). *Hépatozoonose* chez le chien et chez le renard: épidémiologie, clinique et traitement. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*, v. 31, n. 3, p. 243-253.

Beugnet, F. & Marie, J.-L. (2009). Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Veterinary Parasitology*. 03.028.

Binnington, K. C.; Obenchain, F. D. (1982) Structure and function of the circulatory, nervous, and neuroendocrine systems of ticks. In: Obenchain, F. G.; Galun, R. *Physiology of ticks*. 1. ed. Oxford: Pergamon Press. Cap. 10, p. 351-398.

Black WC, IV, Piesman J. (1994). Phylogeny of hard- and softtick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:10034–10038.

Bullova, E.; Lukan, M.; Stanko, M. & cols. (2009) Spatial distribution of *Dermacentor reticulatus* tick in Slovakia in the beginning of the 21st century. *Vet Parasitol*. 165:357-360.

Burgdorfer, W.; Barbour, A.G.; Hayes, S.F. & cols. (1982) *Lyme disease*- a tick-borne spirochetosis? *Science*. 216:1317-1319.

Burridge, M.J. & Simmons, L.A. (2003) Exotic ticks introduced into the United States on imported reptiles from 1962 to 2001 and their potential roles in international dissemination of diseases. *Vet Parasitol*. 113:289-320.

Caeiro, V. (1999). General review of tick species present in Portugal. *Parasitologia* 41, 11–15.

Caeiros, A.P.S. (2012). Detecção de *Babesia* spp. e de outros hemoparasitas em cães, por técnicas morfológicas, serológicas e moleculares, no Distrito de Lisboa, Portugal. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.

Câmara Municipal do Sardoal [CMS]. (2018). Disponível em <http://www.cm-sardoal.pt/index.php/descobrir/caracterizacao>. Acedido a 14 de fevereiro, 2018 em [www.cm-sardoal.pt](http://www.cm-sardoal.pt).

Campbell, T.W., (1994) Avian Hematology. In: Campbell, T. W.; Ed. Avian Hematology & Cytology. Ames; IA: Iowa States University Press, 320 p.

Cardoso, L., H. C. Cortes, O. Eyal, A. Reis, A. P. Lopes, M. J. Vila-Vicosa, P. A. Rodrigues, and G. Baneth. (2014). Molecular and histopathological detection of *Hepatozoon canis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Portugal. Parasites and Vectors 7: 113. Crossref, PubMed, Google Scholar

Carvalho IL, Fonseca JE, Marques JG, Ullmann A, Hojgaard A, Zeidner N, Nuncio (2008) MS.Vasculitis-like syndrome associated with *Borrelia lusitaniae* infection. Clin Rheumatol. 27(12):1587-91.

Collares-Pereira M, Couceiro S, Franca I, Kurtenbach K, Schäfer SM, Vitorino L, Gonçalves L, Baptista S, Vieira ML, Cunha C. (2004). First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. Journal of Clinical Microbiology. 42(3):1316-8.

Companion Vector-Borne Diseases [CVBD]. (2018). Disponível em: <http://www.cvbd.org/en/occurrence-maps/world-map/>. Acedido a 23 de Fevereiro, 2018 de CVBD em [www.cvbd.org](http://www.cvbd.org)

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.

Concelho de Abrantes. (2018) Disponível em: <http://www.ribatejo.com/ecos/abrant/abgeografia.html> Acedido a 14 de fevereiro, 2018 em [www.ribatejo.com/ecos/abrant/index.html](http://www.ribatejo.com/ecos/abrant/index.html)

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.

Dantas-Torres, F., Latrofa, M.S., Weigl, S., Taralho, D., Lia, R.P. & Otranto, D. (2012). *Hepatozoon canis* infection in ticks during spring and summer in Italy. *Parasitology Research*, 110, 695- 698

Eiras D.F.; Basabe J.; Scodellaro C.F.; Banach D.B.; Matos M.L.; Krimer A.; Baneth, G. (2007) . First molecular characterization of *canine hepatozoonosis* in Argentina: evaluation of asymptomatic *Hepatozoon canis* infection in dogs from Buenos Aires. *Veterinary Parasitology*. 149: 275–279.

Elias, E., Homans, P.A. (1988). *Hepatozoon canis* infection in dogs: clinical and haematological findings. *Treatment. Journal of Small Animal Practice*, v. 29, p. 55-62.

ESCCAP (2010). Ectoparasitos Control de insectos y garrapatas que parasitan a perros y gatos (Guidelines GL3). Malvern: UK. Disponível em : [https://www.esccap.org/uploads/docs/22hejwfj\\_esguian3\\_ectoparasitos\\_altausb.pdf](https://www.esccap.org/uploads/docs/22hejwfj_esguian3_ectoparasitos_altausb.pdf) Acedido em 7 Abril, 2018 em [www.esccap.org](http://www.esccap.org)

ESCCAP (2012). Control of Vector-Borne Diseases in Dogs and Cats. (ESCCAP Guideline GL5). Malvern: UK. Disponível em: [https://www.esccap.org/uploads/docs/ih38c2d6\\_ESCCAP\\_Guidelines\\_GL5\\_01Oct2012.pdf](https://www.esccap.org/uploads/docs/ih38c2d6_ESCCAP_Guidelines_GL5_01Oct2012.pdf) Acedido em 7 Abril, 2018 em [www.esccap.org](http://www.esccap.org)

ESCCAP (2017). Control de ectoparasitos en perros y gatos (Modular Guidelines 3). Quinta edição – abril 2016 Disponível em [https://www.esccap.org/uploads/docs/ulf1sox6\\_0746\\_MG3\\_ES\\_20171103.pdf](https://www.esccap.org/uploads/docs/ulf1sox6_0746_MG3_ES_20171103.pdf) Acedido em 9 Junho, 2018 em [www.esccap.org](http://www.esccap.org)

Estrada-Peña , A., Bouattour, A., Camicas, J.L., Walker, A.R. (2004a). *Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region: A Guide to Identification of Species*. University of Zaragoza, Zaragoza.

Ezeokoli C.D.; Ogunkoya A.B.; Abdullahi R. (1983). Clinical and epidemiological studies on *canine hepatozoonosis* in Zaria, Nigeria. *Journal Small Animal Practice*. 24:455-460.

Figueiredo, T. C. D. (2007). Estudo da prevalência de doenças associadas a vetores em canídeos domésticos do distrito de Bragança. Tese de Mestrado em Microbiologia Clínica, Faculdade de Medicina de Lisboa – Universidade de Lisboa

Forlano, M.; Scofield, A.; Elisei, C.; Fernandes, K.R.; Ewing, S.A.; Massard, C.L. (2005). Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. *Veterinary Parasitology*.134: 1–7.

Fudge, M.E; (2000) Avian blood sampling and artifact considerations. In Fudge, A.M. *Laboratory Medicine Avian and Exotic Pets*. Philadelphia. W.B. Saunders, 347 p.

Gavazza, A.; Bizzeti, M.; Papini, R. (2003). Observations on dogs found naturally infected with *Hepatozoon canis* in Italy. *Revue Med Vet*. 154: 565-571.

Giannitti, F., Diab, S.S., Uzal, F.A., Fresneda, K., Rossi, D., Talmi-Frank, D., Baneth, G. (2012). Infection with a *Hepatozoon* sp. closely related *Hepatozoon felis* in a wild Pampas gray fox (*Lycaplex* – *Pseudalopex* – *gymnocercus*) co-infected with canine distemper vírus. *Veterinary Parasitology*, 186, 497-502.

Giennelli, A., Ramos, R.A.N., Paola, G.D., Mencke, N., Dantas-Torres, F., Baneth, G. & Otranto, D. (2013). Transstadial transmission of *Hepatozoon canis* from larvae to nymphs of *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology*, 196, 1-5.

Gomes, p. v.; Mundim, m. j. s.; Mundim, a. v.; Avila, d. f.; Guimarães, e. c.; Cury, M. C. (2010) Occurrence of *Hepatozoon* sp. in dogs in the urban area originating from a municipality in southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 174, n. 1/2, p. 155-161.

Gondim L.F.P., Kohayagawa A., Alencar N.X., Biondo A.W., Takahira R.K. & Franco S.R.V. (1998). *Canine hepatozoonosis* in Brazil: description of eight naturally occurring cases. *Vet. Parasitol.* 74:319-323.

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.

Greene, C.E. (2006). *Infectious diseases of the dog and cat*. Canada: Saunders, 1387p.

Grupo Marktest (2017). Cães e gatos a aumentar nos lares portugueses. Disponível em: <http://www.marktest.com/wap/a/n/id~220d.aspx> Acedido a 24 de Abril, 2018 em [www.marktest.com/wap/](http://www.marktest.com/wap/)

Guglielmone, A.A.; Robbins, R.G.; Apanaskevich, D.A. y cols. (2009). Comments on controversial tick (Acari: Ixodida) species names and species described or resurrected from 2003 to 2008. *Exp Appl Acarol.* 48:311-327.

Harrus, S., Perlman-Avrahami, A., Mumcuoglu, K.Y., Morick, D., Eyal, O. & Baneth, G. (2011). Molecular detection of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma platys*, *Candidatus Midichloria mitochondrii* and *Babesia canis vogeli* in ticks from Israel. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(3), 459-463.

Harvey, J.W. (2001). *Atlas of Veterinary Hematology: Blood and Bone Marrow of Domestic Animals*. Philadelphia: Saunders, Elsevier.

Hoogstraal, H.; Kaiser, M.N.; Traylor, M.A. y cols. (1961). Ticks (*Ixodoidea*) on birds migrating from Africa to Europe and Asia. *Bull World Health Organ.* 24:197-212.

Ibrahim NDG, Rahamathulla PM, Njoku CO. (1989). Neutrophil myeloperoxidase deficiency associated with *canine hepatozoonosis*. *International Journal for Parasitology.* 19:915-918.

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.

Instituto Nacional de Estatística: Censos Definitivos (2011). Acedido em 10 de Fevereiro, 2018, disponível em: <http://www.ine.pt/>

Instituto Português do Mar e da Atmosfera [IPMA]. (2017) Disponível em: [http://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20170904/EZWYUVGfXwatAtsIJOcj/cli\\_20170801\\_20170831\\_pcl\\_mm\\_co\\_pt.pdf](http://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20170904/EZWYUVGfXwatAtsIJOcj/cli_20170801_20170831_pcl_mm_co_pt.pdf) Acedido a 28 Março, 2018 de IPMA em <http://www.ipma.pt/pt/index.html>

Ivanov, A. & Tsachev, I. (2008). *Hepatozoon canis* and hepatozoonosis in the dog. *Trakia Journal of Sciences*, 6 (2), 27-35.

Ivanov, V. P. Central nervous system. In: Balashov, Y. S. (1983). An Atlas of Ixodid Tick Ultrastructure, Leningard: Naka Publishers. cap. 7, p. 175- 190.

Iza, J. F.B. (2010). Las garrapatas exófilas como vectores de agentes zoonóticos: estudio sobre la abundancia y actividad de las garrapatas en la vegetación, e investigación de la presencia de agentes patógenos en garrapatas y micromamíferos. Tesis doctoral, Universidad de Leon

Jittapalapong S.; Rungphisutthipongse O.Maruyama S.; Schaefer J.J.; Stich, R.W. (2006). Detection of *Hepatozoon canis* in Stray Dogs and Cats in Bangkok, Thailand. Annals of the New York Academy of Sciences. 1081: 479.

Jongejan, F. y Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. Parasitology. 129:S3-S14.

Karagenc T.I.; Pasa S.; Kirli G.; Hosgor M.; Bilgic H.B.; Ozon Y.H.; Atasoy A.; Eren H. (2006). A parasitological, molecular and serological survey of *Hepatozoon canis* infection in dogs around the Aegean coast of Turkey Veterinary Parasitology. 135: 113– 119.

Kenny, M.J.; Shaw, S.E.; Hillyard, P.D. y cols. (2004). Ectoparasite and haemoparasite risks associated with imported exotic reptiles. Vet Rec. 154:434-435.

Kiral F.; Karagenc T.; Pasa S; Yenisey C.; Seyrek K. (2005). Dogs with *Hepatozoon canis* respond to the oxidative stress by increased production of glutathione and nitric oxide. Veterinary Parasitology. 131: 15–21.

Klompen JSH, Dobson SJ, Barker SC. (2002) A new subfamily, *Bothriocrotoninae* n. subfam., for the genus *Bothriocroton* Keirans, King & Sharrad, 1994 status amend (Ixodida: Ixodida), and the synonymy of *Aponomma Neumann*, 1899 with *Amblyomma Koch*, 1844. Syst Parasitol. 53:101–107.

Kontos V & Koutinas A. (1991). *Canine hepatozoonosis*: a review of 11 naturally occurring cases. The European Journal of Companion Animal Practice. 2: 26-30.

Korch, G.J. (1994). Geographic dissemination of tick-borne zoonoses. In Ecological dynamics of tick-borne zoonoses. Sonenshine, D. E. and Mather, T. N. New York: Oxford University Press. 139-197.

Lappin, M. R. (2004). Infecções protozoárias e mistas. In: Ettinger, S. J.; Feldman, E. C. Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato. 5. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, v. 1, p. 430-440.

Lindgren, E.; Talleklint, L.; Polfeldt, T. (2000). Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. Environ Health Perspect. 108:119-123.

Mans BJ, Neitz AW (2004) Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. Insect Biochem. Mol. Biol. 34: 1–17.

Marchetti, V., Lubas, G., Baneth, G., Modenato, M. & Mancianti, F. (2009). *Hepatozoonosis* in a dog with skeletal involvement and meningoencephalomyelitis [abstract]. Veterinary Clinical Pathology, 38(1), 121-152.

Massard C.A. (1979). *Hepatozoon canis* (James, 1905) (Adeleida: Hepatozoidae) cães do Brasil, com uma revisão do género em membros da ordem carnívora. Seropédica, Tese (Mestrado em Medicina Veterinária — Parasitologia Veterinária). Departamento de Parasitologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Mathew J.S.; Ewing S.A.; Panciera R.J.; Woods J.P. (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.

Mathew R.A.;Bussche V.D.;Ewing S.A.;Malayer J.R.;Latha B.R.;Panciera R.J. (2000). Phylogenetic Relationships of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) Based on Molecular, Morphologic, and Life-cycle Characters. Journal of Parasitology. 86(2): 366–372.

McCully RM.; Basson P.A.; Bigalke R.D.; De Vos, V.; Young, E. (1975). Observation on naturally acquired *hepatozoonosis* of wild carnivores and dogs in the Republic of South Africa. Onderstepoort Journal of Veterinary Research . 42:117-133.

Miyamoto, K.; Nakao, M.; Fujita, H. & cols. (1993). The ixodic ticks on migratory birds in Japan and the isolation of Lyme disease spirochetes from bird-feeding ticks. *Jpn J Sanit Zool.* 44:315-326.

Mundim, A.V.; Jacomini, J.O.; Mundim, M.J.S.; Araújo, S.F. (1992). *Hepatozoon canis* (James, 1905) em cães de Uberlândia, Minas Gerais. Relato de dois casos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.*, v.29, p.259-261.

Mundim A.V., Moraes I.A., Taveres M., Cury M.C. & Mundim M.J.S. (2008a). Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon* sp. and with other hematozoa: a retrospective study in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.* 153:3-8.

Murata T.; Shiramizu K.; Hara Y.; Inoue M.; Shimoda K.; Nakama S. (1991). First case of *Hepatozoon canis* infection of a dog in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science.* 53: 1097-1099.

Murata T.; Inoue M.; Kono Y.; Ishida M.; Horio M.; Shimada M.; Yokoyama M.; Taura Y.; Nakama S. (1993a). Ultrastructure and cytochemical characteristics of leukocyte infected with *Hepatozoon canis*. *The Journal of Veterinary Medical Science.* 55: 1045-1045.

Murata T.; Inoue M.; Taura Y.; Nakama S.; Abe H.; Fujisaki K. (1995). Detection of *Hepatozoon canis* oocyst from ticks collected from the infected dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science.* 57: 111-113.

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.

Nelson, R. W. & Couto, C. G. (2015). *Medicina interna de pequenos animais*. Elsevier Editora, Amsterdam.

Núncio, M. S; Péter, O; Alves, MJ; Bacellar, F e Filipe, AR. (1992). Isolamento e caracterização de borrélias de *Ixodes ricinus* L. em Portugal. *Rev. Port. Doenç. Infec.* 16(3): 175-179.

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.

- O'Dwyer L.H.; Massard C.L.; Souza J.C.P. (2001). *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 94:143–150.
- O'Dwyer, L. H. ; Saito, M. E.; Hasegawa, M. Y. ; Kohayagawa, A. (2004). Tissue stages of *Hepatozoon canis* in naturally infected dogs from São Paulo state, Brazil. *Parasitology Research*, v. 94, n. 3, p. 240-242.
- O'Dwyer L.H. (2011). Brazilian *canine hepatozoonosis*. *Revta Bras. Parasitol. Vet.* 20(3):181-193.
- Ogden, N.H.; Lindsay, L.R.; Hanincova, K. y cols. (2008) Role of migratory birds in introduction and range expansion of *Ixodes scapularis* ticks and of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Canada. *Appl Environ Microbiol.* 74:1780-1790.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Weigl, S., Latrofa, M.S., Stanneck, D., Decaprarriis, D., Capelli, G. & Baneth, G. (2011). Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR. *Parasites and Vectors*, 4:55.
- Oyamada M.; Davoust B.; Boni M.; Dereure J.; Bucheton B.; Hammad A.; Itamoto K.; Okuda M.; Inokuma H. (2005). Detection of *Babesia canis rossi*, *B. canis vogeli*, and *Hepatozoon canis* in Dogs in a Village of Eastern Sudan by Using a Screening PCR and Sequencing Methodologies. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*.12: 343–1346.
- Paludo G.R.;Dell'Porto A.; Trindade A.R.C.; McManusa C; Friedman H. (2003). *Hepatozoon* spp.: report of some cases in dogs in Brasília, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 118: 243–248.
- Parola, P., Raoult, D. (2001). Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis*, 32:897-928.
- Parola, P. e Raoult, D. (2001a). Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 7:80-83.
- Parola, P.; Davoust, B.; Raoult, D. (2005a). Tick- and flea-borne *rickettsial* emerging zoonoses. *Vet Res.* 36:469-492.Press, New York.

Pasa, S., Voyvoda, H., Karagenc, T.I., Atasoy, A., & Gazyagci, S. (2011). Failure of combination therapy with imidocarb dipropionate and toltrazuril to clear *Hepatozoon canis* infection in dogs. *Parasitology Research*, 109, 919-926.

Perkins, S. L.;Keller, A. K. (2001). Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of *hemogregarines* amplified with specific primers. *The Journal of Parasitology*, v. 87, n. 4, p. 870-876.

Rahmani Amoli, A.A.;Khoshnegah, J.;Razmi, G.R. A. (2012). Preliminary parasitological survey of *Hepatozoon* spp. infection in dogs in Mashhad, Iran. *Iran journal parasitology*. v.7, p.99-103.

Rajamanickam C.; Wiesenhutter E.; Zin F.M.D. (1985). The incidence of canine hematozoa in peninsular Malaysia. *Veterinary Parasitology* 17:151-157.

Ramos, r.; Ramos, c.; Araújo, f.; Oliveira, r.; Souza, i.; Pimentel, d.; Galindo, M.;Santana, m.; Rosas, e.; Faustino, m. Alves, L. (2010). Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (North-eastern Brazil). *Parasitology Research*, Berlin, v. 107, n. 5, p. 1115-1120.

Raoult, D. e Roux, V. (1997). *Rickettsioses* as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 10:694-719.

Relatório REVIVE (2014). Culicídeos e Ixodídeos: Rede de Vigilância de Vetores / Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas Doutor Francisco Cambournac. - Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP.

Rioux J.A.; Golvan Y.J.;Honin R. (1964). Mixed *Hepatozoon canis* and *Leishmania canis* infection in a dog in the Sets area, France. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*. 39:131-135.

Rubini A.S.; Paduan K.S.; Cavalcante G.G.; Ribolla P.E.M.; O'Dwyer L.H. (2005). Molecular identification and characterization of *canine Hepatozoon* species from Brazil. . *Parasitology Research*.. 97: 91-93.

Rubini A.S.; Paduan K.S.; Perez R.R.; Ribolla P.E.M.; O'Dwyer L.H. (2006). Molecular characterization of feline *Hepatozoon* species from Brazil. *Veterinary Parasitology*. 137: 168–171.

Rubini, A.S.; Paduan, K.S.; Lopes, V.V.; O'Dwyer, L.H. (2008). Molecular and parasitological survey of *Hepatozoon canis* in dogs from rural area of Sao Paulo state, Brazil. *Parasitology Research*. v.102, p.895-899.

Samour, J. & Pendl, H. (2009a). Avian hematology. In Martel, A., Bailey, T., Chitty, J., Harcourt-Brown, N., Hatt, J. M., & Jones, M. (Eds), *Proceedings of the 10th European Association of Avian Veterinarians Conference and 8th Scientific European College of Avian Medicine and Surgery Meeting*, Antwerp, 17th – 21st March 2009, pp,513- 523.

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

Sasanelli, M., Paradies, P., Greco, B., Eyal, O., Zaza, V. & Baneth, G. (2010). Failure of imidocarb dipropionate to eliminate *Hepatozoon canis* in naturally infected dogs based on parasitological and molecular evaluation methods. *Veterinary Parasitology*, 171(3-4), 194-199.

Sellon R.K (2003). Update on molecular techniques for diagnostic testing of infectious disease. *Small Animal*. 33: 677–693.

Shaw, S.E. (2008). Understanding Transmission of Infection by Ticks and New Strategies for Control. In *IVIS Proceedings of the 33rd World Small Animal Veterinary Congress 2008 – Dublin, Ireland*.

Smith, T. G.;Kim, B.; Desser, S. S. (1999). Phylogenetic relationships among *Hepatozoon* species from snakes, frogs and mosquitoes of Ontario, Canada, determined by ITS-1 nucleotide sequences and lifecycle, morphological and developmental characteristics. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 2, p. 293-304.

Solano-Gallego, L. & Baneth, G., (2011). *Babesiosis* in dogs and cats—Expanding parasitological and clinical spectra. *Veterinary Parasitology*, 181, 48-60.

Sonenshine, D.E. (1991). *Biology of Ticks I*. New York (USA): Oxford University Press, Inc.

Sonenshine, D.E. (1993) *Biology of ticks II*. New York (USA): Oxford University Press. Ed.

Sonenshine, D.E.; Lane, R.S.; Nicholson, W.L. (2002). Ticks (Ixodida). In *Medical and Veterinary Entomology*. Mullen, G. R. and Durden, L. A. San Diego, California: Academic Press. 517-518.

Spolidorio M.; Labruna M.; Zago A.; Donatele D.; Caliaro K.; Yoshinari N. (2009). *Hepatozoon canis* infecting dogs in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 163, n. 4, p. 357-361.

Stelling, W.; Nascimento, M.D.; Fedullo, L.P.L. Ferrer, D.M.V.; Lemos, M.; Vilar, T.D. (2004) Determinação dos parâmetros hematológicos de Pinguins de Magalhães (Sphenicidae: Aves) *Spheniscus magellanicus* da Fundação Rio Zôo, RJ, Brasil. *Revista Universidade Rural: Série Ciências da Vida*, v. 24, nº 1, p.325-326.

Talleklint-Eisen, L. & Lane, R.S. (2000). Efficiency of drag sampling for estimating population sizes of *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) nymphs in leaf litter. *Journal of Medical Entomology*. 37:484-487.

Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L. (2016). *Veterinary Parasitology*. (4ª ed., pp. 112). USA, Iowa: Blackwell Publishing.

Telford, S.R., III y Goethert, H.K. (2004). Emerging tick-borne infections: rediscovered and better characterized, or truly 'new' ? *Parasitology* 2004; 129 Suppl:S301-S327.

Tenter, A.M., Deplazes, P. (2006): Protozoeninfektionen von Hund und Katze. In Schnieder, T. (ed): *Veterinär medizinische Parasitologie*. Parey, MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG, 409–443.

Urquhart, G., Armour, J., Duncan, J., Dunn, A. & Jennings, F. (1996). *Parasitologia Veterinária* (2ªEd.). Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, S.A.

Vilar, T.D.; Volino, W.; Stelling, W.; Ribeiro, I.C.; Lemos, M.; Nascimento, M.D. (2003). Determinação dos parâmetros hematológicos em Avestruzes (Struthionidae: Aves) *Struthio camelus* no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida. Seropédica, RJ, EDUR*, v.23.

Vilcins, I-M.E., Ujvari, B., Old, J.M. & Deane, E. (2009). Molecular and Morphological Description of a *Hepatozoon* Species in Reptiles and Their Ticks in the Northern Territory, Australia. *Journal of Parasitology*, 95(2), 434-442.

Vilhena, H., Martinez-Díaz, L.V., Cardoso, L., Vieira, L., Altet, L., Francino, O., Pastor, J., Silvestre-Ferreira, A.C.. (2013). Feline vector-borne pathogens in the north and centre of Portugal. *Parasites & Vectors*, 6, 99. Referência: 10.1186/1756-3305-6-99.

Vojta, L., Mrljak, V., Curkovic, S., Zivicnjak, T., Marinculic, A. & Beck, R. (2009). Molecular epizootiology of *canine hepatozoonosis* in Croatia. *International Journal for Parasitology*, 39(10), 1129-1136.

Voyvoda H.;Pasa S.;Uner A. (2004). Clinical *Hepatozoon canis* infection in a dog in Turkey. *Journal of Small Animal Practice*. 45: 613–617.

Wozniak, E. J.;Telford Junior; S. R.;Mclaughlin, G. L. (1994). Employment of the Polymerase chain reaction in the molecular differentiation of reptilian *hemogregarines* and its application to preventative zoological medicine. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 25, n. 4, p. 538-547.

## **10. Anexos**

**Anexo 1 - Distribuição da casuística observada por especialidade em cães e gatos**

ESPECIALIDADE	CANÍDEOS	FELINOS	FI	FR (%)
CARDIOLOGIA	4	4	8	3%
CARDIORRESPIRATÓRIO	0	4	4	2%
DERMATOLOGIA	11	3	14	6%
ENDOCRINOLOGIA	5	2	7	3%
FISIOTERAPIA	1	1	2	1%
GASTROENTEROLOGIA	9	21	30	12%
GENITURINÁRIO	3	6	9	4%
GERIATRIA	2	0	2	1%
HEMATOLOGIA	0	2	2	1%
HEPÁTICO	2	1	3	1%
IMAGIOLOGIA	2	6	8	3%
INFECIOLOGIA	9	9	18	7%
MEDICINA PREVENTIVA	21	30	51	21%
NEONATOLOGIA	0	3	3	1%
NEUROLOGIA	6	1	7	3%
ODONTOLOGIA	4	3	7	3%
OFTALMOLOGIA	6	4	10	4%
ONCOLOGIA	5	3	8	3%
ORTOPEDIA	7	4	11	4%
OTOLOGIA	3	0	3	1%
PARASITOLOGIA	2	0	2	1%
RENAL	2	18	20	8%
REPRODUÇÃO	2	0	2	1%
RESPIRATÓRIO	1	3	4	2%
TOXICOLOGIA	7	0	7	3%
URGÊNCIA	3	1	4	2%
TOTAL	117	129	246	100%

## Anexo 2 – Principais espécies de carraças que estão presentes em Portugal

<b>Espécie Ixodológica</b>	<b>Ocupação Geográfica</b>	<b>Clima</b>	<b>Formas Adultas</b>	<b>Formas Imaturas</b>	<b>Ciclo de vida</b>
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Quase todas as regiões do mundo, com a exceção das zonas circumpolares. Este ixodídeo encontra-se distribuído de Norte a Sul do País de Portugal.	As maiores densidades populacionais foram encontradas nos meses mais quentes (Julho e Agosto).	As formas adultas são encontradas em quase todos os meses do ano, no entanto há um aumento na altura da Primavera/Verão.	A maior atividade das formas imaturas está sobretudo concentrada nos meses de verão.	Podem completar anualmente 2 ou 3 ciclos de vida, com posturas com cerca de 5000 ovos.
<i>Ixodes ricinus</i>	Apresenta uma grande área de expansão, ocupando toda a Europa, bem como a África Mediterrânica e a Ásia Menor. Em Portugal, embora com uma distribuição desigual, pode ser encontrado de Norte a Sul.	Predominantemente nas regiões e/ou locais que apresentem uma cobertura vegetal considerável e onde se verifiquem elevados níveis de humidade relativa (acima de 90%).	As formas adultas estão ativas durante os períodos menos quentes do ano (Setembro/Março) interrompendo a sua atividade durante o período de Verão.	Ao contrário, as formas imaturas têm maior atividade nos meses de Primavera/Verão (Abril/Junho).	Completam um ciclo de vida por ano, podendo estender-se até três anos, com posturas não superiores a 3000 ovos.
<i>Dermacentor marginatus</i>	Europa, Ásia Central e Norte de África, em Portugal encontra-se distribuída por todo o País.	Preferem climas temperados e seco, no entanto suporta com facilidade temperaturas mais elevadas, não sendo também muito exigente em humidade.	As formas adultas apresentam maior atividade na altura do Outono/Inverno	Os estados imaturos de larva e ninfa apresentam maior atividade na Primavera/Verão.	Completam um ciclo de vida por ano, com posturas que podem chegar até aos 7000 ovos.

**Anexo 2 – Principais espécies de carraças que estão presentes em Portuga (Cont.)**

<b>Espécie Ixodológica</b>	<b>Ocupação Geográfica</b>	<b>Clima</b>	<b>Formas Adultas</b>	<b>Formas Imaturas</b>	<b>Ciclo de vida</b>
<i>Hyalomma marginatum</i>	Apresenta uma larga distribuição geográfica, sendo muito comum na Ásia, em algumas regiões de África e nos países da orla do mediterrâneo. Este ixodídeo distribui-se de Norte a Sul de Portugal.	Adaptada a climas quentes e secos.	O período de maior atividade das formas adultas é durante a Primavera–Verão.	As formas imaturas de larvas e ninfas são encontradas, com maior facilidade, no final do Verão e durante o período do Outono-Inverno.	Pode realizar mais de um ciclo de vida por ano, com posturas na ordem dos 11.000 ovos.
<i>Haemaphysalis punctata</i>	Engloba toda a Europa e os países africanos da orla Mediterrânica, nomeadamente Egipto, Líbia, Tunísia, Argélia e Marrocos. Em Portugal encontra-se distribuída de Norte a Sul.	Prefere zonas de clima temperado a frio, não sendo muito exigente nas condições de humidade relativa.	As formas adultas tem maior atividade no período de Outono-Inverno.	ao contrário dos estados imaturos de larva e ninfa cujo período de maior atividade é a Primavera-Verão.	Na Natureza esta espécie apresenta um ciclo de vida anual, com posturas na ordem dos 3000 ovos.

**Anexo 3 – Dados quantitativos sobre os ixodídeos encontrados em cada cão**

Identificação animal	Localização	Larvas	Ninfas	Adultos		Espécie
				Fêmea	Macho	
<b>Tobias</b>	Abrantes	0	2	0	0	<i>R.sanguineus</i>
<b>Anita</b>	Abrantes	0	2	0	0	<i>R.sanguineus</i>
<b>Cloe</b>	Abrantes	0	0	1	0	<i>R.sanguineus</i>
<b>Cachopo</b>	Abrantes	0	1	0	0	<i>R.sanguineus</i>
<b>Nina</b>	Abrantes	0	5	0	0	<i>R.sanguineus</i>
<b>Blue</b>	Abrantes	0	5	0	2	<i>R.sanguineus</i>
<b>Shakira</b>	Alvega	0	1	0	0	<i>R.sanguineus</i>
<b>Lord</b>	Alvega	0	3	9	5	<i>R.sanguineus</i>
<b>Preta</b>	Martinchel	0	2	1	1	<i>R.sanguineus</i>
<b>Tininha</b>	Martinchel	0	0	6	2	<i>R.sanguineus</i>
<b>Fiel</b>	Martinchel	0	2	1	1	<i>R.sanguineus</i>
<b>Perdida</b>	Mouriscas	0	3	1	1	<i>R.sanguineus</i>
<b>Lady</b>	Mouriscas	0	5	3	0	<i>R.sanguineus</i>
<b>Catita</b>	Mouriscas	0	1	1	4	<i>R.sanguineus</i>
<b>Zacarias</b>	Mouriscas	0	3	2	1	<i>R.sanguineus</i>
<b>Olivia</b>	Mouriscas	0	0	1	0	<i>I. ricinus</i>
<b>Beto</b>	Mouriscas	0	3	3	2	<i>R.sanguineus</i>
<b>Nita</b>	Mouriscas	0	0	2	2	<i>R.sanguineus</i>
<b>Kiko</b>	Mouriscas	0	1	1	0	<i>R.sanguineus</i>
<b>Faisca</b>	Mouriscas	0	1	1	3	<i>R.sanguineus</i>
<b>Tica</b>	Tramagal	0	0	6	0	<i>R.sanguineus</i>
<b>Puca</b>	Tramagal	0	4	1	0	<i>R.sanguineus</i>
<b>Lira</b>	Rossio	0	3	0	1	<i>R.sanguineus</i>
<b>Martim</b>	Rossio	0	6	10	4	<i>R.sanguineus</i>
<b>Spyke</b>	Rossio	0	9	12	8	<i>R.sanguineus</i>
<b>Fofinha</b>	Rossio	0	0	2	0	<i>R.sanguineus</i>
<b>Branquinho</b>	Valhascos	0	2	4	1	<i>R.sanguineus</i>
<b>Amarelinho</b>	Valhascos	0	7	0	0	<i>R.sanguineus</i>
	Total	0	71	67 <i>R.s</i> + 1 <i>I. r</i>	38	

**Anexo 4 – População canina dos concelhos de Abrantes e Sardoal (Informação cedida pelas Juntas de Freguesias)**

<b>Abrantes</b>	<b>Número de canídeos registados</b>	<b>Sardoal</b>	<b>Número de canídeos registados</b>
<b>Abrantes (São Vicente e São João) e Alferrarede</b>	1417	<b>Alcaravela</b>	110
<b>Aldeia do Mato e Souto</b>	60	<b>Santiago de Montalegre</b>	161
<b>Alvega e Concavada</b>	462	<b>Sardoal</b>	1029
<b>Bemposta</b>	207	<b>Valhascos</b>	53
<b>Carvalhal</b>	103		
<b>Fontes</b>	40		
<b>Martinchel</b>	350		
<b>Mouriscas</b>	497		
<b>Pego</b>	1100		
<b>Rio de Moinhos</b>	228		
<b>São Facundo e Vale das Mós</b>	100		
<b>São Miguel do Rio torto e Rossio ao sul do Tejo</b>	530		
<b>Tramagal</b>	600		