

JOANA SOFIA MOTA TRINCHEIRAS

***Anaplasma phagocytophilum*: REPERCUSSÃO DA
INFECCÃO DA FAUNA SILVESTRE EM CÃES E
GATOS DE UMA ZONA ENDÉMICA**

Orientador interno: Professora Doutora Margarida Alves

Orientador externo: Doutora Ana Sofia Santos

Orientador externo: Mestre Ângela Martins

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa
2019**

JOANA SOFIA MOTA TRINCHEIRAS

***Anaplasma phagocytophilum*: REPERCUSSÃO DA
INFECÇÃO DA FAUNA SILVESTRE EM CÃES E
GATOS DE UMA ZONA ENDÉMICA**

**Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no
curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade
Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

Orientador interno: Professora Doutora Margarida Alves

Orientador externo: Doutora Ana Sofia Santos

Orientador externo: Mestre Ângela Martins

Júri nomeado pelo despacho n.º: **408/2018**, de 10 de Dezembro de 2018, com a seguinte
composição:

Presidente: Prof.ª. Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Prof.ª. Doutora Maria Margarida Serejo (INSA)

Orientadora: Prof.ª. Doutora Margarida Alves

Vogal: Prof.ª. Doutora Raquel Matos

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa
2019**

Esta dissertação encontra-se ao abrigo do antigo acordo ortográfico de língua portuguesa.

EPÍGRAFE

Personally, I have always felt that the best doctor in the world is the veterinarian. He can't ask his patients what is matter... he's just got to know. – Will Rogers

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, por todo o amor incondicional, todos os sacrifícios que fizeram por mim, por me apoiarem e incentivarem a seguir um sonho que está prestes a tornar-se real.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora interna, professora Doutora Margarida Alves, por toda a ajuda, paciência e compreensão que teve comigo ao longo de toda esta última etapa da minha vida académica;

À minha orientadora externa, Doutora Ângela Martins, por me ter aceite no estágio curricular no Hospital Veterinário da Arrábida e no Centro de Reabilitação Animal da Arrábida, por todos os conhecimentos que me fez adquirir, por toda confiança que depositou em mim e por todo o carinho e compreensão;

À minha orientadora externa, Doutora Ana Sofia Santos por me ter aceite no estágio laboratorial no Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (CEVDI/INSA) pela orientação, pela ajuda prestada e realização de procedimentos fulcrais à realização do estudo;

A toda a equipa do Hospital veterinário da Arrábida e do Centro de Reabilitação Animal da Arrábida pelo carinho, acompanhamento e ajuda nas actividades hospitalares e de reabilitação.

A toda a equipa do CEVDI/INSA, particularmente e à Doutora Margarida Santos Silva pelo acolhimento, pela ajuda prestada, pelos conhecimentos transmitidos relacionados com ixodídeos.

A todos os professores da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, por todos conhecimentos, pela partilha de experiência, pela excelente formação que me colocaram à disposição, por todo o acompanhamento e amizade.

Aos meus pais, por todo o amor incondicional ao longo da vida, por toda a paciência, por nunca me falharem e por todos os sacrifícios que fizeram para que pudesse integrar o curso de Medicina Veterinária.

Ao meu irmão, cunhada e sobrinha pelo apoio constante, por toda a ajuda necessária ao longo do curso, por estarem sempre do meu lado.

Ao meu namorado Alexandre, pelo amor, pela força e apoio constantes, por estar a meu lado ao longo de todo este percurso académico e por toda ajuda.

Ao meu grupo de amigos/as da faculdade que me acompanhou desde o primeiro dia até ao final desta etapa, que me permitiu tardes e noites de estudo, pela elaboração de trabalhos e por toda a ajuda disponibilizada ao longo do curso.

Aos restantes familiares e amigos, por todo o apoio na vida pessoal e vida académica, por sempre torcerem pelo meu sucesso e por permanecerem ao meu lado.

Por último, mas não menos importante, a todos os animais, que cruzaram a minha vida e deixaram um bocadinho de si, pela motivação e a nunca desistir.

RESUMO

Os agentes transmitidos por ixodídeos são a causa de doenças emergentes em animais de companhia, em alguns casos com carácter zoonótico, representando um desafio para o médico veterinário, pela grande variedade de sinais clínicos que poderão originar. A população silvestre ao abrigar uma elevada densidade de ixodídeos pode estar envolvida no ciclo de transmissão de alguns agentes patogénicos. Este facto é, particularmente, importante quando se assiste ao aumento descontrolado das populações silvestres, como se verifica, actualmente, com os javalis em Portugal. Os javalis estão descritos como hospedeiros de uma ampla variedade de espécies ixodológicas, contribuindo para a dispersão dos agentes zoonóticos que lhe estão associados, nomeadamente *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, mas também a espécie zoonótica *Anaplasma phagocytophilum*. O presente estudo, procurou detectar evidência de infecção activa por estes agentes bacterianos, nomeadamente *A. phagocytophilum*, cuja transmissão poderá estar potenciada com o aumento da população de javalis no Parque Natural da Serra da Arrábida (PNSA). Assim foram considerados 21 javalis de três populações distintas, 36 animais de companhia (35 cães e um gato), com sinais clínicos, laboratoriais e/ou epidemiológicos compatíveis com doença associada a ixodídeos, atendidos no Hospital Veterinário da Arrábida, e 80 ixodídeos capturados na vegetação (N=61) ou a parasitar os animais (N=19). A extracção de ADN foi realizada em 155 amostras biológicas incluindo, 33 amostras sanguíneas de animais de companhia, 42 amostras de baço e fígado de javali e os 80 ixodídeos. Para a pesquisa de ADN bacteriano foi realizada uma PCR convencional genérica para *Anaplasma/Ehrlichia* spp. e PCR em tempo real específica para *A. phagocytophilum*. Em nenhuma das amostras foi possível identificar reacções positivas. É, contudo, de salientar que a limitação temporal e geográfica da amostragem, bem como, em alguns casos, a qualidade do ADN obtido, podem ter condicionado os resultados obtidos, não se podendo excluir a circulação do agente e, consequentemente, o risco de doença causada pelo mesmo. Esta dissertação permitiu abrir caminho para a realização de mais estudos de forma a conhecer melhor esta doença, bem como, os seus vectores/reservatórios, alertando para o seu papel na doença veterinária e humana.

Palavras-chave: *Anaplasma phagocytophilum*; Animais de companhia; Javalis; Ixodídeos; *Ixodes ricinus*.

ABSTRACT

Tick-borne agents transmitted by Ixodidae family members are the cause of emerging diseases in companion animals, in some cases with zoonotic potential, posing a challenge for the veterinarian due to the great variety of clinical signs that may arise from these pathologies. The wildlife by harboring a high density of ixodids may be involved in the transmission cycle of some pathogens. This is particularly important when wild animal populations are uncontrolled increasing as is currently the case of wild boars in Portugal. These animals are described as hosts of a wide variety of ixodid species contributing to the dispersion of associated zoonotic agents, namely *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, but also the zoonotic species, *Anaplasma phagocytophilum*. The present study sought to detect evidence of active infection caused by these bacterial agents, namely *A. phagocytophilum*, whose transmission may be enhanced by the increase of wild boar population in the Serra da Arrábida Natural Park (PNSA). Twenty-one wild boars from three different population, 36 companion animals (35 dogs and one cat), with clinical, laboratorial and / or epidemiological signs compatible with ixodidal disease attended at Arrábida Veterinary Hospital and 80 ixodids captured in the vegetation (N = 61) or parasitizing the animals (N = 19) were included in this study. DNA extraction was performed on 155 biological samples including, 33 pet blood samples, 42 boar spleen and liver samples, and the 80 ixodids. A generic PCR for *Anaplasma* / *Ehrlichia* spp. and real-time PCR specific for *A. phagocytophilum* were performed although in none of the samples positive reactions were identify. It should be noted, however, that the temporal and geographical limitation of sampling, as well as in some cases the quality of the DNA obtained, may have conditioned the results obtained and thus the circulation of the agent cannot be excluded and, consequently, the risk of the associated disease. This dissertation was an introduction for further studies to better understand this agent, as well as its vectors / reservoirs, alerting to its role in veterinary and human diseases.

Key-words: *Anaplasma phagocytophilum*; Companion animals; wild boars; Ixodids; *Ixodes ricinus*.

ÍNDICE GERAL

PÁG.

I. Relatório descritivo do estágio curricular: actividades desenvolvidas	19
1.1. Casuística.....	20
1.2. Distribuição por espécie animal	20
1.3. Distribuição por área clínica.....	21
1.3.1. Clínica cirúrgica	21
1.3.2. Clínica médica.....	22
1.3.3. Medicina física e de reabilitação funcional.....	23
1.3.4. Medicina preventiva	24
1.3.5. Medicina de urgência	24
II. <i>Anaplasma phagocytophilum</i> : Repercussão da infecção da fauna silvestre em cães e gatos de uma zona endémica	25
1. Introdução	25
1.1. Agente.....	25
1.2. Epidemiologia.....	26
1.2.1. Vectores.....	27
1.2.2. Reservatórios.....	30
1.3. Sinais Clínicos	31
1.4. Diagnóstico	33
1.5. Prevenção e tratamento.....	34
2. Material e Métodos	36

2.1. População em estudo	36
2.1.1. Animais de companhia	36
2.1.2. Javalis	37
2.1.3. Ixodídeos	37
2.2. Extracção de ADN total.....	38
2.2.1. Extracção de ADN de sangue total de animais de companhia.....	38
2.2.2. Extracção de ADN de tecidos de javalis	39
2.2.3. Extracção de ADN de ixodídeos	40
2.3. Avaliação da qualidade do ADN extraído.....	41
2.3.1. Avaliação da integridade física do ADN extraído das amostras de cão, ixodídeos e javalis	41
2.3.2. Avaliação da presença de inibidores nas amostras de ADN	42
2.3.2.1. Amplificação por PCR de um fragmento do gene <i>β-actina</i> canina.....	42
2.3.2.2. Amplificação por PCR de um fragmento do gene 12S rADN de Ixodídeos	43
2.4. Detecção molecular de ADN de <i>Anaplasma spp</i>	44
2.4.1. PCR convencional para <i>Anaplasma/Ehrlichia</i>	45
2.4.2. PCR em tempo real para <i>A. phagocytophilum</i>	46
2.5. Purificação e sequenciação dos produtos de PCR.....	47
3. Resultados.....	49
3.1 Animais de companhia.....	49
3.1.1. Caracterização da amostra.....	49

3.1.2.	Estudo da integridade do ADN	53
3.1.3.	Amplificação de um fragmento do gene <i>β-actina</i> canina	54
3.1.4.	Pesquisa de <i>A. phagocytophilum</i>	54
3.2.	Javalis	56
3.2.1.	Caracterização da amostra.....	56
3.2.2.	Estudo da integridade do ADN	57
3.2.3.	Pesquisa de <i>A. phagocytophilum</i>	57
3.3.	Ixodídeos	58
3.3.1.	Caracterização da amostra.....	58
3.3.2.	Amplificação de um fragmento do gene 12S rADN de Ixodídeos	61
3.3.3.	Pesquisa de <i>A. phagocytophilum</i>	62
4.	Discussão de resultados	64
5.	Conclusão.....	68
6.	Referências bibliográficas.....	69
	Apêndice I.....	I
	Apêndice II.....	II

ÍNDICE DE TABELAS

PÁG.

Tabela 1 – Distribuição da casuística por área clínica.	21
Tabela 2 – Distribuição da casuística na área da clínica cirúrgica.	22
Tabela 3 – Distribuição da casuística na área da clínica médica.	22
Tabela 4- Distribuição da casuística na área da medicina física e reabilitação funcional.	23
Tabela 5 – Distribuição da casuística na área da medicina preventiva.	24
Tabela 6 - Sequência de <i>primers</i> utilizados na amplificação do gene da β -actina (Maia <i>et al.</i> , 2010).	42
Tabela 7- Condições da reacção de PCR para amplificação de um fragmento do gene da β -actina.	43
Tabela 8- Sequência dos primers utilizados na amplificação do gene 12S rADN (Beati e Keirans, 2001).	44
Tabela 9- Condições da reacção de PCR para amplificação de um fragmento do gene 12S rADN.	44
Tabela 10- Sequência de <i>primers</i> utilizados na amplificação do gene 16S rADN (Maggi <i>et al.</i> , 2006).	45
Tabela 11- Condições da reacção de PCR para amplificação de um fragmento do gene 16S rADN de <i>Anaplasma spp.</i>	46
Tabela 12- Sequência de <i>primers</i> utilizados na amplificação do gene <i>msp2</i> (Coutney <i>et al.</i> , 2004).	47
Tabela 13- Condições da Reacção de PCR em Tempo Real.	47
Tabela 14- Condições da Purificação dos produtos de PCR.	47
Tabela 15- Reacção de Sequenciação dos produtos de PCR.	48

Tabela 16 – Ixodídeos na fase de vida livre capturados, distribuídos por espécies e local de captura no Parque Natural da Serra Arrábida.	60
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁG.

Figura 1 – Distribuição, em valores absolutos, da casuística pelas duas espécies animais mais prevalentes.	21
Figura 2 – Distribuição da casuística na área da medicina de urgências.	24
Figura 3 – Distribuição da amostra relativamente ao género dos cães em estudo (n=35).	49
Figura 4 – Distribuição da amostra relativamente à faixa etária dos cães em estudo (n=35).	50
Figura 5 – Distribuição da amostra de acordo com as características raciais dos cães em estudo (n=35).	50
Figura 6 – Distribuição da amostra de acordo com o estilo de vida dos cães em estudo (n=35).	51
Figura 7 – Manifestações clínicas mais frequentes dos animais de companhia em estudo (35 cães e um gato).	52
Figura 8 – Achados no hemograma da população de cães em estudo (n=33).	53
Figura 9 – Migração electroforética em gel de agarose a 0,8% do ADN extraído das amostras de sangue total dos cães em estudo..	53
Figura 10 – Migração electroforética em gel de agarose a 1,5% de produtos de PCR de algumas amostras em estudo (<i>β -actina</i>).	54
Figura 11 – Electroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos do PCR convencional para pesquisa de <i>Anaplasma spp.</i> / <i>Ehrlichia spp.</i> nas amostras dos cães.	55
Figura 12 – Análise da leitura final do PCR em tempo real para pesquisa de <i>A. phagocytophilum</i> nas amostras de cães..	55

Figura 13 – Distribuição da amostra de javalis em estudo de acordo com o género (n=21).	56
Figura 14 – Localização das áreas de captura dos javalis em estudo (n=21). Imagem adaptada do Google maps (https://www.google.pt/maps/).	56
Figura 15 – Migração electroforética em gel de agarose a 0,8% do ADN extraído das amostras de fígado e baço dos javalis em estudo.	57
Figura 16 – Análise da leitura final do PCR em tempo real para pesquisa de <i>A. phagocytophilum</i> nas amostras de javali..	58
Figura 17 – Distribuição da amostra de ixodídeos na fase parasitária por género e hospedeiro vertebrado.	59
Figura 18 – Localização das áreas de capturas dos ixodídeos na fase de vida livre no Parque Natural da Serra da Arrábida. Imagem adaptada do google maps (https://www.google.pt/maps/).	60
Figura 19 – Distribuição da amostra de ixodídeos de fase de vida livre estudados neste trabalho (n=61).	61
Figura 20 – Migração electroforética em gel de agarose a 1,5% de produtos de PCR (12S rDNA).	61
Figura 21 – Electroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos de PCR convencional para <i>Anaplasma spp.</i> / <i>Ehrlichia spp.</i>	62
Figura 22 – Imagem exemplificativa de PCR em Tempo Real das amostras de ADN de Ixodídeos.	63
Figura 23 – Documento apresentado aos tutores para conhecimento e colaboração no presente estudo	I
Figura 24 – Notícia sobre javalis, no PNSA. Novembro de 2014. Fonte: Diário de Notícias.	II

Figura 25 – Notícia sobre javalis, no PNSA. Novembro 2014 (Continuação). Fonte: Diário de notícias.....	III
Figura 26 – Notícia sobre javalis, no PNSA. Novembro 2014. Fonte: Diário de Notícias.	IV
Figura 27 – Notícia sobre javalis, PNSA. Agosto de 2017. Fonte: Jornal de Notícias.....	V
Figura 28 – Notícia sobre javalis, PNSA. Outubro 2017. Fonte: Diário de Notícias	VI
Figura 29 – Notícia sobre javalis, PNSA. Outubro 2017. Fonte: Diário de Notícias	VII
Figura 30 – Notícia sobre javalis, PNSA. Outubro 2017. Fonte: Diário de Notícias	VIII

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% – Percentagem

® – Marca registada

12S rADN – Gene que codifica a subunidade 12S do ácido desoxirribonucleico ribossómico.

16S rADN – Gene que codifica a Subunidade 16S do ácido desoxirribonucleico ribossómico.

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AGC – Anaplasmosse granulocítica canina

CDC – Centros de Controlo e Prevenção de doenças, do inglês “Centers for Disease Control and Prevention”

CEVDI – Centro de Estudos de Vectores de Doenças Infecciosas

CP – Ponto de intersecção, do inglês “Crossing Point”

CRAA – Centro de Reabilitação Animal da Arrábida

dNTP's – Desoxirribonucleósidos trifosfato, do inglês “Deoxyribonucleoside triphosphates”

DTI – Doenças transmitidas por ixodídeos

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês “Ethylenediaminetetraacetic acid”

EGH – Ehrlichiose granulocítica humana

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês “Enzyme-Linked Immunossorbent Assay”

et al. – E outros, do latim “*et alli*”

EUA – Estados Unidos da América

FMV – Faculdade de Medicina Veterinária

g – Aceleração gravitacional (unidade de força centrífuga relativa)

g – grama

gltA – Enzima Citrato Sintase

groEL – Proteínas de choque térmico

HVA – Hospital Veterinário da Arrábida

Hz – Hertz

IFA – Imunofluorescência indirecta, do inglês “Indirect Immunofluorescent Antibody”

m – metro

mg – Miligrama

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

min – Minuto

mL – Mililitro

*m*sp2 – Proteínas de superfície (*Major surface protein-2*)
*m*sp4 – Proteínas de superfície (*Major surface protein-4*)
NMS – Neurónio motor superior
OVH – Ovariohisterectomia
° C – Graus Celcius
Pb – Par de bases
PBS – Tampão fosfato salino, do inglês “Phosphate Buffered Saline”
PCR – Reacção em Cadeia da Polimerase, do inglês “Polimerase Chain Reaction”
PNSA – Parque Natural da Serra da Arrábida
REVIVE – Rede de Vigilância de Vectores
rpm – rotações por minuto
seg – Segundo
spp. – Espécies
TBE – Tris-borato-EDTA
UHLT – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
UV – Ultravioleta
V – Volt
µL – Microlitro
µm – Micrometro

I. Relatório descritivo do estágio curricular: actividades desenvolvidas

O presente relatório de estágio refere-se às actividades clínicas desenvolvidas no decorrer do estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária (FMV) da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (ULHT), realizado no Hospital Veterinário da Arrábida (HVA) e no Centro de Reabilitação Animal da Arrábida (CRAA), situado em Vila Nogueira de Azeitão. Com a duração de 4 meses, estas actividades foram desenvolvidas entre 02 de Outubro de 2017 e 02 de Fevereiro de 2018, sob orientação da Mestre Ângela Martins.

O estágio curricular permitiu a consolidação e aplicação prática dos conhecimentos académicos adquiridos ao longo do curso, bem como, a aquisição de novos conhecimentos. Incidiu, sobretudo, nas áreas da medicina física e reabilitação funcional, acompanhamento de consultas externas com envolvimento de medicina preventiva, clínica médica, clínica cirúrgica e exames complementares a elas associados. Foram, ainda, realizadas actividades relacionadas com o internamento, nomeadamente, acompanhamento dos casos clínicos, administração de fármacos, realização de procedimentos terapêuticos e monitorização dos doentes, participação na triagem e abordagem à medicina de urgência e de cuidados intensivos com acompanhamento e monitorização dos doentes, tanto em regime diurno como em regime nocturno.

Ao nível da clínica cirúrgica, a autora participou na avaliação pré-cirúrgica, na classificação do risco anestésico, no planeamento cirúrgico e do protocolo anestésico, na assistência e participação nas cirurgias como anestesista (monitorização anestésica) e ajudante do cirurgião e, finalmente, no seguimento do doente durante o período de recobro.

Ao nível da medicina física e reabilitação funcional, foi possível acompanhar o exame de reabilitação funcional, o diagnóstico e elaboração do protocolo a implementar, bem como a execução de exercícios de cinesioterapia, treino locomotor (tanto terrestre como aquático) e a aplicação de modalidades terapêuticas.

Outras oportunidades proporcionadas por este estágio foram a assistência e participação nas aulas destas especialidades leccionadas na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (FMV-ULHT), pela Prof^a convidada Ângela Martins, assim como consultas externas no Hospital Veterinário Arco do Cego, localizado em Lisboa, e na Referência Veterinária, em Cascais. Foram, também,

acompanhados exames ecocardiográficos com o Dr. Pedro Parreira e consultas de medicinas complementares, nomeadamente sessões de acupuntura, com o Mestre Luís Resende.

1.1. Casuística

Os dados relativos à casuística, foram recolhidos durante o período de estágio no HVA/CRAA, distribuindo-se, de acordo com a espécie animal, pelas áreas clínicas de medicina preventiva, clínica médica, clínica cirúrgica, medicina de urgência e medicina física e de reabilitação funcional.

É necessário ter em conta que a contabilização dos dados não corresponde necessariamente ao número total de animais, mas sim ao número total de casos observados, uma vez que no mesmo animal se podem desenvolver doenças concomitantes ou terem sido realizados diversos exames de diagnóstico, podendo, ainda, um caso de clínica médica necessitar de uma abordagem cirúrgica. Por outro lado, a casuística descrita não reflecte exactamente o trabalho hospitalar, mas sim as actividades executadas/observadas pelo estagiário.

Os dados estatísticos são apresentados em frequência absoluta (F_i), que corresponde ao número total de casos observados, e em frequência relativa (F_r), que permite a comparação dos casos observados perante o universo total de casos. Esta última apresenta-se sobre a forma de percentagem, obtida com recurso à fórmula, $F_R = \frac{F_i}{n} \times 100$

1.2. Distribuição por espécie animal

De acordo com a figura 1, pode-se verificar que os cães foram a espécie observada com mais frequência (N=1083), seguindo-se os gatos (N=442) e, com valores menos expressivos em termos estatísticos, os animais considerados exóticos (N=3), incluindo um coelho, um suíno e um peru.

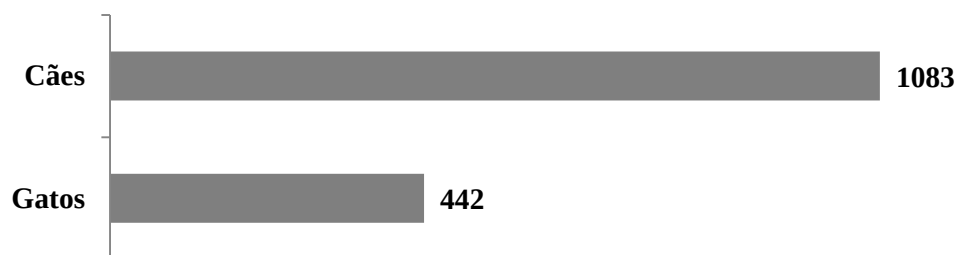


Figura 1 – Distribuição, em valores absolutos, da casuística pelas duas espécies animais mais prevalentes.

1.3. Distribuição por área clínica

A área que se destacou foi a de medicina física e de reabilitação funcional, como se pode constatar na tabela 1, seguindo-se a clínica médica e medicina de urgências, sendo estas duas últimas as áreas de referência do HVA.

Tabela 1 – Distribuição da casuística por área clínica.

Área Clínica	Cão		Gato		Total	
	F _i	F _r [%]	F _i	F _r [%]	F _i	F _r [%]
Clínica Cirúrgica	176	11,54	60	3,93	236	15,48
Clínica Médica	220	14,43	180	11,80	400	26,23
Medicina física e de Reabilitação Funcional	430	28,20	20	1,31	450	29,51
Medicina Preventiva	87	5,70	52	3,41	139	9,11
Medicina Urgências	200	13,11	100	6,56	300	19,67
Total	1113	72,98	412	27,02	1525	100,00

F_i – frequência absoluta; F_r – frequência relativa.

1.3.1. Clínica cirúrgica

Na área da clínica cirúrgica, como verificado na tabela 2, predominaram as cirurgias de tecidos moles, destacando-se as ovariectomias (OVH) e orquiectomias. Procedimentos como nodulectomias e mastectomias foram, também, frequentemente observados.

Relativamente à cirurgia ortopédica, as osteossínteses foram as cirurgias predominantes levadas a cabo pelo Dr. Rui Onça e doutor António Martinho. Em menor número verificaram-se amputações de membros realizadas pela Mestre Ângela Martins. A autora assistiu e colaborou em algumas destas cirurgias.

Tabela 2 – Distribuição da casuística na área da clínica cirúrgica.

Clínica Cirúrgica	Cães	Gatos	Total	
	F_i	F_i	F_i	F_r [%]
Cirurgia Ortopédica	30	6	36	15,25
Cirurgia de Tecidos moles	146	54	200	84,75
Total	176	60	236	100,00

F_i – frequência absoluta; F_r – frequência relativa.

1.3.2. Clínica médica

As especialidades de medicina interna mais relevantes durante o período de estágio, de acordo com a tabela 3, foram a neurologia, seguindo-se a oncologia e ortopedia/músculo-esquelética. A elevada prevalência de casos neurológicos e ortopédicos associa-se ao facto de serem áreas de destaque na medicina física e de reabilitação funcional sendo o HVA/CRAA um local de referência nesta vertente.

Uma grande percentagem dos animais em regime de internamento no CRAA apresentavam-se na fase geriátrica, observando-se, concomitantemente, com doenças neurológicas e/ou ortopédicas, doenças das mais variadas especialidades, destacando-se as alterações ortopédicas e doenças associadas a um estado imunodeprimido, como doenças dermatológicas associadas a *stress* e a factores de internamento no CRAA, bem como, na sua incapacidade motora funcional, nomeadamente piodermatites e lesões cutâneas relacionadas com o decúbito permanente.

Tabela 3 – Distribuição da casuística na área da clínica médica.

Clínica Médica	Cães	Gatos	Total	
	F_i	F_i	F_i	F_r [%]
Neurologia	100	60	160	40,00
Oncologia	80	60	140	35,00
Ortopedia/Músculo-esquelética	20	20	40	10,00
Pneumologia	15	16	31	7,75
Urologia e nefrologia	5	24	29	7,25
Total	220	180	400	100,00

F_i – frequência absoluta; F_r – frequência relativa.

1.3.3. Medicina física e de reabilitação funcional

A medicina física e reabilitação funcional, foi a área que mais se destacou, com o predomínio de lesões ortopédicas/músculo esqueléticas – hérnias de Hansen tipo I e hérnias de Hansen tipo II. Na maioria dos casos, estas foram observadas em localização toracolombar e, deste modo, as lesões de neurónio motor superior (NMS) foram as mais comuns, como se pode constatar na tabela 4.

Tabela 4- Distribuição da casuística na área da medicina física e reabilitação funcional.

Medicina Física e Reabilitação funcional	Cães	Gatos	Total	
	F_i	F_i	F_i	F_R [%]
Neurológico	130	15	145	32,22
Ortopédico/Músculo-esquelético	300	5	305	67,78
Total	430	20	450	100,00

F_i – frequência absoluta; F_r – frequência relativa.

Quanto às modalidades terapêuticas efectuadas, destaca-se a laserterapia classe IV, utilizada no manejo da dor, de lesões de tendões e ligamentos e de feridas tanto superficiais como profundas. Esta terapia apresenta, entre outros, um efeito analgésico, anti-inflamatório e potencia a cicatrização. Outras terapêuticas acompanhadas durante o estágio foram a electromioestimulação (com o objectivo de estimular nervos sensoriais e motores), os ultrasons (com acção biológica tecidual, previne contracturas, melhora a mobilidade articular e reduz a tensão muscular), a magnetoterapia (indicada em casos em que é necessário estimular a regeneração dos tecidos), diatermia com radiofrequência direccionada (permite, não só evitar contracturas, fibroses a nível do sistema músculo-tendinoso, como recuperar fibroses musculares) e as ondas choque (utilizadas para aumentar a mobilidade e reduzir a dor em doentes com displasia da anca, do cotovelo ou osteoartrite).

1.3.4. Medicina preventiva

As consultas de medicina preventiva representam uma área fundamental, quer para a saúde animal, quer para a saúde pública. Esta engloba a vacinação, a desparasitação e a aplicação de identificação electrónica, representando menor casuística, quando comparada com as restantes áreas. Como é possível verificar na tabela 5, de entre as consultas assistidas pela autora, o acto da desparasitação foi o procedimento mais frequente em ambas as espécies.

Tabela 5 – Distribuição da casuística na área da medicina preventiva.

Medicina Preventiva	Cães	Gatos	Total	
	F_i	F_i	F_i	F_R [%]
Desparasitação	54	31	85	61,15
Vacinação	33	21	54	38,85
Total	87	52	139	100,00

F_i – frequência absoluta; F_r – frequência relativa

1.3.5. Medicina de urgência

A abordagem à medicina de urgência, ao longo do período de estágio, foi possibilitada através da elevada casuística observada nesta área, como se pode constatar na figura 2.

As urgências mais relevantes foram as de origem respiratória, bem como traumática (politraumatizados) e neurológica (maioritariamente convulsões), tendo-se, ainda, observado diversos casos de intoxicação e, em menor número, casos de obstrução urinária.



Figura 2 – Distribuição da casuística na área da medicina de urgências.

II. *Anaplasma phagocytophilum*: Repercussão da infecção da fauna silvestre em cães e gatos de uma zona endêmica

1. Introdução

1.1. Agente

Os microrganismos que provocam a Anaplasmosose são bactérias gram negativas, com uma forma cocobacilar a pleomórfica, (de aproximadamente 0,2-1,0µm de diâmetro). Estes são agentes intracelulares obrigatórios que apresentam tropismo para células sanguíneas de vertebrados, no interior das quais formam microcolónias denominadas de mórulas (Dumler *et al.*, 2001; Carrade *et al.*, 2009; Nováková e Víchová, 2010; Diniz & Breitschwerdt, 2012; Silveira *et al.*, 2015;). Estão classificados na família Anaplasmataceae, reconhecendo-se presentemente seis espécies a integrar o género *Anaplasma*: *A. bovis*, *A. centrale*, *A. marginale*, *A. phagocytophilum*, *A. platys* e *A. ovis* (Dumler, *et al.*, 2001; Carrade *et al.*, 2009; Silaghi *et al.*, 2017). *Anaplasma phagocytophilum* destaca-se neste grupo pelo seu potencial zoonótico sendo considerado um agente emergente transmitido por ixodídeos, vulgarmente designados por carraças (Silaghi *et al.*, 2017).

Até 2001, *A. phagocytophilum* pertencia ao género *Ehrlichia* e englobava *E. phagocytophila* - agente da febre da carraça em bovinos, ovinos, caprinos, *E. equi* - agente da Ehrlichiose granulocítica equina e o agente da Ehrlichiose granulocítica humana (agente EGH) (Hodzic *et al.*, 1998; Dumler *et al.*, 2001). A reorganização da classificação taxonómica dos membros da ordem Rickettsiales, em particular da família Anaplasmataceae levou à inclusão destes agentes numa única espécie. Actualmente *A. phagocytophilum* integra como uma espécie única os agentes que anteriormente eram denominados por *E. equi*, *E. phagocytophila* e agente da EGH (Dumler, *et al.*, 2001; Nováková & Víchová, 2010; Woldehiwet, 2010).

Relativamente à patogenia, esta ainda não se encontra perfeitamente esclarecida. Sabe-se que a transmissão de *A. phagocytophilum* ao hospedeiro mamífero, ocorre durante a refeição sanguínea de um ixodídeo infectado, num tempo mínimo de 24 e até 48 horas após a exposição a ixodídeos, disseminando-se o organismo através do sangue ou da linfa. Este é um agente que apresenta tropismo para os leucócitos polimorfonucleados, formando mórulas no

interior de neutrófilos (Diniz & Breitschwerdt, 2012; Silveira *et al.*, 2015). *A. phagocytophilum* possui, também, a capacidade de infectar células endoteliais (Munderloh *et al.*, 2004) e células da linhagem megacariocítica (Granick *et al.*, 2008) Estas últimas poderão servir de reservatórios celulares para a transferência célula a célula e infecção de neutrófilos no sangue periférico (Carrade *et al.*, 2009). O período de incubação pode variar entre uma a duas semanas (Woldehiwet, 2010).

1.2. Epidemiologia

A anaplasmoze granulocítica foi descrita pela primeira vez em 1932, em ovinos na Escócia, associada à parasitação pela carraça *Ixodes ricinus* e descrita, posteriormente, em cavalos, cães, gatos, cabras, camelos e humanos (Gordon *et al.*, 1932). No ano de 1994, nos Estados Unidos da América (EUA), foi diagnosticada pela primeira vez em humanos (Sainz *et al.*, 2015). Actualmente, a anaplasmoze granulocítica é considerada uma doença zoonótica de elevado risco para a saúde pública (Dumler *et al.*, 2001).

A. phagocytophilum tem sido detectado em mamíferos e ixodídeos em praticamente todos os países da Europa. Na Alemanha, é referido como um dos mais importantes agentes zoonóticos transmitidos por ixodídeos (Kohn, 2008). Casos de infecção por este microrganismo têm sido descritos em cães, gatos, asininos, cavalos, pequenos e grandes ruminantes domésticos, humanos (Stuen, 2007; Ebani, *et al.*, 2008; Savidge *et al.*, 2015) e em espécies de animais silváticos (Blanco e Oteo, 2002). O cão e o Homem são considerados hospedeiros acidentais desta espécie (Carrade *et al.*, 2009). A presença de *A. phagocytophilum* foi, também, assinalada em ixodídeos a parasitar aves migratórias o que pode contribuir para aumentar o seu potencial de dispersão e o risco de infecção em animais domésticos e humanos (Leblond *et al.*, 2005; Inokuma, 2007; Stuen, 2007).

A seroprevalência descrita sugere diferente exposição a *A. phagocytophilum*, variando de acordo com a população estudada e área geográfica. Na América do Norte, foram descritas, através do método ELISA, seroprevalências variando entre os 0% e os 55% em cães de oito pequenas cidades do norte da Califórnia (Carrade *et al.*, 2009). A nível Europeu, mais precisamente na Suíça, a pesquisa de anticorpos em 996 cães recorrendo a imunofluorescência indirecta (IFA) indicou uma seroprevalência de 7,5% (Pusterla *et al.*, 1999), enquanto na Alemanha foi de 50,1% (1124 cães em estudo por IFA) (Barutzki *et al.*, 2006).

A doença no Homem é de notificação obrigatória nos EUA desde 1999 e está no *ranking* das 30 mais importantes patologias infecciosas pelo número de casos registados anualmente e declarados ao CDC (do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*). No velho continente o número de casos de Anaplasmosse em humanos é bastante menor, ocorrendo sobretudo nos países da Europa do norte e central, como Eslovénia e Suécia, os estudos de seroprevalência apontam, contudo, para que a infecção humana possa ser mais frequente do que o esperado com base no número de casos de doença, possivelmente como o resultado de infecções assintomáticas ou subclínicas. Em quatro estudos serológicos prospectivos, foram mesmo detectadas seroconversões em 11% dos indivíduos com elevado grau de exposição a ixodídeos, ainda que sem evidência de doença clínica (Santos, 2007). Anticorpos anti-*A. phagocytophilum* têm sido descritos não só em áreas endémicas mas, também, em regiões onde a doença ainda não foi identificada com prevalências a variar 0 a 25% (Santos, 2007). Em Portugal, até à data, ainda não foi descrito nenhum caso de Anaplasmosse Granulocítica Canina (AGC) ou a detecção de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) de *A. phagocytophilum* em cães ou humanos. Num estudo conduzido na região do Algarve, em 55 cães com suspeita de doença transmitida por ixodídeos (DTI) testados por IFA e PCR, 54,5% foram seropositivos e cinco preencheram os critérios serológicos para infecção activa, embora apenas ADN de *A. platys* tenha sido identificado no sangue (Santos *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2009a). Foi, ainda, descrita seropositividade em 31 de 792 humanos (3,9%), por imunofluorescência indirecta, embora não tenha sido confirmado nenhum caso por Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR do inglês *Polimerase Chain Reaction*) ou isolamento do agente (Santos *et al.*, 2009c).

Num estudo decorrido em 366 cães que visitaram 78 clínicas veterinárias distribuídas por Espanha, Itália e Portugal, não foi detectado ADN de *A. phagocytophilum* em nenhuma das amostras obtidas (René-Martellet *et al.*, 2015). Dada a existência de reacções serológicas cruzadas com *A. platys*, torna-se difícil obter uma evidência clara entre a seroprevalência e a exposição de cães a *A. phagocytophilum*, em áreas onde o primeiro é prevalente (Gravino *et al.*, 1997; Dondi *et al.*, 2014).

1.2.1. Vectores

A transmissão de *A. phagocytophilum* está principalmente associada à actividade parasitária de ixodídeos do género *Ixodes*, quer no estado de ninfa, quer no estado de adultos

(Nicholson *et al.*, 2010; Day, 2011). No entanto, estão também descritas outras vias de transmissão da bactéria, como a transmissão perinatal, transfusional e transplante de órgãos no homem (Assi *et al.*, 2007; Kohn *et al.*, 2008; Shields *et al.*, 2015), e a infecção transplacentária em bovinos (Kohn *et al.*, 2008). Recentemente foi descrita a infecção perinatal com *A. phagocytophilum* numa cadela, nos EUA, com fetos mumificados retidos; no entanto, não foi documentada evidência de infecção nos cachorros sobreviventes (Plier *et al.*, 2009).

Nos EUA, os principais vectores de *A. phagocytophilum* são ixodídeos pertencentes à espécie *I. scapularis* e *I. pacificus*. Na Europa, o principal vector pertence à espécie *I. ricinus*, embora na Europa de Leste e Ásia, o papel preponderante seja atribuído à espécie *I. persulcatus* (Inokuma 2007; Foley *et al.*, 2008; Nováková e Víchová, 2010). Em Portugal foram identificadas variantes de *A. phagocytophilum* em *I. ricinus* e *I. ventalloi* (Santos *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2009d). Nováková & Víchová, (2010) demonstraram que, para além do género *Ixodes*, a infecção por *A. phagocytophilum* está, também, associada a outros ixodídeos, nomeadamente *Dermacentor spp.* e *Rhiphicephalus sanguineus*, embora a sua importância epidemiológica esteja, ainda, pouco esclarecida.

A prevalência de *A. phagocytophilum* em *I. ricinus* varia geograficamente e depende da presença de hospedeiros reservatórios. Na Europa, têm sido descritas prevalências entre os 0,4% a 66,7%, tendo a bactéria sido detectada, mais frequentemente, em ixodídeos adultos do que em ninfas. Este facto pode ser explicado pelo ciclo natural da bactéria, em que os principais reservatórios são grandes mamíferos silvestres, considerados reservatórios potenciais para este agente patogénico (Nováková & Víchová, 2010). Outros estudos referem que as taxas de infecção a nível da Europa em *I. ricinus* poderão atingir os 21% em áreas endémicas (Claerebout *et al.*, 2013; Król *et al.*, 2016; Didyk *et al.*, 2017). Em Portugal, num estudo em que foram analisados 2006 ixodídeos recorrendo à PCR, detectaram-se duas espécies portadoras de *A. phagocytophilum*, *I. ricinus* (6/142) e *I. ventalloi* (3/144), constituindo, assim, a primeira evidência da presença do agente no nosso país, tanto na Ilha da Madeira como no continente (Santos *et al.*, 2004). Este trabalho também constituiu o primeiro registo a nível mundial da infecção de ixodídeos da espécie *I. ventalloi* por *A. phagocytophilum*, na região de Setúbal e Santarém. As prevalências de infecção encontradas variaram entre os 0,3% e 10,3% para *I. ricinus* e 2,1% para *I. ventalloi* (Santos *et al.*, 2004; de Carvalho *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009b; Santos *et al.*, 2009c; Santos *et al.*, 2009d; Santos-Silva *et al.*, 2011).

Em Portugal, estão actualmente descritas 11 espécies de *Ixodes*: *I. acuminatus*, *I. arborícola*, *I. bivari*, *I. canisuga*, *I. frontalis*, *I. hexagonus*, *I. inopinatus*, *I. ricinus*, *I. simplex*, *I. ventalloi* e *I. vespertillionis* (Estrada-Peña, 2014; Estrada-Peña, 2017). Destas, *I. ricinus* é o principal ixodídeo encontrado a parasitar o homem, tendo sido também encontrado a parasitar outras 28 espécies animais, incluindo animais de companhia e de interesse pecuário, ocorrendo em todos os distritos do País (Santos-Silva *et al.*, 2011; Santos-Silva *et al.*, 2017). Quanto à segunda espécie associada a *A. phagocytophilum* no nosso país - *I. ventalloi*, não se trata de um ixodídeo tão frequente como o anterior, embora já tenha sido descrito em 12 espécies animais, incluindo animais de companhia (principalmente gatos) e também no Homem (Santos-Silva *et al.*, 2011; Santos-Silva *et al.*, 2017).

À semelhança dos outros ixodídeos, os membros do género *Ixodes* apresentam um ciclo de vida constituído por quatro formas evolutivas: ovo, larva, ninfa e adultos (machos e fêmeas). Após a eclosão, a larva só evolui para ninfa e desta para adulto após a ingestão de sangue, com a realização de uma única refeição em cada uma das fases e à qual se segue um período de metamorfose, designado de muda ou ecdise. Nas formas adultas os machos podem ingerir uma pequena quantidade de sangue ou nem sequer se alimentar morrendo após o acasalamento. Por seu turno as fêmeas fecundadas ingerem uma grande quantidade de sangue, importante para a maturação dos ovos, soltando-se do hospedeiro para realizar a postura no solo morrendo em seguida. Embora não esteja totalmente esclarecido se ocorre transmissão de *A. phagocytophilum* por via transovárica, ou seja da fêmea para os seus ovos, esta hipótese é apontada como pouco provável (McQuiston, *et al.*, 2003). Deste modo, as larvas ou as ninfas só serão infectadas ao ingerirem sangue de animais infectados transmitindo, assim, a bactéria aos estadios sucessivos (ninfa e adulto), denominando-se este processo por transmissão transestadial. Desta forma, para que seja perpetuado o ciclo de transmissão de *A. phagocytophilum* na natureza, é necessário a existência de hospedeiro reservatório (Rizolli *et al.*, 2014).

O clima é um factor importante na distribuição espacial e temporal dos vectores e agentes patogénicos, verificando-se que as alterações climáticas têm um impacto importante na ecologia das populações de vectores, provocando uma variação na incidência e uma alteração na sazonalidade das doenças associadas aos mesmos (Santos-Silva *et al.*, 2011). Em Portugal, *I. ricinus* adultos podem estar activos todo o ano, em especial durante o Outono/Inverno, enquanto as formas imaturas (larvas e ninfas) têm maior actividade na Primavera/Verão (Santos-Silva *et al.*, 2018).

1.2.2. Reservatórios

Os animais silvestres podem albergar uma elevada densidade de artrópodes/ixodídeos que podem transmitir vários agentes patogénicos, entre eles, vírus, bactérias e parasitas. Além da sua importância na área da veterinária, muitos desses agentes podem também afectar a população humana, como resultado do seu potencial zoonótico. Assim, a gestão desta situação exige uma abordagem de Saúde Única (do inglês, *One Health*), tornando-se fundamental o aumento da consciencialização sobre a sua presença, não só a médicos veterinários mas à população em geral (Dantas-Torres, 2012).

Pensa-se que os hospedeiros/reservatórios de *A. phagocytophilum*, possam variar de acordo com a área geográfica, assim como a incidência do agente e o seu potencial patogénico. Esta variação está directamente relacionada com a estirpe ou variante de *A. phagocytophilum*, com a sua capacidade de adaptação ao reservatório/hospedeiro e com os vectores presentes em dada área (Woldehiwet, 2010).

Existem evidências de que *A. phagocytophilum* pode ser introduzido em novas zonas através das aves migratórias ou espécies autóctones como referido no estudo de Leblond *et al.* (2005). Segundo este autor, pequenos canais ou fossas e zonas húmidas, podem tornar-se favoráveis à concentração de aves e introdução dos ixodídeos por estas transportados, promovendo também o contacto destes últimos com outros animais (como roedores, cavalos e pequenos mamíferos reservatórios acidentais) estabelecendo assim novos ciclos do agente.

Os ungulados e roedores silváticos são considerados hospedeiros e, simultaneamente, reservatórios de *A. phagocytophilum* (Nováková & Víchová, 2010). Os ruminantes domésticos são susceptíveis à doença, ocorrendo esta, mais frequentemente, em pequenos ruminantes na Ásia e na Europa (Lillini *et al.*, 2006; Matsumoto *et al.*, 2006; Ebani *et al.*, 2008). Estes animais tornam-se persistentemente infectados, podendo ter um papel importante enquanto hospedeiros reservatórios (Matsumoto *et al.*, 2006), à semelhança dos javalis que, apresentam infecções assintomáticas por *A. phagocytophilum* tornando-se persistentemente infectados (de la Fuente, 2012; Galindo *et al.*, 2012).

Em Portugal foi detectada seropositividade em roedores *Mus spretus* (Santos *et al.*, 2009b), prevalência de infecção num lagarto *Teira dugesii* (de Sousa *et al.*, 2012) e em veados vermelhos *Cervus elaphus*, com uma estirpe idêntica à encontrada anteriormente em roedores europeus e asiáticos (Pereira *et al.*, 2016). Nos javalis (*Sus scrofa*) têm sido descritas taxas de infecção, detectadas por PCR, variando entre 6,2% a 14,3% no Japão e em países europeus (Strasek *et al.*, 2009; Masuzawa *et al.*, 2011; Michalik *et al.*, 2012; Kiss *et al.*, 2014;

Nahayo *et al.*, 2014; Silaghi *et al.*, 2014). *A. phagocytophilum* tem sido descrito com baixa prevalência em javalis na República Checa (Hulinska, 2004) e na Eslovénia confirmados pela técnica molecular PCR *nested* (Strasek *et al.*, 2009). Recentemente, foi detectada, por PCR, na Polónia uma prevalência de 12% em javalis (Michalik, 2012). As sequências de *A. phagocytophilum* encontradas em javalis, na Eslovénia e na Polónia, foram idênticas às sequências associadas a casos clínicos humanos e encontradas em *I. ricinus* (Strasek *et al.*, 2009; Michalik *et al.*, 2012).

O incremento das populações silvestres, com o consequente favorecimento do contacto entre animais silvestres, animais domésticos e a população humana, determina um maior risco de doenças zoonóticas e doenças associadas a vectores, nomeadamente ixodídeos, representando um desafio à implementação de medidas de vigilância e de controlo (Gortázar *et al.*, 2007). Devido ao seu número crescente, os javalis causam sérias perdas económicas, havendo um risco de disseminação de várias doenças (Laddomada, 2000). Na região da Arrábida, a população de javalis tem vindo a aproximar-se das zonas peri-urbanas e urbanas, com o intuito de procurar água e alimentos, aumentando assim o potencial risco de doenças zoonóticas (Apêndice II).

1.3. Sinais Clínicos

A maioria dos cães naturalmente infectados por *A. phagocytophilum* não apresenta sinais clínicos ou apresenta, apenas, uma doença de carácter auto-limitante (Carrade *et al.*, 2009). Entre os sinais clínicos mais frequentemente observados, incluem-se a letargia e hipertermia, ocorrendo geralmente após um período de incubação de uma a duas semanas (Greig *et al.*, 1996; Poitout, 2005; Kohn, 2008; Carrade *et al.*, 2009; Berzina & Matise, 2013). Inapetência, depressão, anorexia, mucosas pálidas associadas a anemia e sinais músculo-esqueléticos, nomeadamente relutância ao movimento, ataxia, dor articular e claudicação são, igualmente, sinais clínicos não específicos da doença frequentemente observados (Greig *et al.*, 1996; Egenvall *et al.*, 2000; Poitout *et al.*, 2005; Kohn *et al.*, 2008; Carrade *et al.*, 2009; Dondi *et al.*, 2014). A claudicação, por vezes, é resultado da poliartrite neutrofílica, apresentando o animal edema das articulações, presença de dor e rigidez muscular de um ou múltiplos membros (Greig *et al.*, 1996; Egenvall *et al.*, 1997; Pusterla, 1999; Cardoso *et al.*, 2012). Podem ser, ainda, registados com menor frequência tosse ligeira não produtiva, uveíte, polidipsia, sinais gastrintestinais como vómitos e diarreia, esplenomegalia, hepatomegalia,

linfadenomegalia e hemorragias manifestadas através de petéquias, epistáxis, hematúria, melena e mucosas pálidas (Greig *et al.*, 1996; Pusterla, 1999; Egenvall *et al.*, 2000; Lester, 2005; Poitout, 2005; Kohn, 2008; Cockwill, 2009; Silaghi *et al.*, 2011). Os sinais neurológicos são incomuns, embora já tenham sido descritas convulsões, ataxia, défices proprioceptivos e disfunção do sistema nervoso que poderão não estar directamente relacionados com anaplasmosse, mas sim com outra doença concomitante (Greig *et al.*, 1996; Egenvall *et al.*, 2000; Cockwill, 2009).

Em gatos, os primeiros casos descritos apresentaram-se com quadros de letargia, anorexia, hipertermia e desidratação, incluindo nas alterações laboratoriais neutrofilia e linfopenia (Greig *et al.*, 1996; Kohn, 2008; Carrade *et al.*, 2009; Granick, 2009; Lappin *et al.*, 2015). Em alguns casos mais graves da doença, para além da anemia hemolítica imunomediada secundária e trombocitopenia imunomediada, pode desenvolver-se meningite e endocardite (Bexfield, 2005). Estes sinais clínicos podem ser acompanhados por alterações hematológicas e bioquímicas, tais como trombocitopénia, anemia, leucopénia, hipoalbuminemia, hipoproteínemia, hiperglobulinémia, hiperbilirrubinémia e aumento da actividade sérica das enzimas hepáticas (Dumler, 2001; Kohn, 2008; Carrade *et al.*, 2009) e da fosfatase alcalina (Greig, 1996; Kohn, 2008).

A doença causada em humanos, cada vez mais reconhecida globalmente, (Ybañez e Inokuma, 2016) denomina-se por Anaplasmosse Granulocítica Humana e manifesta-se como uma síndrome febril inespecífica após mordida do ixodídeo infectado. Em geral, os doentes apresentam hipertermia, dor de cabeça e mialgias generalizadas (Stuen *et al.*, 2013). A maior parte das infecções em humanos resulta numa infecção ligeira ou sem manifestações clínicas. Como mencionado anteriormente estes casos ocorrem sobretudo nos EUA e registam uma taxa de hospitalização de 36%, dos quais 7% necessitam de cuidados intensivos, embora a taxa de letalidade seja inferior a 1%. (Stuen *et al.*, 2013). A transmissão nosocomial de *A. phagocytophilum* foi descrita na China, embora seja, ainda, controversa (Zhang *et al.*, 2008; Silaghi *et al.*, 2017). Em Portugal, em humanos, foi descrita, através do método de imunofluorescência indirecta, seropositividade em 31 de 792 humanos, correspondendo a 3,9% embora ainda não tenham sido confirmadas infecções activas (Santos *et al.*, 2009c).

1.4. Diagnóstico

Existem vários métodos laboratoriais directos e indirectos utilizados no diagnóstico das patologias associadas a vectores, neste caso concreto infecções por *A. phagocytophilum*.

Os métodos laboratoriais directos e conforme resumidos no trabalho de Silaghi *et al.* (2017) baseiam-se: i) na visualização de mórulas *A. phagocytophilum* por microscopia óptica (com a análise de esfregaços do concentrado leucocitário, do inglês, *buffy coat*, obtido de amostras de sangue periférico ou com a análise de amostras de tecidos corados com Romanovsky ou *Giemsa*); ii) no isolamento do agente em cultura celular (com inoculação directa de amostras de *buffy coat* ou de tecidos em linhas celulares de tipo HL60); iii) na detecção de ácidos nucleicos do agente recorrendo à PCR.

Os métodos indirectos baseiam-se na detecção de anticorpos específicos em soro e plasma, recorrendo a técnicas como a imunofluorescência indirecta (IFA, do inglês “*Indirect Immunofluorescent Antibody*”), *Western immunoblot* (WB) e o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA, do inglês “*Enzyme-Linked Immunossorbent Assay*”) (Carrade *et al.*, 2009).

Em termos práticos o diagnóstico deve basear-se na anamnese, na informação sobre a residência do animal em área endémica, a estação do ano em que o vector está mais activo e a presença ou não de ixodídeos, nos sinais clínicos, nas alterações hematológicas, na identificação do agente em neutrófilos circulantes (na fase aguda da doença), na detecção de anticorpos anti- *A. phagocytophilum* e na identificação de ADN do agente por PCR (Pusterla, 1999; Egenvall *et al.*, 2000; Kirtz *et al.*, 2005, Kohn *et al.*, 2011).

Os testes serológicos de ELISA e WB são úteis para a detecção de anticorpos, mas, por rotina, o método de eleição é a IFA (Greig & Armstrong, 2006; Carrade *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2009a). No entanto, este teste apresenta limitações devido a reacções cruzadas, principalmente, entre espécies do mesmo género mas, também, entre *A. phagocytophilum* e *E. canis* (Greig & Armstrong, 2006). A técnica de IFA associada à PCR ultrapassa essa limitação e demonstra a presença de infecção activa (Santos *et al.*, 2009a).

A detecção molecular, por PCR, tem-se revelado bastante útil dada a sua elevada especificidade e sensibilidade, tanto no contexto clínico como de investigação epidemiológica (para identificação de vectores e reservatórios do agente). Esta permite detectar a doença na fase aguda, ainda no período de pré-patência dos anticorpos, possibilitando, também, a identificação específica do agente causal por sequenciação (Carrade *et al.*, 2009; Sainz *et al.*, 2015). Sangue periférico em EDTA é a amostra ideal para a técnica de PCR em animais

sintomáticos (Diniz & Breitschwerdt, 2012; Sainz *et al.*, 2015), No caso dos animais reservatórios assintomáticos, outros órgãos poderão ser mais relevantes, como por exemplo, o baço e o fígado (Silaghi *et al.*, 2017). Entre os alvos moleculares mais usados para a pesquisa de *Anaplasma* spp., destacam-se o 16S rADN (*rrs*), a proteína de choque térmico (*groEL*), a enzima citrato sintase (*gltA*) e proteínas de superfície ou *major surface protein* (*msp2*, *msp4*). Em termos de sensibilidade da técnica, as abordagens que usando genes com cópia múltipla, como os genes que codificam as proteínas de superfície *mps*, são preferíveis aos de cópia única. Para comparação de sequências, as abordagens mais conservadoras ou mediantemente conservadores com base nos genes que codificam 16S rDNA e *groEL* são consideradas a melhor opção. Continuam a ser realizadas reações de PCR em formato convencional e *nested*, embora estas tenham vindo a ser progressivamente substituídas pela PCR em tempo real, menos propensa a contaminação, menos demorada e mais sensível. No entanto, a confirmação adicional de resultados positivos por sequenciação continua a ser requisito indispensável (Silaghi *et al.*, 2017).

1.5. Prevenção e tratamento

A melhor profilaxia destas doenças assenta na utilização de antiparasitários externos em cães e outros animais de companhia, de modo a prevenir e controlar os ectoparasitas, nomeadamente os ixodídeos. Para tal, utiliza-se uma combinação de vários princípios activos como imidaclopride, permetrina, fipronil e (S)-metopreno (Carrade, *et al.*, 2009). Esta prevenção deve ser feita especialmente, nos meses de maior prevalência de ectoparasitas hematófagos, prevenindo a transmissão de *A. phagocytophilum*. (Dantas-Torres, 2008). Os resultados observam-se até 25 dias após a aplicação do antiparasitário (Carrade *et al.*, 2009).

Actualmente, com base em estudos recentes, existe outro princípio activo – Sarolaner –, sob a forma de comprimidos mastigáveis altamente palatáveis, eficaz na prevenção de 10 espécies de artrópodes, incluindo *I. ricinus*, que após administração mantém a sua actividade, pelo menos até cinco semanas. Estudos controlados em laboratório demonstraram, pelo menos, 99,4% de eficácia nas 48 horas após administração de um comprimido por via oral (PO, do latim "*Per Os*") na dose de 2mg/kg (Becskei *et al.*, 2017; Packianathan *et al.*, 2017; Zoetis, 2018).

O tratamento de eleição para a anaplasmose granulocítica em cães consiste na administração de um antibiótico do grupo das tetraciclina, a doxiciclina, na dose de 5 mg/kg,

PO, duas vezes por dia (BID, do latim “*Bis in die*”), com duração de duas semanas, sendo que a maioria dos cães apresenta melhoras clínicas 24 a 48 horas após o início da antibioterapia (Carrade *et al.*, 2009).

Com a presente dissertação pretendeu-se investigar a presença de infecções pelo agente *A. phagocytophilum* e as suas implicações em termos epidemiológicos, uma vez que apresenta elevado risco para a saúde pública.

Este estudo teve como alvo, animais de companhia, com suspeita de doença associada a ixodídeos e residentes em Azeitão, uma das áreas afectadas pelo aumento da população de javalis. A investigação foi complementada com a captura de ixodídeos no PNSA e, ainda, de amostras de javalis obtidas ao abrigo do programa de controlo populacional do ICNF. Nas amostras em estudo foi realizada a pesquisa, por PCR convencional e em tempo real, de ADN bacteriano com o objectivo de investigar as repercussões da infecção da fauna silvestre na sanidade de cães e gatos desta zona endémica.

2. Material e Métodos

2.1. População em estudo

2.1.1. Animais de companhia

No presente estudo foram incluídos animais de companhia que, no período compreendido entre Maio de 2017 e Fevereiro de 2018, visitaram o HVA com sinais clínicos suspeitos de doença associada a ixodídeos.

Como critérios clínicos de inclusão consideraram-se a hipertermia, mucosas pálidas com associação a anemia, distúrbios gastrintestinais, acompanhados de diarreia com ou sem presença de sangue, vômitos, anorexia e hemorragias nasais uni ou bilaterais. Foram, ainda, incluídos animais com alteração dos parâmetros sanguíneos tais como diminuição quantitativa das plaquetas e dos leucócitos. Como critérios epidemiológicos de inclusão consideraram-se a exposição a ixodídeos, o local de habitação do animal, quando exclusivamente no exterior ou no interior de uma habitação mas com acesso ao exterior, e/ou eventuais passeios em localidades da região do PNSA, onde se verifica a presença de javalis.

De cada animal incluído no estudo foi obtida uma amostra de sangue total. A colheita foi realizada por punção da veia cefálica ou jugular e, mais raramente, da veia femoral em casos de animais hipotensos, de acordo com a rotina hospitalar. A amostra de sangue foi de imediato transferida para tubos com anticoagulante EDTA, devidamente identificados com a espécie, nome do animal, data da colheita, código numérico e conservada a -20°C até se proceder à extracção de ADN.

Os animais em estudo foram, ainda, inspeccionados para a presença de ixodídeos. Todos os espécimes removidos foram colocados em tubos secos, devidamente identificados com o nome e código numérico do animal e armazenados como anteriormente descrito até serem processados.

Todas as colheitas foram realizadas no âmbito da avaliação laboratorial de rotina ou para diagnóstico de doença, tendo as amostras de sangue sido, posteriormente, utilizadas para este estudo, mediante obtenção de consentimento informado dos tutores. Para cada animal, no momento da colheita de sangue, foi, também, feito o preenchimento de um formulário com dados epidemiológicos (Apêndice I).

Este procedimento foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal da FMV-ULHT.

2.1.2. Javalis

Foram, considerados neste trabalho javalis abatidos em igual período no PNSA, por caçadores autorizados pelo Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF). Para o estudo foram utilizadas amostras de baço e fígado, recolhidas no dia seguinte ao abate dos animais, durante a sua evisceração. As amostras recolhidas foram acondicionadas em tubos secos, devidamente identificadas e separadas por indivíduo e natureza da amostra. Todo este material biológico foi conservado, preferencialmente, a -20°C (embora não seja possível garantir que esta condição tenha sido sempre assegurada) e transportado, tão breve quanto possível, para o laboratório do CEVDI, onde foi conservado a -80°C até à extracção de ADN.

À semelhança dos animais de companhia, todos os javalis capturados foram inspeccionados para a presença de ixodídeos. Todos os espécimes removidos foram colocados em tubos secos, devidamente identificados com o código numérico do animal, datados e armazenados com as restantes amostras biológicas, até encaminhamento para o laboratório. No CEVDI, foram conservados a -20°C até processamento.

2.1.3. Ixodídeos

Relativamente aos ixodídeos, estes foram obtidos em duas fases distintas: na fase parasitária e na fase de vida livre.

Os ixodídeos em fase parasitária foram obtidos dos animais que se apresentaram no HVA e que satisfizeram os critérios de inclusão, bem como de javalis capturados na área em estudo, como já descrito anteriormente.

Os ixodídeos em fase de vida livre foram capturados na área do PNSA, em nove locais seleccionados, preferencialmente em zonas peri-urbanas frequentadas por javalis e onde ocorre a espécie *I. ricinus*, vector principal de *A. phagocytophilum*.

A colheita foi executada recorrendo ao método da bandeira que corresponde ao arrastamento de um pano turco branco com 1x1 m na vegetação herbácea mais alta (“*Flagging*”) ou na vegetação rasteira que ocorre ao nível do solo (“*Dragging*”). Esta técnica

combinada permite capturar todas as fases de desenvolvimento dos ixodídeos desde os imaturos (larvas e ninfas) aos adultos (macho e fêmeas).

Os ixodídeos capturados na fase de vida livre foram, mantidos em tubos secos, devidamente identificados, separados por área geográfica e processados no dia posterior à captura.

Todos os ixodídeos incluídos neste estudo foram identificados ao género pela autora, com base nas características morfológicas externas, baseando-se em chaves pré-existentes (Estrada-Peña *et al.*, 2017). A identificação específica foi, posteriormente, confirmada pela entomologista responsável do CEVDI, Doutora Margarida Santos Silva.

2.2. Extracção de ADN total

2.2.1. Extracção de ADN de sangue total de animais de companhia

O ADN foi extraído a partir das amostras de sangue total usando o “ISOLATE II Genomic ADN Kit” (Bioline[®]), de acordo com as instruções do fabricante, a seguir descritas:

- 1 - Pipetaram-se 100 µL de tampão PBS, 25 µL de Proteinase K, 200 µL de tampão de lise G3 e 100 µL de sangue total para um microtubo de 1,5 mL devidamente identificado;
- 2 - Incubou-se a amostra a 70°C em banho-maria (Precistern, P-selecta[®]), durante 15 minutos. De seguida, homogeneizou-se no vortex (Mixer, Citomed Labnet Internacional, Inc.) durante 15 segundos e efectuou-se um *short-spin* numa centrífuga (Galaxy, 14D, VWR[®]), para arrastar quaisquer gotículas existentes na tampa antes de abrir o tubo;
- 3 - Adicionaram-se 210 µL de etanol (96-100%) à amostra, agitou-se no vortex durante 15 segundos e efectuou-se novo *short-spin* da amostra na centrífuga;
- 4 - Transferiu-se todo o volume da amostra para a Spin Column D, coluna que é fornecida pelo fabricante associada a um tubo colector, centrifugou-se a 13.000 *g*, durante 1 minuto, e descartou-se o filtrado, reutilizando o tubo colector;
- 5 - De seguida, adicionaram-se 500 µL de tampão GW1 e centrifugou-se a 13.000 *g*, durante 1 minuto, e descartou-se novamente o filtrado, reutilizando o tubo colector;
- 6 - Adicionaram-se 600 µL de tampão GW2, centrifugou-se a 13.000 *g*, durante 1 minuto, descartou-se o filtrado e reutilizou-se o tubo colector;

- 7 - De seguida, centrifugou-se durante 1 minuto a 13.000 *g* para remover etanol residual. A coluna foi, então, transferida para um novo tubo de 1,5 mL e o ADN foi eluído em 100 μ L de água destilada pré-aquecida, após incubação à temperatura ambiente, durante 1 minuto, e posterior centrifugação a 13.000 *g*, durante 1 minuto;
- 8 - Descartou-se a coluna e acondicionou-se o microtubo contendo o ADN eluído a -20°C até realização do PCR.

2.2.2. Extracção de ADN de tecidos de javalis

O ADN foi extraído a partir de amostras de baço e fígado de javalis usando o “DNeasy Blood & Tissue” (Qiagen®), de acordo com as instruções do fabricante a seguir descritas:

- 1 - Numa câmara de fluxo laminar (Faster BH-EN 2004), cortaram-se fragmentos de baço e fígado de pequenas dimensões (de aproximadamente 25 mg) e colocaram-se em tubos de 1,5 mL devidamente identificados;
- 2 - Adicionaram-se 180 μ L de tampão ATL, 40 μ L de Proteinase K e homogeneizou-se a amostra no vórtex, durante 15 segundos, com posterior *short-spin*;
- 3 - Realizou-se uma incubação a 56°C, durante a noite, para garantir a lise total dos tecidos, recorrendo à utilização de um termobloco (Grant Boekel);
- 4 - Homogeneizou-se a amostra no vórtex, durante 15 segundos, com posterior *short-spin* e adicionaram-se 200 μ L de tampão AL;
- 5 - Homogeneizou-se, novamente, no vórtex com posterior *short-Spin* e adicionaram-se 200 μ L de etanol (96-100%);
- 6 - Voltou a homogeneizar-se a amostra no vórtex, com posterior *short-spin* e pipetou-se a totalidade do volume para a coluna “DNeasy Mini Spin”, coluna, fornecida pelo fabricante, associada a um tubo colector de 2 mL;
- 7 - Centrifugou-se, durante 1 minuto, a ≥ 6.000 *g* e descartou-se o filtrado e o tubo colector, colocando a coluna num novo tubo colector de 2 mL;
- 8 - Adicionaram-se 500 μ L de tampão AW1 e centrifugou-se, durante 1 minuto, a ≥ 6.000 *g*, reutilizando o tubo colector após descartar o filtrado;
- 9 - Adicionaram-se 500 μ L de tampão AW2, centrifugou-se, durante 3 minutos, a 20.000 *g* e descartou-se o filtrado e o tubo colector;

- 10 - Colocou-se a coluna “DNeasy Mini spin” em novo tubo de 1,5 mL correctamente identificado. O ADN foi eluído em 100 µL de tampão AE, após incubação à temperatura ambiente, durante 1 minuto, e posterior centrifugação a $\geq 6.000\text{ g}$, durante 1 minuto;
- 11 - Descartou-se a coluna e acondicionou-se o tubo contendo ADN eluído a -20°C até realização do PCR.

2.2.3. Extracção de ADN de ixodídeos

Antes de proceder à extracção de ADN, a superfície exterior dos ixodídeos foi descontaminada por imersão em álcool iodado (1g de iodo sublimado para 500 mL de etanol), durante 5 minutos, passagem em água destilada estéril, durante 5 minutos e secagem em papel de filtro estéril. Os artrópodes foram, então, colocados em microtubos de 1,5 mL, devidamente identificados e processados individualmente, usando o método de hidrólise de amónia descrito por Schouls *et al.* (1999), de acordo com o seguinte protocolo:

- 1 - Na hotte química (Cruma, Alfagene®) preparou-se uma solução de hidróxido de amónia 1,25% (9 mL de água destilada ultra pura DNase free + 1 mL de amónia 25%);
- 2 - Distribuíram-se 100 µL de solução de hidróxido de amónia 1,25% por cada tubo contendo um ixodídeo;
- 3 - Os tubos foram tapados, sujeitos a *short-spin* para garantir a completa imersão dos ixodídeos na solução de amónia e colocados num termobloco (Grant Boekel) a 100°C , durante 20 minutos;
- 4 - De seguida, arrefeceram-se os tubos colocando-os em gelo moído e foi realizado um *short-Spin* para remoção das gotículas existentes na tampa;
- 5 - Abriram-se os tubos e colocaram-se, novamente, no termobloco (Grant Boekel) a 90°C , durante 20 minutos, para evaporar a amónia;
- 6 - Por fim, guardaram-se os tubos contendo ADN a 4°C até realização do PCR. Depois de testado o ADN as amostras foram conservadas a -20°C .

2.3. Avaliação da qualidade do ADN extraído

2.3.1. Avaliação da integridade física do ADN extraído das amostras de cão, ixodídeos e javalis

A integridade física do ADN genómico extraído foi avaliada por electroforese em gel agarose a 0,8% (m/v), em tampão Tris-Borato (90mM) - EDTA (2mM), pH 8,3 (TBE 1x), num sistema de electroforese horizontal (Enduro Horizontal Gel Box-Electrophoresis, Labnet[®]), de acordo com o procedimento a seguir descrito:

- 1- Para preparar um gel com 100 mL, numa balança técnica (EK-600H, AND[®]), pesaram-se para um erlenmeyer 0,8 g de agarose (SeaKem[®] LE Agarose, Lonza[®]);
- 2- De seguida, adicionaram-se 100 mL de tampão TBE 1x;
- 3- De seguida, montou-se o suporte do gel e inseriram-se os pentes para criar os poços no gel de agarose;
- 4- A solução preparada em 2) foi levada ao micro-ondas (700 watts) o tempo necessário para garantir a completa fusão da agarose, observada como um líquido homogéneo e de aspecto translúcido;
- 5- Antes de verter a solução para o suporte, arrefeceu-se agitando o erlenmeyer debaixo de água corrente e adicionou-se GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium) ao gel de agarose, numa proporção de 0,42 µL/100 mL de gel;
- 6- Colocou-se a solução de agarose no suporte e aguardou-se a sua polimerização. Concluída a polimerização, o gel foi colocado numa tina de electroforese;
- 7- Colocou-se o tampão TBE 1x na tina de electroforese até cobrir completamente os poços do gel;
- 8- Prepararam-se as amostras a aplicar nos poços do gel adicionando-se a 10 µL de ADN, 2 µL de *loading buffer* [glicerol 30% (m/v) e azul de bromofenol 0,25% (m/v)];
- 9- Após aplicação das amostras nos poços do gel, ligou-se a fonte de alimentação (Pharmacia LKB-GPS 200/400) e realizou-se a electroforese a 100 volts (V), durante 60 minutos.
- 10- Depois de concluída a migração, observou-se a integridade do ADN num transiluminador UV (AlfaGene[®]), por emissão de fluorescência do GelRed. O

ADN foi considerado íntegro quando era observável uma única banda de elevado peso molecular.

2.3.2. Avaliação da presença de inibidores nas amostras de ADN

Neste trabalho foram usados alvos moleculares específicos para cada grupo animal, com o intuito de averiguar a presença de eventuais inibidores nas amostras de ADN em estudo. A única excepção foram as amostras de javalis, grupo animal para o qual não existia protocolo padronizado em nenhum dos laboratórios envolvidos.

2.3.2.1. Amplificação por PCR de um fragmento do gene β -actina canina

A ausência de inibidores nas amostras de ADN de cão foi avaliada por PCR convencional através da amplificação de um fragmento com cerca de 300-bp do gene da β -actina canina (Maia *et al.*, 2010).

Por cada amostra em teste foi preparada uma mistura reaccional com um volume final de 25 μ L, contendo 1x MyTaq Reaction Buffer (Bioline[®]), que contém 1 mM da mistura de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTP's) e 3 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$), 1U de MyTaq DNA Polimerase (Bioline[®]), 10 pmol de cada *primer*, *forward* (β -ACT- Fw) e *reverse* (β -ACT- Rev), 5 a 10 μ L ADN genómico (até 100 ng de ADN) e água desionizada estéril até perfazer o volume final. Em cada reacção de PCR realizada, foram preparados e incluídos um controlo positivo e um controlo negativo. Os *primers* utilizados e a sua sequência estão descritos na tabela 6.

A reacção de PCR foi efectuada num termociclador Rotor Gene-Q series. (QUIAGEN[®]), de acordo com as condições apresentadas na tabela 7.

Tabela 6 - Sequência de *primers* utilizados na amplificação do gene da β -actina (Maia *et al.*, 2010).

<i>Primers</i>	Sequência (5'→3')
β -ACT- Fw	TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA
β -ACT- Rev	CTA GAA GCA TTG CGG TGG ACG ATG GAG GG

Tabela 7- Condições da reacção de PCR para amplificação de um fragmento do gene da β -actina.

	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	7 minutos	1 ciclo
Desnaturação	94°C	30 segundos	
Ligação dos <i>primers</i> /Annealing	66°C	30 segundos	30 ciclos
Extensão	72°C	30 segundos	
Extensão Final	72°C	7 minutos	1 ciclo

A visualização dos produtos de PCR foi feita submetendo 10 μ L dos mesmos a electroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v), de acordo com o procedimento descrito em 2.3.1.

2.3.2.2. Amplificação por PCR de um fragmento do gene 12S rADN de Ixodídeos

A ausência de inibidores nas amostras de ADN de ixodídeos foi avaliada por PCR convencional com a amplificação de um fragmento de 360-bp do gene 12S rADN destes artrópodes (Beati e Keirans, 2001). Em alguns casos, esta técnica permitiu, também, fazer a confirmação molecular da identificação específica, após sequenciação dos produtos de PCR (técnica descrita mais à frente).

Por cada amostra em teste foi preparada uma mistura reaccional com um volume final de 25 μ L contendo, 1x TaqMaqster (5Prime), 1x Taq Buffer com Mg^{2+} , 0,6 mM de Cloreto de magnésio ($MgCl_2$), 0,2 mM de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTP's), 1 μ M de cada *primer*, *forward* (T1B) e *reverse* (T2A), 1,25 U de Taq DNA polimerase (5Prime), 2,5 a 5 μ L ADN mitocondrial (até 150 ng de ADN), perfazendo o volume total com água desionizada estéril. Em cada reacção de PCR realizada, foram preparados e incluídos um controlo positivo e um controlo negativo. Os *primers* utilizados e a sua sequência, estão descritos na tabela 8.

A reacção de PCR foi efectuada num termociclador Rotor Gene-Q series. (QUIAGEN®), de acordo com as condições apresentadas na tabela 9.

A visualização dos produtos de PCR foi feita submetendo 10 µL dos mesmos a electroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v), de acordo com o procedimento descrito em 2.3.1.

Tabela 8- Sequência dos *primers* utilizados na amplificação do gene 12S rADN (Beati e Keirans, 2001).

Primers	Sequência (5'→3')
T1B	AAACTAGGATTAGATACCCT
T2A	AATGAGAGCGACGGGCGATGT

Tabela 9- Condições da reacção de PCR para amplificação de um fragmento do gene 12S rADN.

	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	94°C	5 minutos	1 ciclo
Desnaturação	94°C	15 segundos	
Ligação dos <i>primers</i> /Annealing	51°C	30 segundos	5 ciclos
Extensão	68°C	30 segundos	
Desnaturação	94°C	15 segundos	
Ligação dos <i>primers</i> /Annealing	53°C	30 segundos	25 ciclos
Extensão	70°C	30 segundos	
Extensão Final	70°C	5 minutos	1 ciclo

2.4. Detecção molecular de ADN de *Anaplasma spp.*

Para a detecção de ADN de *A. phagocytophilum* nas amostras de sangue dos cães, nos ixodídeos e nos tecidos de javali em estudo, foi realizado uma PCR convencional genérica complementada por uma PCR em tempo real específica. A primeira, embora menos sensível, é mais abrangente, amplificando ADN de microrganismos pertencentes aos géneros

Anaplasma e *Ehrlichia* (doravante mencionado como PCR *Anaplasma/Ehrlichia*). A segunda é muito sensível e específica, amplificando, apenas, ADN de *A. phagocytophilum*.

A obtenção de amostras positivas na PCR *Anaplasma/Ehrlichia* pressupõem a sua posterior sequenciação, de forma a identificar a espécie do agente amplificado.

De modo a evitar contaminações das amostras com aerossóis de ADN exógeno, procedeu-se à higienização com lixívia a 10% das bancadas e do material a utilizar antes de cada análise de PCR convencional e em tempo real, nomeadamente micropipetas automáticas, suportes e a superfície exterior de mini centrífugas. De seguida, todos os materiais a utilizar, foram submetidos a luz UV, numa câmara de fluxo laminar Bio48M (Faster®), durante 20 minutos.

Sempre que possível usaram-se pontas com filtro e salas adstritas a cada fase do procedimento do PCR (preparação da mistura reaccional, adição do ADN em estudo, reacção de amplificação e electroforese).

2.4.1. PCR convencional para *Anaplasma/Ehrlichia*

Para a detecção de organismos pertencentes aos géneros *Anaplasma* e *Ehrlichia*, como mencionado anteriormente, realizou-se a técnica de PCR convencional nas amostras de sangue total de cães, nos ixodídeos e nos tecidos de javalis, tendo como alvo molecular um fragmento de, aproximadamente, 430-bp do gene 16S rADN (Maggi *et al.*, 2006).

Por cada amostra em teste foi preparada uma mistura reaccional com um volume total de 25 µL, contendo 1x Mytaq Reaction Buffer (Bioline®), 12 pmol de cada *primer*, *forward* (GEPs) e *reverse* (GEPas), 1 U de Mytaq ADN polimerase (Bioline®), 5 a 10 µL (até 150 ng de ADN) e água desionizada estéril até perfazer o volume final. Para cada uma das reacções de PCR realizadas foram preparados e incluídos um controlo positivo e um controlo negativo.

Os *primers* utilizados e a sua sequência encontram-se descritos na tabela 10.

Tabela 10- Sequência de *primers* utilizados na amplificação do gene 16S rADN (Maggi *et al.*, 2006).

<i>Primers</i>	<i>Sequência (5'→3')</i>
GEPs	CTG GCG GCA AGC YTA ACA CAT GCA AGT CGA ACG GA
GEPas	CTT CTR TRG GTA CCG TCA TTA TCT TCC CYA YTG

A reacção de PCR convencional foi realizada num termociclador Rotor Gene-Q series, (QUIAGEN®), de acordo com as condições apresentadas na tabela 11.

Tabela 11- Condições da reacção de PCR para amplificação de um fragmento do gene 16S rDNA de *Anaplasma spp.*.

	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	10 minutos	1 Ciclo
Desnaturação	94°C	15 segundos	55 Ciclos
Ligação dos primers/ <i>Annealing</i>	60°C	15 segundos	
Extensão	72°C	15 segundos	
Extensão final	72°C	1 minuto	1 Ciclo

A visualização dos produtos de PCR foi feita de submetendo 10 µL dos mesmos a electroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v), de acordo com o procedimento descrito em 2.3.1.

2.4.2. PCR em tempo real para *A. phagocytophilum*

Todas as amostras voltaram a ser testadas pela técnica de PCR em tempo real, tendo como alvo molecular um fragmento de 77-bp do gene *msp2* (Courtney *et al.*, 2004).

Por cada amostra em teste foi preparada uma mistura reaccional com um volume final de 20 µL, contendo 1x LightCycler FastStart Taqman Master, 10 µM de cada *primer*, *forward* (ApMSP2F) e *reverse* (APMSP2R), 4 µM da sonda ApMSP2P, 5 µL de ADN (até 150 ng de ADN) e água desionizada estéril até perfazer o volume total.

Neste protocolo, a mistura reaccional foi distribuída por capilares de vidro, que foram posteriormente, selados e centrifugados (5415 R Labmetro, Eppendorf®) a 800 *g* durante 5 segundos antes da sua colocação no termociclador LightCycler 2.0 (Roche). Em cada reacção de PCR realizada, foram preparados e incluídos um controlo positivo e um controlo negativo. Os *primers* utilizados e a sua sequência, estão descritos na tabela 12. Considerou-se como critério de positividade um ponto de intersecção (CP, do inglês “Crossing Point”) menor ou igual a 37, sendo considerada suspeita uma amostra com um CP entre 37 e 40.

Tabela 12- Sequência de *primers* utilizados na amplificação do gene *msp2* (Coutney *et al.*, 2004).

Primers	Sequência (5'→3')
ApMSP2F	ATGGAAGGTAGTGTGTTGTTATGGTATT
ApMSP2R	TTGGTCTT GAAGCGCTCGTA
ApMSP2P *	TGGTGCCAGGGTTGAGCTTGAGATTG

*Sonda marcada na terminação 5'- 3' com FAM - TAMRA

Tabela 13- Condições da Reacção de PCR em Tempo Real.

	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Pré-incubação	50°C	2 minutos	1 Ciclo
Incubação	95°C	15 minutos	1 Ciclo
Amplificação			
Desnaturação	95°C	15 segundos	
Ligação dos <i>primers</i> / <i>annealing</i>	60°C	35 segundos	45 ciclos
Extensão	72°C	1 segundo	
<i>Cooling</i>	40°C	30 segundos	1 ciclo

A temperatura de transição foi de 20°C/segundo, seleccionando-se a quantificação como modo de análise apenas na etapa da amplificação sendo a leitura da fluorescência efectuada no final de cada ciclo (*aquisition mode: single*)

2.5. Purificação e sequenciação dos produtos de PCR

Para a purificação do ADN alvo adicionaram-se 2 µL de Exosap, 5 µL de produto de PCR em cada microtubo, homogeneizou-se a amostra com *short spin* e incubou-se no termociclador, de acordo com as condições descritas na tabela 14.

Tabela 14- Condições da purificação dos produtos de PCR

	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Incubação	37°C	15 minutos	1 ciclo
	80°C	15 minutos	

Os produtos de PCR assim purificados, foram submetidos à reacção de sequenciação pelo método de Sanger. Por cada amostra em teste foram preparadas duas misturas reaccionais (uma para o primer *forward* e outra para *reverse*) com um volume total de 10 µL contendo 1x de tampão do Bigdye, 0,7 µL de Bigdye, 10 µM de um dos *primers* do par, 1 a 5 µL de produto de PCR (até 150 ng de ADN) e água desionizada estéril até perfazer o volume total. Efectuou-se um *short-spin* e colocaram-se as amostras no termociclador, de acordo com as condições descritas na tabela 15. Posteriormente, o material sequenciado foi enviado para a sede do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, em Lisboa, para se proceder à electroforese capilar e determinação das sequências nucleotídicas. As sequências de ADN *forward* e *reverse* assim obtidas, foram alinhadas no programa DNASTAR por forma a obter-se uma sequência consenso. As sequências nucleotídicas consenso foram, posteriormente, comparadas com outras disponíveis na base de dados pública (NCBI nucleotide, <http://www.ncbi.nih.gov/nucleotide>), para determinação da sua identidade genética através do programa “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) (disponível em http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch).

No sentido de confirmar a identidade dos artrópodes *Ixodes* spp. capturados, os produtos da amplificação do gene 12S rADN foram submetidos a sequenciação. A sequência obtida, apresentou 90% de homologia com *Ixodes ricinus*.

Tabela 15- Reacção de Sequenciação dos produtos de PCR

	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação	96°C	10 segundos	25 ciclos
Ligação dos <i>primers</i> / <i>annealing</i>	50°C	5 segundos	
Extensão	60°C	4 minutos	1 ciclo

3. Resultados

3.1 Animais de companhia

3.1.1. Caracterização da amostra

A amostra analisada foi constituída por 35 cães e um gato, sendo que em dois cães e no gato não foi possível obter sangue total tendo sido, apenas, retirados ixodídeos.

Relativamente ao género, 57,1% dos cães eram fêmeas (20/35) e 42,9% machos (15/35), como representado na figura 3. O único gato incluído no estudo era uma fêmea europeu comum com um mês de idade.

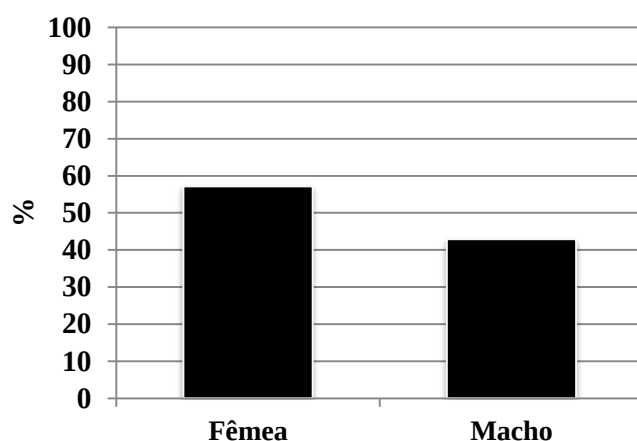


Figura 3 – Distribuição da amostra relativamente ao género dos cães em estudo (n=35).

Quanto à distribuição etária dos cães, 11,4% apresentaram idade inferior a 1 ano (4/35), 40,0% apresentaram idades compreendidas entre os 1 e os 7 anos (14/35) e 25,7% apresentavam idade superior aos 7 anos (9/35). Em oito dos 35 cães em estudo (22,9%), não foi possível determinar a idade (Figura 4).

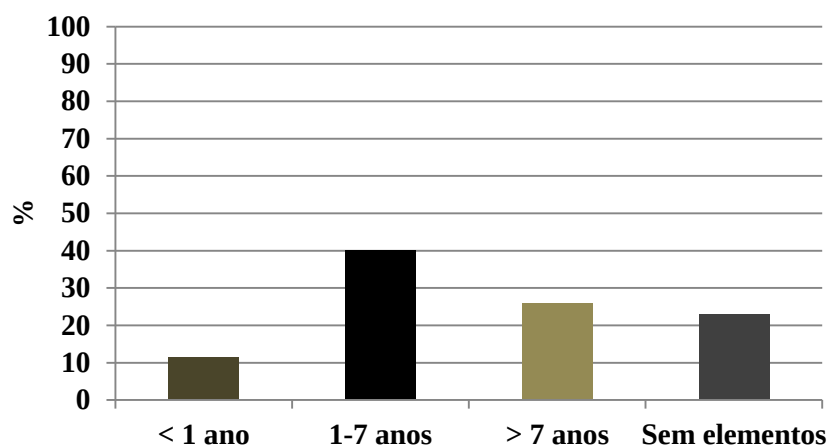


Figura 4 – Distribuição da amostra relativamente à faixa etária dos cães em estudo (n=35).

No que respeita às características raciais da população dos cães, 45,7% não tinham raça definida – SRD (16/35), 20,0% eram Labrador Retriever (7/35) e 8,6% pertenciam à raça pastor alemão (3/35). As restantes raças representadas como “Outras” (25,7%), incluíram um Braco Alemão, um Teckel, um West Highland White Terrier, um Beagle, um Caniche, um Yorkshire Terrier, um Galgo Afegão e um Epagneul Breton, de acordo com o apresentado na figura 5.

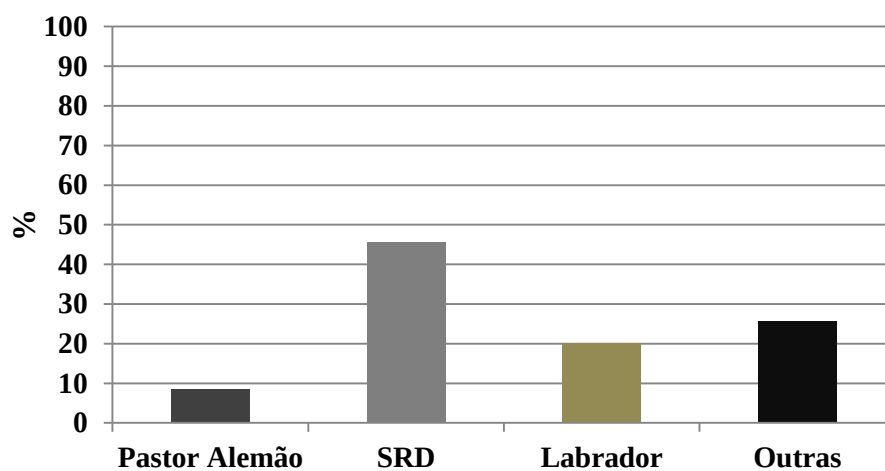


Figura 5 – Distribuição da amostra de acordo com as características raciais dos cães em estudo (n=35).

No que diz respeito ao estilo de vida dos cães em estudo, 42,9% viviam exclusivamente no exterior de uma habitação, enquanto 57,1% viviam no interior de uma habitação mas os tutores referiram passeios em áreas periurbanas, provavelmente frequentadas pela população de javalis (Figura 6).

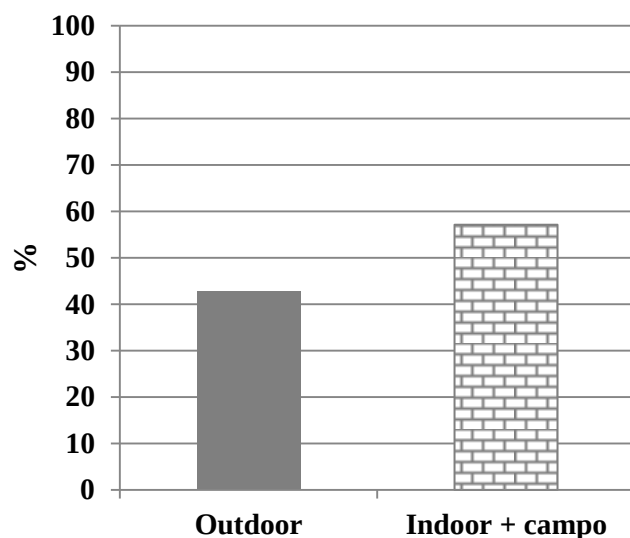


Figura 6 – Distribuição da amostra de acordo com o estilo de vida dos cães em estudo (n=35).

Neste grupo de 36 animais de companhia (35 cães e um gato), os distúrbios gastrintestinais, foram a causa mais frequente para a ida ao veterinário, ocorrendo em 12 casos (33,3%) e manifestando-se por diarreia (N=4), vómitos (N=5) ou pela presença de ambos (N=3). Foram, ainda, identificados animais com hipertermia (N=1), mucosas pálidas (N=3) ou ambas (N=1) e hemorragia nasal (N=1) (Figura 7). Em 12 casos verificaram-se outras manifestações clínicas que não as definidas anteriormente como critérios de inclusão (isto é, hipertermia, mucosas pálidas, hemorragia nasal, diarreia/vómitos), tendo os animais sido considerados no grupo denominado “Outro”. Da mesma forma, seis animais cuja determinação das manifestações clínicas foi condicionada pela ausência de informação foram considerados no grupo “Sem elementos” (Figura 7). De salientar que os animais pertencentes a estes dois últimos grupos (“Outro” e “Sem elementos”) foram incluídos no estudo por se verificar a presença de alterações hematológicas e/ou de um contexto epidemiológico considerado critério de inclusão, como descrito na secção Material e Métodos.

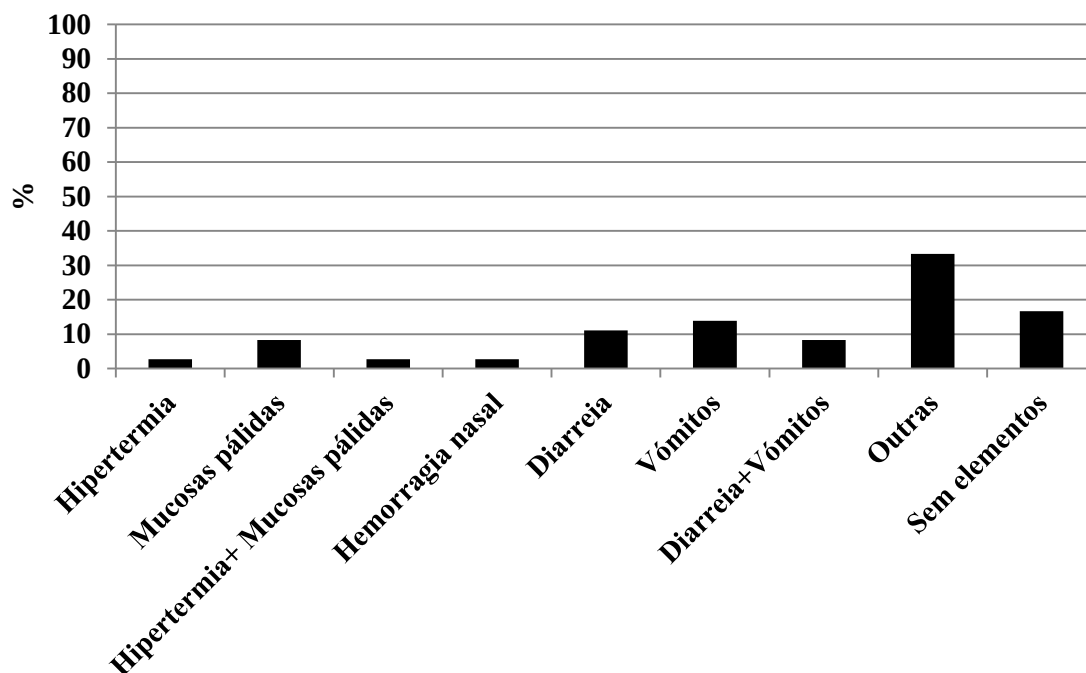


Figura 7 – Manifestações clínicas mais frequentes dos animais de companhia em estudo (35 cães e um gato).

Relativamente aos achados no hemograma dos 33 animais em que foi colhida uma amostra de sangue para análise, a alteração mais frequente, correspondente a 21,2%, foi a trombocitopenia isolada (N=7), seguida da trombocitopenia associada a anemia (N=5), a anemia isolada (n=3) ou a leucopénia (N=1).

Oito animais apresentaram outras alterações, não consideradas critério de inclusão, e, três não registaram quaisquer alterações no hemograma. A ausência de informação em cinco casos levou a que fossem incluídos no grupo “Sem elementos” (Figura 8).

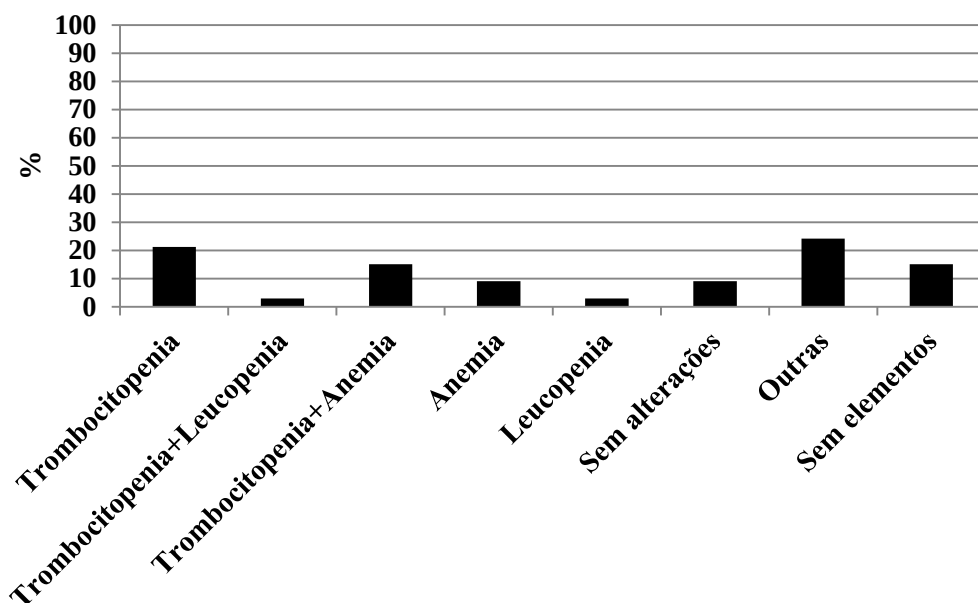


Figura 8 – Achados no hemograma da população de cães em estudo (n=33).

3.1.2. Estudo da integridade do ADN

O ADN extraído das 33 amostras de sangue total de cães, após sujeito a electroforese, apresentou-se em 17 casos como uma banda única de elevado peso molecular, o que comprovou a sua integridade física (Figura 9). Em 16 amostras a presença de ADN degradado foi atribuído a uma potencial falha do kit de extração (Figura 9). Assim, o ADN foi novamente extraído do stock de sangue total original, conservado a -20°C, usando novos reagentes de extração. Em todas as amostras, esta nova extração resultou em ADN com uma boa integridade física comprovada na electroforese.

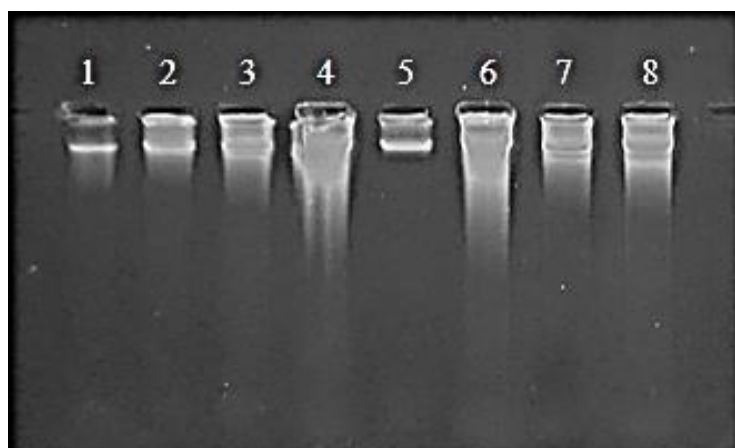


Figura 9 – Migração electroforética em gel de agarose a 0,8% do ADN extraído das amostras de sangue total dos cães em estudo. Linhas 1-3, 5, 7-8 - ADN com banda única de alto peso molecular bem definida; 4 e 6- ADN com alguma fragmentação.

3.1.3. Amplificação de um fragmento do gene β -actina canina

O gene da β -actina canina foi amplificado com sucesso, em todas as 33 amostras de ADN dos cães em estudo. Desta forma, foi evidenciada a ausência de inibidores que pudessem interferir com as reacções de amplificação subsequentes para rastreio de ADN de *A. phagocytophilum* e resultar em falsos negativos. Salienta-se, contudo, que nas 16 amostras com ADN degradado mencionadas anteriormente a amplificação da β -actina só foi conseguida após uma segunda extracção com novos reagentes (Figura 10).

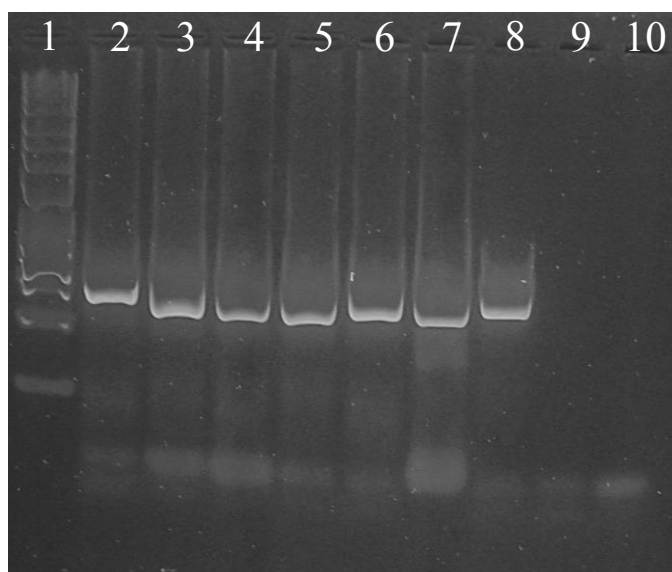


Figura 10 – Migração electroforética em gel de agarose a 1,5% de produtos de PCR de algumas amostras em estudo (β -actina). 1– Marcador de pesos moleculares (Hyper Ladder 100pb, Bioline®); 2-7 – Amostra com amplificação positiva; 8– Controlo positivo; 9-10– Contolo negativo.

3.1.4. Pesquisa de *A. phagocytophilum*

Relativamente à PCR convencional para detecção de ADN de *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp., em nenhuma das 33 amostras dos cães em estudo foi obtido resultado positivo.

Em todas as reacções de PCR realizadas foi, contudo, observada a amplificação do controlo positivo e ausência de ADN no controlo negativo o que validou os resultados obtidos, como se pode verificar na figura 11.

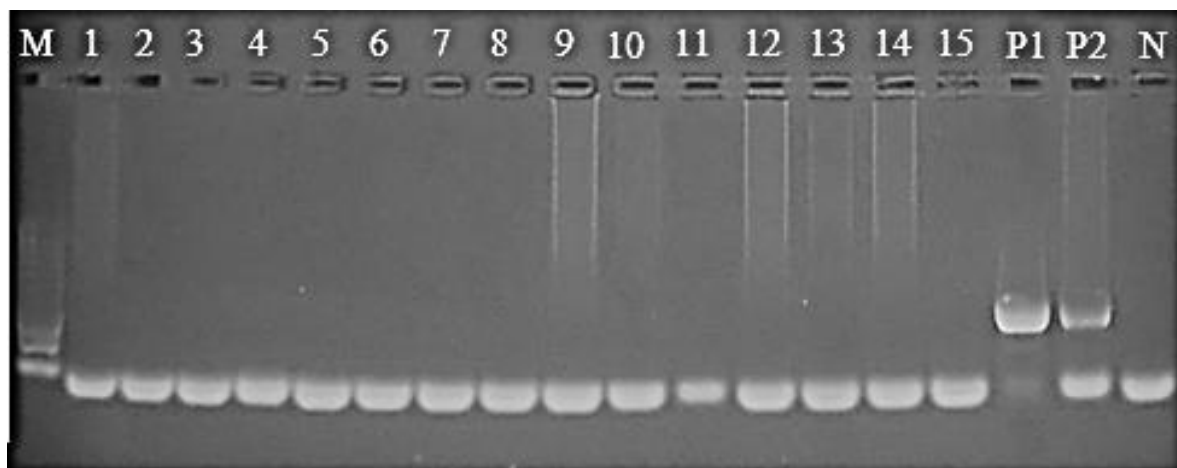


Figura 11 – Electroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos do PCR convencional para pesquisa de *Anaplasma spp./Ehrlichia spp.* nas amostras dos cães. M – Marcador de pesos moleculares (Hypper Ladder 100pb, Bioline®); 1-15– Ausência de algumas das amostras dos cães em estudo; P1 – Controlo positivo (ADN de *A. phagocytophilum*); P2 – Controlo positivo (ADN de *E. chaffeensis*); N – Controlo negativo.

O mesmo se verificou na PCR em tempo real para a detecção de ADN de *A. phagocytophilum*. Em nenhuma das amostras rastreadas se verificou leitura de fluorescência compatível com um resultado positivo ($CP \leq 37$). Esta observação foi validada com a devida amplificação do controlo positivo e a ausência de ADN no controlo negativo em todas reacções de PCR (Figura 12).

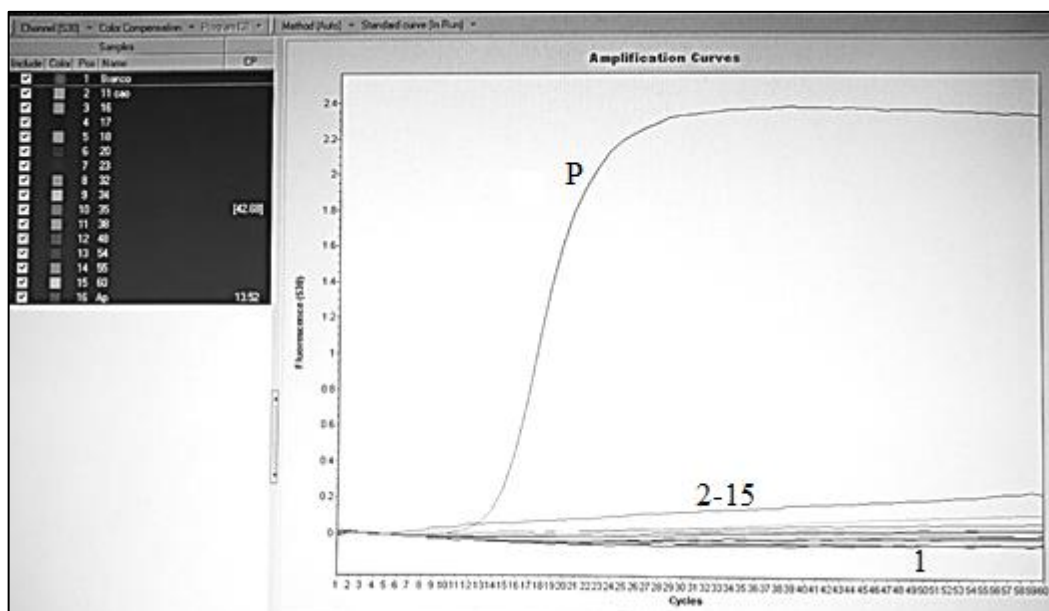


Figura 12 – Análise da leitura final do PCR em tempo real para pesquisa de *A. phagocytophilum* nas amostras de cães. 1 – Controlo negativo; 2-15 - Resultado de algumas das amostras dos cães em estudo; P-Controlo positivo (ADN de *A. phagocytophilum*).

3.2. Javalis

3.2.1. Caracterização da amostra

A população de javalis em estudo foi constituída por 21 indivíduos, 11 fêmeas (52,38%) e 10 machos (47,62%) (Figura 13).

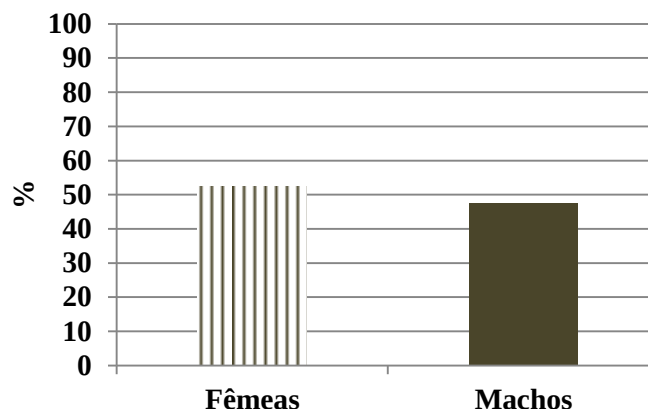


Figura 13 – Distribuição da amostra de javalis em estudo de acordo com o género (n=21).

Relativamente à distribuição geográfica dos javalis, 76,19% (16/21) foram capturados na região do Zambujal, 19,05% (4/21) na Aldeia Grande, pertencente à região do Parque Natural da Serra da Arrábida, e 4,76% (1/21) na região de Casebres (Figura 14).



Figura 14 – Localização das áreas de captura dos javalis em estudo (n=21). Imagem adaptada do Google maps (<https://www.google.pt/maps/>). 1– Aldeia Grande; 2 – Zambujal; 3– Casébre; assinalado com um rectângulo – Área incluída no Parque Natural da Serra da Arrábida.

3.2.2. Estudo da integridade do ADN

A electroforese do ADN extraído de baço e fígado dos 21 javalis em estudo, permitiu verificar que a grande maioria das amostras se apresentava degradada e com um arrastamento de bandas de baixo peso molecular (Figura 15). Esta ausência de integridade física pode ter sido devida à degradação ou lise dos tecidos e, consequente, degradação do ADN.

Como mencionado na secção Material e Métodos, nestas amostras não só não foi possível garantir as condições óptimas de armazenamento no tempo que mediou o abate dos animais e a chegada ao laboratório, como controlar o tempo que mediou o abate do animal e a sua evisceração, aspectos que podem ter contribuído para a detioração do material biológico.

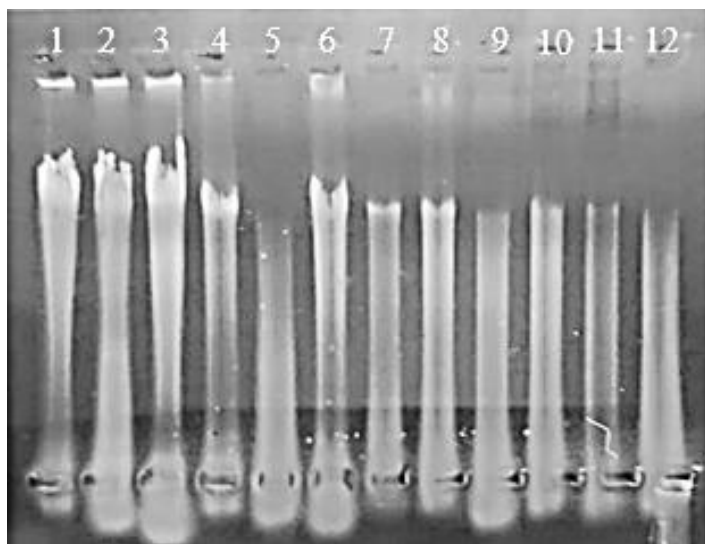


Figura 15 – Migração electroforética em gel de agarose a 0,8% do ADN extraído das amostras de fígado e baço dos javalis em estudo. 1-4, 6 – ADN com banda única de alto peso molecular bem definida. Em todas as amostras é observável arrastamento correspondente a ADN fragmentado.

Dado que não existia protocolo padronizado para pesquisa de ADN de javali em nenhum dos laboratórios envolvidos, não foi possível averiguar a presença de eventuais inibidores nas amostras em estudo.

3.2.3. Pesquisa de *A. phagocytophilum*

Relativamente à PCR convencional para detecção de ADN de *Anaplasma spp.* e *Ehrlichia spp.*, em nenhuma das amostras de fígado e baço dos 21 javalis em estudo foi obtido

resultado positivo. A amplificação do controlo positivo e ausência de ADN no controlo negativo validaram os resultados.

O mesmo se verificou na PCR em tempo real específico para a detecção de ADN de *A. phagocytophilum*. Em nenhuma das amostras rastreadas se verificou leitura de fluorescência compatível com um resultado positivo ($CP \leq 37$). Esta observação foi validada com a devida amplificação do controlo positivo e ausência de ADN no controlo negativo em todas reacções de PCR (Figura 16).

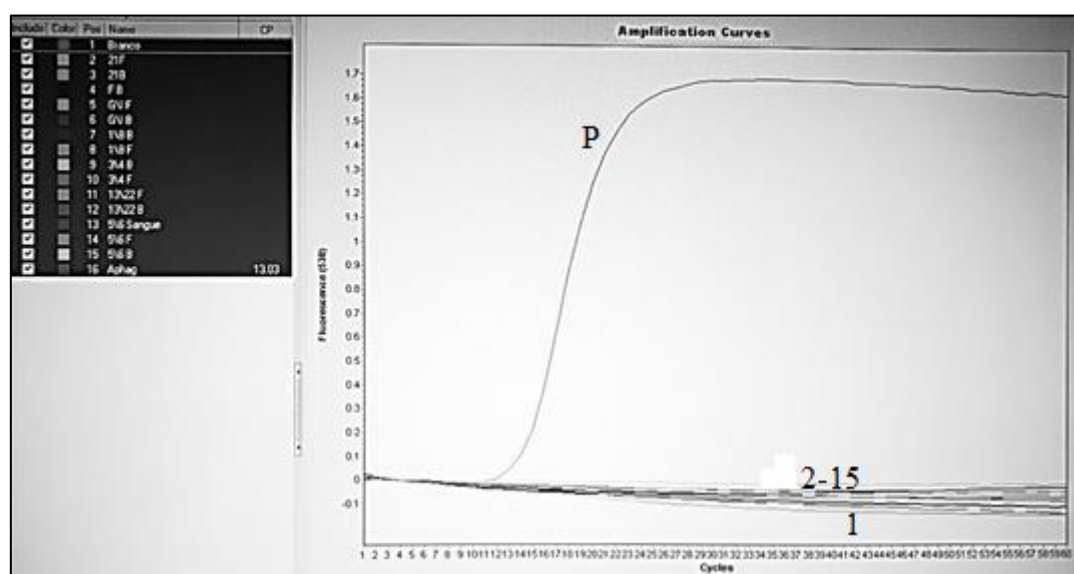


Figura 16 – Análise da leitura final do PCR em tempo real para pesquisa de *A. phagocytophilum* nas amostras de javali. 1 – Controlo negativo; 2-15 – Resultado de algumas das amostras dos javalis em estudo; P – Controlo positivo (ADN de *A. phagocytophilum*).

3.3. Ixodídeos

3.3.1. Caracterização da amostra

A parasitação por ixodídeos foi registada em seis cães e um gato, no grupo de animais de companhia que visitaram o HVA, bem como, em três dos javalis capturados. Os ixodídeos que se encontravam na fase parasitária foram identificados como: *Ixodes* spp. (N=3), *Ixodes ricinus* (N= 6), *Hyalomma marginatum* (N=2) e *Rhipicephalus sanguineus* (N=8).

Nos três exemplares *Ixodes* spp. não foi possível a identificação específica devido à degradação que apresentavam, tendo sido, apenas, classificados ao género.

Na figura 17 estão representados os resultados dos ixodídeos recolhidos na fase parasitária relativamente às espécies, género e hospedeiro vertebrado.

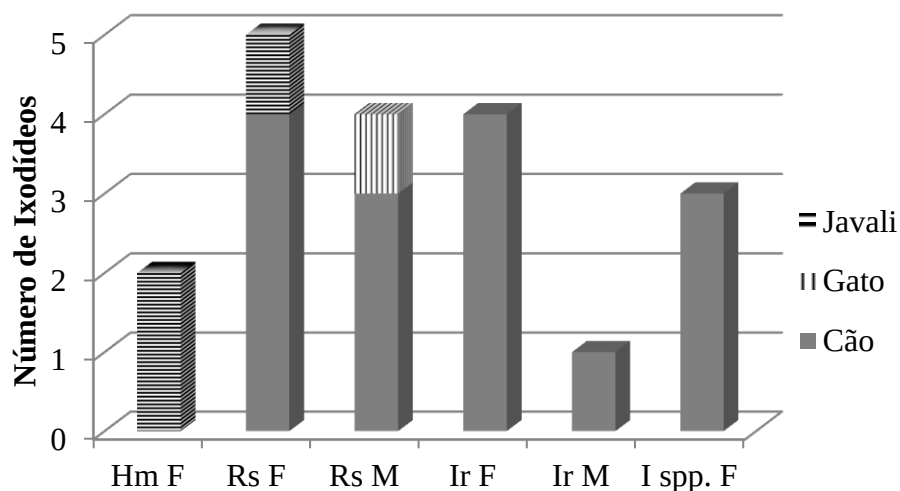


Figura 17 – Distribuição da amostra de ixodídeos na fase parasitária por gênero e hospedeiro vertebrado. Hm – *Hyalomma marginatum*; Rs – *Rhipicephalus sanguineus*; Ir – *Ixodes ricinus*; I spp. – *Ixodes* spp., F – fêmea; M – macho.

Quanto aos ixodídeos em fase de vida livre, foram capturados em nove áreas do Parque Natural da Serra da Arrábida (Figura 18). As capturas foram realizadas em dois dias de trabalho de campo com o rastreio das áreas seleccionadas: dia 9 de Maio de 2018 nas áreas assinaladas de 1 a 8; dia 5 de Julho de 2018 nas áreas 8 e 9. De acordo com a tabela 16, no total foram capturados 367 ixodídeos, incluindo 50 exemplares pertenceram ao género *Ixodes* dos quais 29 foram identificados como *I. ricinus*. Dada a importância deste grupo para o objectivo do estudo, todos os exemplares que se encontravam nas fases de ninfa e adultos foram processados para a pesquisa de *A. phagocytophilum* no total de 46 ixodídeos. Excluíram-se desta análise, apenas, três larvas de *Ixodes* spp. e uma de *I. ricinus*, visto que não há registo deste agente se transmitir por via transovárica. Adicionalmente, incluiu-se também, no rastreio molecular 4,7% (15/ 317) das outras espécies capturadas neste trabalho de campo, incluindo nove *Rhipicephalus sanguineus* e seis *Dermacentor marginatus*. A distribuição dos ixodídeos testados por fase evolutiva encontra-se representada na figura 19.



Figura 18 – Localização das áreas de capturas dos ixodídeos na fase de vida livre no Parque Natural da Serra da Arrábida. 1 – Aldeia Grande; 2 – Maça; 3– Sesimbra-Castelo; 4- Sesimbra Pedreira; 5- Azeitão-Arrábida; 6- Arrábida – El Carmen; 7- Arrábida-Coelhos; 8- Baixa Palmela; 9- Barris. Imagem adaptada do google maps (<https://www.google.pt/maps/>)

Tabela 16 – Ixodídeos na fase de vida livre capturados, distribuídos por espécies e local de captura no Parque Natural da Serra Arrábida.

Local	Dm	H spp	Hl	I spp	Ir	R spp	Rp	Rs	Total
Aldeia Grande	14	-	-	-	-	-	-	38	52
Maça	3	-	-	-	5	-	1	16	25
Sesimbra- Castelo	1	-	-	-	-	-	-	12	13
Sesimbra- Pedreira	1	-	-	-	11	-	22	-	34
Azeitão- Arrábida	7	-	6	-	1	-	1	21	36
Arrábida- El Carmen	5	-	2	-	2	-	1	10	20
Arrábida- Coelhos	-	-	2	-	-	-	-	2	4
Baixa palmela	-	20	-	1	1	3	1	3	29
Barris	16	-	1	20	9	2	1	105	154
Total	47	20	11	21	29	5	27	207	367

Dm – *Dermacentor marginatus*; H spp - *Haemaphysalis* spp. Hm – *Hyalomma lusitanicum*; I spp. – *Ixodes* spp; Ir – *Ixodes ricinus*; R spp – *Rhipicephalus* spp.; Rp – *Rhipicephalus pusillus*; Rs – *Rhipicephalus sanguineus*.

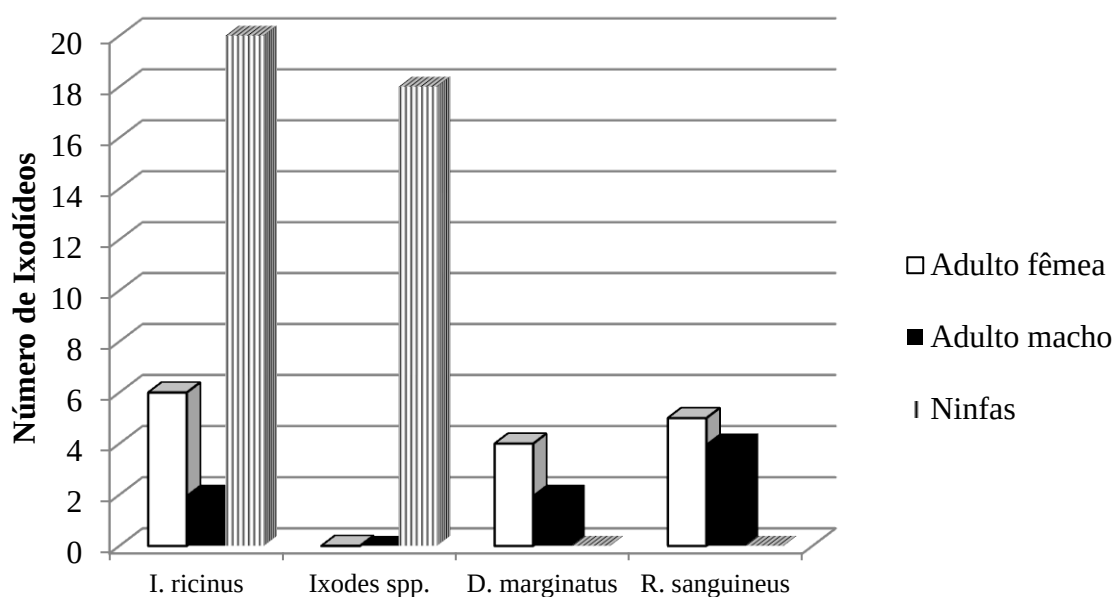


Figura 19 – Distribuição da amostra de ixodídeos de fase de vida livre por fase evolutiva estudados neste trabalho (n=61).

3.3.2. Amplificação de um fragmento do gene 12S rADN de Ixodídeos

Relativamente à avaliação da presença de inibidores, o gene 12S rADN foi amplificado com sucesso, em todas as 80 amostras dos ixodídeos em estudo, 19 na fase parasitária e 61 na fase de vida livre - vegetação.

Desta forma, foi evidenciada a ausência de inibidores de ADN polimerase para todas as amostras, como apresentado na Figura 21.

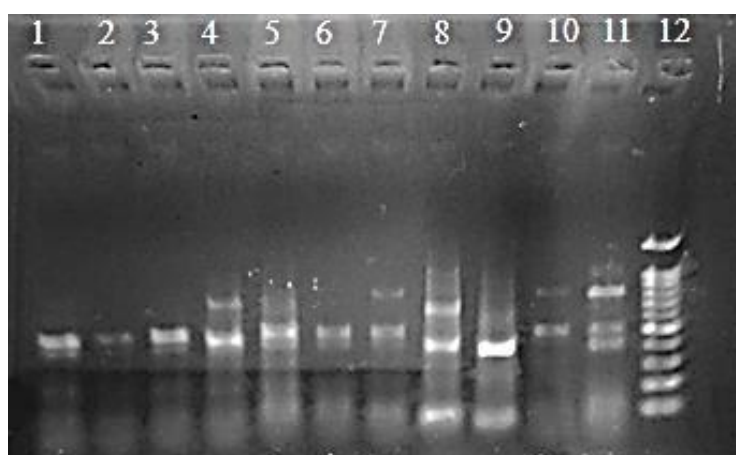


Figura 20 – Migração electroforética em gel de agarose a 1,5% de produtos de PCR (12S rADN). 1-10– Produtos de PCR do gene 12S rDNA de algumas das amostras dos ixodídeos em estudo; 11– Controlo positivo (ADN de ixodídeo); 12– Marcador de pesos moleculares (100 pb plus DNA Ladder, BIORON).

3.3.3. Pesquisa de *A. phagocytophilum*

Relativamente à PCR convencional para detecção de ADN de *Anaplasma spp.* e *Ehrlichia spp.*, nenhuma das 80 amostras de ixodídeos se apresentou positiva, embora o teste tenha sido validado com a observação da amplificação do controlo positivo e ausência da mesma no controlo negativo (Figura 21).

O mesmo se verificou na PCR em tempo real específica para a detecção de ADN de *A. phagocytophilum*. Em nenhuma das amostras rastreadas se verificou leitura de fluorescência compatível com um resultado positivo ($CP \leq 37$). Esta observação foi validada com a devida amplificação do controlo positivo e ausência de ADN no controlo negativo em todas reacções de PCR (Figura 22).

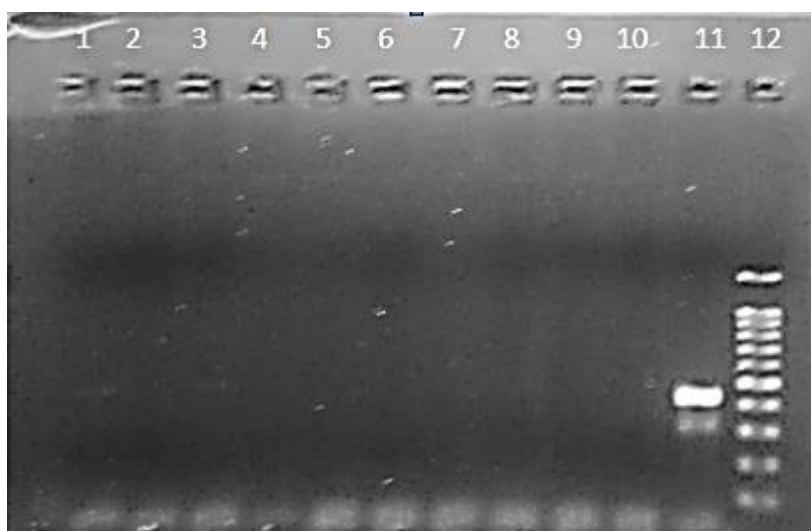


Figura 21 – Electroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos de PCR convencional para *Anaplasma spp.* /*Ehrlichia spp.* 1-9– Resultado de algumas das amostras dos ixodídeos em estudo; 10– Contolo negativo; 11– Controlo positivo (ADN de *A. phagocytophilum*); 12– Marcador de pesos moleculares (100 pb plus DNA Ladder, BIORON).

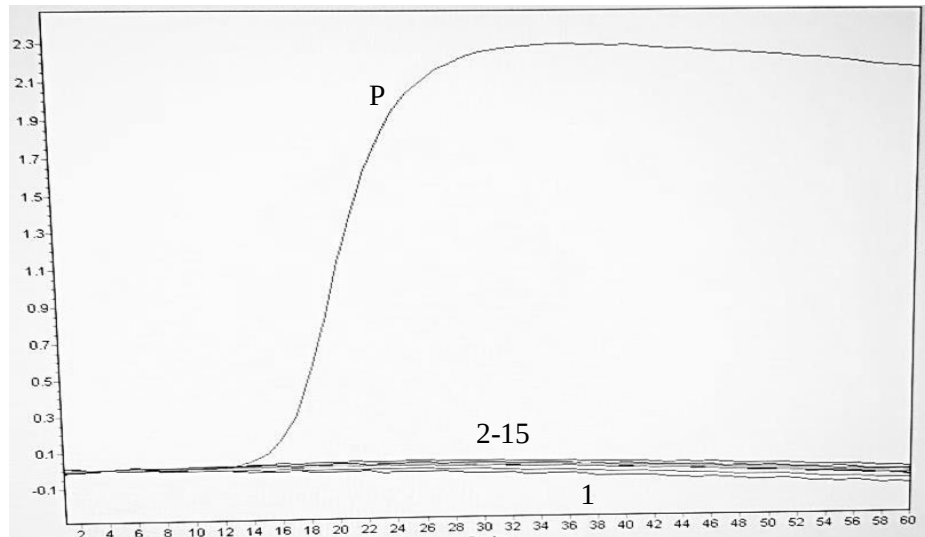


Figura 22 – Análise da leitura final da PCR em tempo real para pesquisa de *A. phagocytophilum* nas amostras de Ixodídeos. 1 – Controlo negativo; 2-15 – Resultado de algumas amostras; P – Controlo positivo (ADN de *A. phagocytophilum*).

4. Discussão de resultados

A fauna silvática pode albergar uma elevada densidade de ixodídeos que estão envolvidos na transmissão de vários agentes patogénicos, como bactérias, vírus e parasitas (Dantas-Torres *et al.*, 2012). Além da sua importância em veterinária, muitos desses agentes transmitidos por ixodídeos podem, também, afectar a população humana como resultado do seu potencial zoonótico. Deste modo, a gestão de tal situação requer uma abordagem integrada, incluindo a consciencialização para esta problemática, de veterinários, médicos e público em geral (Dantas-Torres *et al.*, 2012).

O papel dos animais silvestres na epidemiologia de muitas doenças que afectam espécies pecuárias, animais de companhia e o próprio Homem continua pouco explorado. Este facto é particularmente importante quando se assiste ao aumento descontrolado de algumas populações silvestres, como se verifica, actualmente, com os javalis em vários pontos de Portugal. O PNSA e respectiva cintura rural é um bom exemplo de uma das áreas afectadas. Nesta região, o javali representa uma espécie introduzida cujo aumento está a ter um impacto directo no ecossistema, com potenciais repercussões ao nível da saúde pública. Neste contexto, destacam-se as doenças veiculadas por ixodídeos. Os javalis estão descritos como hospedeiros de uma ampla variedade de espécies ixodológicas, contribuindo para a dispersão dos agentes zoonóticos que lhes estão associados. Na verdade, o aumento descontrolado da população e a busca de recursos, leva os javalis a incursões nos ambientes peri-domésticos ou mesmo domésticos, promovendo a exposição de animais de companhia e do Homem a artrópodes infectados. Entre os agentes transmitidos por ixodídeos e associados a javalis, estão não só as bactérias da Família Anaplasmataceae com implicações veterinárias, como *E. canis* e *A. platys* mas, também, a espécie zoonótica, *A. phagocytophilum*.

Na Europa, os javalis têm sido apontados como estando envolvidos no ciclo enzoótico de *A. phagocytophilum*, disseminando esta bactéria, responsável por anaplasmoose granulocítica em várias espécies de mamíferos domésticos e no Homem, tendo adquirido um papel de hospedeiros reservatórios (Michalik *et al.*, 2012). Este estudo torna-se, assim, pertinente, uma vez que nos últimos anos se verificou no nosso país e, particularmente no PNSA, um aumento da população de javalis que, inclusivamente, invadem áreas peri-urbanas e urbanas, conforme tem sido noticiado em vários órgãos de comunicação social (Apêndice II).

Neste contexto, foram estudadas amostras de 21 javalis, com o intuito de investigar a presença de infecções por *A. phagocytophilum*. Os animais foram capturados ao abrigo do

programa do ICNF de controlo da população em três locais distintos: 76,19% no Zambujal, 19,05% na Aldeia Grande (área incluída no Parque Natural da Serra da Arrábida) e 4,76% em Casebres. O estudo teve por base a análise molecular de fragmentos de baço e fígado, colhidos pelos caçadores durante a evisceração dos animais, através de duas técnicas de amplificação de ADN. Todas as amostras foram testadas em paralelo por uma PCR convencional, genérica para bactérias pertencentes à família Anaplasmataceae, e por uma PCR em tempo real, muito sensível e específica para *A. phagocytophilum* (Courtney *et al.*, 2004; Maggi *et al.*, 2006). Em nenhum dos testes foram obtidos resultados positivos, indicando a potencial ausência, nos animais em estudo, de ADN de *A. phagocytophilum*, assim como de outras Anaplasmataceae. É de frisar, contudo, que o reduzido número de animais analisados e a ausência de integridade física do ADN obtido nas amostras de javali, possivelmente devido à degradação ou lise dos tecidos, em consequência da sua inadequada conservação no tempo que mediou a colheita e a chegada ao laboratório, pode ter condicionado os resultados obtidos. Assim, a circulação destes agentes nos javalis do PNSA não pode ser excluída, realçando-se a importância de manter a vigilância destas populações.

A presença de *A. phagocytophilum* foi, pela primeira vez, assinalada em Portugal em ixodídeos capturados, entre outras áreas, no PNSA num dos locais incluídos neste estudo – Baixa de Palmela (Santos *et al.*, 2004). No referido trabalho, foram analisados 278 *Ixodes* tendo-se verificado, por PCR, a presença de ADN do agente em duas espécies deste grupo: *I. ricinus* e *I. ventralloi*. Trabalhos posteriores confirmaram este resultado, demonstrando taxas de infecção de *A. phagocytophilum* que variam entre os 0,3% e 10,3% para *I. ricinus* e 2,1% para *I. ventralloi* (de Carvalho *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009c; Santos *et al.*, 2009d; Santos-Silva *et al.*, 2011). Na Europa, o principal vector deste agente é *I. ricinus*, embora se questione o envolvimento de outras espécies. Nováková & Víchová, (2010) demonstraram que, para além do género *Ixodes*, a infecção por *A. phagocytophilum* está também associada a outros ixodídeos, nomeadamente *Dermacentor spp.* e *Rhiphicephalus sanguineus*, embora a sua importância epidemiológica esteja, ainda, pouco esclarecida. Desta forma, a presente dissertação visou também o estudo molecular de ixodídeos, incidindo essencialmente no género *Ixodes*. Foram realizados dois dias de trabalho de campo que permitiram a captura e análise de 61 ixodídeos em fase de vida livre (capturados na vegetação). O trabalho de campo decorreu em nove locais distintos do PNSA, seleccionados tendo por base o facto de se tratarem de zonas peri-urbanas frequentadas por javalis e onde o vector ocorre. Para o estudo molecular foram considerados todos os *Ixodes spp.* (N=18) e *I. ricinus* (N=28) capturados,

bem como 4,7% dos restantes ixodídeos, incluindo *R. sanguineus* (N=9) e *D. marginatus* (N=6). Adicionalmente, foram também testados 19 exemplares em fase de vida parasitária removidos dos javalis abatidos (N=3) e de animais de companhia (N=16) hospitalizados no HVA. Contudo, em nenhum dos exemplares estudados foram obtidos resultados positivos, tanto no rastreio específico de *A. phagocytophilum* por PCR em tempo real como no rastreio genérico de *Anaplasma* spp./*Ehrlichia* spp. realizado por PCR convencional. No entanto, é importante salientar que apenas foram realizadas duas colheitas pontuais de ixodídeos, em Maio e Julho, e que à excepção do local 8 (Baixa de Palmela), os restantes locais apenas foram rastreados uma única vez. Idealmente, as colheitas de ixodídeos devem ser realizadas de forma sistemática, cobrindo preferencialmente todas as estações do ano, para garantir que são rastreados as fases de vida mais importantes na transmissão de *A. phagocytophilum* (adultos e ninfas).

A. phagocytophilum é responsável pela anaplasmosse granulocítica, uma zoonose que afecta vários mamíferos na Europa. Para além dos humanos, a infecção foi, igualmente, identificada em animais silváticos, asininos, cavalos, pequenos e grandes ruminantes domésticos, gatos e cães (Blanco e Oteo, 2002; Stuen 2007; Ebani *et al.*, 2008; Savidge *et al.*, 2015). A maioria dos cães naturalmente infectados não apresenta sinais clínicos e a doença parece ser auto-limitante (Carrade *et al.*, 2009). Alguns animais podem apresentar letargia e hipertermia, ocorrendo, geralmente, após um período de incubação de uma a duas semanas (Greig *et al.*, 1996; Poitout, 2005; Carrade *et al.*, 2009; Kohn, 2008). Em Portugal, até à data, ainda não foi descrito nenhum caso de Anaplasmosse Granulocítica Canina (AGC), nem a detecção de ADN de *A. phagocytophilum* em cães ou humanos. Num estudo conduzido na região do Algarve, em 55 cães com suspeita de doença transmitida por ixodídeos (DTI) testados por imunofluorescência indirecta e PCR, 54,5% foram seropositivos sendo que cinco deles preencheram os critérios serológicos para infecção activa (Santos *et al.*, 2009a). Contudo, nenhum dos animais apresentou ADN de *A. phagocytophilum* e apenas *A. platys* foi identificado. Dada a existência de reacções cruzadas com *A. platys*, a qual é muito prevalente em cães em Portugal, e para qual os cães são um hospedeiro reservatório, torna-se difícil obter uma ideia clara da verdadeira seroprevalência e, consequentemente, da exposição de cães de *A. phagocytophilum* (Gravino *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2009a; Dondi *et al.*, 2014). Por outro lado, o facto de a anaplasmosse apresentar um quadro clínico pouco característico, sendo muitas vezes considerada no grande grupo das doenças associadas à exposição de ixodídeos e tratáveis com doxiciclina, faz com que não seja alvo de um diagnóstico mais direccionado.

Existe, portanto, a possibilidade de, em Portugal, infecções sintomáticas por *A. phagocytophilum* ocorrerem em cães que são tratados sem nunca se chegar ao diagnóstico etiológico definitivo. Desta forma, foi, também, considerado pertinente incluir no estudo animais de companhia hospitalizados no HVA com sinais clínicos, alteração dos parâmetros sanguíneos ou com contexto epidemiológico sugestivo. No total foram rastreados para *A. phagocytophilum* 36 animais (35 cães e um gato), verificando-se que, em 33,3% dos casos, ocorriam manifestações gastrintestinais e, em 21,2%, trombocitopénia isolada. De entre estes animais, 57,1% vivia “indoor” mas tinha acesso ao exterior e/ou realizava passeios em localidades da região da Arrábida, onde se verifica a presença de javalis. Nestes animais o rastreio molecular foi efectuado em amostras de sangue total, bem como nos ixodídeos que se encontravam a parasitá-los, conforme já referido. À semelhança dos resultados anteriores, em nenhuma das amostras de sangue foi possível identificar ADN de *A. phagocytophilum* ou de outras bactérias pertencentes à família Anaplasmataceae. Ainda assim, é importante lembrar que *A. phagocytophilum* está associado a bacteriémias curtas, com subsequente limpeza do agente da circulação sanguínea. Outra limitação deste estudo centrara-se no armazenamento das amostras de sangue, uma vez que o ideal seria congelar as amostras e, inicialmente as mesmas foram, apenas, refrigeradas. O facto de as amostras terem sido recolhidas exclusivamente no Hospital Veterinário da Arrábida também tornou o estudo mais restrito. Seria interessante confirmar estes resultados alargando as colheitas a várias clínicas da região de estudo.

Esta dissertação torna-se importante do ponto de vista epidemiológico, contribuindo para o melhor conhecimento não só dos agentes envolvidos, como dos seus vectores/reservatórios, associados à transmissão da doença em estudo quer aos animais quer ao Homem. Apesar dos resultados negativos, é de extrema importância manter a vigilância epidemiológica nesta zona geográfica.

5. Conclusão

Com o presente estudo, pretendeu-se contribuir para o conhecimento das doenças associadas a vectores na região da Arrábida, investigando a presença de *A. phagocytophilum* em animais de companhia com suspeita de DTI, em ixodídeos capturados em locais estratégicos do PNSA e em javalis, animais reservatórios cuja população se tem aproximado cada vez mais de áreas peri-urbanas aumentando, assim, o risco de disseminação deste agente com potencial zoonótico.

Em relação aos objectivos particulares traçados para este estudo, os mesmos foram cumpridos e, embora os resultados obtidos tenham sido na sua totalidade negativos, não se pode excluir a circulação do agente. Esta dissertação permitiu abrir um caminho para a realização de mais estudos de forma a conhecer melhor esta doença, os seus vectores/reservatórios e o seu papel na doença humana e veterinária.

Desta forma, a doença em estudo deve ser alvo de atenção reforçada, tanto pelos médicos veterinários, como pelos restantes agentes de saúde pública, uma vez que estamos perante uma doença zoonótica.

Do ponto de vista clínico, os médicos veterinários poderão estar mais alerta relativamente aos possíveis quadros clínicos e, desta forma, estabelecer como diagnósticos diferenciais as doenças associadas a vectores. Podem, ainda, proceder a técnicas de biologia molecular, como a PCR, para confirmar a doença, sempre que tal se justifique, e proceder, posteriormente, ao tratamento dos animais infectados para eliminar possíveis reservatórios e/ou vectores como é o caso dos ixodídeos.

6. Referências bibliográficas

1. Assi, MA., Yao, JD., Walker, RC. (2007). Lyme disease followed by human granulocytic anaplasmosis in a kidney transplant recipient. *Transpl Infect Dis*, Mar;9(1):66-72.
2. Barutzki, D., De Nicola, A., Zeziola, M., Reule, M. (2006). Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 119(7-8):342-7.
3. Beati, L., Keirans, L.J., 2001. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *J Parasitol*, 87, 32-48.
4. Becskei, C., Lin, D., Rugg, D., Geurden, T. (2017) Speed of kill of a new spot-on formulation of selamectin plus sarolaner for cats against induced infestations with *Ixodes ricinus*. *Vet Parasitol*, 238 (2017) S8-S11.
5. Berzina, I., Krudewig, C., Silaghi, C., Matise, I., Ranka, R., Müller, N., Welle, M. (2014). *Anaplasma phagocytophilum* DNA amplified from lesional skin of seropositive dogs. *Ticks Tick Borne Dis*, 5(3):329-35.
6. Berzina, I. & Matise, I. (2013). Seroprevalence against *Borrelia burgdorferi* sensu lato and occurrence of antibody co-expression with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Latvia. *Ir Vet J*, 21;66(1):9.
7. Bexfield, NH., Villiers, EJ., & Herrtage, ME. (2005). Immune-mediated haemolytic anaemia and thrombocytopenia associated with *Anaplasma phagocytophilum* in a dog. *J small Anim Pract*, 46(11), 543-548.
8. Blanco, JR. & Oteo, JA. (2002). Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect*, 8(12):763-72.

9. Cardoso, L., Mendão, C., Madeira de Carvalho, L. (2012). Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. and *Leishmânia infantum* in apparently healthy and CVBD- suspect dogs in Portugal- a national serological study. *Parasit Vectors*, 27;5:62.
10. Carrade, DD., Foley, JE., Borjesson, DL, Sykes, JE. (2009). Canine granulocytic anaplasmosis: A review. *J Vet Intern Med*, 23(6):1129-41.
11. Claerebout, E., Losson, B., Cochez, C., Casaert, S., Dalemans, AC., De Cat, et al. (2013). Ticks and associated pathogens collected from dogs and cats in Belgium. *Parasit Vectors*, 19(6):183.
12. Cockwill, KR., Taylor, SM., Snead, ECR., Dickinson, R., Cosford, K., Malek, S., et al. (2009). Granulocytic anaplasmosis in three dogs from Saskatoon, Saskatchewan, *Can Vet J*, 50(8):835-840.
13. Courtney, J.W., Kostelnik, L.M., Zeidner, N.S., Massung, R.F., 2004. Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*, *J Clin Microbiol*, 42, 3164–3168.
14. Dantas-Torres, F., Chomel, B., Otranto, D., (2012) “Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective”. *Trends Parasitol*, 10(28):437–446.
15. Dantas-Torres, F. (2008). The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): *Vet Parasitol*, 152(3-4):173–185.
16. Day, MJ. (2011) One health: The importance of companion animal vector-borne Diseases. *Parasit Vectors*, 4:49.
17. de Carvalho, IL., Milhano, N., Santos, AS., Almeida, V., Barros, SC., De Sousa, R., et al. (2008). Detection of *Borrelia lusitaniae*, *Rickettsia* sp.IRS3, *Rickettsia monacensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* collected in Madeira Island, Portugal. *Vector Borne and Zoonotic Dis* (Larchmont, N.Y.), 8(4):575–9.

18. De la Fuente J., Gortázar C. (2012) Wild boars as hosts of human-pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* variants [Letter]. *Emerg Infect Dis*, 12(18):2094–2095.
19. De Sousa, R., Lopes de Carvalho, I., Santos, A.S., Bernardes, C., Milhano, N., Jesus, J., *et al.* (2012). Role of the lizard *Teira dugesii* as a potential host for *Ixodes ricinus* tick-borne pathogens. *Appl Environ Microbiol*, 78(10):3767-9.
20. Didyk, YM., Blanárová, L., Pogrebnyak, S., Akimov, I., Petko, B., Víchová, B. (2017). Emergence of tick-borne pathogens (*Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia raoultii* and *Babesia microti*) in the Kyiv urban parks, Ukraine. *Ticks Tick Borne Dis*, 8(2):219-225.
21. Diniz, PP. & Breitschwerdt, EB. (2012). *Anaplasma phagocytophilum* infection (Canine Granulocytotropic Anaplasmosis) In: Greene infectious Diseases of the Dog and Cat (4thEd, pp. 244-254). Elsevier Saunders.
22. Dondi, F., Russo, S., Agnoli, C., Mengoli, N., Balboni, A., Alberti, A., *et al.* (2014). Clinicopathological and molecular findings in a case of canine *Anaplasma phagocitophilum* infection in Northern Italy. *Sci World J*, (2014):1–6.
23. Dumler, JS., Barbet, AF., Bekker, C., Dasch, GA., Palmer, GH., Ray, SC., *et al.* (2001). Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae. *Int J syst evol microbiol*, 51(6): 2145–2165.
24. Ebani, VV., Cerri, D., Fratini F., Ampola M., Andreani E. (2008). Seroprevalence of *Anaplasma phagocitophilum* in domestic and wild animals from central Italy. *New Microbiol*, 31(3):371–5.
25. Eberts, MD., Diniz, PP., Beall, MJ., Stillman, BA., Chandrashekar, R., & Breitschwerdt, EB. (2011). Typical and atypical manifestation of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc*, 47(6): 86-94.

26. Egenvall, AE., Hedhammar, AA., & Bjöersdorff, AI. (1997). Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. *Vet Rec*, 140(9), 222–226.
27. Egenvall, AE., Lilliehook, I., Bjoersdorff, A., Engvall, EO., Karlstam, E., Artursson, K., et al. (2000). Detection of granulocytic *Ehrlichia* species DNA by PCR in persistently infected dogs. *Vet Rec*, 146(7): 186–190.
28. Estrada-Peña, Agustín, Mihalca, Andrei D., Petney, Trevor N. (2017). Ticks of Europe and North Africa- A Gride to Species Identification. Springer:189–196.
29. Estrada-Peña, A., Nava, S., Petney, T. (2014). Description of all the stages of *Ixodes inopinatus* n. sp.(Acari: Ixodidae). 5(2014):734–743.
30. Foley, J., Nieto, NC., Foley, P., Teglas MB. (2008). “Co-phylogenetic analysis of *Anaplasma phagocitophilum* and its vectors, *Ixodes* spp. ticks.” *Exp Appl Acarology* 45:155-170.
31. Galindo RC, et al. (2012). Gene expression profile suggests that pigs (*Sus scrofa*) are susceptible to *Anaplasma phagocytophilum* but control infection. *Parasites and Vectors*, 5: 181.
32. Gordon, WS., Brownlee, A., Wilson, DR., Macleod, J. (1932). Tick-Borne Fever: A Hitherto Undescribed Disease of sheep. *J comp pathol*, (45):301– 307.
33. Gortázar,C., Ferroglio, E., Hofle, U., Frolich, K., Vicente, J. (2007). Diseases shared between wildlife and livestock: a European perspective. *Eur J Wild Res*, 53:241-256.
34. Granick, JL., Armstrong, PJ., & Bender, JB. (2009). *Anaplasma phagocitophilum* infection in dogs: 34 cases (2000-2007). *J Am Vet Med Assoc*, 234(12):1559–1565.

35. Gravino, AE., De Caprariis, D., Manna, L., Cerundolo, R., Sagazio, P., & Buonavoglia, C. (1997). Preliminary report of infection in dogs related to *Ehrlichia equi*: Description of three cases. *New Microbiologica*, 20(4):361– 363.
36. Greig, B. & Armstrong, PJ. (2006). Canine Granulocytotropic Anaplasmosis (*A. phagocytophilum* infection). In C.E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat*. (3rd ed.). (pp. 219– 224). Philadelphia: Saunders, Elsevier.
37. Greig, B., Asanovich, KM., Jane Armstrong, P., & Stephen Dumler, J. (1996). Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in minnesota and wisconsin dogs. *J Clin Microbiol*, 34(1):44– 48.
38. Hodzic, E., Fish, D., Maretzki, CM., De Silva, AM., Feng, S., Barthold, SW. (1998). Acquisition and transmission of the agente of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes scapularis* ticks. *J Clin Microbiol*, 36(12):3574–3578.
39. Hulinská D., Langrová, K., Pejcoch M., Pavlásek L. (2004). Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in animals by real-time polymerase chain reaction. *Acta Pathol, Microbiol et Immunol Scand*, 112: 239– 247.
40. Inokuma, H. (2007). Vectors and Reservoir Hosts of Anaplasmataceae. *Rickettsial Diseases*, 199 – 212.
41. Kirtz, G., Meli, M., Leidinger, E., Ludwig, P., Thum, D., Czettel, B., *et al.* (2005). *Anaplasma phagocytophilum* infection in a dog: identifying the causative agente using the PCR. *J Small Anim Pract*, 46(6):300– 303.
42. Kiss, T., Cadar, D., Krupaci, F., Bordeanu, A., Spînu, M. (2014). Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in European wild boar (*Sus scrofa*) populations from Transylvania, Romania. *Epidemiol Infect*, 142:246 – 250.

43. Koh, FX., Panchadcharam, C., & Tay, ST. (2016). Vector-Borne diseases in stray dogs in peninsular Malaysia and molecular detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* spp. from *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae) ticks. *J Med Entomol*, 53(1): 183– 187.
44. Kohn, B., Galke, D., Beelitz, P., & Pfister, K. (2008). Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *J Vet Intern Med*, 22(6): 1289– 1295.
45. Kohn, B., Silaghi, C., Galke, D., Arndt, G., Pfister, K. (2011). Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Res Vet Sci*, 91(1):71– 6.
46. Laddomada A. (2000). Incidence and control of CSF in wild boar in Europe. *Vet Microbiol*, 73:121 – 130.
47. Lappin MR., Chandrashekar R., Stillman B., Liu J., Mather TN. (2015). Evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* infection in cats after exposure to wild-caught adult *Ixodes scapularis*. *J Vet Diagn Invest*, (4):522-5.
48. Leblond, A., Pradier S., Pitel, PH., Fortier, G., Boireau, P., Chadoeuf, J., Sabatier, P. (2005). An Epidemiological survey of equine anaplasmosis (*Anaplasma phagocytophilum*) in Southern France. *Vet Sci Tech*, 24(3):899-908.
49. Lester, SJ., Breitschwerdt, EB., Collis, CD., & Hegarty, BC. (2005). *Anaplasma phagocytophilum* infection (granulocytic anaplasmosis) in a dog from Vancouver Island. *Can Vet J*, 46(9): 825– 827.
50. Lillini, E., Macri, G., Proietti, G., Scarpulla, M. (2006). New findings on anaplasmosis caused by infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Ann N Y Acad Sci*, 1081:360-70.

51. Maia, C., Nunes, M., Cristóvão, J., Campino, L. (2010). Experimental canine leishmaniasis: Clinical, parasitological and serological follow-up. *Acta Tropica* 116:193 – 199.
52. Maggi, RG., Diniz, PP., Cadenas, MB. & Breitschwerdt, EB. (2006) The Use of Molecular Diagnostic Techniques to detect *Anaplasma*, *Bartonella* and *Ehrlichia* Species in Arthropods or Patients. *International CVBD Symposium*. 8–13.
53. Masuzawa T., Uchishima Y., Fukui T., Okamoto Y., Muto M., Koizumi N., *et al.* Detection of *Anaplasma phagocytophilum* from wild boars and deer in Japan. *Jpn J Infect Dis*, 2011;64:333–6.
54. Matsumoto, K., Joncour, G., Davoust, B., Pitel, PH., Chauzy, A., Collin, E., *et al.* (2006). *Anaplasma phagocytophilum* infection in cattle in France. *Ann N Y Acad Sci*, 1078:491-4.
55. McQuiston, JH., McCall, CL. e Nicholson, WL. (2003). Ehrlichiosis and related infections. *J Am Vet Med Assoc*, 223(12):1750–1756.
56. Michalik J., *et al.* (2012) Wild boars as hosts of human pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* variants. *Emerg Infect Dis*, 18: 998– 1001.
57. Munderloh, UG., Lynch, MJ., Herron, MJ., Palmer, AT., Kurti, TJ., Nelson, RD., *et al.* (2004). Infection of endotelial cells with *Anaplasma Marginale* and *A. Phagocytophilum*. *Vet Microbiol*, 101(1): 53– 64.
58. Nahayo A, Bardiau M, Volpe R, Pirson J, Paternostre J, Fett T, *et al.* (2014). Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in wild boar (*Sus scrofa*) in Belgium. *BMC Vet Res*, 10:80.
59. Nicholson, WL., Allen KE., McQuiston, JH., Breitschwerdt EB., Little, SE. (2010). The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs in people. *Trends Parasitol*, 26(4):205-12.

60. Nováková, M. e Vichová, B. (2010). Granulocytic anaplasmosis- emerging tick-borne disease of humans and animals. *Biologia* 65:925-931.
61. Packianathan, R., Hodge, A., Bruellke, N., Davis, L., Maeder, S., (2017). Comparative speed of kill of sarolaner (Simparica®) and afoxolaner (NexGard®) against induced infestations of *Ixodes holocyclus* on dogs”. *Parasit Vectors*, (10):98.
62. Pereira, A., Parreira, R., Nunes, M., Casadinho, A., Vieira, ML., Campino, L., *et al.* (2016). Molecular detection of tick-borne bacteria and protozoa in cervids and wild boars from Portugal. *Parasit Vectors*, 9(1):251.
63. Plier, ML., Breitschwerdt, EB., Hegarty, BC., & Kidd, LB. (2009). Lack of evidence for perinatal transmission of canine granulocytic anaplasmosis from a bitch to her offspring. *J Am Anim Hosp Assoc*, 45(5),232-8.
64. Poitout, FM., Shinozaki, JK., Stockwell, PJ., Holland, C.J., & Shukla, SK. (2005). Genetic variants of *Anaplasma Phagocytophilum* infecting dogs in western Washington State. *J Clin Microbiol*, 43(2), 796–801.
65. Pusterla, N., Pusterla, JB, Deplazes, P., Wolfensberger, C., Müller, W., Hörauf, A., *et al.* (1999). Seroprevalence of *Ehrlichia canis* and canine granulocytic *Ehrlichia* infection in dogs in Switzerland. *J Clin Microbiol*, 36(12):3460– 2.
66. René-Martellet, M., Lebert, I., Chêne, J., Massot, R., Leon, M., Leal, A., *et al.* (2015). Diagnosis and incidence risk of clinical canine monocytic ehrlichiosis under field conditions in Southern Europe. *Parasit Vectors*, 6;8:3.
67. Rizzoli, A., Silaghi, C., Obiegala, A., Rudolf, I., Hubálek, Z., Földvári, G., *et al.* (2014). *Ixodes ricinus* and its Transmitted Pathogens in Urban and Peri-Urban Areas in Europe: New Hazards and Relevance for Public Health. *Front in Public Health*, (2):1– 26.

68. Sainz, Á., Roura, X., Miró, G., Estrada-peña, A., Kohn, B., Harrus, S., *et al.* (2015). Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasites & Vectors*, 8(1):75.
69. Santos, AS. (2007). *Anaplasma phagocytophilum* and human granulocytic anaplasmosis in Portugal. Tese de doutoramento. Universidade Nova de Lisboa.
70. Santos, AS., Alexandre, N., Sousa, R., Nuncio, MS., Bacellar, F., Dumler, JS. (2009a). Serological and molecular survey of *Anaplasma* species infections in dogs with suspected tickborne disease in Portugal. *Vet Rec*, 164(6):168-71.
71. Santos, AS., Amaro, F., Santos-Silva, MM., De Sousa, R., Mathias, ML., Ramalhinho, MG., (2009b). Detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum* in Algerian mice (*Mus spretus*), Portugal. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 9(6):663-9.
72. Santos, AS., Bacellar, F., Dumler, JS. (2006). Human exposure to *Anaplasma phagocytophilum* in Portugal. *Ann N Y Acad Sci*, 1078:100-5.
73. Santos, AS, Bacellar, F., Dumler, JS (2009c). A 4-year study of *Anaplasma phagocytophilum* in Portugal. *Clin Microbiol Infect*, 15 Suppl 2:46-7.
74. Santos, AS., Santos-Silva, MM., Almeida, VC., Bacellar, F., Dumler, JS. (2004). Detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in Ixodes ticks (Acari: Ixodidae) from Madeira Island and Setubal District, mainland Portugal. *Emerg Infect Dis*, 10(9):1643-8.
75. Santos AS., Santos-Silva MM., Sousa Rd., Bacellar F., Dumler JS. (2009d) PCR-based survey of *Anaplasma phagocytophilum* in Portuguese ticks (Acari: Ixodidae). *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2009 Feb;9(1):33-40.
76. Santos-Silva, MM., Beati, L., Santos, AS., De Sousa, R., Nuncio, MS., Melo, P., *et al.* (2011). The hard-tick fauna of mainland Portugal (Acari: Ixodidae): an update on

- geographical distribution and known associations with hosts and pathogens. *Exp Appl Acarol*, 55(1):85-121.
77. Santos-Silva, MM., Carvalho, IL., Santos, AS., Núncio, MS., De Sousa, R., Equipa REVIVE. (2017) Ixodídeos removidos de Humanos e agentes infecciosos detetados no âmbito da Rede de Vigilância de Vectores. *Observações- Boletim Epidemiológico*, 18(2ªSérie): 10-13.
78. Santos-Silva, MM., Santos, AS., Carvalho, IL., De Sousa, R., Osório, H., Alves MJ., *et al.*, Revive 2017. Culicídeos e ixodídeos, Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Abril 2018. 29-50.
79. Savidge, C., Ewing, P., Andrews, J., Aucoin, D., Lappin MR., Moroff, S. (2015). *Anaplasma phagocytophilum* infection of domestic cats: 16 cases from the northeastern USA. *J Feline Med Surg*, 18(2):85-91.
80. Schouls, LM., Van De Pol, I., Rijpkema, SG., Schot, CS. (1999) Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol*, 37:2215–2222.
81. Shields, K., Cumming, M., Rios, J., Wong, MT., Zwicker, JL., Stramer, SL., *et al.* (2015). Transfusion- associated *Anaplasma phagocytophilum* infection in a pregnant patient with talassemia trait: A case report. *Transfus*, 55(4):719-25.
82. Stuen, S. (2007). *Anaplasma phagocitophilum*- The Most Widespread Tick- Borne Infection in Animals in Europe. *Vet Res Commun*, 31:79-84.
83. Stuen, S., Granquist EG., Silaghi, C. (2013). *Anaplasma phagocytophilum*- a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front Cell Infect Microbiol*, 22;3:31.

84. Silaghi, C., Kohn, B., Chirek, A., Thiel, C., Nolte, I., Liebisch, G., & Pfister, K. (2011). Investigations on the relationship of molecular and clinical findings of *Anaplasma phagocytophilum* involved in natural infections of dogs. *J Clin Microbiol*, 12(49):4413-4414.
85. Silaghi C., Pfister K., Overzier E. (2014) Molecular investigation for bacterial and protozoan tick-borne pathogens in wild boars (*Sus scrofa*) from Southern Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 14:371–3.
86. Silaghi C., Santos AS., Gomes J., Christova I., Matei IA., Walder G., *et al.* (2017). Guidelines for the Direct Detection of *Anaplasma* spp. in Diagnosis and Epidemiological Studies. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 17(1):12-22.
87. Silveira, JAG., Valente, PCLG., Paes, PRO., Vasconcelos, AV., Silvestre, BT., & Ribeiro, MFB. (2015). The first clinical and laboratory evidence of co-infection by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in Brazilian dog. *Ticks and Tick-Borne Dis*, 6(3), 242-245.
88. Strašek Smrdel K, *et al.* (2009). Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in wild boar in Slovenia. *Clin Microbiol Infect*, 15 (Suppl. 2): 50–52.
89. Woldehiwet, Z. (2010). The natural history of *Anaplasma phagocitophilum*. *Vet Parasitol*, 167(2-4):108-122.
90. Ybañez, AP. & Inokuma, H.. (2016). Anaplasma species of veterinary importance in Japan. *Vet World*, 9(11):1190-1196.
91. Zhang L., Liu Y., Ni D., Li Q., Yu Y., Yu XJ. (2008). Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China. *JAMA* 300(19):2263-2270.
92. Zoetis (2018). Acedido em 25 Julho 2018 em <http://www.zoetis.com.pt>.

Apêndice I



"Anaplasma phagocytophilum: repercussão da infecção da fauna silvestre em cães e gatos de uma zona endémica"

Nome do Proprietário: _____

Nome do Animal: _____ Idade: _____ Nº de Ficha: _____

Espécie: CÃO ☐ GATO ☐

Género: MI ☐ MC ☐ FI ☐ FC ☐

Raça: _____

Modo de Vida:

OUTDOOR ☐ Indoor com passeios no campo ☐

Motivo da Consulta:

Pirécia ☐ Mucosas Pálidas ☐ Outro ☐ _____

Amostra Recolhida:

Tubo EDTA (Sangue Total) ☐ Tubo Seco (Carraças) ☐

Data da Colheita: _____

OBSERVAÇÕES:

Notas: Tubo EDTA (Tampa Roxa): Sangue total
Tubo Seco (Tampa Vermelha): Carraças
Gatos SÓ OUTDOOR

Joana Trincheiras

Figura 23 – Documento apresentado aos tutores para conhecimento e colaboração no presente estudo.

Apêndice II

Diário de Notícias

INÍCIO / PORTUGAL

Há uma praga de javalis na Arrábida. Caçadores oferecem-se para abatê-los

Animais descem a zonas habitadas em busca de comida nos caixotes do lixo. Há perigo para moradores e ainda para a fauna e flora.

Roberto Doria
22 Novembro 2014 — 00:02

TOPICOS

- Portugal
- Parque Natural da Arrábida
- Câmara de Setúbal
- javalis

Relacionados

PARQUE NATURAL DA A...

Só os moradores podem matar javalis que destruam agricultura na Arrábida



Encontrar javalis à procura de comida junto a um contentor do lixo ou debaixo da mesa da esplanada de um qualquer restaurante passou a ser um cenário recorrente em plena serra da Arrábida. A proliferação de suínos disparou, sobretudo, nos últimos dois anos e estará hoje fora de controlo. Os caçadores querem evitar as atividades furtivas - que existem e assustam os moradores - e propõem montarias organizadas para acabar com a praga. Mas a resposta foi negativa.

Figura 24 – Notícia sobre javalis no PNSA. Novembro de 2014. Fonte: Diário de Notícias.

II

Há uma praga de javalis na Arrábida. Caçadores oferecem-se para abatê-los

Os animais chegam a descer a serra para entrar na cidade de Setúbal ou na vila de Azeitão à procura de água e alimento. Os moradores estão preocupados, receando ataques, mas também a fauna e flora se encontram ameaçadas. Sem predador, a dimensão do problema levou a Federação Nacional de Caça (Fencaça) a pedir ao Parque Natural da Arrábida (PNA) que permita a realização de montarias na serra para abate de alguns animais.

Mas a resposta foi negativa, apesar de o PNA reconhecer que o perigo espreita na serra e até deixar um aviso a quem visita o Portinho.

"Não há outra maneira de controlar esta praga", garante ao DN o presidente da Fencaça, Jacinto Amaro, recordando que os responsáveis do Parque Natural da Arrábida (PNA) "até já assumiram a necessidade de a praga ser controlada, porque é preocupante". Mas "depois proíbem ou limitam a caça ao javali a um número restrito de montarias e a um reduzido número de caçadores e de cães", lamenta o mesmo dirigente, recordando que no sopé da Arrábida existem várias zonas de caça, "mas todas elas têm fortes restrições".

Ainda segundo Jacinto Amaro, há quem esteja a dedicar-se à caça furtiva do javali, havendo vários relatos dos moradores que frequentemente ouvem tiros na serra. "É um novo fenómeno, que pode correr muito mal, porque alguém pode ser atingido, mesmo dentro do próprio quintal", sublinha.

Contactado pelo DN, o PNA remeteu comentários para o Instituto de Conservação da Natureza e da Floresta (ICNF) - que integra aquele organismo -, não tendo respondido em tempo útil, embora na porta do Forte de Santa Maria da Arrábida, que pertence ao PNA, esteja afixado um aviso que alerta para frequentes aparecimentos de javalis na zona.

São agressivos e atacam

O documento afixado pela PNA aconselha as pessoas a não alimentarem os animais, nem a colocarem comida à vista, alertando também para o perigo de uma maior aproximação aos suínos. "Lembre-se que estes animais são selvagens e quando ameaçados ou mesmo próximo de pessoas podem tornar-se agressivos e atacar", sublinha o ICNF.

Ninguém sabe explicar ao certo como apareceram os primeiros javalis na Arrábida, há cerca de cinco anos, onde já não davam sinais de vida há décadas. Afirma-se que alguém terá trazido alguns exemplares para ali que logo se reproduziram.

Estes animais não têm predador natural, podendo as fêmeas ter duas ninhadas de quatro a cinco crias a cada três anos, o que explica o boom.

Figura 25 – Notícia sobre javalis no PNSA. Novembro 2014 (Continuação). Fonte: Diário de notícias.

Diário de Notícias

agricultura na Arrábida

A autorização para poder matar javalis a tiro na Arrábida até consta de um processo simples. Mas é exclusivo a moradores.

Roberto Dorea

24 Novembro 2014 — 21.02

TEMAS

Parque Natural da Arrábida

Arrábida

javalis

Portugal

Relacionados

PORTUGAL

Há uma praga de javalis na Arrábida. Caçadores oferecem-se para abatê-los

O processo para poder abater legalmente javalis que andam à solta na zona da Arrábida é até relativamente simples. Basta ter licença de caçador e ser dono de uma parcela de terreno agrícola, que possa estar ameaçada pela praga de suínos que há três anos prolifera na serra.

Nestas circunstâncias, o Instituto de Conservação da Natureza e da Floresta (ICNF) emite credenciais a autorizar o abate dos animais, como revelou hoje aquele organismo ao DN. Mas o Clube da Arrábida (CA), formado por moradores, coloca reservas na exceção introduzida há cerca de um ano, justificando que "é perigosa", porque alguma pessoa pode ser atingida.

Recorde-se que a Federação Nacional da Caça (Fencapa) se ofereceu para colocar caçadores na Arrábida, promovendo frequentes montarias que permitissem controlar a espécie - há exemplares que se passeiam regularmente por zonas frequentadas por pessoas - mas o ICNF não permite. Alega que a caça é uma "atividade interdita" em grande parte da área do Parque Natural, pelo que só os proprietários rurais e florestais da encosta norte da serra têm acesso às licenças que permitem "corrigir o excesso de densidade de javali", diz fonte oficial do ICNF, reconhecendo o aumento desta espécie na serra, causadora de "danos nas produções agrícolas".

A mesma fonte avança ainda que em zonas mais naturais da serra, onde existem espécies de flora prioritárias para a conservação, já estão a ser detetados problemas idênticos de destruição destes "importantes habitats", alertando que uma zona crítica em termos de presença de javalis está situada na zona do Fortinho da Arrábida, Creiro e Alportuche. É uma franja da serra onde existem caixotes do lixo, pelo que os animais procuram por ali alimento.

Mas Pedro Vieira, presidente do CA e caçador há mais de 30 anos, alerta para o perigo que pode encerrar a caça ao javali feita por moradores com pouca experiência, uma vez que "dia e noite, há sempre pessoas a percorrer a serra por várias razões". E afirma ter contactado o parque há um ano sobre o assunto. "Eles mostraram-se favoráveis a emitir as licenças para desbaste da espécie, mas sempre achámos que são necessários outros meios", insiste, justificando que perante um "terreno tão atípico por ser muito fechado" é necessária a conjugação de vários agentes, como GNR, SEPNA, guardas do próprio parque natural e uma associação de caçadores que saiba organizar montarias. "Eu, por exemplo, não aceitei a credencial", assume o dirigente e morador em Alportuche.

E o que fazer quanto à encosta do lado sul, junto ao mar, onde se concentrará a maioria dos javalis? O ICNF explica que por ser uma zona muito encaixada morfologicamente, urbana e povoada, "não permite que sejam utilizadas correções de densidade que utilizem tiro", revelando apenas estar em curso a implementação de um projeto integrado de médio prazo. O objetivo passa pela "recolha, transporte e monitorização da espécie, salvaguardando as questões da preservação da flora, a saúde pública e a segurança da população residente e utilizadora desta área protegida", concluiu a mesma fonte.

Figura 26 – Notícia sobre javalis no PNSA. Novembro 2014. Fonte: Diário de Notícias.

Javalis surpreendem banhistas em praia da Arrábida

Arrábida

18 Agosto 2017 às 17:44



COMENTAR

TÓPICOS

Pessoas



Os populares que esta sexta-feira se deslocaram até às praias da Arrábida, entre eles o antigo jogador de futebol Jorge Cadete, viram-se confrontados com a presença invulgar de javalis no areal.

O aparecimento inusitado destes animais nas praias de Setúbal foi captado em fotografias pela antiga estrela do Sporting Clube de Portugal, que as partilhou naquele momento na sua conta de Facebook, numa publicação aberta.

Naquela que é, para Jorge Cadete, "a melhor praia do mundo", os javalis "passearam-se" no areal e tornaram-se rapidamente na principal atração dos banhistas, que fotografaram e filmaram o momento para mais tarde recordar. Os animais selvagens mantiveram-se perto da água e mostraram-se tranquilos com a presença próxima de pessoas.

Figura 27 – Notícia sobre javalis no PNSA. Agosto de 2017. Fonte: Jornal de Notícias.

INÍCIO / SOCIEDADE

Javalis à solta nas cidades são ameaça para a saúde pública

Direção Geral de Alimentação e Veterinária revela que 7% dos javalis abatidos entre 2011 e 2016 eram portadores da doença

 Roberto Dorea
27 Outubro 2017 — 00:27


TÓPICOS

- Tuberculose
- javalis
- natureza
- Sociedade
- Papel



Populações de javalis estão a aumentar © Fernando Fontes / Global Imagens

As populações de javalis estão a aumentar todos os dias em várias zonas do país, aproximando-se de cidades, vilas e aldeias à procura de comida e água, mas as autoridades alertam que representam uma séria ameaça para a saúde pública. São portadores de tuberculose e estão a pôr a vida humana em "risco", segundo alerta Eduardo Correia, do Sindicato de Médicos Veterinários (SMV), enquanto a Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) revela que 7% dos javalis abatidos nos últimos cinco anos de caça eram portadores da doença.

Os dados oficiais da DGAV - só em percentagem, pois não revelou o número de animais - sublinham a gravidade do problema. Entre 2011 e 2016 foram notificados aos serviços casos positivos de carcaças contagiadas com tuberculose em 28% das jornadas de caça na região Centro e 12% no Alentejo, após as respetivas confirmações laboratoriais.

Figura 28 – Notícia sobre javalis no PNSA Outubro 2017. Fonte: Diário de Notícias.

Javalis à solta nas cidades são ameaça para a saúde pública

problema. Entre 2011 e 2016 foram notificados aos serviços casos positivos de carcaças contagiadas com tuberculose em 28% das jornadas de caça na região Centro e 12% no Alentejo, após as respetivas confirmações laboratoriais.

José Manuel Batista, dirigente do Movimento Caçadores Mais Caça, relata ao DN que deixou de comer carne de javali há três anos, quando uma carcaça de um animal abatido numa montaria já revelava contágio de tuberculose. "O problema é que nessa montaria a tuberculose deu positivo porque havia um veterinário que analisou o animal, mas grande parte de outras montarias e batidas não têm médico", alerta, admitindo que muita carne esteja a chegar ao consumidor "sem ser sujeita à despistagem da doença", porque, segundo denuncia após vários contactos com as autoridades de saúde, "o país não tem veterinários em número suficiente".

E o sindicato dos veterinários confirma. Eduardo Correia revela que o contágio de tuberculose de que são alvo javalis e veados já foi tema de conversa com a DGAV, para se tentar encontrar uma solução que permita garantir inspeção a todos os animais abatidos, mas ainda não há resposta. "É um problema de saúde pública e temos que saber como devemos estar organizados, mas receio que não estejamos a fazer um bom trabalho, sobretudo na raia", admite, apoiando Jorge Cid, bastonário da Ordem dos Médicos Veterinários, que, citado pela Vida Rural, defendeu recentemente a criação de um corpo nacional de inspetores e a aprovação da carreira de inspetores sanitários para que todas as espécies de consumo público fossem analisadas.

O bastonário considerou "um problema grave de incidência de tuberculose nos veados e javalis", alertando que já existem casos de transmissão da doença a espécies pecuárias, existindo riscos para as pessoas, pelo que o sindicalista Eduardo Correia diz ser chegada a hora do Estado "formar mais gente. Não basta dizer que não há e deixar as pessoas ao risco. Este problema é muito sério para ser tratado assim".

A DGAV avança que não existe obrigatoriedade das montarias serem acompanhadas por um médico veterinário. A legislação em vigor na União Europeia obriga apenas a que pelo menos uma pessoa de um grupo de caçadores, designada "pessoa devidamente formada", tenha os conhecimentos de doenças de espécies cinegéticas "e seja capaz de reconhecer os problemas de saúde dos animais caçados. Esta pessoa pode ser um caçador ou o gestor de caça, acrescentando ainda este organismo que desde 2010, têm sido organizados e ministrados cursos de formação para habilitar essa "pessoa formada".

Ainda assim, diz a DGAV, na zona raiana entre Idanha-a-Nova e Barrancos, desde 2011 tem vindo a ser aplicado um plano especial de controlo da tuberculose em caça maior (javalis, veados, gamos, corços), confirmando que "foi concebido precisamente para evitar a propagação da tuberculose na zona geográfica identificada como de maior risco para transmissão da doença.

A tutela alerta ainda para o chamado Plano de Controlo e Erradicação da Tuberculose que está em aplicação desde 2011. Consiste na programação das montarias, sendo designado um médico veterinário oficial (da DGAV ou das autarquias) para observar os órgãos e as carcaças dos animais abatidos, procedendo ao exame das peças capturadas e à colheita de amostras para diversas doenças, como tuberculose, brucelose ou peste suína.

Jacinto Amaro, presidente da Fencapa (Federação Nacional de Caçadores), que tem vindo a acompanhar a evolução do fenómeno junto das autoridades, refere que é na linha de fronteira com Espanha, na larga extensão entre Idanha a Nova e Moura, que reside o maior risco epidemiológico. "Tanto em javalis como em veados e pode chegar aos animais domésticos como já acontece na Estremadura espanhola", refere, justificando que a doença existe em maior escala na região de Cáceres, na serra de São Pedro, tendo cruzado a raia nos últimos anos

Figura 29 – Notícia sobre javalis no PNSA. Outubro 2017. Fonte: Diário de Notícias.

Javalis à solta nas cidades são ameaça para a saúde pública

existe em maior escala na região de Cáceres, na serra de São Pedro, tendo cruzado a raia nos últimos anos.

"Os animais selvagens movimentam-se sem controlo à procura de comida e chegaram cá. Na Estremadura espanhola - que faz fronteira com o Alentejo - aproximaram-se de bovinos e caprinos, que também começaram a aparecer doentes. É outro risco que corremos em Portugal", diz o dirigente.

"Procuram alimento e é no Alentejo e Ribatejo que conseguem encontrar pivôs de milho que têm a comida, água e a cobertura ideal que para eles", diz, alertando ainda para os acidentes que têm vindo a provocar nas estradas, sobretudo nas vias de Coruche, Arraiolos, Montemor-o-Novo e Vendas Novas. "É rara a semana que não temos notícia de mais um carro que embateu num javali", conta.

600 abatidos na Arrábida

Os 600 javalis que anualmente têm sido abatidos na serra da Arrábida, segundo dados oficiais avançados pelo Instituto de Conservação da Natureza e Florestas (ICNF), pelos donos dos terrenos onde os animais procuram comida, atestam o boom que a espécie alcançou nesta região. Por aqui proliferou nos últimos sete anos entre os concelhos de Setúbal, Palmela e Sesimbra, tendo este verão sido vistos alguns animais na praia da Fonte da Telha, já no concelho de Almada.

Mas mas nem as chamadas "correções de densidades" levadas a cabo pelos proprietários e as associações de proprietários têm logrado travar o avanço da espécie na Arrábida, onde já é adjectivada de "praga". Este ano, o calor levou vários exemplares a refrescarem-se na praia de Galapinhos, indiferentes às dezenas de banhistas, enquanto em setembro dois javalis aproveitaram a calada da noite para tomarem de assalto o restaurante do Clube Naval Setubalense (Âncora Azul), deixando o estabelecimento parcialmente destruído.

Contactadas pelo DN, as câmaras de Setúbal e Sesimbra preferiram não comentar o assunto, alegando não ser da sua competência, mas o presidente da Clube da Arrábida, Pedro Vieira, reclama "mão pesada" ao ICNF no combate à invasão destes suínos selvagens, "antes que haja más notícias, com ataques a pessoas, por exemplo", diz. O dirigente, recorda que as batidas promovidas pelas autoridades e caçadores para correção de densidades, há dois anos, não resultaram, tal como viria a acontecer em 2016 com as capturas de animais vivos, com recurso a capturadores.

"É preciso investir noutras modalidades, como a espera noturna", sugere Pedro Vieira, revelando que esta estratégia tem resultado no lado norte da serra com os proprietários que dispõe de licença de uso e porte de arma e a quem o ICNF tem passado as credenciais que os habilitam a disparar sobre os animais que invadem os seus terrenos.

Ninguém sabe explicar ao certo como apareceram os primeiros javalis na serra Arrábida, onde estiveram décadas sem darem sinais de vida, mas recentemente passou a ser cenário recorrente encontrar javalis à procura de comida junto a um contentor do lixo ou até debaixo da mesa da esplanada de um qualquer restaurante no Portinho da Arrábida.

Figura 30 – Notícia sobre javalis no PNSA. Outubro 2017. Fonte: Diário de Notícias.