



U N I V E R S I D A D E
LUSÓFONA
CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Contributo para a caracterização morfológica e molecular de vectores
e agentes patogénicos de uma população insular de cães

Dissertação apresentada a provas públicas para a obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária, orientada por Professora Doutora Ana Elisabete Pires, Professor Doutor André Pereira [co-orientador] e Professora Doutora Margarida Alves [co-orientadora].

Matilde Mourinha de Jesus Polónia Santos, n°21902868

2026

www.ulusofona.pt

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**Contributo para a caracterização morfológica e molecular de
vectores e agentes patogénicos de uma população insular de cães**

Matilde Mourinha de Jesus Polónia Santos

VERSÃO FINAL

Dissertação defendida por Matilde Santos em provas públicas na Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa, no dia 24/02/2026, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação n.º: 90/2026, de 4 de Fevereiro de 2026, com a seguinte composição:

Presidente: Professora Doutora Inês Lourenço da Silva Delgado (Universidade Lusófona – Centro Universitário Lisboa)

Vogal: Professora Doutora Catia Filipa Saraiva Marques (Universidade Lusófona – Centro Universitário Lisboa) - arguente

Orientador: Professora Doutora Ana Elisabete Pires

Este trabalho também foi orientado por Professor Doutor André Pereira (co-orientador) e Professora Doutora Margarida Alves (co-orientadora).

Matilde Mourinha de Jesus Polónia Santos, nº21902868

2026

“Ad astra per aspera”

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa, e a todo o corpo docente que me acompanhou no meu percurso académico, que contribuiu para a minha formação e que me deu as bases e os exemplos para me tornar numa boa médica veterinária.

À Professora Doutora Ana Elisabete Pires, quero expressar o meu mais sincero agradecimento pelo apoio e orientação atenta, rigorosa e sempre disponível durante a redação desta dissertação. A sua dedicação, conhecimento científico e espírito crítico foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu crescimento académico. Agradeço ainda a oportunidade de integrar a equipa do projeto CREOLEDOGS, bem como a confiança depositada em mim ao permitir a minha participação no processo laboratorial deste projeto.

À Professora Doutora Margarida Alves, o meu profundo agradecimento por me ter mostrado caminhos quando eu própria acreditava que não eram possíveis, pela confiança que sempre depositou em mim e nas minhas capacidades, e pelo apoio constante ao longo de todo o meu estágio curricular. A sua dedicação incansável, a meu ver subvalorizada, a todos os alunos de Medicina Veterinária, desde a primeira aula até à entrega do diploma, é verdadeiramente inspiradora. Agradeço toda a paciência, a motivação permanente e a todos os conhecimentos partilhados, que marcaram de forma indelével o meu percurso académico e pessoal.

Aos professores Doutor André Pereira e Doutor David Ramilo, agradeço toda a paciência, apoio e disponibilidade demonstrados durante o meu trabalho em laboratório e ao longo da escrita desta dissertação. Agradeço todos os conhecimentos partilhados e lembrados, o cuidado constante em assegurar que realizasse um bom trabalho e em incentivar-me a ir sempre além do que já tinha alcançado.

À minha família a quem eu devo tudo, não há palavras no dicionário que façam jus à gratidão que sinto. À minha mãe e ao meu pai que nunca duvidaram de mim, a todo o amor e suporte, por me fazerem acreditar em mim mesma quando pensava que já não era capaz. Aos meus avós, os que estão e os que já partiram, por nunca duvidarem em mim. Aos meus tios, padrinhos e primos pelas palavras de carinho e motivação.

À segunda família que o curso me deu. À Inês Simões e a todos os nossos *one brain cell moment*, à Carolina Oliveira e a todos os momentos guardados em fotos que nunca tiraríamos sem a tua insistência, à Ana Catarina Duarte e a todos os momentos engraçados e caóticos que tornaram cada dia mais interessante (e às perguntas pertinentes), à Micaela Ribeiro e aos momentos de “vou ter de fazer e vou” que tornaram os dias difíceis mais fáceis. Sem vocês, estes 5 anos teriam sido insuportáveis.

Por fim, ao meu patudo, Ice, que esteve sempre comigo, principalmente, durante todo o processo de escrita desta tese e que me lembrava de fazer uma pausa nos momentos mais stressantes (mesmo que tenha sido para lhe dar comida). A todos os momentos passados aconchegados no sofá, a todos os momentos que foste o meu primeiro paciente, agradeço por seres uma das principais razões para me esforçar todos os dias a ser melhor veterinária do que fui no dia anterior.

Resumo

Agentes patogénicos transmitidos por vectores representam riscos significativos para a saúde tanto dos animais como dos humanos. Dados sobre a prevalência destes agentes em cães da Ilha de São Vicente, Cabo Verde, são escassos. Assim sendo, pretendeu-se, com este estudo, a) caracterizar morfológicamente uma população de cães errantes, b) caracterizar morfológicamente e molecularmente os seus ectoparasitas, c) identificar molecularmente até ao nível da espécie, os agentes patogénicos transmitidos por vectores.

Para tal, foram recolhidas amostras de sangue de cães errantes ($n=20$, para fins clínicos como análises pré-cirúrgicas) e os seus ectoparasitas ($n=47$), durante uma campanha de captura-esterilização-retorno (no ano 2024). Foi ainda realizado um registo fotográfico. Os ectoparasitas foram identificados morfológicamente por microscopia (microscópio óptico e estereomicroscópio) utilizando chaves taxonómicas dicotómicas. O DNA foi extraído das amostras de sangue dos cães e dos ectoparasitas. Seguiu-se a pesquisa molecular para identificação dos ectoparasitas e de diferentes agentes patogénicos - bactérias tais como *Anaplasma/Ehrlichia* spp., *Bartonella* spp., *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp e protozoários: *Babesia/Theileria* spp.; *Hepatozoon* spp., *Leishmania* spp. - por PCR, sequenciação e análise filogenética.

Foram detectados ectoparasitas em 80,0% (16/20) dos cães. Foi recolhido um total de 47 ectoparasitas, identificados como carraças *Rhipicephalus sanguineus* ($n=38$, 10 fêmeas, 26 machos e 2 larvas), pulgas *Echidnophaga gallinacea* ($n=1$, fêmea) e *Ctenocephalides felis* ($n=4$, fêmeas) e piolhos da espécie *Heterodoxus spiniger* ($n=4$). A sequenciação das amostras permitiu a identificação de *Rickettsia asembonensis* e *Borrelia bavariensis* em 5 pulgas e no sangue de 1 cão, respectivamente, e *Hepatozoon canis* em 13 carraças e no sangue de 13 cães. Não foram detectadas *Leishmania* spp. nem de *Bartonella* spp. em nenhum dos ectoparasitas nem no sangue dos cães,

Neste estudo, tanto *R. asembonensis* como *B. bavariensis*, potenciais agentes zoonóticos, foram reportados pela primeira vez em Cabo Verde, e *H. canis* foi reportado pela primeira vez na ilha de São Vicente. Estas descobertas destacam a importância de uma vigilância contínua, da realização de estudos mais abrangentes e da implementação de estratégias integradas de Uma Só Saúde para monitorizar e controlar os agentes patogénicos transmitidos por vetores, a fim de proteger humanos e animais.

Palavras-chave: Vectores Biológicos; Zoonoses, Cães errantes; Ilha de São Vicente, Cabo Verde; Epidemiologia molecular

Abstract

Vector-borne pathogens pose significant health risks to both animals and humans. Data on the prevalence of these agents in dogs on São Vicente Island, Cape Verde, are scarce. Therefore this study aims to: a) morphologically characterise a population of stray dogs, b) morphologically and molecularly characterize their ectoparasites, c) molecularly identify vector-borne pathogens to the species level.

To do so, blood samples were collected from stray dogs (n=20, for clinical purposes such as pre-surgical analysis) and their ectoparasites (n=47) during a trap-neuter-return campaign (2024). Photographic documentation was also carried out. Ectoparasites were morphologically identified by microscopy (optical microscope and stereomicroscope) using dichotomous taxonomic keys. DNA was extracted from the blood samples and ectoparasites. Molecular screening followed to identify ectoparasites and different pathogenic agents - bacteria such as *Anaplasma/Ehrlichia* spp., *Bartonella* spp., *Borrelia* spp. and *Rickettsia* spp. and protozoa such as *Hepatozoon* spp., *Babesia/Theileria* spp. and *Leishmania* spp. - by PCR, sequencing, and phylogenetic analysis.

Ectoparasites were detected in 80,0% (16/20) of the dogs. A total of 47 ectoparasites, identified as hard ticks *Rhipicephalus sanguineus* (n=38, 10 females, 26 males and 2 larvae), fleas *Echidnophaga gallinacea* (n=1, female) and *Ctenocephalides felis* (n=4, females), and lice of the species *Heterodoxus spiniger* (n=4), were collected. Sequencing of the samples allowed the identification of *Rickettsia asembonensis* and *Borrelia bavariensis* in 5 fleas and in the blood of 1 dog, respectively, and *Hepatozoon canis* in 13 ticks and in the blood of 13 dogs. *Leishmania* spp. or *Bartonella* spp. were not detected in none of the ectoparasites nor in the dogs' blood.

In this study, both *R. asembonensis* and *B. bavariensis*, potential zoonotic agents, were reported for the first time in Cape Verde, and *H. canis* was first reported on São Vicente Island. These findings highlight the importance of continued surveillance, new data studies, and the implementation of integrated One Health strategies to monitor and control emerging vector-borne pathogens to protect humans and animals alike.

Key-words: Biological Vectors; Zoonoses; Stray dogs; São Vincent Island, Cape Verde; Molecular markers

Lista de abreviaturas

® - Marca registrada

µL – Microlitros

A - Adenina

BIC - Critério de informação bayesiano (do inglês *Bayesian information criterion*)

BLAST – Ferramenta básica de busca de alinhamento local (do inglês *Basic local alignment search tool*)

C - Citosina

CC – Condição corporal

°C - Graus celsius

COX-I - Citocromo c oxidase subunidade 1

COX-II - Citocromo c oxidase subunidade 2

DNA – Ácido desoxirribonucléico (do inglês *Deoxyribonucleic acid*)

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês *Ethylenediaminetetraacetic acid*)

et al. - E outros/e outras (da locução latina *et alli* (masculino), *et aliae* (feminino) ou *et alia* (neutro))

flaB - Flagelina *flaB*

G - Guanina

GEP - Perfil de expressão genética (do inglês *Gene expression profiling*)

GroEL - Proteína da família Hsp60, pertencente às chaperoninas do grupo I

HI – Hospedeiros invertebrados

HV – Hospedeiros vertebrados

ITS - Espaçador interno transcrito (do inglês *Internal Transcribed Spacer*)

IUPAC - União internacional de química pura e aplicada (do inglês *International union of pure and applied chemistry*)

kDNA minicircle region - Região dos minicírculos de DNA de cinetoplasto (do inglês *kinetoplast DNA minicircles region*)

Kg – Quilogramas

L1 - Larva em estágio 1 (do inglês *Stage 1 larva*)

L2 - Larva em estágio 2 (do inglês *Stage 2 larva*)

L3 - Larva em estágio 3 (do inglês *Stage 3 larva*)

M - Grupos amino em posição comum, pode corresponder a adenina ou a citosina

MAFFTv7 - MAFFT versão 7

mg – Miligramas

min – Minutos

ML - Máxima verossimilhança (do inglês *Maximum likelihood*)

mL – Mililitros

NCBI - Centro nacional de informação sobre biotecnologia (do inglês *National centre for biotechnology information*)

ompA - Proteína A da membrana externa (do inglês *outer membrane protein A*)

ompB - Proteína B da membrana externa (do inglês *outer membrane protein B*)

ONG – Organização não governamental

pb – Pares de bases

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

R - Purina, pode corresponder a adenina ou a guanina

rDNA – DNA ribossomal (do inglês *ribosomal DNA*)

RNA - Ácido ribossomal (do inglês *ribosomal RNA*)

rRNA - RNA ribossomal (do inglês *ribosomal RNA*)

rpm – Rotações por minuto

Seg – Segundos

T - Timina

TBA – Tris-acetato-EDTA

TBE – Tris-borato-EDTA

™ - Marca registrada (do inglês *trademark*)

UV – Ultra-violeta

W - Ligação de hidrogénio fraca, pode corresponder a adenina ou a timina

Y - Pirimidina, pode corresponder a timina ou a citosina

16S rDNA - DNA ribossómico 16S

18S rRNA - RNA ribossómico de subunidade pequena

Índice

Casuística de estágio.....	12
I – Introdução.....	14
1. Ilha de São Vicente e a sua população de cães errantes	14
2. Vectores biológicos	15
2.1 Carraças (família Ixodidae).....	15
2.2 Pulgas	18
2.3 Piolhos.....	20
3. Agentes patogénicos	21
3.1 Bactérias dos géneros <i>Anaplasma</i> e <i>Ehrlichia</i>	21
3.2 Protozoários dos géneros <i>Babesia</i> e <i>Theileria</i>	24
3.3 Bactérias do género <i>Bartonella</i>	25
3.4 Bactérias do género <i>Borrelia</i>	26
3.5 Protozoários do género <i>Hepatozoon</i>	27
3.6 Protozoários do género <i>Leishmania</i>	28
3.7 Bactérias do género <i>Rickettsia</i>	29
4. Fundamentos teóricos.....	31
5. Objetivos.....	32
II - Material e Métodos	33
1. População em estudo	33
2. Colheita e identificação das amostras.....	34
3. Extração de ácidos nucleicos do sangue (de cães)	34
4. Extração de ácidos nucleicos dos ectoparasitas presentes no pêlo dos cão.....	35
5. Amplificação de DNA de agentes infecciosos	36
5.1 Amplificação de DNA de <i>Ehrlichia/Anaplasma</i> spp.	36
5.2 Amplificação de DNA de <i>Bartonella</i> spp.	39
5.3 Amplificação de DNA de <i>Borrelia</i> spp.....	40
5.4 Amplificação de DNA de <i>Babesia/Theileria</i> spp.....	41
5.5 Amplificação de DNA de <i>Hepatozoon</i> spp.	42
5.6 Amplificação de DNA de <i>Leishmania</i> spp.....	42
5.7 Amplificação de DNA de <i>Rickettsia</i> spp.....	43
6. Amplificação de segmentos citocromo c oxidase (COX)	44

7. Visualização dos produtos de PCR amplificados	46
8. Purificação e sequenciação dos produtos de PCR amplificados	46
III – Resultados.....	50
1. Caracterização da amostra.....	50
2. Presença de Ectoparasitas.....	50
2.1. Análise morfológica dos ectoparasitas.....	51
2.2. Análise molecular dos ectoparasitas com base em marcadores genéticos – genes COX-I e COX-II.....	55
3. Análise molecular e filogenética dos agentes infecciosos.....	56
3.1. Identificação Molecular de agentes patogénicos ao nível da espécie	56
4. Presença de agentes patogénicos em esfregaços sanguíneos.....	57
5. Análise molecular de agentes patogénicos presentes no sangue dos cães.....	58
6. Árvores filogenéticas.....	58
7. Análise de co-infecções.....	61
IV – Discussão.....	63
V – Conclusões.....	67
Referências bibliográficas	68
Apêndices	I
Anexos.....	III

Casuística de estágio

A autora realizou o seu estágio no Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona-Centro Universitário de Lisboa (FMV-UL-CUL), entre Fevereiro de 2025 e Junho de 2025. Com a orientação da Professora Doutora Ana Elisabete Pires, co-orientação do Professor Doutor André Pereira e da Professora Doutora Margarida Alves e apoio do Professor Doutor David Ramilo. O estágio curricular foi realizado no âmbito do projeto “Creole Dogs – Genomics, heritage and health of creole dogs from Cape Verde”, decorrido entre Dezembro de 2023 e Junho de 2025.

Durante um período de cinco meses, a autora teve a oportunidade de aprofundar os seus conhecimentos no âmbito do conceito de Uma Só Saúde, uma abordagem integrada que reconhece a interdependência entre a saúde humana, a saúde animal e a saúde ambiental e cuja compreensão é essencial para enfrentar desafios higieno-sanitários globais. Neste sentido, foi analisada de forma particular a problemática dos agentes zoonóticos, microrganismos com potencial de transmissão interespecies, no contexto de cães errantes em ambientes insulares, em particular Cabo Verde, ilha de São Vicente, dada a insularidade potenciar dinâmicas epidemiológicas particulares, como restrições geográficas, isolamento populacional e fragilidades na saúde pública.

Simultaneamente, a autora teve oportunidade de consolidar as suas competências metodológicas na aplicação de técnicas de identificação e diagnóstico morfológico e moleculares na sistemática biológica, em particular nas vertentes de taxonomia e filogenia.

Foi adquirida experiência nas seguintes técnicas de biologia molecular:

i) extração de DNA (do inglês *Deoxyribonucleic acid*) de 38 amostras de carraças recolhidos a partir de uma população de cães errantes, com recurso a um kit comercial (NZY tissue *gDNA Isolation*® da NZYtech);

ii) análise da pureza e quantificação do DNA isolado por espectrofotometria em 38 amostras de carraças;

iii) amplificação de DNA por PCR (do inglês *Polymerase chain reaction*) de 38 amostras de carraças para 10 loci alvos de 5 agentes patogénicos diferentes (*Anaplasma/Ehrlichia* spp., *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Babesia/Theileria* spp. e *Hepatozoon* spp.), 5 amostras de pulgas para 2 agentes patogénicos diferentes (*Rickettsia* spp. e *Bartonella* spp.), e 20 amostras de sangue de cão para 2 agentes patogénicos diferentes (*Borrelia* spp. e *Leishmania* spp.);

iv) amplificação de DNA de oito carraças e um piolho com primers desenhados para reconhecer segmentos do gene *COX-I* e amplificação de DNA de cinco pulgas com primers desenhados para reconhecer segmentos do gene *COX-II*;

v) electroforese dos produtos amplificados em gele de agarose, para sua visualização, registo fotográfico (NanoZoomer® *Digital Slide Scanner*) e posterior sequenciação (aquisição de serviço externo – envio de um total de 56 amostras).

vi) registo fotográfico das amostras de duas carraças, cinco pulgas e três piolhos (NanoZoomer® *Digital Slide Scanner*) para posterior caracterização morfológica através de chaves dicotómicas

vii) edição e análise de 56 sequências de DNA (31 sequências de carraça, 17 de sangue de cão, 7 de pulga e 1 de piolho)

A autora teve também oportunidade de adquirir conhecimento sobre os marcadores morfológicos utilizados na identificação morfológica dos ectoparasitas - insectos e artrópodes, e aprimorar a sua técnica de microscopia óptica.

A investigação e o trabalho laboratorial desenvolvidos culminaram na elaboração da presente dissertação.

Adicionalmente, a autora teve a possibilidade de apresentar o seu tema de Mestrado, com resultados preliminares, no 4º Encontro Anual AL4AnimalS (maio de 2025) através de um póster e no *IV FMV Research Meeting* (julho de 2025) através de uma apresentação oral. Encontra-se em preparação a redação de um artigo científico.

contribuiu para a reprodução descontrolada de cães errantes e para o aumento desta população (Rosário, 2024).

Estes cães têm a tendência a viver em contacto próximo com os humanos devido à maior disponibilidade de recursos, como restos alimentares, pontos de acesso de água e abrigos improvisados, e podem atuar como reservatórios para diversos agentes patogénicos zoonóticos. (Nametov *et al.*, 2025). Desta forma, é de extrema importância a consciencialização da população em geral para esta problemática que está interligada com situações de segurança e saúde pública e, consequentemente, a implementação de programas socioeducativos e políticas de apoio acessíveis a todos para a prevenção, vacinação e controlo demográfico, com uma preocupação acrescida para o número de animais errantes reservatórios de doenças zoonóticas (Rosário, 2024; Langlois *et al.*, 2025; Smith *et al.*, 2025). Simultaneamente, estes esforços devem ser enquadrados no conceito de Uma Só Saúde, reconhecendo que a saúde humana, saúde animal, saúde vegetal e saúde ambiental são indissociáveis e, como tal, a gestão dos riscos e a criação de medidas de prevenção requerem uma colaboração interdisciplinar entre os sectores de saúde veterinária, saúde pública e proteção ambiental.

2. Vectores biológicos

Em Medicina, vectores, de acordo com a EFSA (*European Food Safety Authority*, 2025), entendem-se por “organismos vivos que transmitem um agente infeccioso de um animal infectado para um humano ou outro animal”. Em animais, os vectores mais frequentes pertencem ao Filo *Arthropoda* e às subclasses *Acarina* - é o caso das carrças e de ácaros - ou à classe *Insecta* - é o caso das pulgas, piolhos e flebotómios (Martins, 2019).

2.1 Carrças (família Ixodidae)

As carrças são aracnídeos hematófagos da subclasse Acari, da ordem Ixodida, com cerca de 850 espécies de carrças conhecidas divididas em três famílias - Nuttalliellidae (com 1 espécie), Ixodidae (com cerca de 700 espécies) e Argasidae (com cerca de 200 espécies) - sendo a família Ixodidae a mais significativa no contexto de medicina veterinária (Wall & Shearer, 1997; Marques, 2017). São também vetores de muitos agentes patogénicos - vírus (como o *classic tick-borne encephalitis virus*), bactérias (como *Rickettsia* spp.), protozoários (como a *Babesia* spp., *Theileria* spp. e *Hepatozoon canis*) ou helmintos (como *Acanthocheilonema* e *Cercophithifilaria*) (Beugnet *et al.*, 2018).

Estes ixodídeos são extremamente eficazes na parasitação de hospedeiros e consequente transmissão de agentes patogénicos. Ao fixarem-se firmemente ao hospedeiro, asseguram não só um longo período de alimentação - o que leva a uma maior ingestão de agentes patogénicos presentes no sangue do animal - como também um transporte para diversos habitats com possíveis melhores condições ou outros potenciais hospedeiros. As carrças têm a capacidade de parasitar múltiplos hospedeiros, o que facilita a transmissão de

agentes patogénicos entre diferentes animais hospedeiros, apresentam um ciclo de vida longo com a capacidade de sobreviver a longos períodos de tempo em jejum e as fêmeas apresentam a capacidade de depositar um elevado número de ovos, acelerando o crescimento populacional. Adicionalmente, os agentes patogénicos ingeridos pelas carraças podem ser transmitidos para as várias fases da vida da carraça - da larva para a ninfa e da ninfa para adulto (transestadial) e de fêmeas adultas para a descendência (transovarial) (Wall & Shearer, 1997). Os géneros mais importantes de carraças que infestam os animais a nível global são *Ixodes* spp., *Rhipicephalus* spp., *Dermacentor* spp., *Amblyomma* spp. e *Haemaphysalis* spp., dado que os cães são mais afetados por carraças dos géneros *Ixodes* spp., *Rhipicephalus* spp. e *Dermacentor* spp. (Beugnet *et al.*, 2018).

2.1.1. Ciclo de Vida

As carraças podem ter um de três tipos de ciclo de vida: ciclo monofásico (as duas mudas ocorrem no mesmo hospedeiro), ciclo bifásico (a passagem de larva para ninfa ocorre no primeiro hospedeiro, havendo dois hospedeiros por geração de carraça) e o ciclo trifásico (os estádios larval, ninfal e adulto apresentam um hospedeiro cada, havendo três hospedeiros por geração de carraça) (Figura C1) (Beugnet *et al.*, 2018).

As carraças *Rhipicephalus sanguineus* são aqui destacadas devido à sua prevalência, sobretudo em ambientes domésticos e semi-urbanos, à sua ampla distribuição geográfica e importância médico-veterinária. Possuem um ciclo de vida trifásico, no qual o acasalamento ocorre no hospedeiro. Após o acasalamento, a fêmea alimenta-se durante 2 semanas, sai do primeiro hospedeiro para o solo onde deposita em média 3000 a 10000 ovos de uma só vez. Com a oviposição, a fêmea esgota todas as suas reservas de energia, culminando com a sua morte (Taylor *et al.*, 2016; Beugnet *et al.*, 2018).

Após 17 a 30 dias, os ovos eclodem e surgem as larvas. As larvas alimentam-se por 6 dias no segundo hospedeiro antes de voltarem a cair para o solo. A muda de larva para ninfa tem uma duração de cerca de 5 a 23 dias. Posteriormente, a ninfa alimenta-se durante 4 a 9 dias no terceiro hospedeiro antes de sair deste para a última muda - de ninfa a adulto (Taylor *et al.*, 2016).

A duração do ciclo de vida das carraças pode variar muito, dependendo não só do tipo de ciclo de vida, mas também das condições climáticas e do comportamento dos hospedeiros. O ciclo pode ainda ser interrompido por: diapausa (retenção temporária do desenvolvimento) dos ovos (uma situação excepcional que pode durar até 3 anos), diapausa comportamental (larvas, ninfas ou adultos), diapausa em fases de jejum (até 1 ano), espera de condições climáticas favoráveis ou espera de hospedeiro (Beugnet *et al.*, 2018).

2.1.2. Identificação Morfológica

Carraças da família Ixodidae são relativamente grandes, podendo chegar aos 20 mm, com um corpo achatado dorsoventralmente, quando em jejum, dividido em duas secções:

gnatossoma anterior ou capítulo - com palpos com 4 segmentos (órgãos sensoriais para localização do hospedeiro) e, entre os palpos, quelíceras perfurantes (para agarrar e cortar a pele do hospedeiro aquando da alimentação) - e idiossoma posterior, donde saem 4 pares de patas (cada uma composta por coxa, trocanter, fémur, rótula, tíbia e tarso com garras e almofadas adesivas). A base do capítulo pode variar de forma, consoante o género, podendo ser retangular, triangular ou hexagonal, e possui uma estrutura situada abaixo das quelíceras, que se estende anterior e ventralmente, denominada hipostoma. Esta estrutura é imóvel e, nas larvas, ninfas e fêmeas adultas, é formada por várias fileiras de dentes ventrais voltados caudalmente que servem para se fixarem no hospedeiro (Figura 2).

A família Ixodidae apresenta um rosto denticulado e um escudo dorsal quitinoso. O escudo dorsal é mais desenvolvido e maior nos machos, que, ao contrário das fêmeas, não aumentam substancialmente o seu tamanho. As larvas, contrariamente às ninfas e às carraças adultas, possuem apenas 3 pares de patas.

Alguns dos órgãos sensoriais dos ixodídeos mais importantes são: o órgão de Haller - localizado no tarso do primeiro par de patas, envolvido na localização do hospedeiro através de vibrações e variações de dióxido de carbono -, poros abertos na superfície dorsal e em ambos os lados do capítulo - permitem detetar machos e comunicar com outros ixodídeos através de feromonas. Os olhos/órgãos fotossensíveis podem estar presentes ou ausentes.

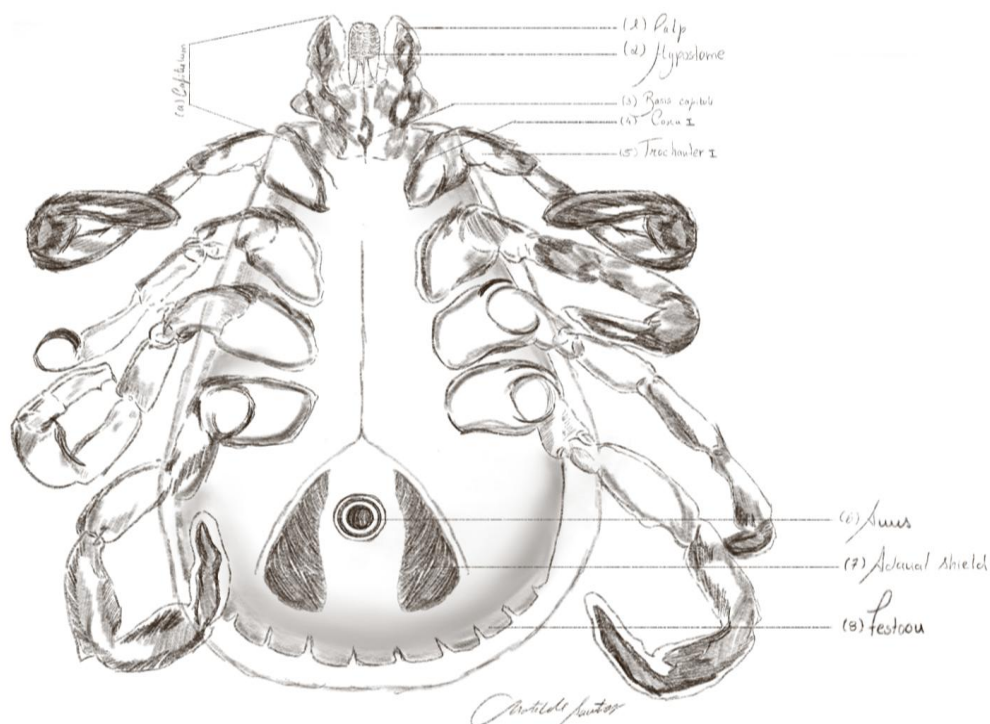


Figura 2 - Ilustração de uma carraça *Rhipicephalus sanguineus* (macho) observada no NannoZoomer Digital Slides Scanner®. (a) Capítulo, (1) Palpo, (2) Hipostoma, (3) Base do Capítulo, (4) Coxa I, (5) Trocânter I, (6) Ânus, (7) Escudo adanal, (8) Festoon. Ilustração original da autora.

2.2 Pulgas

As pulgas são insetos sem asas da ordem Siphonaptera com aproximadamente 2500 espécies divididas em 15 famílias (sendo a família Pulicidae a com maior número de pulgas com importância médica e veterinária) e 200 géneros. Estes ectoparasitas são dos mais comuns em animais em ambos os habitats rurais e urbanos (Beugnet *et al.*, 2018).

2.2.1. Ciclo de Vida

As pulgas são insetos holometábolos, ou seja, passam por uma metamorfose completa com quatro estádios: ovo (fase inicial do ciclo de vida), larva (fase de crescimento), pupa (fase de transição) e adulto (fase final e reprodutiva do inseto) (Figura C2).

Os ovos, embora possam ser depositados no solo ou no hospedeiro, não são fixos no hospedeiro, podendo ficar neste até, aproximadamente, 2 horas antes de acabar por cair. A eclosão dos ovos ocorre entre dois dias a duas semanas, dependendo das condições ambientais. Se a temperatura e a humidade forem óptimas, os ovos eclodem em 3 a 7 dias no solo (Taylor *et al.*, 2016; Beugnet *et al.*, 2018).

As larvas apresentam um corpo com poucos milímetros de comprimento, com vários segmentos circulares com cerdas direcionadas caudalmente e, no último segmento, com suportes anais, o que permite a sua movimentação. A cabeça é composta por peças bucais mastigadoras que permitem à larva se alimentar de detritos orgânicos - pele, pêlos, penas, fezes de pulgas adultas. As larvas preferem condições húmidas e mais escuras, pelo que larvas em estágio 1 (L1) e larvas em estágio 2 (L2) são extremamente sensíveis à luz ultravioleta (UV) e à desidratação (Taylor *et al.*, 2016; Beugnet *et al.*, 2018). A passagem de L1 a L2 e, depois, a larva em estágio 3 (L3) demoram aproximadamente entre 1 semana e 1 mês, dependendo da temperatura e da humidade ambiente, e, em 10 dias, cada L3 tece um casulo, onde a L3 metamorfoseia-se numa pulga adulta pré-formada - a pupa.

A pupa, se não houver hospedeiros por perto, consegue viver no casulo, relativamente protegida de inseticidas, até 12 meses. Neste período de tempo, as pupas são facilmente transportadas, por animais ou humanos, devido à adesividade do casulo, para locais com possíveis hospedeiros. Uma vez com hospedeiros disponíveis, a pupa emerge do casulo como pulga adulta e inicia de imediato a procura de um hospedeiro - preferencialmente um gato ou um cão. A pulga adulta consegue sobreviver até uma semana sem se alimentar de sangue (Beugnet *et al.*, 2018).

O ciclo de vida das pulgas e cada etapa presente neste ciclo estão dependentes de condições ambientais óptimas. Humidade relativa de 85 % é a ideal - cada estágio está suscetível à desidratação -, temperaturas muito elevadas (acima dos 30 °C) tendem a reduzir o período de vida de adultos, temperaturas entre os 17 °C e os 19 °C tendem a abrandar o ciclo de vida (embora não tenha implicações para as pupas) e temperaturas negativas tendem a ser fatais para larvas e pupas. (Beugnet *et al.*, 2018)

A passagem de pupa para pulga adulta também é influenciada por diversos fatores como sombras, passos e vibrações (estes fatores dão um aviso à pupa de que um possível hospedeiro está próximo, desencadeando a emergência da pulga adulta) (Beugnet *et al.*, 2018).

2.2.2. Identificação Morfológica

As pulgas são pequenos insetos, geralmente castanhos-escuros, ápteros e hematófagos. Apresentam um corpo comprimido lateralmente, olhos, quando presentes, fotossensíveis, antenas em ambos os lados numa região denominada fossa antenal, compostas por três segmentos, e três pares de pernas - sendo o terceiro par mais longo e desenvolvido, adaptado para o salto. A cabeça e o pronoto (primeiro segmento do tórax) podem apresentar fileiras ventrais (ctenídios/pentes genais) ou posteriores (ctenídios/pentes pronotais) de espinhos (Wall Shearer, 1997; Taylor, *et al.*, 2016; Beugnet, *et al.*, 2018) (Figura 3).

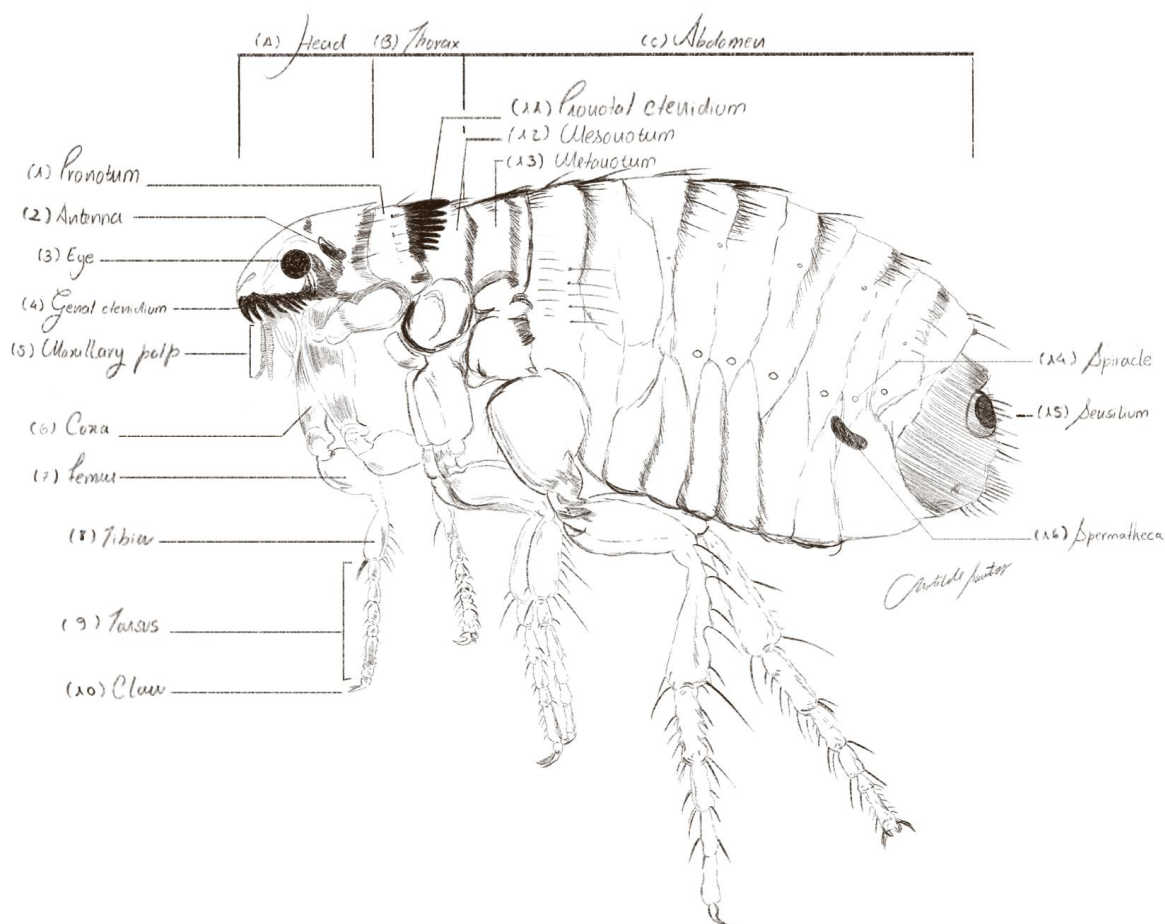


Figura 3 - Ilustração de uma pulga *Ctenocephalides felis* (fêmea) observada no NannoZoomer Digital Slides Scanner®. (a) Cabeça, (b) Tórax, (c) Abdómen, (1) Pronoto, (2) Antena, (3) Olho, (4) Ctenídio genal, (5) Palpo maxilar, (6) Coxa, (7) Fémur, (8) Tíbia, (9) Tarsos, (10) Garra, (11) Ctenídeo pronotal, (12) Mesonoto, (13) Metanoto, (14) Espiráculo, (15) Sensílio, (16) Espermateca. Ilustração original da autora.

2.3 Piolhos

Os piolhos são pequenos insetos sem asas que se podem dividir em piolhos sugadores (subordem Anoplura) e piolhos mastigadores (subordem Mallophaga). As infestações por piolhos não são comuns, comparativamente às ectoparasitoses por carraças ou pulgas, uma vez que estes insetos apresentam um único hospedeiro (*host-specific*), não sobrevivem mais que uns dias fora do hospedeiro e devido ao uso regular de tratamentos antiparasitários em animais domésticos. Não obstante, a infestação por piolhos em animais existe e tem uma maior tendência a ocorrer em ambientes de superlotação ou em animais que não são observados com tanta frequência (Taylor *et al.*, 2016; Beugnet *et al.*, 2018; Lundgren, 2023).

2.3.1. Ciclo de vida

Os piolhos, tanto mastigadores como sugadores, apresentam um ciclo biológico de 2 a 4 semanas com uma metamorfose incompleta, ou seja, com apenas 3 estádios: ovos, ninfas e adultos. Estes insetos passam todo o ciclo de vida num só hospedeiro, apresentando um ciclo monofásico, e só passam para outro hospedeiro através de contacto direto ou por fómites (por exemplo, escovas) - os piolhos não sobrevivem mais de 3 a 4 dias fora do hospedeiro, por não suportarem temperaturas altas ou baixas e por terem a necessidade de se alimentar continuamente (Figura C3) (Beugnet *et al.*, 2018; Clay, 2025).

As fêmeas, maiores e em maior número que os machos, depositam 20 a 300 ovos operculados (ovos com um opérculo que facilita a eclosão), visíveis a olho nu, que se fixam à base dos pêlos, penas e cabelos. Após aproximadamente 6 dias, os ovos eclodem originando as ninfas - morfologicamente semelhantes a piolhos adultos, mas mais pequenas. As ninfas sofrem três mudas, aumentando de tamanho, antes de se transformarem em adultos (Taylor *et al.*, 2016; Beugnet *et al.*, 2018).

2.3.2. Identificação Morfológica

Os piolhos são pequenos insetos ápteros dorsoventralmente achatados com corpos segmentados divididos em três secções: cabeça, tórax e abdómen. A cabeça de piolhos Mallophaga é mais larga que o tórax, contrariamente à de piolhos Anoplura, apresenta duas antenas, visíveis ou escondidas, compostas por três segmentos e os olhos, quando presentes, são vestigiais e pouco desenvolvidos. Os piolhos apresentam três pares de pernas articuladas com uma ou duas garras, dependendo da espécie, no final de cada perna. O tórax é composto por três segmentos - protórax, mesotórax e metatórax (primeiro, segundo e terceiro segmentos, respectivamente) - sendo que o mesotórax e o metatórax podem estar fundidos (em piolhos sugadores, os três segmentos podem estar fundidos). O abdómen é composto por sete a oito segmentos e pode apresentar até seis pares de espiráculos (Taylor *et al.*, 2016; Beugnet *et al.*, 2018; Clay, 2025) (Figura 4).

Os órgãos sensoriais dos piolhos são os olhos, que, embora pouco desenvolvidos ou mesmo ausentes, são sensíveis à luz, pêlos tácteis e órgãos sensoriais na boca e nas antenas que funcionam como órgãos olfativos e gustativos (Clay, 2025).

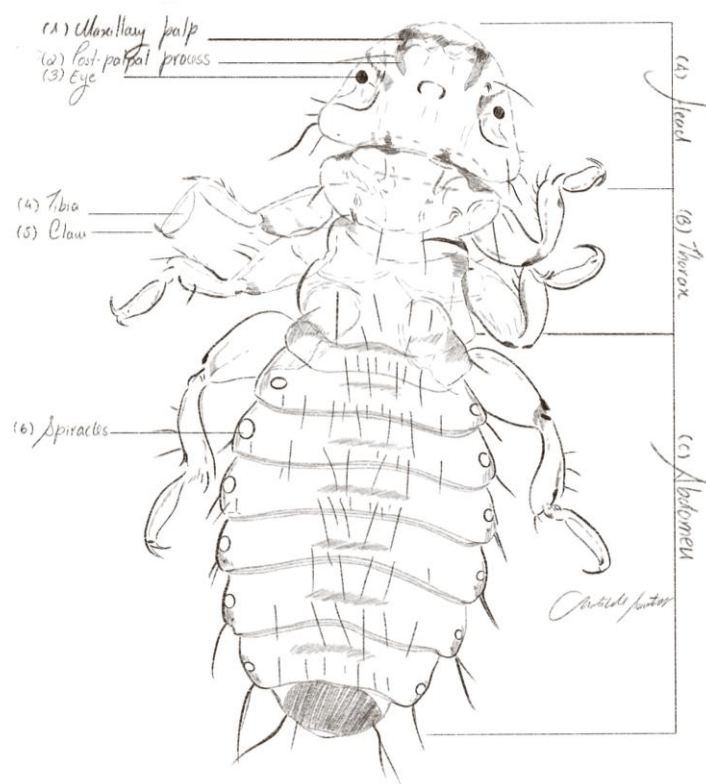


Figura 4 - Ilustração de um piolho *Heterodoxus spiniger* observado no NannoZoomer Digital Slides Scanner®. (a) Cabeça, (b) Tórax, (c) Abdômen, (1) Palpo maxilar, (2) Processo pós-papal, (3) Olho, (4) Tíbia, (5) Garra, (6) Espiráculos. Ilustração original da autora.

3. Agentes patogénicos

Foram pesquisados nove agentes patogénicos transmitidos e/ou associados a carraças, pulgas e piolhos que, frequentemente, causam doenças clinicamente importantes, não só em cães como em humanos. Muitos destes agentes têm potencial zoonótico e a sua inclusão permite avaliar potenciais co-infecções e obter uma visão integrada da circulação de agentes num contexto de Uma Só Saúde.

3.1 Bactérias dos géneros *Anaplasma* e *Ehrlichia*

Os géneros *Anaplasma* e *Ehrlichia* compreendem bactérias intracelulares pertencentes à ordem Rickettsiales e à família Anaplasmataceae. *Anaplasma* spp. infecta granulócitos, nomeadamente neutrófilos, aparecendo como vacúolos delimitados por membranas no citoplasma destas células, *Ehrlichia* spp. pode ser encontrada em leucócitos no sangue

circulante e ambos os agentes são transmitidos, principalmente, pela mordida de carrças ixodídeas, como *Rhipicephalus sanguineus* ou *Amblyomma americanum* (Taylor *et al.*, 2016).

Após a entrada na corrente sanguínea, *Anaplasma* spp. penetra nas células sanguíneas por invaginação da membrana celular, formando um vacúolo intracitoplasmático. No interior deste, o microrganismo divide-se e forma mórulas (corpos de inclusão com até oito corpos iniciais agrupados). Estes corpos de inclusão são mais numerosos na fase aguda da infecção e podem persistir no organismo do hospedeiro durante anos. Parte do ciclo de vida de *Anaplasma* spp. ocorre dentro da carrça e é transmitido entre os diferentes estádios do artrópode (passagem transestadial) (Taylor *et al.*, 2016).

De forma semelhante, as carrças adquirem a infecção por bactérias do género *Ehrlichia* ao alimentar-se de hospedeiros portadores do agente, mantendo a infecção durante os vários estádios do artrópode (CAPC, 2015).

Dadas as carrças se alimentarem de uma vasta gama de vertebrados, a transmissão destes agentes pode ocorrer entre múltiplas espécies hospedeiras (Taylor *et al.*, 2016).

Entre as espécies de maior relevância epidemiológica destacam-se *Anaplasma phagocytophilum*, responsável pela anaplasmoze (conhecida vulgarmente como febre da carrça) e reconhecida como uma zoonose relevante para a medicina humana e para a medicina veterinária, *Anaplasma platys*, agente da trombocitopénia cíclica canina com importância na medicina veterinária, mas relevância zoonótica incerta, e as espécies *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffensis* e *Ehrlichia ewingii*, todas zoonóticas, sendo que a *E.chaffensis* possui maior relevância para a saúde humana. Em cães, *E.canis* e *E.chaffensis* são responsáveis pela erliquiose monocítica canina (também conhecida por pancitopenia canina tropical) e a *E.ewingii* pela erliquiose granulocítica canina (Taylor *et al.*, 2016) (Tabela 1).

Tabela 1 - Doenças e principais aspectos destas das principais espécies de *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp.

Agente Patogénico	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<i>Anaplasma platys</i>	<i>Ehrlichia canis</i>	<i>Ehrlichia chaffensis</i>	<i>Ehrlichia ewingii</i>
Nome da Doença	Anaplasmoze Anaplasmoze granulocitica humana	Trombocitopenia cíclica canina	Ehrliquiose monocítica canina Pancitopenia canina tropical	Ehrliquiose monocítica canina	Ehrliquiose granulocítica canina
Hospedeiros	Ovelha, bovino, cão, cavalo, veado, roedores, humano (1)	Cão (1)	Cão (1)	Cão, humano,veado (1)	Cão (1)
Vectores Primários	<i>Ixodes ricinus</i> (1)	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> (1)	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> (1)	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> , <i>Amblyomma americanum</i> (1)	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> , <i>Amblyomma americanum</i> (1)
Distribuição	Europa, EUA, América do Sul, Austrália (1)	Mundial (1)	Ásia, Europa, África, Austrália e América (1)	Estados do sul dos EUA (1)	Estados do sul e sudeste dos EUA (1)
Células Alvo	Neutrófilos (1)	Plaquetas (1)	Monócitos (1)	Monócitos e macrófagos (1)	Neutrófilos e eosinófilos (1)
Sinais Clínicos em Cães	Letargia, Hipertermia, Trombocitopénia, Leucopenia, Anemia (2)	Trombocitopenia, Petéquias, Epistáxis, Letargia	Febre, Anorexia, Perda de peso, Epistaxe, Vômitos, Diarreia, Anemia, Linfadenopatia, Trombocitopenia, Hepatomegalia, Esplenomegalia, Meningite (4)		
Sinais Clínicos em Humanos	Febre, Mialgia, Fraqueza, Náuseas, Vômitos, Tosse, Cefaleia, Coagulação intravascular disseminada, Falência múltipla de órgãos, Convulsões, Coma (3)	Febre, Cefaleia, Mialgias, Mal-estar geral, Trombocitopenia leve a moderada, leucopenia ocasional	Febre, Mialgia, Fraqueza, Náuseas, Vômitos, Tosse, Cefaleia, Exantema maculopapular ou petequial, Coagulação intravascular disseminada, Falência múltipla de órgãos, Convulsões, Coma (3)		
Referências	(1) Taylor et al., 2016 (2) Trincheiras et al., 2019 (3) Petri & Tesini, 2024 (4) Gomes & Coelho, 2023				

Coinfeções de *Ehrlichia* com outros agentes, nomeadamente *Anaplasma*, *Rickettsia*, *Bartonella* ou *Babesia*, são frequentes em cães (Gomes & Coelho, 2023).

3.2 Protozoários dos gêneros *Babesia* e *Theileria*

Os protozoários dos gêneros *Babesia* e *Theileria* são agentes hemoprotozoários pertencentes à ordem Piroplasmida e à família Theileriidae, respectivamente. Ambos os gêneros são responsáveis por doenças de importância veterinária (e alguma importância na saúde humana, dado que podem ser consideradas zoonóticas devido a alguns casos descritos de infecções humanas), conhecidas como babesioses e theilerioses que afetam diversos mamíferos domésticos e silvestres (Taylor *et al.*, 2016).

A transmissão de protozoários do gênero *Babesia* spp. ocorre através da mordedura de carrças infectadas, nas quais o parasita é transmitido transovaricamente (dos ovos de uma geração para a geração seguinte). Os esporozoítos infecciosos presentes nas glândulas salivares da carrça são inoculados no hospedeiro durante a alimentação e, no interior do hospedeiro vertebrado, a multiplicação parasitária ocorre nos eritrócitos por fissão binária, endodigenia, endopoligenia ou merogonia, resultando na formação de merozoítos. Durante fases repetidas de merogonia, os eritrócitos parasitados rompem e libertam merozoítos que invadem outros eritrócitos. Em casos de infecções crônicas, os parasitas tendem a sequestrar-se nas redes capilares de órgãos como o baço e o fígado, onde são libertados periodicamente para a circulação sanguínea e, conseqüentemente, originam recrudescências parasitárias (Taylor *et al.*, 2016).

Ao serem ingeridas pela carrça, estas formas, agora vermiformes após sofrerem uma série de transformações no intestino do vetor, penetram nos óvulos (mais especificamente nos oócitos) onde se dividem em organismos redondos até às fases larvar e ninfal da carrça. Quando a carrça passa para a fase de ninfa, os parasitas migram para as glândulas salivares e multiplicam-se ativamente por fissão binária, penetrando nas células glandulares. Conforme estas células se enchem de parasitas, estes transformam-se novamente em vermiformes, são libertados para o lúmen da glândula salivar e são inoculados no novo hospedeiro durante a alimentação da carrça (Taylor *et al.*, 2016).

Semelhantemente, o gênero *Theileria* é também transmitido pela picada de carrças ixodídeas, mas distingue-se pela sua fase de multiplicação inicial ocorrer em linfócitos e outras células do sistema mononuclear fagocitário do hospedeiro. Após a inoculação dos esporozoítos, estes invadem os linfócitos, local onde sofrem divisões sucessivas por esquizogonia, originando merontes. Os merontes (ou corpos de Koch) podem ser classificados em macromerontes e micromerontes, ambos capazes de produzir organismos (micromerozoítos) que invadem eritrócitos e originam piroplasmas. Nos eritrócitos, ocorre uma nova fase de merogonia, resultando na formação de merozoítos conhecida como Cruz de Malta. A gametogonia ocorre no intestino da carrça vetora e a esporogonia nas glândulas salivares (Taylor *et al.*, 2016).

Entre as espécies mais relevantes encontram-se a *Babesia canis* (com as subespécies *B. canis canis*, *B. canis rossi* e *B. canis vogeli*), *Babesia gibsoni* e *Theileria annae* (por vezes, designada *Babesia annae*) (Taylor *et al.*, 2016).

3.3 Bactérias do género *Bartonella*

O género *Bartonella* compreende bactérias Gram-negativas, pleomórficas, frequentemente encontradas sob forma de bastonetes, pertencentes à ordem Rhizobiales e à família Bartonellaceae (Taylor et al., 2016). Estes microrganismos apresentam um estilo de vida intracelular facultativo, estando adaptados a infectar diversos hospedeiros mamíferos. São transmitidas principalmente por vetores artrópodes hematófagos como pulgas, piolhos e carraças.

O ciclo de vida destas bactérias caracteriza-se por interações complexas entre o hospedeiro e o vetor. No interior do intestino médio da carraça, a bactéria replica-se e é, posteriormente, excretada nas fezes. A infecção do hospedeiro pode ocorrer acidentalmente, por inoculação cutânea acidental (por exemplo, por lesões cutâneas contaminadas com material fecal infectado) ou por inoculação direta através da picada do vetor. Uma vez na derme, bactérias do género *Bartonella* colonizam um microambiente denominado “nicho dérmico”, no qual se acreditam estar incluídas células dendríticas (células pertencentes ao sistema mononuclear fagocitário). Nesta etapa, estes microrganismos são capazes de modular a resposta imunitária do hospedeiro (Fromm & Dehio, 2021).

Numa etapa seguinte, as células imunitárias migratórias, nomeadamente macrófagos e células dendríticas, atuam como transporte para a disseminação bacteriana na vasculatura do hospedeiro. Posteriormente, as bactérias são libertadas na corrente sanguínea, invadindo os eritrócitos e iniciando uma fase intracelular que lhes confere proteção contra o sistema imunitário do hospedeiro, assegurando uma persistência prolongada. No interior das hemácias, as bactérias replicam-se controladamente e, juntamente com a sua persistência nos eritrócitos do hospedeiro, esta replicação contínua e controlada permite que as bactérias sejam ingeridas novamente por um outro vetor, reiniciando o seu ciclo biológico (Fromm & Dehio, 2021).

Entre as espécies de maior relevância epidemiológica destaca-se *Bartonella henselae* por se tratar de um agente zoonótico amplamente distribuído (Tabela 2) (Taylor et al., 2016).

Tabela 2 - Doenças, e principais aspectos destas, transmitidas pela *Bartonella henselae*.

Nome da Doença	Doença da arranhadura do gato Bartonelose canina
Hospedeiros	Cão, gato (1)
Vectores Primários	Artrópodes hematófagos (1)
Distribuição	Mundial (1)
Células Alvo	Macrófagos, Células dendríticas (2)
Sinais Clínicos em Cães	Assintomáticos (maioria dos casos), Endocardite, Miocardite, Comprometimento renal, Disfunção hematológica, Anormalidades cardíacas (especialmente envolvendo a válvula aórtica), Febre intermitente, Letargia, Claudicação inexplicável, Doença granulomatosa inexplicada (3)
Sinais Clínicos em Humanos	Pápila indolor, eritematosa com crosta, Linfadenopatia regional, Febre, Mal estar, Cefaleia, Anorexia, Febre de origem desconhecida, Endocardite com cultura negativa, Angiomatose bacilar, Peliose hepática, Doença grave disseminada (em pacientes com aids), Síndrome oculoglandular de Parinaud - 50% dos casos atípicos, Manifestações neurológicas (encefalopatia, convulsões, neuroretinite, radiculite, mielite, paraplegia, arterite cerebral) - 2% dos casos atípicos, Doença granulomatosa hepatoesplênica - <1% dos casos atípicos (4)
Referências	(1) Taylor et al., 2016 (2) Fromm & Dehio, 2021 (3) dos Santos, 2023 (4) Bush et al., 2024

3.4 Bactérias do género *Borrelia*

O género *Borrelia* compreende bactérias pertencentes à ordem Spirochaetales e à família Borreliaceae. São caracterizadas como sendo espiroquetas Gram-negativas, com morfologia helicoidal, flexível, dotadas de flagelos periplasmicos que lhes conferem maior mobilidade em meios como tecidos conjuntivos ou sangue. São transmitidas principalmente por artrópodes hematófagos, nomeadamente carraças ixodídeas (Taylor et al., 2016).

Estas espiroquetas são transmitidas, fundamentalmente, pela mordida de carraças infectadas. Durante a refeição de sangue das carraças, as bactérias migram para as glândulas salivares do vector e são inoculadas no hospedeiro por meio de secreções coxais ou salivares. Adicionalmente, a infecção também pode ocorrer por contacto indireto com fezes ou tecidos de aves infectadas, que atuam como reservatórios naturais (WOAH, 2021).

Entre as várias espécies pertencentes ao género *Borrelia*, a *B. burgdorferi* sensu stricto destaca-se pela sua importância zoonótica, sendo o principal agente etiológico da borreliose de Lyme, uma das zoonoses por carraças mais prevalentes no hemisfério norte (Tabela 3) (WOAH, 2021).

Tabela 3 - Doenças, e principais aspectos desta, transmitidas pela *Borrelia burgdorferi* sensu stricto

Nome da Doença	Borreliose de Lyme
Hospedeiros	Melro preto (<i>Turdus merula</i>), Roedores do género <i>Apodemus</i> (2)
Vectores Primários	Carraças Ixodídeas (1)
Distribuição	Mundial (1)
Células Alvo	Células sanguíneas, Células dendríticas (2)
Sinais Clínicos em Cães	Edema das articulações, Claudicação aguda ou intermitente, Febre, Anorexia, Miocardite, Falência renal, Mudanças de comportamento (3)
Sinais Clínicos em Humanos	Eritema migratório, Disseminação hematogénica precoce, Mal estar, Fadiga, Febre, Calafrios, Cefaleia, Rigidez da nuca, Mialgias, Artralgias, Dor dorsal, Náuseas e vômitos, Dor de garganta, Linfadenopatia, Esplenomegalia, Meningite linfocítica, Meningoencefalites, Neurite craniana, Paralisia de Bell, Radiculoneuropatia sensorial/motora, Bloqueios atrioventriculares (1º grau/ Wenckebach/ 3º grau), Miopericardites, Fração de ejeção reduzida, Cardiomegalia, Acrodermatite crónica atrófica, Polineuropatia ou encefalopatia discreta com alterações de humor e de memória, Distúrbios do sono (2)
Referências	(1) Taylor et al., 2016 (2) Bush et al., 2025 (3) Patrício, 2017

3.5 Protozoários do género *Hepatozoon*

O género *Hepatozoon* compreende protozoários pertencentes à ordem Eucoccidiorida, subordem Adeleorina e à família Hepatozoidae, sendo agentes parasitários intracelulares obrigatórios que afetam uma ampla variedade de vertebrados, com especial importância nos cães (Taylor et al., 2016).

O ciclo de vida destes protozoários caracteriza-se como bifásico, ou seja, requerem dois hospedeiros distintos. A transmissão do agente ocorre através da ingestão do hospedeiro definitivo infectado. O desenvolvimento sexual do *Hepatozoon* spp. ocorrem no hospedeiro definitivo invertebrado hematófago, enquanto que a merogonia seguida da gametogonia ocorre no hospedeiro intermediário vertebrado (Taylor et al., 2016).

A infecção do hospedeiro intermediário ocorre aquando da ingestão, acidental ou comportamental, de uma carraça infectada com oocistos maduros. Uma vez ingeridos, os oocistos libertam esporozoítos que penetram a mucosa intestinal e se disseminam pela corrente sanguínea e linfática para os diferentes órgãos e tecidos. Quando um novo vetor hematófago se alimenta do hospedeiro vertebrado infectado, os gamontes (resultado da gametogonia) são ingeridos e o ciclo reenicia-se no intestino do vector, onde se completa o desenvolvimento sexual do protozoário (Taylor et al., 2016).

Das várias espécies, *H. canis* e *H. americanum* assumem particular importância na medicina veterinária, sendo responsáveis pela hepatozoonose canina (forma subclínica a clínica da doença) e pela hepatozoonose americana (forma mais grave e frequentemente fatal da doença), respetivamente (Taylor et al., 2016).

3.6 Protozoários do género *Leishmania*

O género *Leishmania*, pertencente à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae, compreende protozoários difenéticos caracterizados morfologicamente pela presença de um cinetoplasto, localizado anteriormente à base do flagelo, conferindo motilidade e um papel importante na bioenergética e replicação do microrganismo (Pires, 2016; Taylor *et al.*, 2016).

O ciclo de vida destes protozoários envolve um hospedeiro vertebrado mamífero e um insecto flebotomínico (Esch & Petersen, 2023). O ciclo inicia com a inoculação de promastigotas metacíclicas pelo flebótomo infectado na pele de um mamífero durante hematofagia. Uma vez na pele, as promastigotas são fagocitadas por macrófagos e células dendríticas e, consequentemente, transformadas em amastigotas no interior de vacúolos parasitóforos, local onde se multiplicam por divisão binária simples. A proliferação das amastigotas culmina com a destruição das células hospedeiras e a infecção de novas células fagocíticas (Esch & Petersen, 2023).

A disseminação do parasita dentro do organismo do hospedeiro depende de vários factores, pelo que a infecção pode permanecer localizada (leishmanioses cutâneas) ou pode propagar-se para os órgãos linfoides secundários - fígado e baço -, levando a uma forma mais grave da doença (leishmaniose visceral) (Esch & Petersen, 2023).

Do ponto de vista epidemiológico e clínico, a *L. infantum* pode ser destacada como espécie de maior relevância na medicina veterinária e pública, sendo responsável pela leishmaniose visceral zoonótica, doença que afeta cães (principais reservatórios e hospedeiro primário) e seres humanos (hospedeiros acidentais) (Tabela 4) (Taylor *et al.*, 2016).

Tabela 4 - Doenças, e principais aspectos desta, transmitidas pela *Leishmania infantum*.

Nome da Doença	Leishmaniose visceral zoonótica
Hospedeiros	Cão (1)
Vectores Primários	Flebótomos (gênero <i>Lutzomyia</i> ou gênero <i>Phlebotomus</i>) (2)
Distribuição	Regiões mediterrânicas, Médio Oriente, América do Sul, áreas endêmicas de África e Ásia (1)
Células Alvo	Macrófagos, Células dendríticas (2)
Sinais Clínicos em Cães	Linfadenomegalia generalizada, Perda de peso, Diminuição ou aumento do apetite, Letargia, Membranas mucosas pálidas, Esplenomegalia, Poliúria, Febre, Vômitos e Diarreias, Dermatites (esfoliativas não pruríticas/ erosiva ou ulcerativa/ nodular/ papular/pustular), Onicogribose, Blefarite e conjuntivite, Ceratoconjuntivite, Uveíte anterior, Endoftalmite, Anemia não regenerativa ligeira a moderada, Leucocitose ou leucopénia, Linfopenia, neutrofilia, neutropenia, Trombocitopenia, Trombocitopatia, Hiperproteinemia, Hiperglobulinemia, Hipoalbuminemia, Azotémia renal, Proteinúria, entre outros (3)
Sinais Clínicos em Humanos	Febre, Palidez cutâneo-mucosa, Hepatoesplenomegalia, Diarreias, Tosse não produtiva, Hepatomegalia, Hiperglobulinemia, Velocidade de hemossedimentação alta, Anemia, Trombocitopenia, Leucopenia, Níveis de aminotransferases elevados, Níveis de bilirrubinas elevadas, Aumento dos níveis de ureia e creatinina, Desnutrição, Edema dos membros inferiores, Anasarca, Hemorragias (epistaxe, gengivorragia e petéquias), Icterícia, Ascite, (4)
Referências	(1) Taylor et al., 2016 (2) Esch & Petersen, 2023 (3) LeishVet, 2018 (4) Ministério da Saúde, 2003

3.7 Bactérias do género *Rickettsia*

O género *Rickettsia* compreende microrganismos parasitários Gram-negativos, estritamente intracelulares, frequentemente associados a artrópodes, entre eles, *Amblyomma* spp. e *Rhipicephalus* spp.. Estas bactérias, pertencentes à ordem Rickettsiales e à família Rickettsiaceae, são reconhecidas pela sua capacidade de provocar diversas doenças zoonóticas de elevada importância em medicina humana e em medicina veterinária, reconhecidas como rickettsioses (Taylor et al., 2016).

Os organismos do género *Rickettsia* são seres intracelulares obrigatórios, ou seja, são inteiramente dependentes das células eucarióticas hospedeiras para sobreviverem e se replicarem, desenvolvendo ciclos de vida complexos. O ciclo de vida destes agentes inicia-se com a adesão à superfície da célula hospedeira por proteínas de adesão específicas e segue-se pela internalização do microrganismo por fagocitose, originando um vacúolo fagocítico no interior da célula hospedeira. Uma vez no interior da célula hospedeira, as bactérias evitam a degradação intracelular (devido à sua capacidade de escapar do fagossoma antes da fusão com os lisossomas) e são libertadas no citoplasma, passando a residir e a replicar-se livremente no citosol das células hospedeiras. Após as replicações dentro do citosol, as bactérias do género *Rickettsia* podem disseminar-se para outras células vizinhas por lise da célula hospedeira - onde as bactérias são libertadas para o meio extracelular - ou por propagação direta através de junções célula-célula (McGinn & Lamason, 2021).

Ao contrário de outros gêneros da ordem Rickettsiales, como *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp., as *Rickettsias* têm a capacidade de parasitar células de tecidos variados, excluindo os eritrócitos, infectando hospedeiros vertebrados, incluindo humanos. Os artrópodes vetores desempenham um papel crucial na manutenção e transmissão destas bactérias, actuando como reservatório biológico e como transmissores mecânicos (Taylor et al., 2016).

Entre as espécies de maior relevância epidemiológica destacam-se *R. conorii*, agente da febre botonosa (do inglês, *boutonneuse fever*), *R. rickettsii*, responsável pela febre maculosa das Montanhas Rochosas (do inglês, *Rocky Mountain spotted fever*), *R. felis*, associada à febre maculosa transmitida por pulgas, e *R. australis*, agente etiológico da febre maculosa de Queensland (do inglês, *Queensland tick typhus*). Estas espécies podem infectar uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados, incluindo o ser humano que atua frequentemente como hospedeiro acidental (Tabela 5) (Taylor et al., 2016).

Tabela 5 - Doenças e principais aspectos destas das principais espécies de *Rickettsia* spp.

Agente Patogénico	<i>Rickettsia conorii</i>	<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>Rickettsia felis</i>	<i>Rickettsia australis</i>
Nome da Doença	Febre botonosa	Febre maculosa das Montanhas Rochosas	Febre maculosa transmitida por pulgas	Febre maculosa de Queensland
Hospedeiros	Cão, rato, humano (1)	Cão, raposa, guaxinim, humano (1)	Gato, cão, humano (1)	Humano (1)
Vectores Primários	<i>Amblyomma</i> , <i>Hyalomma</i> , <i>Rhipicephalus</i> spp. (1)	<i>Amblyomma</i> , <i>Dermacentor</i> , <i>Ixodes</i> , <i>Rhipicephalus</i> spp. (1)	Pulgas (1)	<i>Ixodes holocyclus</i> (1)
Distribuição	África, Médio Oriente, Sul da Europa (1)	Norte e Sul da América (1)	Norte e Sul da América, Europa (1)	Austrália (1)
Células Alvo	Células endoteliais de vasos sanguíneos menores (1)			
Sinais Clínicos em Cães	Febre, Letargia ou depressão, Linfadenomegalia, Anorexia, Petéquias, Equimoses, Taquicardia, Dor articular, Anemia, Trombocitopénia, Leucocitose/Leucopénia, entre outros (2)			
Sinais Clínicos em Humanos	Febre, Mialgias, Cefaleias, Exantema (maculo-papular ou maculo-papulo-nodular, não puriginoso e ascendente), Escara de inoculação, Artralgias, Dor abdominal, Náuseas, Diarreia, Fotofobia (3)	Cefaleia intensa, Calafrios, Prostração, Dores musculares, Febres altas e persistentes (com possíveis remissões matutinas), Exantema (inicialmente macular e róseo; posteriormente, maculopapular e mais escuro), Petéquias que podem formar áreas hemorrágicas que ulceram, Insónias, Delírio, Coma, Encefalites, Hipotensão em casos graves, Hepatomegalia, Náuseas e vômitos, Pneumonias, necrose de tecido e falência circulatória (se não tratada), Paragem cardíaca com morte súbita (casos fulminantes) (4)	Febre, Exantema, Dor de cabeça, Mialgia, Erupção cutânea, Dor abdominal, Náusea, Vômito, Diarreia, Fotofobia, Trombocitopénia, Hepatosplenomegalia, Anemia, Leucocitose ou leucopénia, Trombocitose (5)	Febre, Dor de cabeça, Mal estar, Mialgia, Erupção cutânea, Sépsis severa com falha multiorgânica (em casos mais graves) (6)
Referências	(1) Taylor et al., 2016 (2) Duarte, 2008 (3) Marques et al., 2005 (4) Petri & Tesini, 2024 (5) Galvão et al., 2004 (6) Stewart et al., 2017			

4. Fundamentos teóricos

A classificação por chaves dicotômicas é um método de classificação das espécies de seres vivos bastante utilizado. Esta ferramenta identifica os organismos através de uma sequência de escolhas binárias, mutuamente exclusivas, em que cada par de alternativas leva a dois grupos distintos definidos por características partilhadas e exclusivas, permitindo avançar passo a passo até à identificação do organismo em estudo (Porto Editora, n.d.).

Para uma diferenciação mais precisa entre espécies de ectoparasitas, a análise com as chaves dicotômicas pode ser complementada por identificação molecular com marcadores genéticos, como o gene mitocondrial citocromo C oxidase, em especial as subunidades I (*COX-I*) e II (*COX-II*), que apresentam elevada capacidade de discriminação, sendo até considerados uma abordagem de DNA *barcoding*. A subunidade *COX-I* é reconhecida por apresentar uma maior diversidade nucleotídica, sendo por isso historicamente o gene de referência em estudos de *barcoding* de artrópodes (Lawrence *et al.*, 2022); enquanto que a subunidade *COX-II* destaca-se pela maior diversidade ao nível aminoacídico e pelo seu maior potencial em protocolos de reação em cadeia da polimerase (PCR do inglês *Polymerase chain reaction*), por amplificar com maior eficiência utilizando apenas um par de oligonucleótidos (*primers*) e por possuir um fragmento de interesse relativamente mais longo do que a *COX-I* (Hornok *et al.*, 2018; Güvendi *et al.*, 2022)

De forma a realizar a identificação até ao nível da espécie dos agentes patogénicos são necessários vários procedimentos, entre eles:

- PCR: esta técnica é usada para amplificar várias cópias, rápidas e precisas, de um segmento específico de DNA, permitindo, essencialmente, obter grandes quantidades de DNA e identificar zonas alvo específicas do genoma (Britannica Editors, 2025)
- Foram pesquisados, por PCR, vários loci: loci *16S rDNA* e *GroEL* para os agentes *Anaplasma* e *Ehrlichia* spp., locus *ITS* para *Bartonella* spp., locus *flaB* para *Borrelia* spp., locus *18S rDNA* para *Babesia* e *Theileria* spp., locus *18S rDNA* para *Hepatozoon* spp., locus *região do minicirculo de kDNA* para *Leishmania* spp. e loci *omp-A* e *omp-B* para *Rickettsia* spp. (Tabela 6)
- Sequenciação de Sanger : esta sequenciação tem como objetivo determinar a sequência de bases nucleotídicas num pedaço de DNA, normalmente com menos de 1000 pares de bases (pb) de comprimento. Considerado o modo padrão para a validação de sequências de DNA, com 99,99% de precisão e elevada especificidade para sequências específicas com mínima contaminação cruzada (CD Genomics, 2020).
- Análise Bioinformática: a análise das sequências pode ser realizada através de múltiplos *softwares*, e algoritmos. Entre estas ferramentas para edição, alinhamento, comparação e tratamento de sequências de DNA, pode-se destacar o programa bioinformático *BioEdit Sequence Alignment Editor®* versão 7.7.1 (Hall, 2021), utilizado para edição e análise preliminar das sequências; o servidor do *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) utilizando os algoritmos *BLASTn* (disponível em https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch) para análise de e comparação de nucleótidos e o *BLASTx* (disponível em

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastn), usado para comparação das sequências obtidas com bases de dados de referência (bases de dados utilizadas fazem parte do trabalho do Professor Doutor André Pereira); o programa *MAFFT*v7 (disponível em <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>), permite realizar múltiplos alinhamentos de sequências; e o programa G-Blocks (disponível em http://phylogeny.lirmm.fr/phylo.cgi/one_task.cgi?task_type=gblocks), usado para seleção e exclusão de regiões de alinhamento pouco informativas.

5. Objetivos

Até ao momento, existem dados limitados disponíveis relativamente à diversidade de agentes patogénicos transmitidos por vectores em cães da Ilha de São Vicente, Cabo Verde, pelo que a presente investigação surgiu na sequência de um projeto da FMV - Universidade Lusófona-I-MVET com o objetivo de caracterizar morfológicamente e geneticamente ectoparasitas de uma população de cães errantes da Ilha de São Vicente. Ainda identificar molecularmente alguns agentes patogénicos transmitidos por esses vectores (ectoparasitas artrópodes: insectos e aracnídeos), presentes na amostra de cães e o potencial risco para os humanos.

II - Material e Métodos

1. População em estudo

Durante uma campanha de esterilização organizada pela Animais de Rua (Associação de proteção animal sediada em Portugal) e pela Simabô (Organização Não Governamental (ONG) Cabo Verdiana), foram recolhidas amostras de sangue (3 mL de sangue preservado num tubo com ácido etilenodiamino tetra-acético [EDTA], anticoagulante) de um total de 20 cães errantes na cidade do Mindelo, e dos seus ectoparasitas (preservados em álcool a 70%) .

Para todos os animais envolvidos neste estudo foram recolhidos dados biométricos e clínicos, e apontados numa folha de registo com um número individual (Figura A1), como idade e peso aproximados, sexo, condição corporal (CC 1/5), dia e local de recolha, presença de ectoparasitas, sinais clínicos observados (mordidas, tosse, diarreia, epistaxis, icterícia, claudicações, linfadenopatia, atrofia muscular, sinais neurológicos, lesões oculares, membranas mucosas pálidas, petéquias, taquipneia, entre outros) e descrição morfológica dos cães. Os dados foram anotados numa folha de registo (Figura A1). Adicionalmente, para melhor identificação dos cães, foram obtidos registos fotográficos dos animais.

A Figura 5 resume esquematicamente todas as etapas realizadas para colheita de amostras e análise em contexto de laboratório.

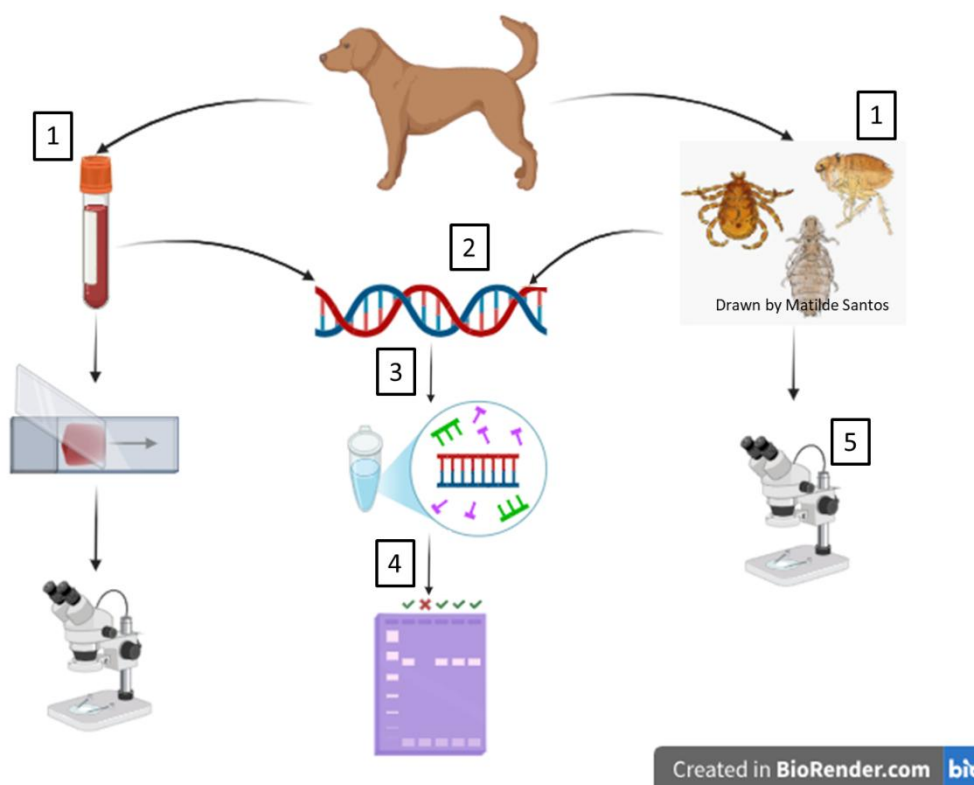


Figura 5 – Esquema do procedimento adoptado de recolha e análise laboratorial de vectores e agentes patogénicos que afectam o cão. Legenda: 1 – Colheita de sangue de cães errantes na ilha de S. Vicente, Cabo Verde (n=20), incluindo um esfregaço sanguíneo, e colheita de

ectoparasitas (n=47) durante uma campanha de esterilização; 2 – Extração de DNA das amostras de sangue de cão e dos ectoparasitas individuais através de kits comerciais; 3 – Identificação molecular através de PCR convencional e/ou *nested*, recorrendo a oligonucleótidos específicos (*primers*) para os taxa/género; 4 – Identificação dos fragmentos de PCR positivos e excisão da banda para sequenciação; 5 – Identificação morfológica de ectoparasitas e registo fotográfico. Original da autora com o uso do *software* de imagem e ilustração BioRender (disponível em <https://www.biorender.com/>)

2. Colheita e identificação das amostras

No local de colheita (Mindelo, São Vicente, Cabo Verde) foram recolhidos, através de um acesso venoso, 3 mL de sangue para um tubo com EDTA, posteriormente armazenados a 2 a 8 °C. Foram realizados esfregaços sanguíneos para todas as amostras de sangue periférico, para pesquisa de agentes infecciosos.

No laboratório da FMV-Ulusófona, Lisboa, Portugal, foi realizada extração DNA das amostras de sangue de cão para pesquisa de nove agentes patogénicos e confirmação de infecção dos cães. Dos cães amostrados foram recolhidos ectoparasitas a nível do pêlo: pulgas (fêmeas), carraças (fêmeas, machos e larvas), piolhos e céstodes.

3. Extração de ácidos nucleicos do sangue (de cães)

A extração de DNA do sangue foi realizada a partir do *kit innuPREP Blood DNA mini kit (Innuscreen GmbH)*, seguindo o protocolo do fornecedor.

1. Num tubo de 2,0 mL foram pipetados 400 µL da amostra de sangue e adicionados 400 µL da solução de lise SLS e 30 µL de Proteinase K.
2. Homogeneizaram-se as amostras com ajuda do vórtex durante 10 segundos e incubaram-se a 60 °C por 10 minutos.
3. Após a incubação, adicionaram-se 1 a 2 µL da solução *RNase A stock* (10 mg/mL) à mistura, homogeneizaram-se os tubos com vórtex e ficaram a incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente.
4. De seguida adicionaram-se 700 µL da *Binding Solution* às amostras lisadas e misturaram-se pipetando para cima e para baixo 3 a 4 vezes. Foram adicionados 750 µL da amostra a uma coluna incluída num tubo de recolha. É importante não usar a centrífuga ou o vórtex neste passo, dado que o uso deste material levará à redução do rendimento do DNA.
5. Centrifugou-se a amostra a 12000 rpm durante 1 minuto e descartou-se o filtrado.
6. À coluna, adicionaram-se 400 µL da solução de lavagem C e centrifugou-se a 12000 rpm por 1 minuto, descartando novamente o filtrado.
7. Voltou-se a centrifugar a amostra, desta vez à velocidade máxima (15000 rpm) por 3 minutos, de forma a remover quaisquer vestígios de etanol. Descartaram-se os tubos de recolha, colocando a coluna num novo tubo (tubo de eluição).

8. A eluição final decorreu por dois momentos, utilizando 100 µL do tampão de eluição de cada vez previamente aquecido a 60 °C. A coluna ficou em incubação à temperatura ambiente por 2 minutos, previamente à centrifugação. O volume final da eluição foi de 200 µL.

Procedeu-se à quantificação do DNA através do *Spex Nanosnap*TM.

4. Extração de ácidos nucleicos dos ectoparasitas presentes no pêlo dos cão

A extração de DNA dos ectoparasitas foi realizada através do *kit NZY tissue gDNA Isolation*® da NZYtech, seguindo o protocolo apresentado pelo fornecedor com algumas modificações.

Para a extração do DNA, os ectoparasitas foram sujeitos a um de dois métodos de preparação – corte ou maceração.

No método de corte, 8 carraças (62%) e 5 pulgas (38%) foram cortadas longitudinalmente com o auxílio de uma lâmina de bisturi, de pinças para a estabilização da amostra e sob visualização ao estereomicroscópio (Motic®). Cada amostra terá sido, posteriormente, colocada num tubo de microcentrifuga Eppendorf estéril de 1,5 mL contendo 180 µL de tampão NT1. Adicionaram-se 25 µL de Proteinase K (0,167 mg/mL) e homogeneizou-se com vórtex e *short-spin* na centrífuga (10 segundos).

No método de maceração, 30 carraças (97%) e 1 piolho (3%) foram colocados em tubos estéreis de 1,5 mL com 90 µL de tampão NT1, com a ajuda de pinças finas. Com o auxílio de pontas de pipeta, macerou-se cada amostra em cada tubo até ser quase impossível de identificar a carraça. Adicionaram-se mais 90 µL de tampão NT1 e 25 µL da proteinase K (concentração), homogeneizando-se, de seguida, com vórtex e *short-spin* na centrífuga (10 segundos).

O procedimento apresentado de seguida foi aplicado a todas as 44 amostras resultantes do método de corte e do método de maceração, podendo ser descrito em 11 passos:

1. Colocou-se as amostras em banho maria (56 °C) durante 3 horas com agitações manuais e com vórtex periódicas
2. Após 1 hora e 30 minutos no banho maria, acrescentou-se 40 µL de Proteínase K (20 mg/mL)
3. Terminando às 3 horas, homogeneizou-se com auxílio do vórtex e adicionaram-se 200 µL do tampão de NL. Homogeneizou-se novamente por 10 segundos.
4. Adicionou-se 210 µL de etanol 100%. Homogeneizou-se imediatamente com o vórtex e um *short-spin* na centrífuga durante cerca de 10 segundos.
5. Recolheu-se o líquido da amostra e transferiu-se para uma coluna incluída num tubo colector. Centrifugou-se por 1 minuto e 50 segundos a 13000 rpm. Descartou-se, posteriormente, o tubo colector juntamente com o filtrado.
6. Colocou-se novamente a coluna num tubo colector e adicionaram-se 500 µL de NW1. Centrifugou-se por 1 minuto e 50 segundos a 13000 rpm e descartou-se o tubo colector juntamente com o filtrado.

7. Incluiu-se novamente a coluna num tubo colector e adicionaram-se 600 μL de NW2, centrifugando, posteriormente, por 90 seg a 13000 rpm.
8. Pré-aqueceu-se o tampão NE a 70 °C por 5 minutos e descartou-se o tubo colector com o filtrado, colocando a coluna num tubo colector estéril.
9. Adicionaram-se 40 μL de NE na membrana da coluna, deixando-a incubar por 1 minuto à temperatura ambiente e, de seguida, centrifugar por 3 minutos.
10. Adicionaram-se mais 30 μL de NE na membrana da coluna e deixou-se incubar por 1 minuto à temperatura ambiente, centrifugando por 3 minutos logo de seguida.
11. Por fim, descartou-se a coluna e guardou-se o eluído num tubo estéril, armazenando-o a -20 °C.

5. Amplificação de DNA de agentes infecciosos

Para a amplificação de DNA dos agentes infecciosos transmitidos pelos vectores biológicos (ectoparasitas) foram usados protocolos de PCR convencional ou PCR *nested*, podendo-se dividir ambos os protocolos em três etapas.

Na primeira etapa, todo o processo é realizado numa câmara “DNA-free” limpa com lixívia diluída e exposta a luz UV por 20 minutos previamente à preparação das reacções, onde são manuseados todos os reagentes necessários para a realização da amplificação (NZYTaQ 2x Green Master Mix® (Nzytech); *primer*; água ultrapura), com exceção da manipulação das amostras de DNA, de forma a prevenir a contaminação. Nesta etapa preparou-se, por amostra, uma mistura com volume final de 25 μL contendo 12,5 μL de NZYTaQ 2x Green Master Mix® (Nzytech), 1 μL de cada primer (forward e reverse) e 0,5 μL de água ultrapura. Os restantes 5 μL que faltam serão adicionados na segunda etapa (adição das amostras de DNA).

Nos tubos referentes aos controlos positivo e negativo, foram adicionados 15 μL da mistura descrita acima mais 10 μL de água pura para o controlo negativo e 8 μL de água para o controlo positivo. Os restantes 2 μL que faltam no controlo positivo para se ter os 25 μL de volume final serão adicionados na segunda etapa (adição da amostra de DNA do controlo positivo).

Na segunda etapa, o processo já é realizado fora da câmara, numa bancada previamente limpa com lixívia diluída e são adicionados os 5 μL de DNA das carraças/pulgas/piolhos/sangue para cada amostra e 2 μL de DNA do agente (controlo positivo).

Na etapa seguinte, as amostras resultantes da mistura preparada na câmara DNA-free com o DNA foram submetidas à técnica de PCR num termociclador (termociclador qTower® G (Analytik Jena), onde foram programadas as condições específicas da reacção de PCR para cada locus específico dos genomas dos agentes infecciosos a amplificar.

No caso do PCR *nested*, o processo é composto pela realização de dois PCRs. No primeiro PCR segue-se o protocolo acima descrito. No segundo PCR, é feita uma nova mistura com

volume final de 25 μ L contendo 12,5 μ L de NZYTa^q 2x Green Master Mix® (Nzytech), 1 μ L de novos primer (forward e reverse), 8,5 μ L de água ultrapura e 2 μ L do resultado do primeiro PCR. Neste segundo PCR, teremos ainda um controlo positivo composto por 23 μ L da segunda mistura e 2 μ L do controlo positivo após amplificação no termociclador, um controlo negativo composto por 23 μ L da segunda mistura e 2 μ L do controlo negativo após amplificação no termociclador e um segundo controlo negativo composto por 23 μ L da segunda mistura e 2 μ L de água ultrapura. Os tubos com a segunda mistura e resultados do primeiro PCR, o novo controlo positivo e os dois novos controlos negativos são, então, submetidos novamente à técnica de PCR no termociclador, com as condições específicas programadas.

A tabela 6 resume toda a informação relativa aos agentes patogénicos pesquisados.

Tabela 6 - Informação relativa à pesquisa de agentes patogénicos pesquisados: genes alvo e *oligonucleótidos* seleccionados e respectiva fonte bibliográfica, tipo de PCR empregue, tipo de hospedeiro testado. Amostras não assinaladas a negrito foram analisadas por outro elemento da equipa (Professor Dr. André Pereira). Pb – tamanho do fragmento esperado em pares de bases; Cão – Sangue Periférico

Agente	Microrganismo	Loci Alvo	Tipo de PCR	Primers	Sequências (5´... 3´)	pb	Amostras analisadas	Referências
<i>Anaplasma/Ehrlichia</i> spp.	Bactérias	16S rDna (GEP curto)	Convencional	EHR16SD	GGTACCYACAGAAGAAGTCC	345	Carraças	Parola, et al. (2000). Inokuma, et al. (2001). Sainz, et al. (2015).
				EHR16SR	TAGCACTCATCGTTTACAGC			
		16S rDna (GEP longo)	Convencional	GEPs	CTGGCGGCAAGCYTAACACATGCAAGTCGAACGGA	973	Carraças, Cão	Breitschwerdt, et al. (2014). Sainz, et al. (2015).
				LongGep1060r	CTGTGTRAGGTCCAGCCGAAGTGMSSYC			
		GroEL	Nested	HS1	TGGGCTGGTAMTGAAAT	1350	Carraças	Petrovec, et al. (1999).
				HS6	CCICIGGIACIAYACCTTC			
				HS43	ATWGCWAARGAAGCAT	442		
				HS45	ACTTCACGYTTCATAGAC			
<i>Ehrlichia canis</i>	Bactérias	16S rDNA	Nested	ECC	AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC	478	Carraças	Gaunt, et al. (2010). Cardoso, et al. (2016). Checa, et al. (2023).
				ECB	CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA			
				HE3	TATAGGTACCGTCATTATCTTGGGTAT	389		
				ECAN5	CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA			
<i>Bartonella</i> spp.	Bactérias	ITS	Convencional	Bspp325s	CTTCAGATGATGATCCCAAGCCTTCTGGCG	500-800	Pulgas, Cão	Varanat, et al. (2011). Oteo, et al. (2017). Zarea, et al. (2023).
				Bspp 1100as	GAACCGACGACCCCCTGCTTGCAAAGCA			
<i>Borrelia</i> spp.	Bactérias	flaB	Nested	132f	TGGTATGGGAGTTTCTGG	774	Carraças, Cão	Wodecka, et al. (2010). Raileanu, et al. (2017). Garrido, et al. (2018). Hansford, et al. (2022).
				905r	TCTGTCA TTGTAGCATCTTT			
				220f	CAGACAACAGAGGGAAAT	604		
				823r	TCAAGTCTATTTTGGAAAGCACC			
<i>Babesia/Theileria</i> spp.	Protozoários	18S rDna	Convencional	Piro-A	AATACCCAATCCTGACACAGGG	408	Carraças, Cão	Irwin, (2009). Cardoso, et al. (2010).
				Piro-B	TTAAATACGAATGCCCCCAAC			
<i>Hepatozoon</i> spp.	Protozoários	18S rRNA	Convencional	HEP-F	ATACATGAGCAAAATCTCAAC	626-666	Carraças, Cão	Forlano, et al. (2007). Maia, et al. (2015).
				HEP-R	CTTATTATTCCATGCTGCAG			
<i>Leishmania</i> spp.	Protozoários	kDNA minicircl e region	Convencional	MC1	GTTAGCCGSTGGTGGTCTTG	447	Cão	da Silva, et al. (2015). Pires (2016).
				MC2	CACCCATTTTCCGATTTTG			
<i>Rickettsia</i> spp.	Bactérias	ompB	Convencional	120-M59	CCGCAGGGTTGGTAACTGC	833	Carraças, Pulgas, Cão	Novakova, et al. (2016). Brown & Macaluso, (2016).
				120-807	CCTTTTAGATTACCGCCTAA			
	Bactérias	ompA	Convencional	Rel90-70p	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	532		
				Rel90-602n	AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT			

5.1 Amplificação de DNA de *Ehrlichia*/*Anaplasma* spp.

Para a amplificação de DNA de *Ehrlichia*/*Anaplasma* spp. com o intuito de identificar até à espécie, foram realizados:

- Dois protocolos de PCR convencional com a utilização de *primers* cuja sequência é complementar e reconhece segmentos do gene bacteriano *16S rDNA* (Tabelas 7-10);
- Um protocolo de PCR *nested* com a utilização de *primers* desenhados para reconhecer o gene que codifica a proteína *groEL* (importante para o enrolamento tridimensional proteico) e amplificar DNA e diferenciar entre as espécies bacterianas do género *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia chaffensis* (Tabelas 11 -13);
- Um protocolo de PCR *nested* com a utilização de *primers* desenhados para reconhecer especificamente um fragmento do gene *16S rRNA* de *Ehrlichia canis* (Tabelas 14 - 16).

Tabela 7 – Sequência de primers utilizados na amplificação parcial do gene bacteriano *16S rDNA* (GEP curto) para identificação de bactérias do género *Ehrlichia*/*Anaplasma* spp.

Primer	Sequência	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
EHR16SD	GGTACCYACAGAAGAAGTCC	345
EHR16SR	TAGCACTCATCGTTTACAGC	

Tabela 8 – Condições de reação de PCR na amplificação parcial do gene *16S rDNA* (GEP curto)

Fase de Amplificação	Temperatura	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	00:10:00	1
Desnaturação	94°C	00:00:25	55
Hibridação dos <i>primers</i>	64°C	00:00:25	
Extensão	72°C	00:00:30	
Extensão final	72°C	00:05:00	1

Tabela 9 – Sequência de *primers* utilizados na amplificação parcial do gene 16S rDNA (GEP longo) para identificação de bactérias do gênero *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. O Y, segundo o código IUPAC, nas sequências corresponde a uma pirimidina, podendo corresponder a uma timina (T) ou a uma citosina (C), e o M corresponde a grupos amino em posição comum, podendo corresponder a uma adenina (A) ou a uma citosina (C).

Primer	Sequência	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
GEPs	CTGGCGGCAAGCYTAACACATGCAAGTCGAACGGA	973
LongGep1060r	CTGTGTRAGGTCCAGCCGAAGTGMSSYC	

Tabela 10 – Condições de reação de PCR na amplificação parcial do gene 16S rDNA (GEP longo)

Fase de Amplificação	Temperatura	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	00:10:00	1
Desnaturação	94°C	00:00:25	55
Hibridação dos <i>primers</i>	64°C	00:00:25	
Extensão	72°C	00:00:30	
Extensão final	72°C	00:05:00	1

Tabela 11 – Sequência de *primers* utilizados na amplificação parcial do gene que codifica a proteína GroEL para identificação de bactérias do gênero *Ehrlichia chaffensis* e *Anaplasma* spp. Segundo o código IUPAC, o Y nas sequências corresponde a uma pirimidina, podendo corresponder a uma timina (T) ou a uma citosina (C), o M corresponde a grupos amino em posição comum, podendo corresponder a uma adenina (A) ou a uma citosina (C), o W corresponde a ligações de hidrogênio fracas, podendo corresponder a uma adenina (A) ou a uma timina (T) e o R corresponde a uma purina, podendo corresponder a uma adenina (A) ou a uma guanina (G).

	Primer	Sequência	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
1ºPCR	HS1	TGGGCTGGTAMTGAAAT	1350
	HS6	CCICCIIGGIACIAYACCTTC	
2ºPCR	HS43	ATWGCWAARGAAGCAT	528
	HS45	ACTTCACGYTTCATAGAC	

Tabela 12 – Condições de reação de PCR na amplificação parcial do gene que codifica a proteína GroEL no 1º PCR.

Fase de Amplificação	Temperatura	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	00:05:00	1
Desnaturação	94°C	00:01:00	3
Hibridação dos <i>primers</i>	48°C	00:00:30	
Extensão	72°C	00:01:00	
Desnaturação	95°C	00:00:30	37
Hibridação dos <i>primers</i>	52°C	00:01:00	
Extensão	72°C	00:01:30	
Extensão final	72°C	00:05:00	1

Tabela 13 – Condições de reação de PCR na amplificação parcial do gene que codifica a proteína GroEL no 2º PCR.

Fase de Amplificação	Temperatura	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	00:05:00	1
Desnaturação	94°C	00:01:00	3
Hibridação dos <i>primers</i>	50°C	00:00:30	
Extensão	72°C	00:00:30	
Desnaturação	95°C	00:01:00	37
Hibridação dos <i>primers</i>	55°C	00:00:30	
Extensão	72°C	00:00:30	
Extensão final	72°C	00:05:00	1

Tabela 14 – Sequência de *primers* utilizados na amplificação parcial do gene *16S rRNA* para identificação de bactérias do gênero *Ehrlichia canis*.

	Primer	Sequência	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
1ºPCR	ECC	AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC	478
	ECB	CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA	
2ºPCR	HE3	TATAGGTACCGTCATTATCTTGGGTAT	389
	ECAN5	CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA	

Tabela 15 – Condições de reação de PCR na amplificação parcial do gene *16S rRNA* no 1º PCR.

Fase de Amplificação	Temperatura	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94°C	00:03:00	1
Desnaturação	94°C	00:01:00	40
Hibridação dos <i>primers</i>	45°C	00:02:30	
Extensão	72°C	00:00:30	
Extensão final	72°C	00:05:00	1

Tabela 16 – Condições de reação de PCR na amplificação parcial do gene *16S rRNA* no 2º PCR

Fase de Amplificação	Temperatura	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94°C	00:03:00	1
Desnaturação	94°C	00:01:00	40
Hibridação dos <i>primers</i>	55°C	00:02:00	
Extensão	72°C	00:00:15	
Extensão final	72°C	00:05:00	1

5.2 Amplificação de DNA de *Bartonella* spp.

Para a amplificação de DNA da bactéria *Bartonella* spp. foi realizado um protocolo de PCR convencional com a utilização de *primers* desenhados para reconhecer segmentos do gene *ITS*.

Tabela 17 – Sequência de primers utilizados na amplificação parcial do gene *ITS* para identificação de bactérias do gênero *Bartonella*.

Primer	Sequência	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
Bspp 325s	CTTCAGATGATGATCCCAAGCCTTCTGGCG	500-800
Bspp 1100as	GAACCGACGACCCCCTGCTTGCAAAGCA	

Tabela 18 – Condições de reação de PCR na amplificação parcial do gene *ITS*.

Fase de Amplificação	Temperatura	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	00:05:00	1
Desnaturação	95°C	00:00:15	55
Hibridação dos <i>primers</i>	66°C	00:00:30	
Extensão	72°C	00:07:00	
Extensão final	25°C	00:05:00	1

5.3 Amplificação de DNA de *Borrelia* spp.

Para a amplificação de DNA de *Borrelia* spp. foi realizado um protocolo de PCR *nested* com a utilização de *primers* desenhados para reconhecer segmentos do gene *flaB*.

Tabela 19 – Sequência de *primers* utilizados na amplificação parcial do gene *flaB* para identificação de bactérias do gênero *Borrelia*.

	Primer	Sequência	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
1ºPCR	132f	TGGTATGGGAGTTTCTGG	774
	905r	TCTGTCATTGTAGCATCTTT	
2ºPCR	220f	CAGACAACAGAGGGAAAT	604
	823r	TCAAGTCTATTTTGGAAAGCACC	

Tabela 20 – Condições de reação de PCR na amplificação parcial do gene *flaB* no 1º PCR.

Fase de Amplificação	Temperatura	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	00:05:00	1
Desnaturação	95°C	00:00:30	35
Hibridação dos <i>primers</i>	59°C	00:00:30	
Extensão	72°C	00:01:00	
Extensão final	72°C	00:05:00	1

Tabela 21 – Condições de reação de PCR na amplificação do gene *flaB* no 2ºPCR

Fase de Amplificação	Temperatura	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	00:05:00	1
Desnaturação	95°C	00:00:30	35
Hibridação dos <i>primers</i>	59°C	00:00:30	
Extensão	72°C	00:01:00	
Extensão final	72°C	00:05:00	1

5.4 Amplificação de DNA de *Babesia/Theileria* spp.

Para a amplificação de DNA de *Babesia/Theileria* spp. foi realizado um protocolo de PCR convencional com a utilização de *primers* desenhados para reconhecer segmentos do gene *18S rDNA*.

Tabela 22 – Sequência de *primers* utilizados na amplificação parcial do gene *18S rDNA* para identificação de protozoários do género *Babesia/Theileria* spp.

Primer	Sequência	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
Piro -A	AATACCCAATCCTGACACAGGG	408
Piro - B	TTAAATACGAATGCCCCCAAC	

Tabela 23 – Condições de reação de PCR na amplificação parcial do gene *18S rDNA*.

Fase de Amplificação	Temperatura	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	00:04:00	1
Desnaturação	95°C	00:00:30	35
Hibridação dos <i>primers</i>	64°C	00:00:30	
Extensão	72°C	00:00:30	
Extensão final	72°C	00:07:00	1

5.5 Amplificação de DNA de *Hepatozoon* spp.

Para a amplificação de DNA do agente patogénico protozoário do género *Hepatozoon* foi realizado um protocolo de PCR convencional com a utilização de primers desenhados para reconhecer segmentos do gene 18S rRNA.

Tabela 24 – Sequência de *primers* utilizados na amplificação parcial do gene 18S rRNA para identificação de protozoários do género *Hepatozoon*.

Primer	Sequência	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
HEP-F	ATACATGAGCAAAATCTCAAC	626-666
HEP-R	CTTATTATTCCATGCTGCAG	

Tabela 25 – Condições de reação de PCR na amplificação parcial do gene 18S rRNA.

Fase de Amplificação	Temperatura	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	00:05:00	1
Desnaturação	95°C	00:00:30	35
Hibridação dos <i>primers</i>	57°C	00:00:30	
Extensão	72°C	00:01:30	
Extensão final	72°C	00:05:00	1

5.6 Amplificação de DNA de *Leishmania* spp.

Para a amplificação de DNA de *Leishmania* spp. foi realizado um protocolo de PCR convencional com a utilização de primers desenhados para reconhecer segmentos da *região do minicírculo do kDNA*.

Tabela 26 – Sequência de *primers* utilizados na amplificação parcial da *região do minicírculo do kDNA* para identificação de protozoários do gênero *Leishmania*.

Primer	Sequência	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
MC1	GTTAGCCGSTGGTGGTCTTG	447
MC2	CACCCATTTTCCGATTTTG	

Tabela 27 – Condições de reação de PCR na amplificação parcial da *região do minicírculo do kDNA*.

Fase de Amplificação	Temperatura	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	00:07:00	1
Desnaturação	95°C	00:00:30	30
Hibridação dos <i>primers</i>	60°C	00:00:30	
Extensão	72°C	00:00:30	
Extensão final	72°C	00:07:00	1

5.7 Amplificação de DNA de *Rickettsia* spp.

Para a amplificação de DNA de *Rickettsia* spp. foram realizados dois protocolos de PCR convencional com a utilização de *primers* desenhados para reconhecer segmentos do gene *ompB* e do gene *ompA*.

Tabela 28 – Sequência de *primers* utilizados na amplificação parcial do gene *ompB* para identificação de bactérias do gênero *Rickettsia*.

Primer	Sequência	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
120-M59	CCGCAGGGTTGGTAACTGC	833
120-807	CCTTTTAGATTACCGCCTAA	

Tabela 29 – Condições de reação de PCR na amplificação parcial do gene *ompB*

Fase de Amplificação	Temperatura	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	00:05:00	1
Desnaturação	95°C	00:00:30	35
Hibridação dos <i>primers</i>	57°C	00:00:30	
Extensão	72°C	00:01:30	
Extensão final	72°C	00:05:00	1

Tabela 30 – Sequência de *primers* utilizados na amplificação do gene *ompA* para identificação de bactérias do gênero *Rickettsia*.

Primer	Sequência	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
Rel90-70p	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	532
Rel90-602n	AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT	

Tabela 31 – Condições de reação de PCR na amplificação do gene *ompA*

Fase de Amplificação	Temperatura	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	00:05:00	1
Desnaturação	95°C	00:00:20	35
Hibridação dos <i>primers</i>	48°C	00:00:30	
Extensão	60°C	00:02:00	
Extensão final	72°C	00:05:00	1

6. Amplificação de segmentos citocromo c oxidase (COX)

Para amplificação dos segmentos do gene citocromo c oxidase subunidades 1 e 2, terá sido usado o mesmo processo de PCR convencional utilizado para amplificação de DNA de agentes infecciosos. Para amplificação do DNA das carraças e dos piolhos foram utilizados *primers* desenhados para reconhecer segmentos do gene *COX-I* e para amplificação do DNA das pulgas foram usados *primers* para reconhecer segmentos do gene *COX-II*.

Tabela 32 – Sequência de *primers* utilizados na amplificação parcial do gene *COX-I*.

Primer	Sequência	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	700
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	

Tabela 33 – Condições de reação de PCR na amplificação parcial do gene *COX-I*.

Fase de Amplificação	Temperatura	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	00:01:00	1
Desnaturação	94°C	00:01:00	5
Hibridação dos <i>primers</i>	45°C	00:01:30	
Extensão	72°C	00:01:30	
Desnaturação	94°C	00:01:30	35
Hibridação dos <i>primers</i>	50°C	00:01:30	
Extensão	72°C	00:01:00	
Extensão final	72°C	00:05:00	1

Tabela 34 – Sequência de *primers* utilizados na amplificação parcial do gene *COX-II*

Primer	Sequência	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
F-Leu	TCTAATATGGCAGATTAGTGC	780
R-Lys	GAGACCAGTACTTGCTTTCAGTCA TC	

Tabela 35 – Condições de reação de PCR na amplificação do gene *COX-II*

Fase de Amplificação	Temperatura	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	00:02:00	1
Desnaturação	94°C	00:00:15	55
Hibridação dos primers	66°C	00:00:15	
Extensão	72°C	00:00:15	
Extensão final	72°C	00:01:00	

7. Visualização dos produtos de PCR amplificados

Os produtos resultantes de cada protocolo de PCR foram visualizados em gel de agarose a 2,0% (m/v). Para a preparação do gel de agarose, pesou-se 4 g de agarose (Fisher bioreagents® Agarose) num erlenmeyer (terá sido usado um de 500 mL para melhor acomodar o preparado) e adicionou-se 200 mL de tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 1x ou 200 mL de tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1x. A mistura foi aquecida no micro-ondas para homogeneização da mistura até o preparado ficar translúcido. Devido à natureza volátil do corante, antes de acrescentar e misturar o GelRed® Nucleic Acid Stain (Biotium) à mistura, deve-se arrefecer o exterior do *Erlenmeyer* com água corrente e agitar até ser possível agarrar o fundo do *erlenmeyer* com a mão confortavelmente. É despejada, de seguida, a solução para um molde com o pente, com a atenção de não criar bolhas, e deixando polimerizar à temperatura ambiente ou no a 8 °C (frigorífico).

Seguidamente, o gel foi colocado na tina de electroforese (*Biometra Compact Multi-Wide, analytik jenaTM*) com o tampão de electroforese TBE 1x ou TAE 1x. Aplicaram-se 8 µL do produto de PCR de cada amostra diretamente em cada poço e, no primeiro poço de cada pente, 5 µL do marcador de 100 pb *NZYDNA Ladder V®* (NZYtech) para determinação dos pesos moleculares dos produtos de amplificação. O gel foi submetido a uma corrente elétrica contínua de 80V durante 1h30 a 2h utilizando o equipamento do *Biometra PS 300TP power supply (analytik jenaTM)*. Os resultados foram visualizados com o auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta (*GelDoc Go Gel Imaging System, Bio-Rad®*).

8. Purificação e sequenciação dos produtos de PCR amplificados

As amostras de PCR positivas previamente visualizadas no gel após electroforese foram submetidas a um processo de purificação. Os fragmentos de interesse (tamanho esperado tendo em conta o controlo positivo) foram excisados do gel com o auxílio de um bisturi de lâminas descartáveis - uma lâmina por banda de forma a evitar contaminações entre amostras.

Foi utilizado o *Kit innuPREP PCRpure (Innuscreen GmbH)* para a maioria das amostras e o *Kit Speedy NZY ExoSAP Mix (NZYtech)* para amostras positivas mais fracas/com amplificação pouco intenso (Figura 6).



Figura 6 - Exemplo do que se considerou uma banda fraca (esquerda no retângulo amarelo) e uma banda forte (direita no retângulo amarelo). Original da autora.

Protocolo *InnuPREP PCRpure Kit (Innuscreen GmbH) modificado*

1. Misturaram-se 200 μ L de *Binding buffer* com 200 μ L da amostra de PCR, pipetando para cima e para baixo ou através do vórtex, num *receiver tube*.
2. Após um *short spin*, transferiu-se a mistura para um *Spin Filter*
3. Centrifugou-se por 3 minutos a 11.000 rpm e, de seguida, descartou-se o *receiver tube*.
4. Colocou-se o *Spin Filter* num tubo de eluição.
5. Foram pipetados, no mínimo, 12 μ L de *buffer de eluição diretamente* para o centro do *spin filter*.
6. Incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente.
7. Centrifugou-se por 2 minutos a 11.000 rpm.
8. Foram adicionados 5 μ L do primer FW. Centrifugou-se e transferiu-se a mistura para os tubos de sequenciação (*STAB vida tubes*).

Protocolo *Speedy NZY ExoSAP Mix (NZYtech)*

1. Retirou-se o *Speedy NZY ExoSAP Mix* do congelador e manteve-se em gelo durante o procedimento.
2. Misturaram-se 6 μ L da amostra de PCR com 1 μ L de *Speedy NZY ExoSAP Mix*.
3. Centrifugou-se minuciosamente de forma a levar a mistura para o fundo do tubo.
4. Incubou-se a reação num termociclador de acordo com o protocolo seguinte:
 1. 37 °C por 2 minutos;
 2. 80 °C por 1 minuto;
 3. Manter a 4 °C e transferir as amostras para gelo.

5. Centrifugou-se e adicionou-se 5 µL do primer FW a cada amostra/cada gene. Voltou a centrifugar-se e a mistura foi adicionada ao tubo de sequenciação (*STAB vida tubes*).

Os produtos purificados foram, posteriormente, enviados para o laboratório STABVida para sequenciação pelo método de Sanger *et al.* (1977).

As sequências e os cromatogramas gerados pela STABVida foram acedidos e, de seguida, foram analisados e editados com a ajuda do programa informático *BioEdit Sequence Alignment Editor*® versão 7.7.1 (Hall, 2021).

Prosseguiu-se, para cada fragmento amplificado, com a identificação das semelhanças e diferenças entre as sequências de nucleótidos e as de referência presentes em repositórios públicos, nomeadamente, no servidor do *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) utilizando os algoritmos *BLASTn* (disponível em https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch) para análise de nucleótidos e o *BLASTx* (disponível em https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastn) para a tradução de proteínas. Esta análise permitiu a criação de uma base de dados composta por sequências de DNA encontrados em várias partes do mundo e em várias espécies de mamíferos, mas especialmente em cães no continente africano para este estudo e, posteriormente, inferir ligações evolutivas entre sequências homólogas a partir do alinhamento de nucleótidos gerados pelo algoritmo *MAFFTv7* (disponível em <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>). Estas sequências foram, de seguida, editadas via *G-Blocks* (disponível em http://phylogeny.lirmm.fr/phylo.cgi/one_task.cgi?task_type=gblocks). Prosseguiu-se com a construção de árvores filogenéticas com base no critério de máxima verossimilhança (ML), selecionando os modelos evolutivos de substituição sugeridos através do Critério de Informação Bayesiano (BIC) que melhor explica a variabilidade genética encontrada entre as várias sequências, para cada conjunto de sequências em análise. Foram definidos como critérios de aceitação e de robustez topológica das árvores obtidas, valores de *bootstrap* iguais ou superiores a 75,0%.

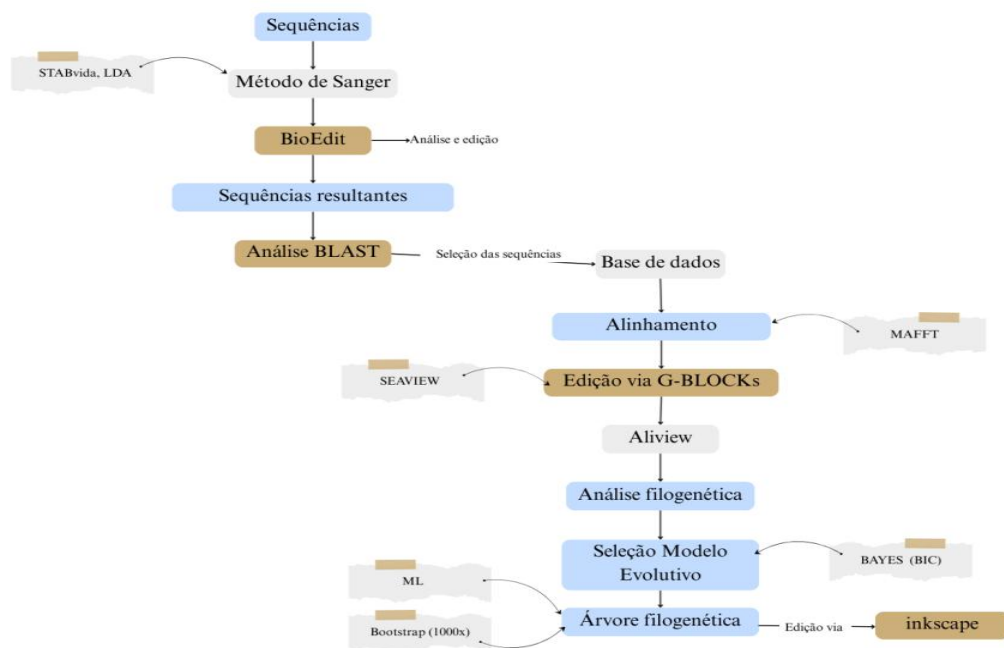


Figura 7 - Fluxograma do procedimento de inferência filogenética para criação das árvores filogenéticas.

III – Resultados

1. Caracterização da amostra

A população estudada compreendeu um total de 20 cães errantes, dos quais 10 (50,0%) eram machos - sendo 7 adultos (idade superior a 1 ano) e 2 sêniores (idade superior a 10 anos) - e 10 (50,0%) eram fêmeas, sendo 4 jovens (idade inferior a 1 ano) e 7 adultas (Figura 8). Quanto ao porte dos animais, dois (10,0%) cães apresentavam porte pequeno (peso inferior a 10 kg) e os restantes 18 cães apresentavam porte médio (peso inferior a 26 kg). A amostragem não compreendeu nenhum cão de porte grande (>26 kg). Relativamente ao tipo de pêlo, todos apresentavam pêlo liso, sendo 7 (28,6%) de pêlo comprido e 13 (71,4%) de pêlo curto. No que se refere ao padrão da pelagem, 11 (70,0%) apresentavam um padrão de cor uniforme (foram detectadas várias colorações), 3 (15,0%) um padrão bicolor, 2 (10,0%) malhados e 1 (5,0%) tigrado. As características da população de cães estudada (sexo, idade, porte e tipo de pelagem) podem ser observadas na Figura 8.



Figura 8 - Representação esquemática da população estudada (n=20; 10 machos e 10 fêmeas) de acordo com sexo, idade, porte e tipo de pêlo.

2. Presença de Ectoparasitas

Dos 20 cães analisados, 80,0% (16/20) revelaram presença de ectoparasitas. Nestes 16 animais foram recolhidos um total de 47 exemplares de ectoparasitas, que, posteriormente,

terão sido submetidos a um registo fotográfico e a um de dois métodos de extração de DNA - corte ou maceração.



Figura 9 - Percentagem de ectoparasitas sujeitos aos métodos de corte e de maceração para extração de DNA.

Destes 48 ectoparasitas, 38 (74,5%) foram identificados como carraças do género *Rhipicephalus* spp. (Figura 10), cinco a pulgas, maioritariamente da espécie *Ctenocephalides felis* (4/47; 7,8%) (Figura 11), mas também um exemplar de *Echidnophaga gallinacea* (1/47; 2,0%) (Figura 12), e quatro piolhos da espécie *Heterodoxus spiniger* (4/47; 7,8%) (Figura 13). Estes resultados resumem a análise morfológica e molecular que se descreve em baixo.

2.1. Análise morfológica dos ectoparasitas

A identificação da espécie baseou-se, primeiramente, na análise morfológica dos ectoparasitas e foi realizada através de chaves taxonómicas (Knott *et al.*, 2015) e pela análise das imagens após o registo fotográfico dos ectoparasitas com o equipamento *NannoZoomer Digital Slides Scanner*®.

2.1.1. Carraças

Todas as 38 carraças observadas foram classificadas como *Rhipicephalus sanguineus* pois, de acordo com a chave dicotómica para carraças de Knott, *et al.*, 2015 (Figuras 10 e D1), apresentaram:

- Coxa I bífida;

- Sulco anal posterior;
- Aparelho bucal e palpos curtos, comparativamente à base do capítulo;
- Olhos mas pouco desenvolvidos;
- Festões em carraças não ingurgitadas.

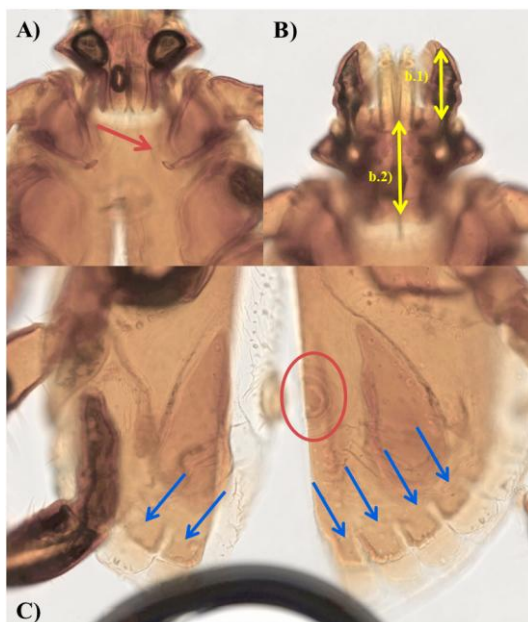


Figura 10 - Características morfológicas de um exemplar de carraça macho da espécie *Rhipicephalus sanguineus* (x100). A) Coxa I bífida assinalada com seta vermelha; B) Tamanho dos palpos (b1) inferior ao tamanho da base do capítulo (b2); C) Sulco anal posterior marcado com círculo vermelho e *festoons* assinalados com setas azuis. Original da autora.

Os machos ($n=26$) e as fêmeas ($n=10$) foram diferenciados através das diferenças estruturais das seguintes características (CEVS, 2018):

- Do espinho da coxa IV (o do macho é maior que o da fêmea);
- Presença de três sulcos na porção posterior do escudo nos machos;
- Presença de duas placas adanais internas desenvolvidas posteriormente e duas placas externas rudimentares, nos machos;
- Tamanho do escudo (nos machos, cobre toda a extensão do dorso; enquanto que nas fêmeas cobre apenas a parte frontal do corpo, permitindo o aumento do tamanho e expansão do abdómen aquando da alimentação de sangue - aspecto ingurgitado).

2.1.2. Pulgas

Quatro das pulgas observadas foram classificadas como *Ctenocephalides felis*, as mais frequentes em cães, pois, de acordo com a chave dicotômica para pulgas de Knott, *et al.*, 2015 (Figuras 11 e D2), apresentaram:

- Ctenídeo pronotal e Ctenídeo genal;
- Ctenídeo genal horizontal com oito ou nove espinhos;
- Cabeça alongada anteriormente (a da fêmea é duas vezes mais longa que alta, enquanto que a do macho é tão longa como alta); os dois primeiros espinhos do ctenídeo genal de comprimento semelhante; margem dorsal da tíbia posterior com seis entalhes com cerdas robustas.

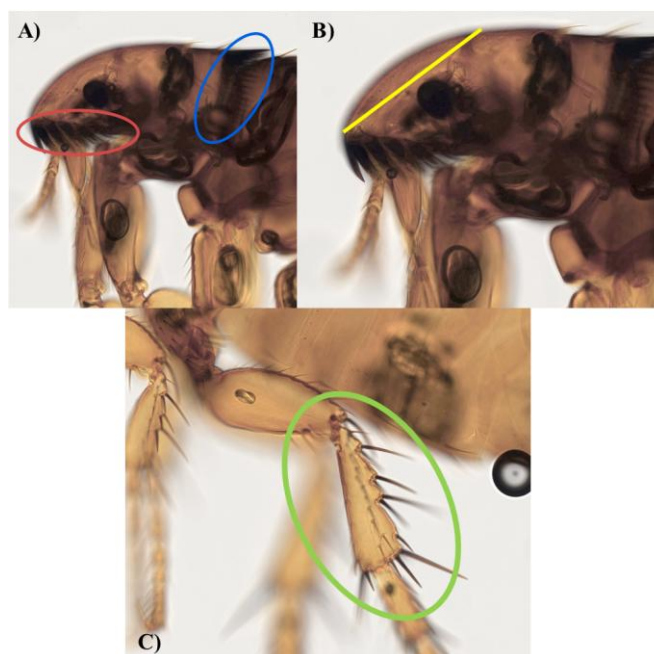


Figura 11 - Características morfológicas de um exemplar de pulga fêmea da espécie *Ctenocephalides felis* (x100). A) Ctenídeo genal horizontal com 8-9 espinhos (círculo vermelho) e ctenídeo pronotal (círculo azul); B) Cabeça alongada anteriormente; C) Margem dorsal da tíbia posterior com seis entalhes com cerdas robustas (círculo verde). Imagem original da autora.

A quinta pulga observada foi classificada como *Echidnophaga gallinacea* pois, de acordo com a chave dicotômica para pulgas de Knott, *et al.*, 2015 (Figuras 12 e D2), apresentou:

- Ctenídeos ausentes;
- Tórax reduzido (o conjunto dos três segmentos torácicos é mais curto em largura que o primeiro segmento abdominal); duas cerdas na cabeça atrás da antena.

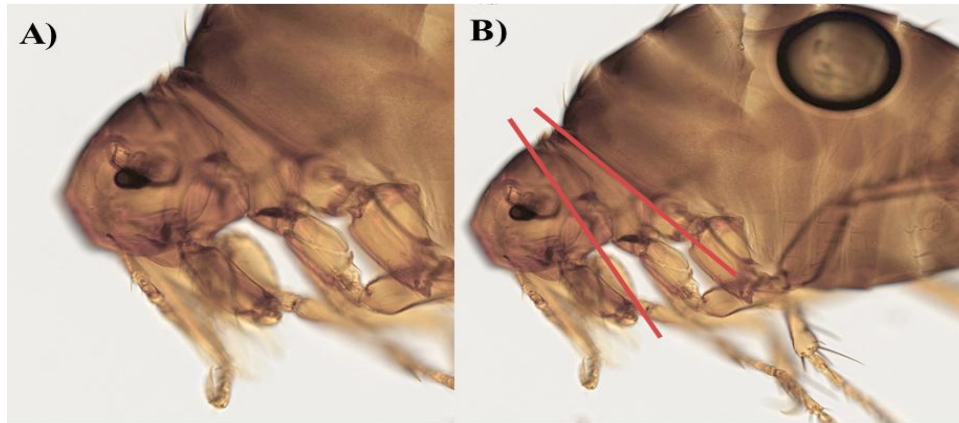


Figura 12 - Características morfológicas de um exemplar de pulga fêmea da espécie *Echidnophaga gallinacea* (x100). A) Cabeça com ctenídeos ausentes. B) Tórax reduzido delimitado por duas linhas vermelhas. Imagem original da autora.

As pulgas, todas fêmeas em ambas as espécies, foram sexadas através das superfícies ventral e dorsal serem arredondadas e através da presença de espermateca (Wall & Shearer, 1997).

2.1.3. Piolhos

Todo os piolhos amostrados ($n=4$) foram classificados como *Heterodoxus spiniger* pois, de acordo com a chave dicotômica para piolhos de Knott, *et al.*, 2015 (Figuras 13 e D3), apresentaram:

- Cabeça larga com a frente geralmente arredondada ou triangular;
- Antenas com quatro segmentos e escondidas em sulcos antenais;
- Encontrados em mamíferos;
- Encontrados em cães.

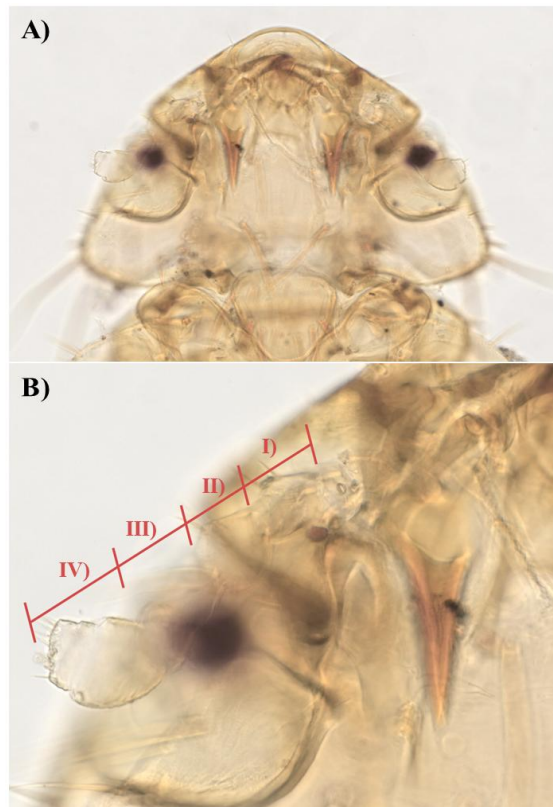


Figura 13 - Características morfológicas de um exemplar de piolho da espécie *Heterodoxus spiniger* (x100). A) Cabeça larga e triangular; B) Antenas com 4 segmentos [I, II, III, IV)] e escondidas em sulcos antenais. Imagem original da autora.

Piolhos, como o caso do *Heterodoxus spiniger*, não apresentam dimorfismo sexual, pelo que é impossível distinguir as fêmeas dos machos apenas pelas características morfológicas.

Todas as fotografias foram obtidas a partir dos exemplares amostrados no âmbito deste estudo e durante o estudo desenvolvido pela estudante, autora deste estágio.

2.2. Análise molecular dos ectoparasitas com base em marcadores genéticos – genes COX-I e COX-II

Foram obtidas sequências para 7 amostras de carraças (de um total de 38), 1 amostra de piolho (de um total de 4) e 2 amostras de pulgas (de um total de 5) utilizando o gene COX-I para as carraças e o piolho e utilizando o gene COX 2 para as pulgas. Com a utilização da ferramenta bioinformática *BLASTn*, foi possível atribuir a espécie a quase todos os vectores (Tabela 36).

Tabela 36 - Resultado da análise molecular de ectoparasitas com base na sequência dos genes COX-I e COX-II.

ID	Vector	Subunidade de Cox	Resultado BLASTn	% de identidade
TC1 5.1	Carraça	COX-I	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	99.84
TC1 5.2	Carraça	COX-I	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	99.83
TC1 14.1	Carraça	COX-I	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	99.84
TC1 14.2	Carraça	COX-I	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	99.84
TC1 18.1	Carraça	COX-I	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	99.83
TC1 18.2	Carraça	COX-I	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	99.82
TC1 19.1	Carraça	COX-I	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	100
LC1 6.6	Piolho	COX-I	Inviável	-
FC2 5.2	Pulga	COX-II	<i>Ctenocephalides felis felis</i>	94
FC2 15.3	Pulga	COX-II	Inviável	-

A identificação até à espécie foi confirmada por meio do DNA *barcoding* com os genes COX-I e COX-II. Esta identificação confirma a identificação realizada com as chaves dicotômicas.

3. Análise molecular e filogenética dos agentes infecciosos

3.1. Identificação Molecular de agentes patogénicos ao nível da espécie

Pela técnica de PCR para amplificação de genes bacterianos foi possível detectar, em ectoparasitas, a amplificação positiva (banda visível no gel de electroforese para o tamanho esperado e de acordo com o controlo positivo) e presença de:

Ehrlichia/Anaplasma spp. em 14 (36,8%) amostras de carraça por amplificação do gene *16S rDNA* (GEP curto), em 3 (7,9%) amostras de carraça utilizando o gene *16S rDNA* (GEP longo), em 5 (13,1%) amostras de carraça utilizando o gene *16S rRNA* e em 9 (25,0%) amostras de carraças para o gene *GroEL*.

Borrelia spp. foi detectada em 2 (5,3%) amostras de carraça utilizando o gene *flaB*, *Babesia/Theileria* spp. em 6 (15,8%) amostras de carraça utilizando o gene *18S rDNA* e *Hepatozoon* spp. em 16 (42,1%) amostras de carraça utilizando o gene *18S rRNA*.

Rickettsia spp. foi detectada em 5 (100,0%) amostras de pulga por amplificação do gene *omp-B*; por amplificação do gene *omp-A*, não foi detectada *Rickettsia* spp. em nenhuma amostra de carraça nem de pulga. Adicionalmente, não foi detectada *Bartonella* spp. em nenhuma amostra de pulga utilizando o gene *ITS*.

Subsequentemente a esta análise inicial, sequenciaram-se as amostras de PCR positivas (amostras com agentes patogénicos detectados), de forma a identificar as espécies por análise das sequências.

Sumariamente, foi possível identificar a bactéria *Ehrlichia canis* em 2 (40,0%) amostras de carraça, o protozoário *Hepatozoon canis* em 13 (81,2%) amostras de carraça e a bactéria *Rickettsia asembonensis* em 5 (100,0%) amostras de pulga.

Tabela 37 - Resultado da análise molecular de agentes patogénicos no DNA de vectores. Resultados inviáveis correspondem às sequências cuja amplificação do PCR não foi suficiente, a sequências com PCR não optimizado (com amplificação inespecíficas), entre outros, e que não foi possível obter um resultado preciso por sequenciação.

Resultado da amplificação do PCR	Resultado da sequenciação
14 (36,84%) amostras de carraças positivas para <i>Anaplasma/Ehrlichia</i> spp. por amplificação do gene <i>16S rDNA</i> (GEP curto)	Resultados inviáveis
3 (7,89%) amostras de carraças positivas para <i>Anaplasma/Ehrlichia</i> spp. por amplificação do gene <i>16S rDNA</i> (GEP longo)	Resultados inviáveis
5 (13,15%) amostras de carraças positivas para <i>Anaplasma/Ehrlichia</i> spp. por amplificação do gene <i>16S rRNA</i>	2 amostras compatíveis para <i>Ehrlichia canis</i>
9 (25,00%) amostras de carraças positivas para <i>Anaplasma/Ehrlichia</i> spp. por amplificação do gene <i>GroEL</i>	Resultados inviáveis
2 (5,26%) amostras de carraças positivas para <i>Borrelia</i> spp. por amplificação do gene <i>flaB</i>	Resultados inviáveis
6 (15,79%) amostras carraça positivas para <i>Babesia/Theileria</i> spp. por amplificação do gene <i>18S rDNA</i>	Resultados inviáveis
16 (42,10%) amostras de carraças positivas para <i>Hepatozoon</i> spp. por amplificação do gene <i>18S SSU rRNA</i>	13 amostras compatíveis com <i>Hepatozoon canis</i>
5 (100%) amostras de pulgas positivas para <i>Rickettsia</i> spp. por amplificação do gene <i>omp-B</i>	5 amostras compatíveis para <i>Rickettsia asembonensis</i>

4. Presença de agentes patogénicos em esfregaços sanguíneos

Dos esfregaços sanguíneos realizados a partir do sangue recolhido em animais errantes foi possível pesquisar a infecção de células sanguíneas para algum sinal de infeção.

Com auxílio do microscópio óptico, foram observadas 9 amostras compatíveis com *Hepatozoon canis* (45,0%), 4 amostras compatíveis com *Ehrlichia/Anaplasma* spp. (20,0%), 1 amostra compatível com *Hepatozoon canis* e *Ehrlichia/Anaplasma* spp. (5,0%). Seis amostras revelaram-se negativas, ou seja, não foi possível, com este método, detectar nenhum agente patogénico (30,0%).

Resultados do Esfregaço Sanguíneo

- *Ehrlichia/Anaplasma* + *Hepatozoon* spp.
- *Hepatozoon* spp.
- *Ehrlichia/Anaplasma* spp.
- Negativo

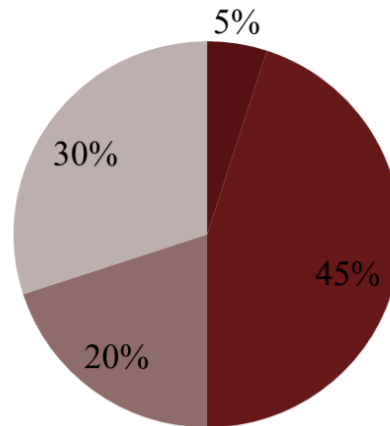


Figura 14 - Resultados da pesquisa de agentes infecciosos no esfregaço sanguíneo de uma população de 20 cães párias de Cabo Verde.

5. Análise molecular de agentes patogénicos presentes no sangue dos cães

A análise do DNA extraído das amostras de sangue dos 20 cães revelou resultados positivos para *Anaplasma* spp. em 9 (45,0%) indivíduos pelo locus 16S rDNA, para *Borrelia* spp. em 1 (0,05%) indivíduo pelo locus *flaB* e para *Hepatozoon* spp. em 16 (80,0%) pelo locus 18S rRNA.

Não foi possível detectar a presença de *Rickettsia* spp., *Leishmania* spp., *Babesia* spp. ou *Bartonella* spp. em nenhuma das amostras sanguíneas de cães por análise molecular.

A subsequente a análise *BLAST* é sugestiva de *Hepatozoon canis* em 13 amostras e *Borrelia bavariensis* em 1 amostra. Estes resultados, com a comparação com os resultados da análise molecular dos agentes patogénicos presentes no DNA dos vectores, permitem concluir que 5 cães com *H. canis* presente no seu sangue apresentavam, igualmente, carraças com *H. canis*.

Estes agentes foram confirmados por análise filogenética descrita no ponto seguinte.

6. Árvores filogenéticas

A análise filogenética realizada com base no método de maior verossimilhança (ML, do inglês *maximum likelihood*) permitiu a construção de árvores filogenéticas para os géneros

bacterianos *Borrelia* e *Rickettsia* e protozoário *Hepatozoon*, utilizando sequências dos genes *16S rRNA*, *flaB*, *omp-B* e *18S rRNA*, respectivamente.

O alvo amplificado de *Ehrlichia* spp. (*16S rDNA*) não tem sinal filogenético suficiente para inferir relações filogenéticas que permitam a classificação não ambígua ao nível da espécie, pelo que não foi realizada árvore filogenética para este agente.

Borrelia spp.

Nesta análise foi incluída a única sequência obtida no sangue de um dos cães (CREODOG10), com comprimento final de 604 pb e qualidade adequada para inferência filogenética. Esta sequência agrupou-se com isolados de *Borrelia bavariensis*, confirmando a sua identidade genética. Esta detecção representa a primeira identificação de *B. bavariensis* no arquipélago de Cabo Verde.



Figura 15 - Árvore filogenética de *Borrelia* spp. inferida pelo método de ML usando o método evolutivo TPM3u+F+G4 a partir de sequências parciais do gene *flaB*. As sequências obtidas neste trabalho surgem destacadas a negrito com uma seta vermelha. BB10 corresponde a uma sequência obtida na amostra de sangue do cão CREODOG10. Ver Tabela B1 em anexo.

Hepatozoon spp.

Das amostras obtidas, 24 sequências provenientes de carraças e de sangue de cão apresentaram qualidade suficiente (626-666 pb) para integração na análise, agrupando-se de forma consistente num grupo monofilético, com suporte estatístico máximo (*bootstrap* de 100%), sendo identificadas como *Hepatozoon canis*. Esta identificação representa a primeira detecção de *H. canis* em cães na ilha de São Vicente, Cabo Verde.

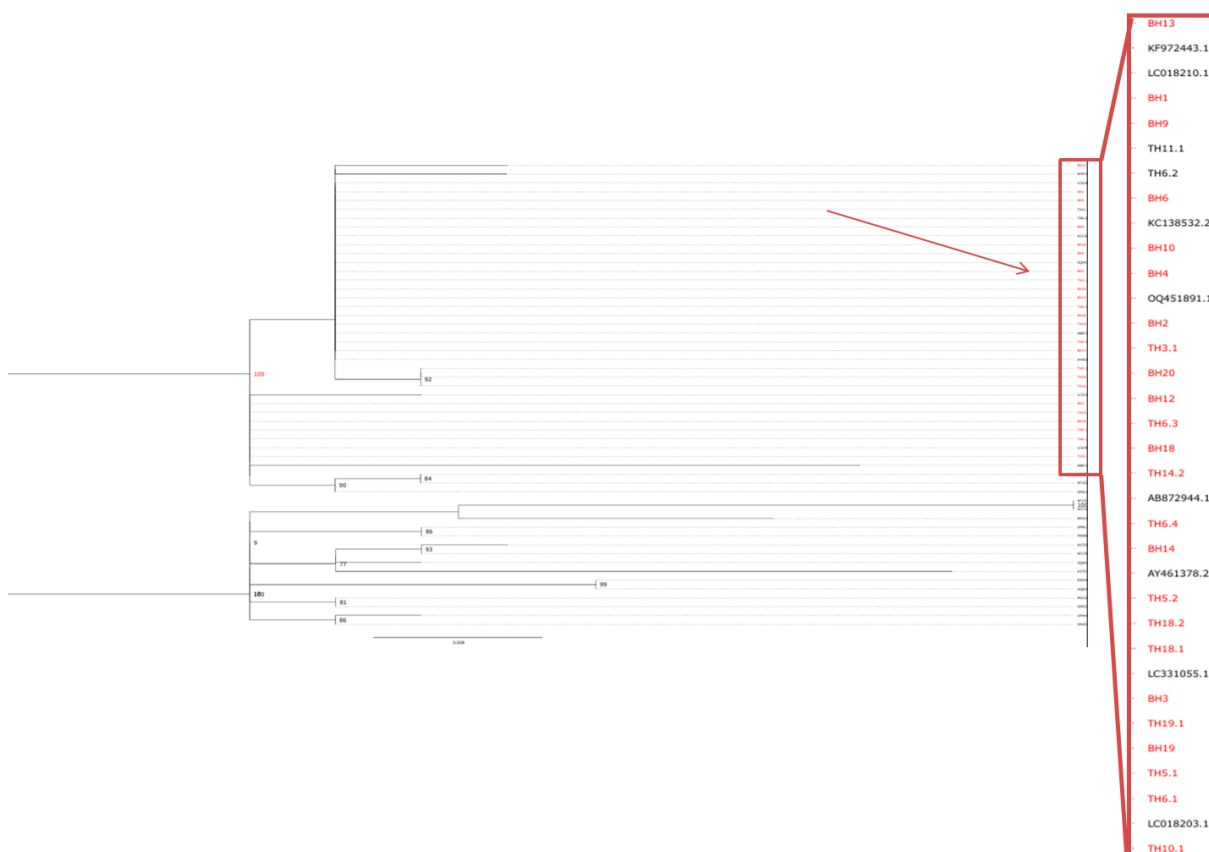


Figura 16 - Árvore filogenética da *Hepatozoon* spp. construída pelo método de ML usando como modelo evolutivo HKY+F, a partir de sequências parciais do gene *18S rRNA*. As sequências obtidas neste estudo, surgem destacadas a vermelho com uma seta vermelha (sangue de cão BHxxx e de carraça THxxx). Ver Tabela B1 em anexo.

Rickettsia spp.

Das amostras obtidas, quatro sequências provenientes de pulgas, de 3 cães distintos (CREODOG 1, 5 e 16, Tabela B1 em anexo)), apresentaram qualidade suficiente (833 pb) para integração na análise, agrupando-se de forma consistente num grupo monofilético, com suporte estatístico máximo (*bootstrap* de 100%), sendo identificadas como *Rickettsia asembonensis*. Esta identificação representa a primeira detecção de *R. asembonensis* em cães no arquipélago de Cabo Verde.



Figura 17 - Árvore filogenética da *Rickettsia* spp. construída pelo método de ML usando o método evolutivo TVM+F+G4 a partir de sequências parciais do gene *omp-B*. As sequências obtidas neste estudo, em pulgas, FR1-4, surgem a negrito destacadas com uma seta vermelha. Ver Tabela B1 em anexo.

7. Análise de co-infecções

Com a análise molecular dos agentes patogênicos presentes no sangue, nas carraças e nas pulgas (Tabela 38) foi possível concluir que:

- 14 (70,0%) amostras de sangue de cão não demonstraram quaisquer co-infecções; 5 (25,0%) amostras apresentavam co-infecções de *Anaplasma/Ehrlichia* spp. e *Hepatozoon* spp.; e 1 (5,0%) apresentava co-infecções de *Anaplasma/Ehrlichia* spp. *Borrelia* spp. e *Hepatozoon* spp.
- 23 (60,5%) amostras de carraças não demonstraram quaisquer co-infecções; 9 (23,7%) amostras apresentavam co-infecções de *Anaplasma/Ehrlichia* spp. e *Hepatozoon* spp.; 4 (10,5%) apresentavam co-infecções de *Anaplasma/Ehrlichia* spp., *Babesia/Theileria* spp. e *Hepatozoon* spp. e 2 (5,3%) apresentavam co-infecções de *Anaplasma/Ehrlichia* spp. e *Babesia/Theileria* spp.
- 5 (100,0%) amostras de pulgas não demonstraram quaisquer co-infecções;

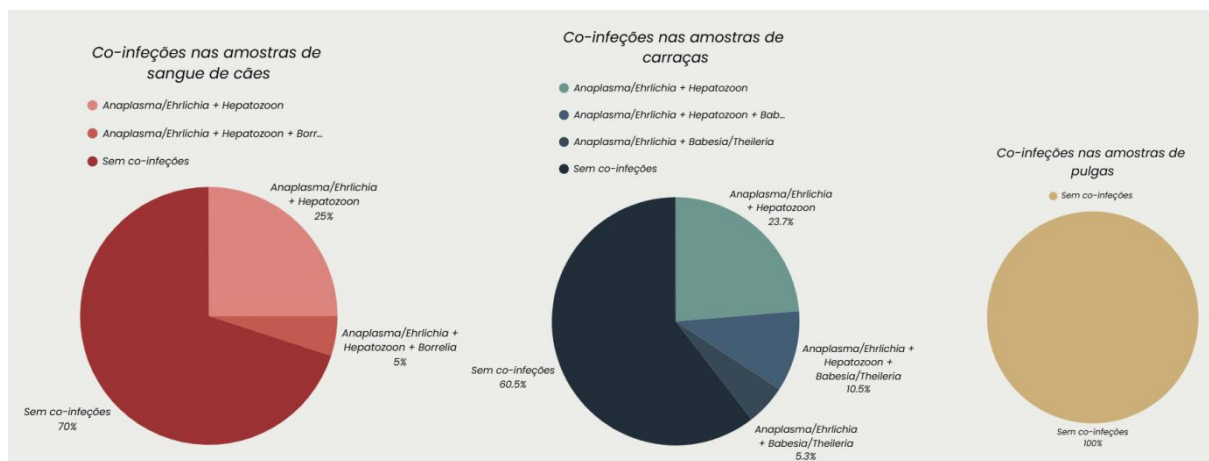


Figura 18 – Gráfico de co-infeções em amostras de sangue de cães, amostras de carraças e amostras de pulgas.

IV – Discussão

Estudos em Cabo Verde sobre doenças associadas a vectores estão, ainda, muito focados apenas em doenças transmitidas por mosquitos, doenças estas que constituem perigos elevados para a saúde humana. Doenças como o Dengue (que nos últimos anos tem afectado a ilha de São Vicente mais do que qualquer outra ilha do grupo de Barlavento), Malária, Chikungunya e a Zika são o principal foco de estudos de doenças transmitidas por vectores devido ao elevado risco para a saúde humana associado à elevada probabilidade do ser humano contrair a doença, ou à dificuldade de tratamento de doença ou pela gravidade dos sintomas. Não obstante, é importante ter noção de que doenças transmitidas por outros vectores (carraças, pulgas e piolhos, por exemplo) têm igual importância e risco zoonótico.

A presente investigação, sequente a um projeto da FMV - Universidade Lusófona-IMVET, constitui um contributo relevante para a caracterização morfológica e molecular de vectores e agentes infecciosos de uma população de cães errantes da cidade de Mindelo, ilha de São Vicente, Cabo Verde, de forma a fornecer mais informação relativamente a doenças transmitidas por vectores. Para tal, foi analisado o sangue de 20 cães e, dentre estes, foram colhidos 47 ectoparasitas artrópodes.

Ectoparasitas artrópodes, como carraças, pulgas e piolhos, não são novidade em Cabo Verde. Vários estudos relativos a populações de cães em Cabo Verde revelam que estes animais domésticos estão altamente parasitados, a ponto de se recomendar evitar o transporte de animais (especialmente cães) de Cabo Verde para a Europa (Duarte, 2013).

Espécies de carraças ixodidas como *Amblyomma variegatum*, *Margaropus decoloratus* e *Hyalomma* sp. já foram relatadas em diversos estudos e, mais recentemente, a espécie *Rhipicephalus sanguineus* foi adicionada à lista de espécies de carraças reportadas em Cabo Verde (Duarte, 2013; The Armed Forces Pest Management Board, 2021).

Relativamente a espécies de pulgas em Cabo Verde, destacam-se *Ctenocephalides felis*, *Pulex irritans*, *Echidnophaga gallinacea* e *Tunga penetrans*, espécies estas que podem infestar cães mesmo que estes não sejam os hospedeiros principais (Duarte, 2013).

Em Cabo Verde, todas as espécies de piolhos da ordem Anoplura que infestam humanos já foram reportadas no arquipélago, afetando toda a sociedade caboverdiana, mas com preferência a populações com condições higiénicas precárias ou de extrema pobreza (Duarte, 2013). Outras espécies, como o caso de *Heterodoxus spiniger*, uma espécie que afeta cães (relembrando que piolhos são específicos de cada espécie, ou seja, piolhos que afetam humanos não afetam cães e vice-versa), também podem ser encontrados em Cabo Verde, tendo *H. spiniger* já sido reportado em documentos de, pelo menos, 1963 (Eichler, 1963).

Os 47 ectoparasitas deste estudo foram identificados morfológicamente através de chaves dicotómicas (Knott et al., 2015), pelo que se detecaram, em cães errantes, 38 carraças da espécie *Rhipicephalus sanguineus*, 4 pulgas da espécie *Ctenocephalides felis*, 1 pulga da espécie *Echidnophaga gallinacea* e 4 piolhos da espécie *Heterodoxus spiniger*. A identificação até à espécie foi confirmada através do uso de genes COX-I e COX-II para DNA *barcoding*, que permitiu complementar e confirmar os achados previamente descobertos

através da abordagem morfológica. Esta identificação suporta a presença destes vectores já reportados em estudos prévios.

Relativamente aos agentes patogénicos transmitidos pelos vectores já identificados, este estudo verificou, genericamente, a presença de ácidos nucleicos de *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp., *Hepatozoon* spp., *Rickettsia* spp. e *Theileria* spp. em carraças da espécie *Rhipicephalus sanguineus*; *Rickettsia* spp. em pulgas da espécie *Ctenocephalides felis*; e *Anaplasma* spp., *Borrelia* spp. e *Hepatozoon* spp. no sangue dos cães. Dado serem específicos para cada espécie e dado não terem a capacidade de infectar, acidentalmente ou não, humanos, não foram pesquisados agentes patogénicos no DNA de piolhos *Heterodoxus spiniger*.

É importante referir que não há conhecimento se as carraças realizaram ou não uma refeição sanguínea anteriormente à sua recolha, pelo que não se pode afirmar que o que se detetou se reflete à infeção do vetor ou à infeção de sangue digerido

A utilização de métodos moleculares para identificação até ao nível da espécie demonstrou-se crucial para a detecção e diferenciação dos vectores (carraças, pulgas e piolhos) e, principalmente, de agentes patogénicos de difícil distinção, como *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp. ou *Babesia* spp. e *Theileria* spp., agentes que apresentam semelhanças morfológicas que dificultam a sua identificação em esfregaços sanguíneos. Desta forma, foi possível chegar à identificação de bactérias *Ehrlichia canis* (n=2) e protozoários *Hepatozoon canis* (n=13) em sequências de DNA de carraças; bactérias *Rickettsia asembonensis* (n=5) em sequências de DNA de pulgas; e *Hepatozoon canis* (n=13) e *Borrelia bavariensis* (n=1) no sangue de 14 cães.

Comparando os resultados da análise dos agentes patogénicos presentes no DNA das carraças e presentes no sangue dos cães, 5 cães apresentaram não só protozoários *Hepatozoon canis* no seu sangue como também carraças com *H. canis* no seu DNA.

Até à presente data, não existem outras evidências de *Rickettsia asembonensis* ou *Borrelia bavariensis* no arquipélago de Cabo Verde. A sua presença, no entanto, pode ser justificada pelo transporte de cães ou outros animais infestados por pulgas, vindos de outros países para Cabo Verde.

Ricketesioses não são incomuns em Cabo Verde. O mesmo se aplica a pulgas *Ctenocephalides felis* (Duarte, 2013; The Armed Forces Pest Management Board, 2021). Não obstante, até à data, *Rickettsia asembonensis*, bactérias proeminentemente encontradas em pulgas *Ctenocephalides felis*, apenas terá sido reportada no Quênia, Irão, Tunísia, Costa Rica, Egipto, Israel, Malásia, Brasil, Uganda, EUA e Peru (Maina *et al.*, 2019; Seidi *et al.*, 2024). A ausência de outros relatos sobre a presença de *Rickettsia asembonensis* em Cabo Verde, mesmo com a presença do vector amplamente distribuída no país, pode ser justificada pela simples ausência de estudos específicos para a identificação desta bactéria no arquipélago de Cabo Verde.

Borrelia bavariensis pode afectar vários animais incluindo animais domésticos (incluindo cães), pequenos mamíferos que atuam como hospedeiros reservatórios (como ratos do mato e outros roedores da família *Cricetidae*) e algumas aves marinhas do Norte do Atlântico, entre elas, papagaios do mar [*Fratercula cirrhata* ou *Fratercula arctica*] e corvos

marinhos [*Phalacrocorax urile*] (Gatzmann *et al.*, 2015; Munro *et al.*, 2017). No entanto, estes roedores não são nativos de Cabo Verde e os padrões migratórios destas aves do Atlântico Norte não incluem o arquipélago de Cabo Verde (Piatt *et al.*, 2020; Burnham *et al.*, 2021; Wallace & Wallace, 2021), pelo que apenas o transporte (acidental ou intencional) de animais domésticos ou roedores da família *Cricetidae* infectados com *Borrelia bavariensis* ou a falta de estudos justificaria a presença desta bactéria em Cabo Verde.

Até à presente data, não existem relatórios que presenciem *Hepatozoon canis* na ilha de São Vicente, embora haja vários estudos que evidenciem a presença deste protozoário em outras ilhas do arquipélago, nomeadamente na ilha da Boa Vista, ilha de Santiago e na ilha de Maio. Este facto é justificável, da mesma forma que ocorre com a *Rickettsia asembonensis*, pela escassez de estudos de doenças transmitidas por vectores artrópodes na ilha de São Vicente, Cabo Verde (Götsch *et al.*, 2009; Lauzi *et al.*, 2016; Checa *et al.*, 2024).

Do mesmo modo que *Hepatozoon canis*, existem vários estudos que relatam a presença de *Ehrlichia canis* em várias ilhas de Cabo Verde, mas nenhum específico da ilha de São Vicente. Estudos na ilha de Boa Vista (Checa *et al.*, 2024) demonstram uma alta prevalência serológica e molecular de *E. canis*, enquanto estudos na ilha de Maio (Lauzi *et al.*, 2016) e na ilha de Santiago (Götsch *et al.*, 2009) detectaram *E. canis* por PCR em cães com uma prevalência relativamente mais baixa que na ilha de Boa Vista. Alguns estudos mais antigos como Kirchner *et al.*, 2008, detectaram *E. canis* por PCR em cães, mas não especificaram as ilhas do arquipélago de Cabo Verde onde retiraram amostras. Desta forma, semelhante ao que acontece com o *Hepatozoon canis*, a falta de relatórios que presenciem *E. canis* na ilha de São Vicente é justificável pela escassez de estudos realizados nesta ilha.

Apesar dos resultados significativos, este trabalho apresenta três grandes limitações que devem ser reconhecidas. Primeiramente, a dimensão reduzida da amostra, composta por apenas vinte cães errantes capturados no âmbito de uma campanha de esterilização, condiciona a robustez estatística das conclusões e restringe a representatividade da população de cães errantes da ilha de São Vicente, Cabo Verde. Adicionalmente, a recolha das amostras ocorreu exclusivamente numa área delimitada da cidade do Mindelo, limitando a extrapolação dos dados para outras zonas da ilha sujeitas a potenciais dinâmicas ecológicas, sanitárias e de circulação de agentes patogénicos diferentes.

Outra limitação relevante prende-se com a impossibilidade da realização de análises sorológicas que forneceriam informações importantes relativas à resposta imunológica dos indivíduos e permitiriam complementar os resultados moleculares. Estas análises e a avaliação da exposição dos cães a estes agentes seriam importante para uma melhor compreensão epidemiológica. Esta limitação baseia-se no facto de o sangue recolhido de cada cão ter sido colhido apenas para tubos de EDTA, não tendo sido inicialmente previsto, nem preparado o material, para recolha de sangue em tubos secos.

Por fim, dado que se tratou de uma população de cães errantes, não foi possível aceder a informações sobre o histórico clínico ou de deslocações destes cães, como antecedentes de vacinação, origem geográfica ou eventual translocação entre ilhas ou mesmo continentes. A falta destas informações limita a compreensão dos fatores que podem ter condicionado a exposição prévia destes cães a vectores e agentes patogénicos transportados pelos mesmos e, consequentemente, a interpretação dos resultados obtidos.

Em suma, o presente estudo destaca-se pela sua particular relevância e pioneirismo no contexto científico de Cabo Verde, ao alargar o conhecimento e foco das investigações relativas a doenças transmitidas por vectores, previamente centradas quase exclusivamente em mosquitos e em patologias de maior impacto direto na saúde humana. Ao incorporar estruturadamente a análise de vectores artrópodes (carraças, pulgas e piolhos), dos agentes patogénicos que estes podem transportar e possíveis implicações que estes podem causar na saúde humana e veterinária, este trabalho permite completar o conhecimento epidemiológico da ilha e, consequentemente, do arquipélago. Deste modo, esta investigação não só introduz dados inéditos com elevado impacto na epidemiologia de Cabo Verde, demonstra a importância da estabilização de novos métodos de vigilância e estratégias de controlo de doenças transmitidas por vetores e oferece bases científicas capazes de orientar futuros estudos científicos.

V – Conclusões

O presente trabalho permitiu atingir os objetivos propostos, nomeadamente a caracterização morfológica e genética das 38 carraças, 5 pulgas e 4 piolhos recolhidos da população de vinte cães errantes da ilha de São Vicente e a identificação molecular dos agentes patogénicos transmitidos por estes vetores, com particular atenção ao potencial zoonótico associado a cada agente.

Os resultados obtidos contribuíram, para o conhecimento das doenças transmitidas por vetores artrópodes na ilha de São Vicente e, conseqüentemente, no arquipélago de Cabo Verde, ao demonstrar a circulação de agentes patogénicos até à data não relatados nem nesta ilha, como *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis*, nem no arquipélago, como *Rickettsia asembonensis* e *Borrelia bavariensis*. Esta descoberta é especialmente significativa, dado a tratar-se de microrganismos com conhecido potencial zoonótico, capazes de provocar doenças graves, de difícil tratamento ou clinicamente relevantes e de evolução grave - com excepção de *H. canis*, que permanece restrito ao hospedeiro canino, não tendo potencial zoonótico conhecido. Estes achados evidenciam a subvalorização do estudo de doenças transmitidas por vectores que não sejam mosquitos e reforçam a importância e necessidade de consolidar as estratégias de vigilância a nível epidemiológico e implementar medidas consistentes de controlo e prevenção, não só dos artrópodes, mas também da população de cães errantes, que atuam como reservatórios e disseminadores destes agentes patogénicos. A realização de estudos multidisciplinares, integrando as áreas de medicina veterinária, medicina humana, entomologia, microbiologia, epidemiologia e ciências ambientais, seriam uma mais valia fundamental por permitir uma compreensão mais abrangente e precisa da dinâmica de transmissão dos agentes patogénicos, das interações entre hospedeiros, vetores e ambiente, e como diversos fatores (socioeconómicos e climáticos, principalmente) influenciam a propagação e emergência destas doenças. Estes estudos proporcionariam ainda formas de identificação precoce de riscos de saúde pública e o desenvolvimento de estratégias de intervenção mais eficazes, sustentáveis e moldadas para a realidade da ilha de São Vicente.

Numa próxima análise, será particularmente interessante incluir a recolha de sangue em tubos secos, de forma a permitir a obtenção de soro para a realização de análises serológicas. A quantificação e análise de anticorpos proporcionariam uma importante compreensão relativamente à resposta imunitária dos cães, permitindo distinguir entre infecções ativas e exposição a agentes patogénicos. A combinação dos métodos moleculares com os métodos sorológicos possibilitaria uma avaliação muito mais completa dos agentes patogénicos e vetores que os transmitem, complementando o conhecimento, até à data, de doenças transmitidas por vetores no arquipélago de Cabo Verde.

Por fim, a realização de mais estudos, mais aprofundados e a partilha de informações e descobertas entre profissionais de saúde humana e profissionais de saúde veterinária é crucial para um melhor conhecimento epidemiológico de doenças em Cabo Verde, para a promoção de uma abordagem integrada e interdisciplinar alinhada com o conceito de Uma Só Saúde e para o desenvolvimento e conseqüente implementação de medidas de prevenção, vigilância e educação mais eficazes para a melhoria das condições de higiene, bem-estar e de saúde das populações do arquipélago de Cabo Verde.

Referências bibliográficas

- Agência de Aeroportos e Aviação Civil (AAI). (n.d.). *Sobre Cabo Verde*. Acedido a 17 de setembro de 2025 em <https://aai.gov.cv/cabo-verde>
- Almeida, B. F. M. (2015). *Deteção Molecular de Protozoários e Bactérias Transmitidos por Artrópodes Vetores em Cães do Sul de Portugal* (Dissertação de Mestrado). Universidade Lusófona, Lisboa.
- Galvão, M. A., Mafra, C., Chamone, C. B., Calic, S. B., Zavala-Velazquez, J. E., & Walker, D. H. (2004). Clinical and laboratorial evidence of *Rickettsia felis* infections in Latin America. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37(3), 238–240. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822004000300009>
- Beugnet, F., Halos, L., Guillot, Jacques, & Artal, J. Gragera. (2018). Textbook of clinical parasitology in dogs and cats. In Servet editorial - Grupo Asís Biomedica, S.L.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, 3(5), 294–299.
- Breitschwerdt, E. B., Hegarty, B. C., Qurollo, B. A., Saito, T. B., Maggi, R. G., Blanton, L. S., & Bouyer, D. H. (2014). Intravascular persistence of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewingii* DNA in the blood of a dog and two family members. *Parasites & vectors*, 7, 298. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-298>
- Britannica Editors (2025, November 4). Polymerase chain reaction. *Encyclopedia Britannica*., disponível em <https://www.britannica.com/science/polymerase-chain-reaction>
- Brown, L. D., & Macaluso, K. R. (2016). *Rickettsia felis*, an Emerging Flea-Borne Rickettsiosis. In *Current Tropical Medicine Reports* (Vol. 3, Issue 2, pp. 27–39). Springer Verlag, disponível em <https://doi.org/10.1007/s40475-016-0070-6>
- Burnham, K. K., Burnham, J. L., Johnson, J. A., & Huffman, A. (2021). Migratory movements of Atlantic puffins *Fratercula arctica naumanni* from high Arctic Greenland. In *PLoS ONE*, disponível em <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252055>
- CAPC. (2015). *Ehrlichia spp. and Anaplasma spp. for dog*. Companion Animal Parasite Council (CAPC). <https://capcvet.org/guidelines/ehrlichia-spp-and-anaplasma-spp/>
- Cardoso, L., Oliveira, A. C., Granada, S., Nachum-Biala, Y., Gilad, M., Lopes, A. P., Sousa, S. R., Vilhena, H., & Baneth, G. (2016). Molecular investigation of tick-borne pathogens in dogs from Luanda, Angola. *Parasites & Vectors*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1536-z>
- Cardoso, L., Yisaschar-Mekuzas, Y., Rodrigues, F. T., Costa, Á., MacHado, J., Diz-Lopes, D., & Baneth, G. (2010). Canine babesiosis in northern Portugal and molecular characterization of vector-borne co-infections. *Parasites & Vectors*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-27>

CD Genomics. (2020). *Sanger Sequencing: Introduction, Principle, and Protocol*. CD Genomics Blog. <https://www.cd-genomics.com/blog/sanger-sequencing-introduction-principle-and-protocol/>

Centro Estadual de Vigilância em saúde RS (CEVS). (2018). *Guia de vigilância acarológica: vetores e hospedeiros da febre maculosa e outras riquetsioses no Rio Grande do Sul* (Porto Alegre, Ed.). www.cevs.rs.gov.br/inicial

Checa, R., Peteiro, L., Pérez-Hernando, B., de la Morena, M., Cano, L., López-Suárez, P., Barrera, J. P., Estévez-Sánchez, E., Sarquis, J., Fernández-Cebrián, B., Montoya, A., & Miró, G. (2024). High serological and molecular prevalence of *Ehrlichia canis* and other vector-borne pathogens in dogs from Boa Vista Island, Cape Verde. *Parasites & Vectors*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-024-06437-9>

Clay, T. (2025). Louse. In Editors of Encyclopaedia Britannica (Ed.), Britannica. Disponível em <https://www.britannica.com/animal/lice/Evolution-and-paleontology>

da Silva, T. A. M., Gomes, L. I., Oliveira, E., Coura-Vital, W., Silva, L. D. A., Pais, F. S. M., Ker, H. G., Reis, A. B., Rabello, A., & Carneiro, M. (2015). Genetic homogeneity among *Leishmania (Leishmania) infantum* isolates from dog and human samples in Belo Horizonte Metropolitan Area (BHMA), Minas Gerais, Brazil. *Parasites & Vectors*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0837-y>

Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J. F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J. M., & Gascuel, O. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic acids research*, 36(Web Server issue), W465–W469. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn180>

dos Santos, C. M. (2023). *Ocorrência da infecção por Bartonella sp. e Ehrlichia sp. em cães (canis lupus familiaris) e gatos (felis catus) de Campo Grande, MS* (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil .

Duarte, E. H. (2013). The haematophagous arthropods (Animalia: Arthropoda) of the Cape Verde Islands: a review. *Zoologia Caboverdiana*, 4(2), 31-42. Disponível em www.scvz.org

Duarte, M. T. (2008). *Riquetsioses do grupo das febres exantemáticas em canídeos domésticos em Portugal: Revisão bibliográfica e estudo retrospectivo* (Dissertação de Mestrado). Universidade Técnica de Lisboa.

Eichler. (1963). *Dr. H.G. Bronns Klassen und Ordnungen des Tierreichs. . 5. Band. III. Abteilung. 7. Buch: W. Eichler: Mallophaga. (VII. 290 Seitenn, 150 Textabb.)*. Leipzig. Akademische Verlagsges. 1939-1963. <https://dn720301.ca.archive.org/0/items/protozoa01buts/protozoa01buts.pdf>

Esch, K. J., & Petersen, C. A. (2013). Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1), 58–85. <https://doi.org/10.1128/CMR.00067-12>

European Food Safety Authority. (2025). Vector-borne diseases. Disponível em <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/vector-borne-diseases>

- Forlano, M. D., Teixeira, K. R. S., Scofield, A., Elisei, C., Yotoko, K. S. C., Fernandes, K. R., Linhares, G. F. C., Ewing, S. A., & Massard, C. L. (2007). Molecular characterization of *Hepatozoon* sp. from Brazilian dogs and its phylogenetic relationship with other *Hepatozoon* spp. *Veterinary Parasitology*, 145(1–2), 21–30. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.10.023>
- Fromm, K., & Dehio, C. (2021). The Impact of *Bartonella* VirB/VirD4 Type IV Secretion System Effectors on Eukaryotic Host Cells. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.762582>
- Garrido, P. M., & Borges-Costa, J. (2018). Doença de Lyme: Epidemiologia e Manifestações Clínicas Cutâneas. *Journal of the Portuguese Society of Dermatology and Venereology*, 76(2), 169–176. Disponível em <https://doi.org/10.29021/spdv.76.2.907>
- Gatzmann, F., Metzler, D., Krebs, S., Blum, H., Sing, A., Takano, A., Kawabata, H., Fingerle, V., Margos, G., & Becker, N. S. (2015). NGS population genetics analyses reveal divergent evolution of Lyme Borreliosis agent in Europe and Asia. In *Ticks and Tick-borne Diseases* (Vol. 6, pp. 344–351). <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.02.008>
- Gaunt, S. D., Beall, M. J., Stillman, B. A., Lorentzen, L., Diniz, P. P. V. P., Chandrashekar, R., & Breitschwerdt, E. B. (2010). Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasites & vectors*, 3(1), 33.
- Götsch, S., Leschnik, M., Duscher, G., Burgstaller, J. P., Wille-Piazzai, W., & Joachim, A. (2009). Ticks and haemoparasites of dogs from Praia, Cape Verde. In *Veterinary Parasitology* (Vol. 166, pp. 171–174). Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.08.009>
- Griffiths, H. J. (1978). *A Handbook of Veterinary Parasitology - Domestic Animals of North America*. University of Minnesota Press.
- Güvendi, M., Can, H., Köseoğlu, A. E., Erkunt Alak, S., Kandemir, Ç., Taşkın, T., Sürgeç, E., Demir, S., Değirmenci Döşkaya, A., Karakavuk, M., Gül, A., Döşkaya, M., Gürüz, A. Y., & Ün, C. (2022). Investigation of the genetic diversity and flea-borne pathogens in *Ctenocephalides felis* samples collected from goats in İzmir and Şanlıurfa provinces of Turkey. *Comp Immunol, Microbiol Infect Dis*, 90–91, 101896. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2022.101896>
- Hall, T. (2021). BioEdit: biological sequence alignment editor (version 7.7.1). Disponível em <https://bioedit.software.informer.com/7.7/>
- Hansford, K. M., Wheeler, B. W., Tschirren, B., & Medlock, J. M. (2022). Questing Ixodes ricinus ticks and *Borrelia* spp. in urban green space across Europe: A review. In *Zoonoses and Public Health* (Vol. 69, Issue 3, pp. 153–166). John Wiley and Sons Inc. Disponível em <https://doi.org/10.1111/zph.12913>
- Hornok, S., Beck, R., Farkas, R., Grima, A., Otranto, D., Kontschán, J., Takács, N., Horváth, G., Szőke, K., Szekeres, S., Majoros, G., Juhász, A., Salant, H., Hofmann Lehmann, R., Stanko, M., & Baneth, G. (2018). High mitochondrial sequence divergence in synanthropic

- flea species (Insecta: Siphonaptera) from Europe and the Mediterranean. *In Parasit Vectors*, 11(1), 221. Disponível em <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2798-4>
- Inokuma, H., Terada, Y., Kamio, T., Raoult, D., & Brouqui, P. (2001). Analysis of the 16S rRNA gene sequence of *Anaplasma centrale* and its phylogenetic relatedness to other *Ehrlichiae*. *In Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(2), 241–244. Disponível em <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.2.241-244.2001>
- Irwin, P. J. (2009). Canine babesiosis: From molecular taxonomy to control. *In Parasites & Vectors* (Vol. 2, Issue SUPPL.1). Disponível em <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S4>
- Kim, H. K. (2022). *Rickettsia*-Host-Tick Interactions: Knowledge Advances and Gaps. *In Infection and Immunity* (Vol. 90, Issue 9, pp. 1–17). American Society for Microbiology. Disponível em <https://doi.org/10.1128/iai.00621-21>
- Kirchner, M., Brunner, A., Edelhofer, R., & Joachim, A. (2008). Untersuchungen zu vektorübertragenen parasiten bei hunden auf den Kapverdischen Inseln. *In Wiener Klinische Wochenschrift*, 120(SUPPL. 4), 49–53. Disponível em <https://doi.org/10.1007/s00508-008-1075-5>
- Knott, L., Beveridge, I., Jones, M., Elliott, A., & Bayer Animal Health. (2015). Common Parasites of Veterinary Importance. The University of Queensland, Australia. Disponível em <https://shire.science.uq.edu.au/parasites/index.php>
- Langlois, T., Hurtrez-Boussès, S., & de Garine-Wichatitsky, M. (2025). Pet and Stray Dogs' Contribution to Zoonotic Transmission Pathways: A Bibliometric Review. *In Z. Peng (Ed.), Transboundary and Emerging Diseases* (Vol. 2025, Issue 1). John Wiley and Sons Ltd. Disponível em <https://doi.org/10.1155/tbed/5522451>
- Lauzi, S., Maia, J. P., Epis, S., Marcos, R., Pereira, C., Luzzago, C., Santos, M., Puente-Payo, P., Giordano, A., Pajoro, M., Sironi, G., & Faustino, A. (2016). Molecular detection of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* and *Rickettsia monacensis* in dogs from Maio Island of Cape Verde archipelago. *In Tick and Tick-borne Diseases* (Vol. 7, pp. 964–969). Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.05.001>
- Lawrence, A. L., Brown, G. K., Peters, B., Spielman, D. S., Morin-Adeline, V., & Šlapeta, J. (2014). High phylogenetic diversity of the cat flea (*Ctenocephalides felis*) at two mitochondrial DNA markers. *In Med Vet Entomol*, 28(3), 330–336. Disponível em <https://doi.org/10.1111/mve.12051>
- Lawrence, A. L., Webb, C. E., Clark, N. J., Halajian, A., Mihalca, A. D., Miret, J., D'Amico, G., Brown, G., Kumsa, B., Modrý, D., & Šlapeta, J. (2019). Out-of-Africa, human-mediated dispersal of the common cat flea, *Ctenocephalides felis*: The hitchhiker's guide to world domination. *In Int J Parasitol*, 49(5), 321–336. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.01.001>
- LeishVet. (2018). LEISHMANIOSE CANINA E FELINA. Disponível em www.leishvet.org
- Lundgren, B. (2023). Lice in Dogs and Cats. Disponível em <https://veterinarypartner.vin.com/doc/?id=4952773&pid=19239>

- Maia, C., Almeida, B., Coimbra, M., Fernandes, M. C., Cristóvão, J. M., Ramos, C., Martins, Â., Martinho, F., Silva, P., Neves, N., Nunes, M., Vieira, M. L., Cardoso, L., & Campino, L. (2015). Bacterial and protozoal agents of canine vector-borne diseases in the blood of domestic and stray dogs from southern Portugal. *Parasites & Vectors*, 8(1). Disponível em <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0759-8>
- Maina, A. N., Jiang, J., Luce-Fedrow, A., St. John, H. K., Farris, C. M., & Richards, A. L. (2019). Worldwide presence and features of flea-borne *Rickettsia asembonensis*. In *Frontiers in Veterinary Science* (Vol. 5, Issue JAN). Frontiers Media S.A. Disponível em <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00334>
- Marques, L., Mesquita, S., Tavares, E., & Guedes, M. (2005). Consensos em Infecçologia Pediátrica–Febre escaro-nodular. *Acta Pediatr Port*, 36, 257-63.
- Marques, W. E. R. (2017). Caracterização molecular e pesquisa de agentes patogénicos em carraças de Angola, Cabo Verde, Guiné-Bissau, Moçambique e Portugal (Dissertação de Mestrado). Universidade Técnica de Lisboa.
- McGinn, J., & Lamason, R. L. (2021). The enigmatic biology of rickettsiae: Recent advances, open questions and outlook. In *Pathogens and Disease* (Vol. 79, Issue 4). Oxford University Press. Disponível em <https://doi.org/10.1093/femspd/ftab019>
- Medina, L. (2009). Evolução Demográfica da ilha de São Vicente do Descobrimento a 1950 (Dissertação de Mestrado). Instituto Universitário de Lisboa. Disponível em <https://core.ac.uk/download/pdf/38680338.pdf>
- Ministério da Saúde. (2003). *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral* (1st ed.). Editora MS. Disponível em https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscer_al_1edicao.pdf
- Moita, M. S. de M. (2012). Estudo Retrospectivo das doenças transmitidas por vectores - babesiose, ehrlichiose, rickettsiose e leishmaniose - em cães no concelho de Cascais (Dissertação de Mestrado). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa.
- Monteiro, I. V. P. (2014). O impacto da descentralização no desenvolvimento de São Vicente (Dissertação de Licenciatura). Universidade do Mindelo. Disponível em <https://1library.org/document/yeo3nr4q-o-impacto-da-descentralizacao-no-desenvolvimento-sao-vicente.html>
- Munro, H. J., Ogden, N. H., Lindsay, L. R., Robertson, G. J., Whitney, H., Lang, A. S., Labrador, C., & Dudley, E. G. (2017). Evidence for *Borrelia bavariensis* Infections of *Ixodes uriae* within Seabird Colonies of the North Atlantic Ocean.
- Nametov, A., Karmaliyev, R., Sidikhov, B., Murzabayev, K., Orynkhonov, K., Kadrallyeva, B., Yertleuova, B., Gabdullin, D., Abilova, Z., & Dushayeva, L. (2025). Stray Dogs as Reservoirs and Sources of Infectious and Parasitic Diseases in the Environment of the City of Uralsk in Western Kazakhstan. In *Biology*, 14(6). Disponível em <https://doi.org/10.3390/biology14060683>

- Novakova, M., Costa, F. B., Krause, F., Literak, I., & Labruna, M. B. (2016). *Rickettsia vini* n. sp. (Rickettsiaceae) infecting the tick *Ixodes arboricola* (Acari: Ixodidae). *In Parasites & Vectors*, 9(1). Disponível em <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1742-8>
- Oteo, J. A., Maggi, R., Portillo, A., Bradley, J., García-Álvarez, L., San-Martín, M., Roura, X., & Breitschwerdt, E. (2017). Prevalence of *Bartonella* spp. By culture, PCR, and serology, in veterinary personnel from Spain. *In Parasites & Vectors*, 10(1). Disponível em <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2483-z>
- Parola, P., Roux, V., Camicas, J. L., Baradji, I., Brouqui, P., & Raoult, D. (2000). Detection of Ehrlichiae in African ticks by polymerase chain reaction. *In Trans R Soc Trop Med Hyg*, 94(6), 707–8.
- Patrício, C. S. S. (2017). Borreliose de Lyme em cães e cavalos: caracterização serológica e molecular em animais assintomáticos (Dissertação de Mestrado). Universidade Nova de Lisboa. Disponível em <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/ComInf/Noticias/Documents/2016/Abril/II%2>
- Petri, W. A. Jr., & Tesini, B. L. (2024, January). Febre maculosa das Montanhas Rochosas (FMMR). *In Manual MSD*. Disponível em <https://doi.org/10.1086/518145>
- Petrovec, M., Sumner, J. W., Nicholson, W. L., Childs, J. E., Strle, F., Barlič, J., Lotrič - Furlan, S., Avš Ič, A. T., & Upanc, Z. ˇ. (1999). Identity of Ehrlichial DNA Sequences Derived from *Ixodes ricinus* Ticks with Those Obtained from Patients with Human Granulocytic Ehrlichiosis in Slovenia. *In JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* (Vol. 37, Issue 1). Disponível em <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC84210/>
- Piatt, J.F. and A. S. Kitaysky (2020). Tufted Puffin (*Fratercula cirrhata*), version 1.0. *In Birds of the World* (S. M. Billerman, Editor). Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY, USA. Disponível em <https://doi.org/10.2173/bow.tufpuf.01>
- Pires, M. L. (2016). Estudo da infeção por *Leishmania* spp. numa colónia de gatos errantes da ilha de Faro (Dissertação de Mestrado). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa.
- Porto Editora. (n.d.). *Chave dicotómica*. Infopédia. Acedido a 14 de Novembro de 2025 em [https://www.infopedia.pt/artigos/\\$chave-dicotomica#:~:text=Numa%20chave%20dicot%C3%B3mica%20podem%2Dse,podem%20encontrar%20numa%20determinada%20regi%C3%A3o.](https://www.infopedia.pt/artigos/$chave-dicotomica#:~:text=Numa%20chave%20dicot%C3%B3mica%20podem%2Dse,podem%20encontrar%20numa%20determinada%20regi%C3%A3o.)
- Raileanu, C., Moutailler, S., Pavel, I., Porea, D., Mihalca, A. D., Savuta, G., & Vayssier-Taussat, M. (2017). *Borrelia* diversity and co-infection with other tick-borne pathogens in ticks. *In Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(FEB). Disponível em <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00036>
- Rosário, J. A. (2024). São Vicente: Cães Vadios, um problema no Mindelo. *In A Nação - Jornal Independente*, 881. Disponível em <https://www.anacao.cv/noticia/2024/07/21/sao-vicente-caes-vadios-um-problema-no-mindelo/>
- Sainz, Á., Roura, X., Miró, G., Estrada-Peña, A., Kohn, B., Harrus, S., & Solano-Gallego, L. (2015). Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in

- Europe. In *Parasites & Vectors* (Vol. 8, Issue 1). BioMed Central Ltd. Disponível em <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0649-0>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174) (Vol. 74, Issue 12).
- Smith, L. M., Hartmann, S., Munteanu, A. M., Villa, P. D., Quinnell, R. J., & Collins, L. M. (2019). The effectiveness of dog population management: A systematic review. In *Animals* (Vol. 9, Issue 12). MDPI AG. Disponível em <https://doi.org/10.3390/ani9121020>
- Stewart, A., Armstrong, M., Graves, S., & Hajkiewicz, K. (2017). *Rickettsia Australis* and Queensland tick typhus: A rickettsial spotted fever group infection in Australia. In *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (Vol. 97, Issue 1, pp. 24–29). American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Disponível em <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0915>
- Taylor, M. A., Coop, R. L., & Wall, R. L. (2016). In *Veterinary Parasitology* (4th Edition).
- The Armed Forces Pest Management Board. (2021). *Disease Vector Ecology Profile Cabo Verde*. Disponível em <https://www.ncmi.dodiis.mil/>
- União das cidades capitais de língua portuguesa (UCCLA). (2024). São Vicente / Mindelo. Disponível em <https://www.uccla.pt/membro/membro-associado/sao-vice-mindelo>
- Varanat, M., Maggi, R. G., Linder, K. E., & Breitschwerdt, E. B. (2011). Molecular Prevalence of *Bartonella*, *Babesia*, and *Hemotropic Mycoplasma* sp. in Dogs with Splenic Disease. In *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(6), 1284–1291. Disponível em <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.00811.x>
- Vásquez-Aguilar, A. A., Barbachano-Guerrero, A., Angulo, D. F., & Jarquín-Díaz, V. H. (2021). Phylogeography and population differentiation in *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) reveal expansion and gene flow in world populations. In *Parasites & Vectors*, 14(1). Disponível em <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04924-x>
- Vilela, J. (n.d.). Datas e factos do Cabo Submarino em Portugal (1855-2015). Fundação Portuguesa Das Comunicações. Acedido a 20 de Setembro de 2025 em <https://www.fpc.pt/pt/datas-e-factos-do-cabo-submarino-em-portugal/>
- Visit Cabo Verde. (n.d.). Ilha de São Vicente. Acedido a 17 de setembro de 2025 em <https://www.visit-caboverde.com/ilhas/ilha-de-sao-vice>
- Wall, R., & Shearer, D. (1997). Veterinary Entomology. In *Veterinary Entomology*. Springer Netherlands. Disponível em <https://doi.org/10.1007/978-94-011-5852-7>
- Wallace, E. A. & Wallace, G. E. (2021). Brandt's Cormorant (*Urile penicillatus*), version 1.1. In *Birds of the World* (A. F. Poole and F. B. Gill, Editors). Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY, USA. Disponível em <https://doi.org/10.2173/bow.bracor.01.1>
- Wodecka, B., Leońska, A., & Skotarczak, B. (2010). A comparative analysis of molecular markers for the detection and identification of *Borrelia spirochaetes* in *Ixodes ricinus*. In *Journal of Medical Microbiology* (Vol. 59, Issue 3). Disponível em <https://doi.org/10.1099/jmm.0.013508-0>

World Organisation for Animal Health (WOAH). (2021). *Infection with Borrelia spp.* In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (pp. 1–13). Disponível em <https://www.woah.org/app/uploads/2021/05/borrelia-spp-infection-with.pdf>

Zarea, A. A. K., Tempesta, M., Odigie, A. E., Mrenoshki, D., Fanelli, A., Martella, V., Decaro, N., & Greco, G. (2023). The Global Molecular Prevalence of Bartonella spp. in Cats and Dogs: A Systematic Review and Meta-Analysis. In Transboundary and Emerging Diseases (Vol. 2023). Wiley-Hindawi. Disponível em <https://doi.org/10.1155/2023/7867562>

Apêndices

Apêndice A

Project "Creole Dogs"

ID: CREODOG__

Approximate age:

☐ Juvenile (<1 year)

☐ Adult (>1 year)

☐ Senior (>10 years)

Sterilization:

☐ Yes

☐ No

Harvest place: _____

Place of origin: _____

Pack of origin: _____

Harvest Date: _____

Lifestyle: ☐ Stray dog ☐ Owner

Sex: ☐ M ☐ F

Vaccinated ☐

Dewormed ☐

Ectoparasites present:

☐ Yes

☐ No

Which ones: _____

Clinical signs present:

☐ Bites

☐ Cough

☐ Diarrhea

☐ Epistaxis

☐ Jaundice

☐ Lameness

☐ Lymphadenopathy

☐ Muscular atrophy

☐ Neurological signs

☐ Ocular lesions

☐ Pale mucous membranes

☐ Petechiae

☐ Tachypnoea

Other: _____

Brief Description:

Approximate weight:

☐ Small (<10kg)

☐ Medium (<26kg)

☐ Large (>26kg)

Approximate length: _____ cm

Approximate height: _____ cm

Coat colour: _____

Coat pattern:

Solid ☐ Bicolored ☐

Spotted ☐ Tricolored ☐

Stripped ☐ Other: _____

Coat type:

Short ☐

Long ☐

Curly ☐

Double coat ☐

Other: _____

Harvested product:

☐ Blood in EDTA

☐ Blood smear

Other: _____

Ectoparasites:

Which ones: _____



☐



☐



☐



☐



☐

Figura A1 – Folha de registro

Apêndice B

Identificação das amostras sequenciadas que serviram de base para a realização das árvores filogenéticas

Tabela B1 – Amostras sequenciadas que serviram de base para a realização das árvores filogenéticas, correspondente

Código	ID de amostra	Amostra	Cão	Resultado
BB10	CREODOG10	Sangue	CREODOG10	<i>B. bavariensis</i>
BH1	CREODOG01	Sangue	CREODOG01	
BH2	CREODOG02	Sangue	CREODOG02	
BH3	CREODOG03	Sangue	CREODOG03	
BH4	CREODOG04	Sangue	CREODOG04	
BH6	CREODOG06	Sangue	CREODOG06	
BH9	CREODOG09	Sangue	CREODOG09	
BH10	CREODOG10	Sangue	CREODOG10	
BH12	CREODOG12	Sangue	CREODOG12	
BH13	CREODOG13	Sangue	CREODOG13	
BH14	CREODOG14	Sangue	CREODOG14	
BH18	CREODOG18	Sangue	CREODOG18	
BH19	CREODOG19	Sangue	CREODOG19	
BH20	CREODOG20	Sangue	CREODOG20	
TH3.1	CREO03.1	Carraça	CREODOG03	
TH5.1	CREO05.1	Carraça	CREODOG05	
TH5.2	CREO05.2	Carraça	CREODOG05	
TH6.1	CREO06.1	Carraça	CREODOG06	
TH6.3	CREO06.3	Carraça	CREODOG06	
TH6.4	CREO06.4	Carraça	CREODOG06	
TH10.1	CREO10.1	Carraça	CREODOG10	
TH14.2	CREO14.2	Carraça	CREODOG14	
TH18.1	CREO18.1	Carraça	CREODOG18	
TH18.2	CREO18.2	Carraça	CREODOG18	
TH19.1	CREO19.1	Carraça	CREODOG19	
FR1	CREO01.1	Pulga	CREODOG01	<i>R. asembonensis</i>
FR2	CREO05.1	Pulga	CREODOG05	
FR3	CREO16.1	Pulga	CREODOG16	
FR4	CREO16.2	Pulga	CREODOG16	

Anexos

Anexos C

Ciclos de Vida dos Ectoparasitas

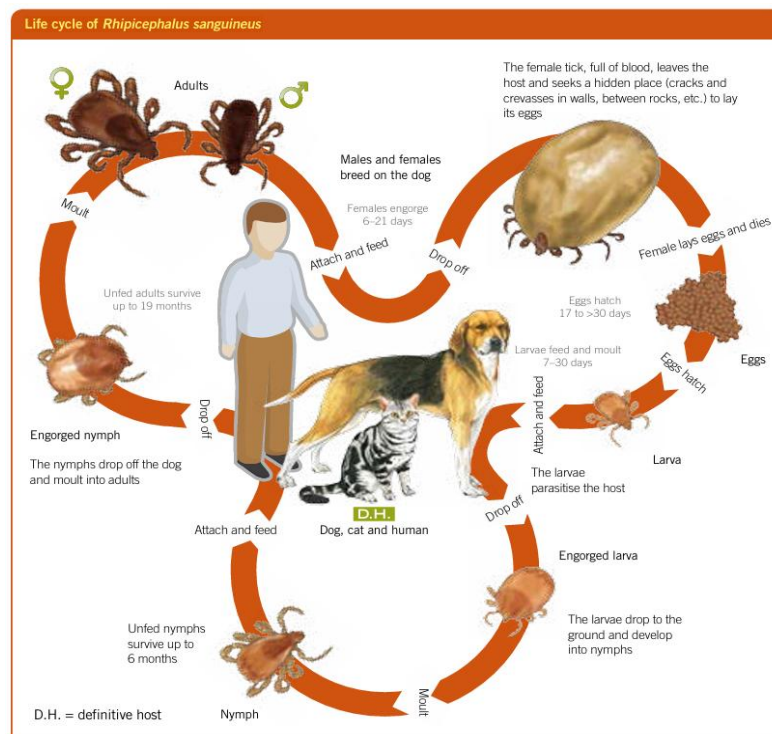


Figura C1 - Ciclo de vida de *Rhipicephalus sanguineus* (Beugnet, *et al.*, 2018).

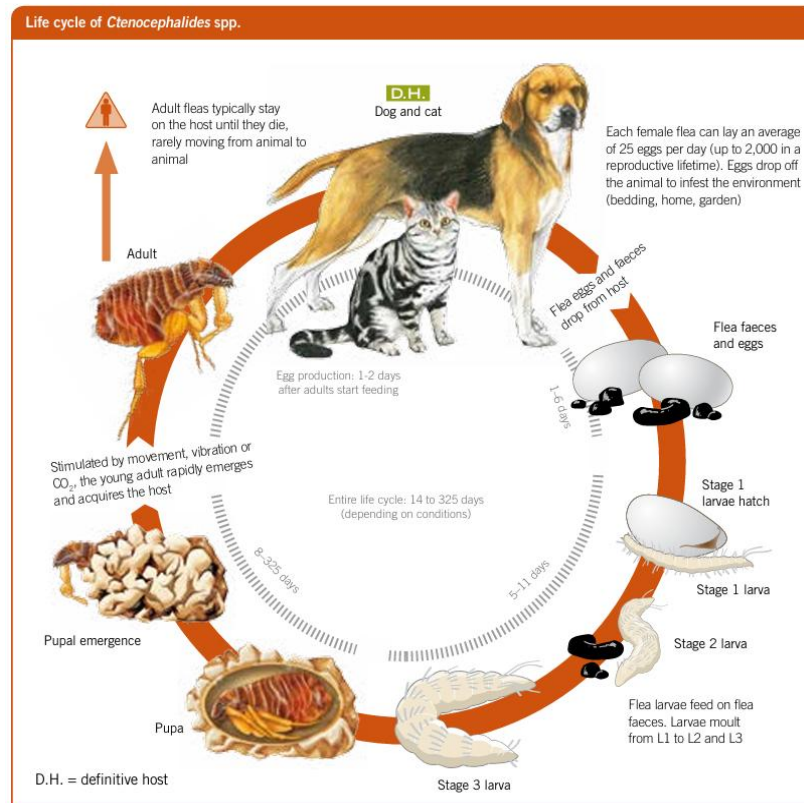


Figura C2 - Ciclo de vida de *Ctenocephalides* spp. (Beugnet *et al.*, 2018).

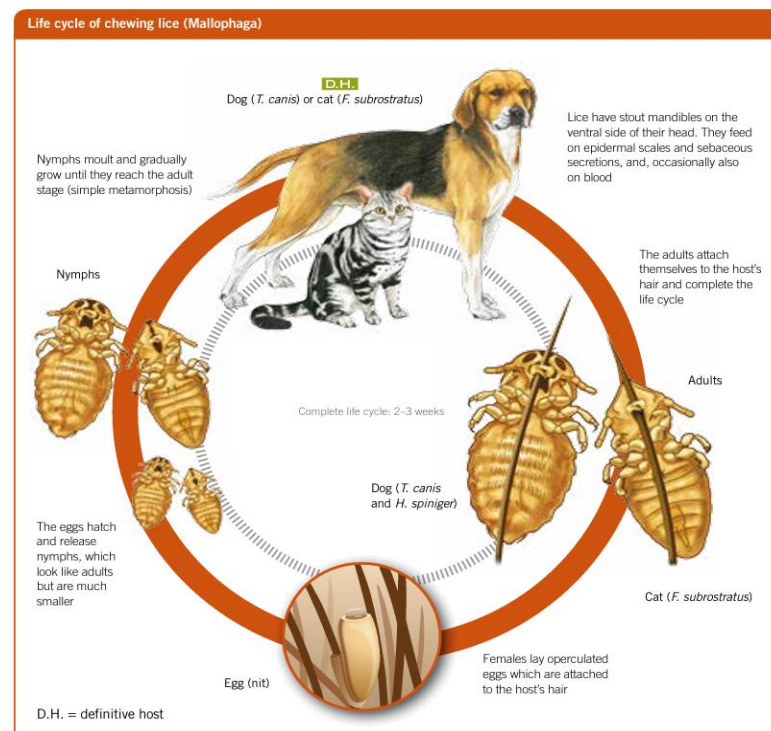


Figura C3 - Ciclo de vida de piolhos mastigadores (*Mallophaga*) (Beugnet *et al.*, 2018).

Anexo D

Chaves Dicotómicas

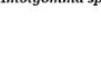
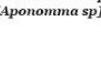
TICK MORPHOLOGY & IDENTIFICATION						
	Coxa 1	Anal Groove	Leg 1 Position (distance to mouthparts)	Mouthparts & Palps (compare with basis capitulum)	Eyes (hard to see)	Festoons (seen in unengorged ticks)
<i>Rhipicephalus sanguineus</i> 	Bifid (2 long spurs)  	Posterior 	n/a	Short 	Yes 	Yes 
<i>Ixodes sp</i> 	n/a	Anterior <i>[Ixodes holocyclus has complete circle]</i>  	n/a	Long  	No 	No  
<i>Haemaphysalis sp</i> 	Single spur (often) 	Posterior  	Close 	Short; Palps point laterally 	No 	Yes  
<i>Rhipicephalus microplus</i> 	2 very short spurs  	Absent  	Distant  	Very short  	Yes  	No 
<i>Amblyomma sp</i> 	n/a	Posterior 	n/a	Long 	Yes 	Yes 
<i>Bothriocroton sp</i> <i>[Aponomma sp]</i> 	n/a	Posterior 	n/a	Long 	No 	Yes 
Soft Ticks 	n/a	n/a	n/a	Ventral  	n/a	n/a

Figura D1 - Chave dicotômica para identificação de carrças. (Knott, *et al.*, 2015)

1		Ctenidia absent	2
		With pronotal ctenidium (+/- genal ctenidium)	4
2		Thorax not reduced - the 3 thoracic segments together are much wider than the first abdominal segment	3
		Thorax reduced - the 3 thoracic segments together are shorter in width than the first abdominal segment; Two setae on head behind antenna; On birds, especially poultry, but also dogs, cats, rabbits	<i>Echidnophaga gallinacea</i>
3		Pleural rod absent - pleural rod is a vertical ridge that divides the mesosternum (thoracic plate above the coxa of the 2nd pair of legs); Only 1 strong seta on a head behind antennae; On pigs, people, dogs, cats	<i>Pulex irritans</i>
		Pleural rod present	<i>Xenopsylla cheopis</i>
4		With pronotal ctenidium only	8
		With both pronotal and genal ctenidia	5
5		Genal ctenidium horizontal and formed of 8 or 9 spines	<i>Ctenocephalides</i> 7
		Genal ctenidium vertical or oblique, and formed of 6 or fewer spines	6
6		Genal ctenidium vertical with 2-4 spines; On rodents	<i>Leptopsylla</i> spp
		Genal ctenidium oblique, and formed of 4-6 elements; On rabbits, cats	<i>Spilopsyllus cuniculi</i>
7		Head elongate anteriorly (♀ head twice as long as high, but ♂ head as long as high); First 2 spines of genal ctenidium similar in length; Dorsal margin of hind tibia with 6 notches bearing stout setae	<i>Ctenocephalides felis</i>
		Head rounded anteriorly (in both sexes, less than twice as long as high); First spine of genal ctenidium noticeably shorter than second; Dorsal margin of hind tibia with 8 notches bearing stout setae	<i>Ctenocephalides canis</i>
8		Pronotal ctenidium with more than 24 spines (on the 2 sides combined); Row of 4-6 bristles on the inner surface of the hind femur; On poultry	<i>Ceratophyllus gallinae</i>
		Pronotal ctenidium with fewer than 24 spines (on the 2 sides combined); Inner surface of the hind femur bears 3-4 bristles; On rodents	<i>Nosopsyllus</i>

Figura D2 - Chave dicotômica para identificação de pulgas. (Knott, *et al.*, 2015)

1		Head broad; front usually rounded, sometimes triangular	[Biting Lice] 5
		Head long; front usually pointed	[Anoplura] 2
2		All legs of similar size; Paratergal plates on abdominal segments present and heavily chitinated; On ungulates	<i>Haematopinus</i>
		All legs of similar size, Paratergal plates on abdominal segments present and heavily chitinated; On humans	<i>Pediculus</i>
		1st pair of legs shorter than others	3
3		2 rows of ventral setae on each abdominal segment; Spiracles not on tubercles	4
		1 row of ventral setae on each abdominal segment, Spiracles on tubercles which protrude from the abdomen	<i>Solenopotes</i>
4		Paratergal plates absent; On cattle, sheep, goats and dogs	<i>Linognathus</i>
		Paratergal plates present; On rodents	<i>Polyplax</i>
5		Antennae 3 to 5 segmented, not hidden in antennal grooves	[Ischnocera] 6
		Antennae 4 segmented and hidden in antennal grooves	[Amblycera] 12
6		On Birds; Antennae 5 segmented; Paired claws	7
		On mammals; Antennae 3 segmented; Single claws	10
7		Hind legs similar length to first two pairs of legs	8
		Hind legs at least twice as long as first two pairs; Body long and narrow; On poultry	<i>Lipeurus</i>
8		3 long bristles project from each side of the dorsal surface of the head; Barrel-shaped body; ~2mm long	<i>Cuculotogaster</i>
		2 long bristles projecting from each side of the dorsal surface of the head	9
9		Distinct hollow margin posterior to antennae; Marked angular corners at the posterior margins; 3-5mm long; On Poultry	<i>Goniodes</i>
		Head rounded; Less than 2mm long; On poultry	<i>Goniocotes</i>
10		Head triangular; On cats	<i>Felicola</i>
		Head rounded anteriorly	11
11		On ruminants or horses	<i>Bovicola</i>
		On dogs	<i>Trichodectes</i>
12		On birds	13
		On mammals	14
13		~2mm long; Abdomen with sparse covering of setae; Found on thigh or breast feathers	<i>Menopan</i>
		Larger lice (~3.5mm); Abdomen with dense covering of setae; Found on thigh, breast or perivert feathers	<i>Menacanthus</i>
14		On guinea pigs; Oval abdomen; 6 pairs of ventrolaterally located abdominal spiracles	<i>Gyropus</i>
		On Guinea pigs; Slender abdomen (sides parallel); 5 pairs of ventrally located abdominal spiracles	<i>Gliricola</i>
		On dogs	<i>Heterodoxus</i>

Figura D3 - Chave dicotômica para identificação de piolhos. (Knott, *et al.*, 2015)