

JOANA MARIA TOSTÃO VALÉRIO

**Deteção molecular de *Anaplasma phagocytophilum*
em ovinos das raças Merina Branca e Merina Preta no
Alentejo**

Orientador interno: Professor Doutor David Ramilo

**Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa
Faculdade de Medicina Veterinária**

Lisboa

2023

JOANA MARIA TOSTÃO VALÉRIO

**Deteção molecular de *Anaplasma phagocytophilum*
em ovinos das raças Merina Branca e Merina Preta no
Alentejo**

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, conferido pela Universidade Lusófona - Centro Universitário de Lisboa, no dia 24 de fevereiro de 2023, perante o júri, com o Despacho de Nomeação N.º 140/2023, de 27 de janeiro de 2023, com a seguinte composição:

Presidente: Professora Doutora Margarida Alves, por delegação da Professora Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Professor Doutor Jacinto Gomes

Orientador: Professor Doutor David Ramilo

Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2023

Agradecimentos

Ao professor David Wilson Russo Ramilo pela disponibilidade em orientar-me na elaboração desta dissertação e pelo acompanhamento prestado.

À professora Helga Marlene Cardoso Waap pela disponibilidade em orientar-me na elaboração desta dissertação e pelo acompanhamento prestado durante a realização do meu estágio curricular.

À Ana Paula Dutra pela disponibilidade, paciência e pelo conhecimento transmitido durante o estágio, bem como pelo tempo dedicado a ajudar-me.

A toda a equipa do Departamento de Parasitologia do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária pela disponibilidade, auxílio e apoio diário.

À Associação Nacional de Criadores de Ovinos da Raça Merina (ANCORM), pela disponibilidade para que fossem recolhidas as amostras utilizadas na elaboração do presente trabalho.

Aos meus pais, pela dedicação e amor incondicionais que me permitiram alcançar este e muitos outros objetivos.

A todos os meus amigos e restantes familiares pelo apoio e motivação que me deram de início ao fim desta etapa da minha vida.

Aos meus bichinhos, que foram a minha maior inspiração no decorrer desta jornada.

Resumo

Anaplasma phagocytophilum é uma bactéria transmitida aos mamíferos através da picada de carrças infetadas. Esta bactéria é responsável por causar doença nos animais domésticos e selvagens. Sendo um agente com potencial zoonótico, representa também um risco para a saúde pública.

Este estudo teve como objetivo determinar a prevalência e fatores de risco da infecção por *A. phagocytophilum*, e avaliar a sua relação com o hemograma e parâmetros bioquímicos em ovinos das raças Merina Branca e Merina Preta.

No total, foram analisadas 409 amostras de sangue recolhidas de 255 ovinos da raça Merina Branca e 154 ovinos da raça Merina Preta provenientes de 27 explorações no Alentejo. O ADN das amostras foi extraído e uma sequência parcial do gene 16S RNA de *A. phagocytophilum* foi amplificado por *nested* PCR.

A presença do agente foi detetada em 16 dos animais, traduzindo-se numa prevalência global de, aproximadamente, 3,9% (IC95%: 2,03% - 5,79%). A percentagem de animais infetados foi significativamente superior entre os meses de abril a setembro, comparativamente ao restante período do ano. A análise do hemograma revelou percentagens de neutrófilos inferiores e de eosinófilos superiores nos animais infetados, quando comparados aos animais não infetados.

Os resultados do estudo sugerem uma baixa prevalência de *A. phagocytophilum* em ovinos de raça Merina na região do Alentejo e identificaram a época do ano como um fator de risco para a infecção, contribuindo assim para um melhor conhecimento da epidemiologia deste agente em Portugal.

Abstract

Anaplasma phagocytophilum is a bacterium transmitted to mammals through the bite of infected ticks. This bacterium is responsible for causing disease in domestic and wild animals. Being an agent with zoonotic potential, it also poses a risk to public health. This study aimed to determine the prevalence and risk factors for *A. phagocytophilum* infection, and to evaluate its relationship with blood count and biochemical parameters in sheep of the Merina Branca and Merina Preta breeds. In total, 409 blood samples collected from 255 Merina Branca and 154 Merina Preta sheep from 27 farms in Alentejo were analyzed. The samples were submitted to DNA extraction and tested by nested PCR of a partial sequence of the 16S RNA gene of *A. phagocytophilum*.

The presence of the agent was found in 16 of the animals, resulting in an overall prevalence of approximately 3.9% (IC95%: 2.03% - 5.79%). The percentage of infected animals was significantly higher between April and October comparatively to the remaining period of the year. Blood count analysis revealed a lower percentage of neutrophils and a higher percentage of eosinophils in infected animals when compared to non-infected animals.

The results of this study suggest a low prevalence of *A. phagocytophilum* in Merina sheep in the Alentejo region and identified the time of year as a risk factor for the infection, thus contributing to a better knowledge of the epidemiology of this agent in Portugal.

Índice geral

I. Descrição do estágio curricular: atividades desenvolvidas	13
II. Detecção molecular de <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	14
em ovinos das raças Merina Branca e Merina Preta no Alentejo	14
1. Introdução	14
<i>1.1 Agente</i>	14
1.1.2 História e Classificação taxonómica	14
1.1.3 Variantes de <i>A. phagocytophilum</i>	15
<i>1.2 Epidemiologia</i>	16
1.2.1 Vias de transmissão	19
1.2.2 Hospedeiros e Reservatórios	20
<i>1.3 Patogenia e Sinais clínicos</i>	21
<i>1.4 Diagnóstico</i>	23
<i>1.5 Prevenção e tratamento</i>	24
2. Material e Métodos	26
<i>2.1 Caracterização da amostra</i>	26
2.1.1 Amostra inicial total	26
2.1.2 Amostras selecionadas	26
<i>2.2 Caracterização das explorações</i>	27
<i>2.3 Extração de ADN total</i>	27
<i>2.4 Amplificação do gene 16S rRNA de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> por nested PCR</i>	28
<i>2.5 Amplificação do gene β-actina por PCR convencional</i>	30

2.6	<i>Observação dos produtos amplificados</i>	31
2.7	<i>Análise estatística</i>	32
3.	Resultados	34
3.1	<i>Caracterização da amostra</i>	34
3.1.1	Idade	34
3.1.2	Sexo	35
3.1.3	Raça	35
3.1.4	Tipo de pastoreio	36
3.1.5	Época do ano	37
3.2	Amplificação do gene da β -actina por PCR	37
3.3	Pesquisa de <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	38
3.3.1	Distribuição de animais positivos por exploração	39
3.3.2	Distribuição de animais positivos por freguesia	40
3.3.3	Relação entre a prevalência de infecção e os fatores de risco	41
3.3.4	Relação entre a prevalência de infecção e os parâmetros do hemograma	43
3.3.5	Relação entre a prevalência de infecção e os parâmetros bioquímicos	45
3.4	<i>Análise estatística</i>	46
3.4.1	Associação entre os potenciais fatores de risco e a infecção por <i>A. phagocytophilum</i>	46
3.4.2	Associação entre a infecção por <i>A. phagocytophilum</i> e os parâmetros hematológicos e bioquímicos	46
4.	Discussão de resultados	50
5.	Conclusão	56
6.	Referências bibliográficas	57
	Apêndice A	I
	Apêndice B	III

Índice de tabelas

Tabela 1 :Sequência dos primers utilizados na amplificação por nested-PCR do gene 16S rRNA de <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	30
Tabela 2: Sequência dos primers utilizados na amplificação por PCR do gene β -actina de ovino.	31
Tabela 3: Número de animais testados, número de animais positivos e respectivas prevalências intraexploração, nas explorações nas quais se obteve resultados positivos.	39
Tabela 4: Distribuição dos animais positivos e negativos em função da freguesia. ..	40
Tabela 5: Prevalência de <i>A. phagocytophilum</i> em função das variáveis em estudo. .	42
Tabela 6: Alterações do hemograma observadas nos animais testados para <i>A. phagocytophilum</i> e percentagem de animais infetados em cada categoria.	44
Tabela 7: Alterações dos parâmetros bioquímicos observados nos animais testados para <i>A. phagocytophilum</i> e percentagem de animais infetados em cada categoria.	45
Tabela 8: Parâmetros hematológicos e bioquímicos analisados, valores medianos, intervalos de referência e respetivos valores de <i>p</i>	47
Tabela A1: Resultados do Teste Exato de Fisher aplicado aos fatores de risco analisados.	I
Tabela A2: Resultados do Teste U de Mann-Witney aplicado aos parâmetros hematológicos e bioquímicos analisados.....	I

Índice de figuras

Figura 1: Distribuição dos animais por grupos etários.....	34
Figura 2: Distribuição dos animais relativamente ao sexo.....	35
Figura 3: Distribuição dos animais relativamente à raça.	36
Figura 4: Distribuição dos animais relativamente à prática de pastoreio misto.....	36
Figura 5: Distribuição das amostras relativamente à época de recolha.....	37
Figura 6: Amplificação do gene da β -actina ovina.....	38
Figura 7: Amplificação do gene 16S rRNA para deteção de <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	39
Figura 8: Boxplot- Distribuição da percentagem de neutrófilos nos animais positivos e negativos..	48
Figura 9: Boxplot- Distribuição da percentagem de eosinófilos nos animais positivos e negativos..	49
Figura B: Poster: “Deteção molecular de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> em ovinos no Alentejo.	III

Abreviaturas, siglas e símbolos

% – Percentagem

® – Marca registada

™ – Marca registada, do inglês *trademark*

< – Menor que

> – Maior que

16S rRNA – Gene que codifica a Subunidade 16S do ácido ribonucleico ribossómico

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ANCORME – Associação Nacional de Criadores de Ovinos da Raça Merina

anKA – do inglês *Ankyrin A Protein*

APA – *American Psychological Association*

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

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

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

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

FMV-ULisboa – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

g – grama

g – Força centrífuga relativa

g/dL – gramas por decilitro

gltA – Citrato sintase do inglês *citrate synthase*

groEL – Proteínas de choque térmico do inglês *heat shock operon*

HGA – Anaplasrose Granulocítica Humana do inglês *Human Granulocytic Anaplasmosis*

HGE – Erliquiose Granulocítica Humana do inglês *Human Granulocytic Erlichiosis*

IC – Intervalo de Confiança

INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

mg – Miligrama

mM – Massa Molecular

mL – Mililitro

msp2 – Proteínas de superfície (*Major surface protein-2*)

msp4 – Proteínas de superfície (*Major surface protein-4*)

°C – Graus Celsius

Pb – Pares de base

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

p/v – Peso por Volume

spp. – Espécies

TBE – Tris-borato-EDTA

ULusofona – Universidade Lusófona

U/L – Unidades por Litro

UV – Ultravioleta

var1 – Variante 1

var2 – Variante 2

V – Volt

W – Watt

μ m – Mricrómetro

μ L – Microlitro

I. Descrição do estágio curricular: atividades desenvolvidas

A autora realizou o seu estágio curricular no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) durante o período decorrido entre outubro de 2021 e fevereiro de 2022, tendo desenvolvido um projeto de investigação que resultou na elaboração da presente dissertação.

O estágio curricular teve como principais objetivos a consolidação e aplicação prática de conhecimentos adquiridos ao longo do percurso académico e a aquisição de novos conhecimentos e competências laboratoriais. Através da realização deste estágio foi permitido à autora realizar diferentes atividades laboratoriais nas quais estão incluídas técnicas como extração de ácido desoxirribonucleico (ADN) total a partir de amostras sanguíneas, *Polymerase Chain Reaction* (PCR) convencional, *nested* PCR e eletroforese em gel de agarose.

II. Detecção molecular de *Anaplasma phagocytophilum*

em ovinos das raças Merina Branca e Merina Preta no Alentejo

1. Introdução

1.1 Agente

Anaplasma phagocytophilum é uma bactéria Gram-negativa de dimensão reduzida (entre 0,5 e 0,8 μ m) cujo formato varia entre cocóide a elipsoidal, sendo o nucleóide e os ribossomas revestidos por duas membranas. Este microrganismo forma mórulas no citoplasma das células dos animais vertebrados que infeta (Dumler et al., 2001; Eberts et al., 2011; Nováková & Víchová, 2010; Popov et al., 1998; Silveira et al., 2015).

Atualmente, a espécie *A. phagocytophilum* encontra-se incluída no género *Anaplasma* juntamente com as espécies *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma platys* e *Anaplasma ovis* (Bauer et al., 2021; Dumler et al., 2001; Silaghi et al., 2018). Dentro deste género, a espécie *A. phagocytophilum* tem especial relevância uma vez que apresenta potencial zoonótico (Silaghi et al., 2018).

1.1.2 História e Classificação taxonómica

A família *Anaplasmataceae* pertence ao Reino *Bacteria*, Filo *Protobacteria*, Classe *Alphaproteobacteria* e Ordem *Rickettsiales* e foi durante muito tempo categorizada apenas com base em aspetos morfológicos, ecológicos, epidemiológicos e em características clínicas (Garrity et al., 2004).

Foi o desenvolvimento das técnicas moleculares e a melhoria dos métodos de cultura bacteriana que permitiram esclarecer a posição filogenética da Família *Anaplasmataceae*, e que, consequentemente, levaram a uma reorganização da mesma (Garrity et al., 2004).

A integração do género *Anaplasma*, composto pelas espécies *A. centrale*, *A. marginale* e *A. ovis*, na Família *Anaplasmataceae* (Garrity et al., 2004) foi proposta pela primeira vez em 1957, tendo em 1974 sido incluídos mais 4 géneros (*Aegyptianella*, *Eperythrozoon*, *Haemobartonella* e *Paranaplasma*) (Garrity et al., 2004).

Posteriormente, a análise de sequências de genes, como o 16s rRNA, proteínas de choque térmico (groEL) e citrato sintase (gltA), permitiu traçar relações filogenéticas entre *Anaplasmataceae* e bactérias de outras famílias (Inokuma et al., 2001a; Inokuma et al., 2001b). Desta forma, foi demonstrado que alguns agentes pertencentes à família *Rickettsiaceae* estavam proximamente relacionados com o género *Anaplasma* (Drancourt & Raoult, 1994; Inokuma et al., 2001a; Inokuma et al., 2001b; Walker & Dumler, 1996) e como tal, em 2001, Dumler et al. propuseram a reorganização da Ordem *Rickettsiales*.

No que diz respeito à família *Anaplasmataceae*, foi proposto que o género *Anaplasma* passasse a incorporar as espécies *Ehrlichia bovis*, *Ehrlichia platys* e *A. phagocytophilum*, tendo sido proposta a sinonímia da última com as espécies *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* e o agente da erliquiose granulocítica humana (HGE), dada a semelhança molecular e antigénica entre estes 3 agentes, demonstrada em diversos estudos prévios (Chen et al., 1994; Inokuma et al., 2001a; Inokuma et al., 2001b).

O primeiro agente reconhecido como agente etiológico de anaplasnose nos ruminantes foi *A. marginale*, no ano de 1910 (Theiler, 1911), sendo que vários outros agentes foram também associados a esta doença nos anos que se seguiram, entre os quais *E. phagocytophila* (atualmente *A. phagocytophilum*) (Foggie, 1951; Gordon et al., 1932). Apesar dos numerosos casos reportados em animais, nenhum caso de infeção humana por agentes da Família *Anaplasmataceae* tinha sido descrito até ao ano de 1954 (Misao & Kobayashi, 1955); no entanto, em 1986 foi reportado o primeiro caso severo e fatal de erliquiose monocítica humana nos Estados Unidos da América (Maeda, 1987) e, em 1994, foram reportados os primeiros casos de anaplasnose granulocítica humana (HGA) anteriormente chamada erliquiose granulocítica humana (HGE), nos estados de Minnesota e Wisconsin (Bakken et al., 1994; Chen et al., 1994). A natureza do agente desta doença permaneceu pouco conhecida até à junção das espécies *E. phagocytophila* e *E. equi* numa única espécie designada por *A. phagocytophilum*, o que só viria a ocorrer em 2001 (Dumler et al., 2001).

1.1.3 Variantes de *Anaplasma phagocytophilum*

As diversas variantes genéticas de *A. phagocytophilum* que circulam nos animais e nas carraças podem ser diferenciadas pela análise de genes como o 16S rRNA, groEL, *Major surface protein-2* (msp2), *Major surface protein-4* (msp4) e *Ankyrin A protein* (anKA) (Jaarsma et al., 2019; Langenwalder et al., 2020). Aparentemente existem graus variáveis de imunidade

cruzada estas variantes (Scharf et al., 2011). A existência de variantes patogénicas e apatogénicas foi já proposta, bem como a possibilidade de determinadas variantes serem específicas dos seus hospedeiros (Jaarsma et al., 2019; Ladbury et al., 2008; Langenwalder et al., 2020; Silaghi et al., 2011; Stuen et al., 2002).

Entre as 4 variantes identificadas na Noruega, encontram-se a variante 1 (var1) que se crê estar associada à maioria dos casos fatais de febre da carraça nos ovinos (Stuen et al., 2003b) e a variante 2 (var2), comumente encontrada em ovinos infetados naturalmente. Esta última está associada a manifestações clínicas menos graves, períodos febris e de bacteremia mais curtos e neutropenias menos severas (Stuen et al., 2003b; Stuen et al., 2009), demonstrando que as diferentes variantes deste agente causam sinais clínicos e reações distintas nos animais (Foggie, 1951; Stuen et al., 2003a). A infeção de ovinos com várias variantes em simultâneo foi também descrita e admite-se que na sua origem possa estar uma superinfeção ou a transmissão através de diferentes carraças infetadas (Ladbury et al., 2008; Stuen et al., 2009).

No Japão foram reportadas, tanto em ruminantes como em carraças, variantes de *Anaplasma* identificadas como *A. phagocytophilum* (Kawahara et al., 2006; Yoshimoto et al., 2010). A análise filogenética destas variantes mostrou que as mesmas formam um ramo distinto responsável por causar doença clínica em ruminantes na Europa e nos Estados Unidos da América, e que embora esteja relacionada com *A. phagocytophilum*, apresenta diferenças (Ybañez et al., 2012). Esta descoberta levou a que fosse proposto classificar estas variantes como uma nova espécie (Ybañez et al., 2012).

Recentemente, na China, outras variantes de *Anaplasma* relacionadas com *A. phagocytophilum* foram também detetadas em carraças e pequenos ruminantes. Estas mostraram ser filogeneticamente distintas das espécies de *Anaplasma* conhecidas e ainda por classificar, incluindo as japonesas (Kang et al., 2014; Yang et al., 2015).

Tanto as variantes japonesas como as chinesas foram em seguida detetadas em bovinos, pequenos ruminantes e carraças na Tunísia (Said et al., 2015; Said et al., 2017), bem como em ovinos e caprinos em Itália (Zobba et al., 2020).

1.2 Epidemiologia

A. phagocytophilum é considerado endémico em diversas áreas de distribuição dos seus vetores, incluindo os continentes europeu, asiático e americano (Brodie et al., 1986). No

entanto, a presença de animais serologicamente positivos também foi relatada em regiões onde a doença ainda não foi descrita, com prevalências variáveis até 25% (Santos, 2007).

A anaplasmoze granulocítica foi descrita pela primeira vez em 1932, num ovino na Escócia, tendo, já na altura, sido associada à presença de carrças da espécie *Ixodes ricinus*. Mais tarde, a doença foi também descrita noutras espécies de vertebrados, como cães, gatos, cavalos, cabras e camelos (Gordon et al., 1932). A doença foi observada pela primeira vez no ser humano, em 1994, nos Estados Unidos da América, tendo os primeiros casos humanos na Europa sido relatados em 1997 (Petrovec et al., 1997). Hoje é considerada uma doença de elevado risco zoonótico, representando um risco para a saúde pública (Dumler et al., 2001).

No Médio Oriente, a infeção por *A. phagocytophilum* em ovinos foi reportada em diversos países, entre os quais o Irão, onde foi detetada através de técnicas moleculares também em bovinos, caprinos e cães (Bashiribod, 2004; Noaman & Moradi, 2019; Yousefi et al., 2019), o Iraque (Hamzah & Hasso, 2019) e a Turquia (Aktas et al., 2010; Aktas et al., 2021).

No continente europeu, a infeção foi descrita não só em ovinos e caprinos, mas também em gatos, asininos, bovinos, equinos e humanos (Ebani et al., 2008; Savidge et al., 2016; Stuen et al., 2013), tendo a presença do agente sido também detetada em ixodídeos de aves migratórias (Leblond et al., 2005; Stuen et al., 2013). A presença desta bactéria foi ainda descrita em várias espécies de animais silvestres (Blanco & Oteo, 2002).

Os dados de prevalência reportados na Europa são muito variáveis. Na Noruega, a presença de *A. phagocytophilum* foi detetada em 12 de 32 (37,5%) amostras de sangue de borregos em pastoreio (Stuen et al., 2013) e na Alemanha foram descritas prevalências de 4% e 25% nos anos de 2011 e 2021 respetivamente, discrepância que os autores creem ter-se devido aos diferentes métodos de amostragem utilizados (Scharf et al., 2011).

Em Itália, foram também conduzidos diversos estudos em borregos apresentando, entre eles, resultados distintos (Ebani et al., 2008; Lillini et al., 2006; Moretta et al., 2019; Torina et al., 2010). Assim, a seroprevalência de 8,01% reportada em 2018 (Moretta et al., 2019) foi inferior aos dados obtidos entre 2006 e 2008 (Ebani et al., 2008; Lillini et al., 2006), que apontavam para valores entre 12% e 18% e consideravelmente inferior à percentagem de 98% identificada na região da Sicília em 2010 (Torina et al., 2010).

Em ovinos do norte da Europa, a infeção por *A. phagocytophilum* é comumente associada à presença de sinais clínicos; no entanto, no caso dos países mediterrânicos e países

do norte de África (Alberti et al., 2005; Said et al., 2018) a literatura não sugere que esta bactéria tenha um papel relevante em termos de patogenicidade. Embora o agente tenha sido observado em diversas espécies de carraças, a febre da carraça parece ser menos frequente ou desvalorizada em continentes que não o europeu (Stuen et al., 2009). Apesar disto, algumas das variantes identificadas em diversas espécies de vertebrados aparentam ser patogénicas também nestes locais (Alberti et al., 2005; Said et al., 2018).

É possível que a diferente relevância atribuída a esta doença na Europa e em outros continentes esteja relacionada com diferenças ao nível do manejo, vigilância e meios de diagnóstico disponíveis, espécies hospedeiras, raças de ovinos e variantes da bactéria (Stuen et al., 2009).

Mesmo entre zonas de pasto adjacentes, os problemas associados à infeção podem diferir, possivelmente devido ao envolvimento de variantes com diferentes graus de virulência e respostas imunitárias distintas (Stuen et al., 2003a). Julga-se que as variantes da bactéria possam ser transportadas para um novo local juntamente com as carraças infetadas, transmitindo assim a infeção a outros animais suscetíveis (Stuen et al., 2003a). Uma vez que os ovinos muitas vezes não apresentam manifestações clínicas, a doença pode manter-se camuflada durante muito tempo até que perdas severas associadas a infeções secundárias sejam notadas (Stuen, 2016).

O pico de ocorrência de casos foi identificado durante o período entre abril e setembro, com alguns casos observados durante o mês de outubro, coincidindo com a dinâmica sazonal da atividade das carraças, mais intensa durante estes meses em estudos realizados na Eslováquia (Chvostáč et al., 2018) e na Alemanha (Kohn et al., 2008). Porém, as alterações climáticas podem levar ao aumento do número de vetores, bem como a mudanças nos habitats e à dispersão quer dos vetores quer dos hospedeiros, o que pode contribuir para um aumento da incidência da doença (Klaus et al., 2008).

Os casos de doença humana, por sua vez, são maioritariamente registados nos Estados Unidos da América e apenas 36% destes requerem hospitalização, com uma taxa de letalidade de 1% (Dumler et al., 2005; Stuen et al., 2013). Já na Europa, a seroprevalência da infeção varia entre 2% e 28% (Dumler et al., 2005; Strle, 2004).

Em Portugal ainda não foram diagnosticadas infeções ativas no ser humano, porém foi detetada seropositividade para o agente em 31 de 792 pessoas (3,9%), com recurso ao método de imunofluorescência indireta (dos Santos et al., 2009b).

1.2.1 Vias de transmissão

Os vetores artrópodes são responsáveis pela transmissão de diversos agentes zoonóticos, estando envolvidos na transmissão de cerca de 50% das bactérias e riquetsias (Taylor et al., 2001). Entre as doenças transmitidas por vetores, as transmitidas por carrças são as mais importantes, afetando tanto os animais como o ser humano (Paules et al., 2018).

A transmissão e infecção por *A. phagocytophilum* dependem do ciclo de vida das carrças, os vetores deste agente, bem como do próprio hospedeiro vertebrado. Este agente foi detetado em várias espécies de carrças em todo mundo incluindo *Ixodes* spp., *Rhipicephalus* spp., *Amblyomma americanum*, *Dermacentor* spp., *Hyalomma* spp., e *Haemaphysalis* spp (Atif, 2016).

Na América do Norte, os vetores mais comuns são *Ixodes scapularis* e *Ixodes pacificus* (Teglas & Foley, 2006). No Médio-Oriente, no Irão e na Turquia, *Ixodes ricinus* foi sugerido como o vetor mais comum (Gokce et al., 2008; Noaman & Shayan, 2009).

Na Europa, o agente é maioritariamente transmitido por *I. ricinus*, sendo que em Portugal foram identificadas variantes de *A. phagocytophilum* em *I. ricinus* e *Ixodes ventralloii* (Santos et al., 2004; Stuen et al., 2013).

Os ciclos epidemiológicos deste agente são ainda pouco conhecidos no continente europeu dado que existe pouca informação acerca dos seus reservatórios naturais (Dugat et al., 2015) e embora tenha sido identificado em ixodídeos de outras espécies para além de *I. ricinus*, o contributo destas espécies enquanto vetores de *A. phagocytophilum* é ainda discutido (Woldehiwet, 2006).

A presença de vetores depende de diversos fatores entre os quais a temperatura, humidade e a abundância de hospedeiros suscetíveis, tendo as alterações climáticas levado a um aumento da incidência de *I. ricinus* em várias regiões (Medlock et al., 2013).

Geralmente, *A. phagocytophilum* é transmitido durante a refeição sanguínea do vetor 24 horas após a carrça se fixar, embora a infecção do hospedeiro possa dar-se antes (des Vignes et al., 2001). A disseminação do agente no organismo do hospedeiro ocorre através do sangue ou da linfa (Diniz & Breitschwerdt, 2012; Silveira et al., 2015).

Na China foi ainda documentada a transmissão nosocomial de *A. phagocytophilum* através do contacto direto com sangue ou secreções respiratórias, sendo necessária uma

investigação mais profunda para avaliar a importância desta via (Silaghi et al., 2018; Zhang et al., 2008).

No que respeita a transmissão vertical, Stuen et al (2018) sugeriram que a bactéria possa ser transmitida da mãe para o feto, por via transplacentária. No entanto, até hoje, só foi possível demonstrar a presença de ADN de *A. phagocytophilum* em borregos recém-nascidos, não havendo evidência de infecção viável, pelo que é essencial conduzir mais estudos em animais suscetíveis para confirmar esta via de transmissão (Stuen et al., 2018).

1.2.2 Hospedeiros e Reservatórios

A incidência do agente, bem como o seu potencial patogénico e a sua área de distribuição geográfica, aparentam estar relacionados com a disponibilidade de hospedeiros e reservatórios (Woldehiwet, 2010).

A proximidade entre animais silvestres e animais domésticos, bem como com o ser humano, constitui um risco para a ocorrência de doenças zoonóticas e doenças transmitidas por vetores. Assim, a presença natural de vetores artrópodes nas espécies silvestres poderá, com um contacto mais frequente, derivado, por exemplo, da sobreposição de habitat nas zonas de pasto dos animais de produção ou, no caso do Homem, de atividades ao ar livre ou da caça, constituir uma ameaça para a saúde animal e para a saúde humana. Trata-se de um problema que, sendo um desafio no que diz respeito à implementação de medidas de controlo e vigilância (Gortázar et al., 2007), requer uma maior consciencialização geral (Dantas-Torres et al., 2012).

Nos continentes europeu e asiático, a ocorrência da doença é mais frequente em ruminantes domésticos, o que indica uma maior suscetibilidade destes animais (Ebani et al., 2008; Matsumoto et al., 2006). Uma vez que os ruminantes podem desenvolver infeções persistentes, estes desempenham um papel importante, tanto como hospedeiros, como enquanto reservatórios (Matsumoto et al., 2006).

Animais como roedores e ungulados silvestres são considerados hospedeiros vertebrados e reservatórios em simultâneo (Nováková & Víchová, 2010). Espécies como o javali, podem desenvolver infeções assintomáticas e persistentes (Galindo et al., 2012). A infeção destes animais foi confirmada por reação em cadeia da polimerase (PCR) no Japão e em diversos países da Europa (Kiss et al., 2014; Masuzawa et al., 2011; Nahayo et al., 2014; Smrdel et al., 2009). As sequências de *A. phagocytophilum* identificadas em javalis na

Eslovénia e Polónia revelaram-se idênticas às sequências associadas a casos de doença em seres humanos (Srnđel et al., 2009).

Em Portugal foi detetada seropositividade em veados vermelhos (*Cervus elaphus*) (Pereira et al., 2016), roedores (*Mus spretus*) (Santos et al., 2009a) e também num lagarto (*Teira dugesii*) (De Sousa et al., 2012).

Segundo Leblond et al. (2005), o agente pode ser ainda transportado por aves migratórias de diversas espécies. Os autores sugerem que fossas, zonas húmidas e canais, ao favorecer uma maior concentração destas aves, podem contribuir para a introdução e disseminação de carrças a outros animais, e assim, estabelecer novos ciclos de *A. phagocytophilum* (Leblond et al., 2005).

1.3 Patogenia e Sinais clínicos

Dependendo do hospedeiro, *A. phagocytophilum* tem como alvo diferentes tipos de células e o seu ciclo de replicação ainda não é totalmente conhecido. Sabe-se, no entanto, que a bactéria apresenta tropismo para os leucócitos polimorfonucleares, em especial para os neutrófilos (Chen et al., 1994; Gordon et al., 1932; Gribble, 1969), formando mórulas dentro destas células (Diniz e Breitschwerdt, 2012; Silveira et al., 2015). Este organismo possui também a capacidade de infetar células endoteliais (Munderloh et al., 2004) e células da linhagem megacariocítica (Granick et al., 2008) que podem servir de reservatórios celulares e promover a infeção de neutrófilos no sangue periférico (Carrade et al., 2009).

A patogenia de *A. phagocytophilum* está relacionada com a estirpe ou variante em questão e a sua adaptabilidade ao hospedeiro/reservatório ou ao vetor presente (Woldehiwet, 2010). O agente tem capacidade de infetar várias espécies de vertebrados incluindo humanos, bovinos, ovinos, caprinos, cervídeos, equinos, bem como roedores, cães e gatos (Wang et al., 2013).

No ser humano, a incidência de casos de doenças transmitidas por carrças tem vindo a aumentar nas últimas décadas (Jaenson et al., 2012) sendo a anaplasmoose granulocítica humana uma doença cada vez mais reconhecida a nível global (Ybañez & Inokuma, 2016). Na Europa e na Ásia, o número de casos de Anaplasmoose em humanos é bastante menor, ocorrendo sobretudo nos países da Europa do Norte e Central, como a Suécia e a Eslovénia. Estudos de seroprevalência apontam, contudo, para que a infeção humana possa estar subdiagnosticada na

Europa, possivelmente devido a uma predominância de infecções assintomáticas ou subclínicas (dos Santos, 2007).

No Homem, a infecção manifesta-se como uma síndrome febril inespecífica e, em geral, os sinais clínicos incluem hipertermia, cefaleias e mialgias generalizadas (Stuen et al., 2013). Na sua grande maioria, as infecções humanas são ligeiras ou assintomáticas (Dumler et al., 2005; Stuen et al., 2013) sendo a doença frequentemente autolimitada, passando, assim, despercebida (Dumler et al., 2005; Strle, 2004).

Para além do potencial zoonótico deste agente patogénico, *A. phagocytophilum* representa uma ameaça para a indústria ovina, uma vez que pode causar doença clínica nestes animais associada à imunossupressão, o que pode levar a complicações e infecções consequentes (Stuen et al., 2013).

O período de incubação do agente em ovinos pode variar entre uma a duas semanas (Woldehiwet, 2010). Os sinais clínicos incluem um período de febre alta, geralmente com a duração de cerca de uma semana, podendo prolongar-se até duas semanas (Gribble, 1969; Stuen et al., 2003a; Woldehiwet, 1987). A reação febril que pode ser superior a 41 °C, atinge o seu pico ao segundo dia de bacteriemia (Foggie, 1951; Woldehiwet, 1987) e é seguida de neutropenia (<0,7 neutrófilos/ml) durante uma a duas semanas, sendo que a manifestação de febre pode diferir consoante a variante da bactéria, a idade dos animais e o seu estado imunológico inicial (Stuen et al., 2003a). Os animais infetados são suscetíveis a infecções secundárias, como septicémia, artrite e pneumonia (Stuen, 2001; Stuen et al., 2012). Pensa-se que a doença clínica associada a infecção secundária ocorra apenas em ovinos infetados pela primeira vez ou em casos nos quais se encontram envolvidas variantes heterólogas do agente, de alta patogenicidade (Stuen et al., 2016). No entanto, ainda que a infecção não seja sempre causa de doença evidente, podendo manter-se subclínica ou não ser reconhecida, esta pode afetar o crescimento dos animais e provocar perdas de produção (Stuen et al., 2016).

Estudos sugerem que as taxas de infecção são mais elevadas em adultos, possivelmente devido à infecção crónica nestes animais (Hamzah et al., 2019; Said et al., 2015), embora esta associação não tenha ainda sido comprovada em nenhuma espécie (Stuen, 2016). Foi também sugerido que ovinos do sexo feminino apresentam uma maior pré-disposição à infecção, provavelmente por estarem mais expostos a fatores de stress, como a gravidez, lactação e parto (Hamzah & Hasso, 2019).

Nos borregos, a imunossupressão causada tem um impacto negativo na saúde dos animais, ao predispor para infecções secundárias por *Mannheimia haemolytica* ou *Bibersteinia*

trehalosi, associadas a stress respiratório (Daniel et al., 2016). Para além disto, pode ocorrer coinfeção com diversos outros microrganismos, incluindo *A. ovis* (Torina et al., 2012) e estafilococos que, nestes animais, podem originar piemia e poliartrite severa (Sargison & Edwards, 2009) potencialmente levando a paralisia e claudicação (Stuen et al., 2009).

1.4 Diagnóstico

O diagnóstico preciso de doenças transmitidas por carraças, em especial as com potencial zoonótico, como a anaplasmose granulocítica, é essencial para avaliação do risco e implementação de programas de controlo (Said et al., 2017).

Em ovinos, a ocorrência de determinados sinais clínicos em simultâneo sugere a presença da doença, mais especificamente, o aparecimento repentino de febre alta acompanhada de alterações hematológicas e a presença de inclusões citoplasmáticas típicas em fagócitos, especialmente em neutrófilos (Foggie, 1951). No exame *post mortem* de animais infetados, a presença de um fígado aumentado até 5 vezes o seu tamanho normal, frequentemente com presença de hemorragia subcapsular, é sugestiva de anaplasmose granulocítica ovina (Foggie, 1951).

A microscopia de esfregaços de sangue recolhidos de animais durante o período febril, é geralmente suficiente para confirmar o diagnóstico, dado que na fase aguda da doença, até 90% dos neutrófilos podem aparecer infetados (Foggie, 1951). Na observação microscópica do esfregaço, o microrganismo é visível sob a forma de inclusões azuis claras quando corado com May-Grünwald-Giemsa (Foggie, 1951).

A inoculação de sangue infetado em animais suscetíveis foi utilizada no passado como método de confirmação de diagnóstico; no entanto, a PCR é atualmente o meio mais frequentemente usado para confirmar a presença de *A. phagocytophilum* em amostras de sangue e tecidos (Stuen et al., 2013), devido à sua elevada sensibilidade e especificidade, que permite um diagnóstico clínico rápido (Song et al., 2020). Também a imunofluorescência indireta tem sido utilizada, porém pode ser difícil conseguir um diagnóstico através desta técnica nos casos de infeção aguda em borregos em virtude do período de janela imunológica (Stuen et al., 2013).

1.5 Prevenção e tratamento

A substância de primeira escolha no tratamento direto da infecção, bem como no tratamento profilático da febre da carraça, é a tetraciclina (Stuen, 2001; Stuen et al., 2012). Stuen et al. (2001) sugerem que a administração de oxitetraciclinas de curta e longa duração nas doses 20 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, durante 5 dias consecutivos, é eficiente no tratamento de febre da carraça, ainda que não seja capaz de eliminar a infecção na totalidade. A dose de 40 mg/kg até 15 dias antes da infecção demonstrou ser eficaz na prevenção da doença (Brodie et al., 1988). Este princípio ativo é utilizado profilaticamente no Reino Unido, quando os animais são movidos para um novo local (Brodie et al., 1986; Samish et al., 2004).

A forma mais eficaz de prevenir a febre da carraça é evitar que os animais tenham acesso a áreas infestadas pelo vetor, o que é difícil, sobretudo nos animais criados em extensivo (Stuen et al., 2003a). Uma forma de diminuir a densidade de carraças e, por conseguinte, a ocorrência de febre da carraça, são as técnicas de manejo e modificação das pastagens, através de métodos como a drenagem, queima controlada, tratamentos herbicidas, desbaste mecânico e remoção de folhas velhas (Sonenshine, 1993).

No entanto, modificações ambientais significativas não são sempre possíveis e os animais encontram-se sempre em risco de ser infestados com carraças vindas de ambientes próximos, principalmente se outros animais utilizarem o mesmo pasto (Samish et al., 2004). Em áreas endêmicas, quando não existe possibilidade de evitar as áreas infestadas, o tratamento *pour-on* com ectoparasiticidas, como os piretróides, pode ser necessário (Stuen et al., 2003a, Stuen et al., 2012). Contudo, é necessário ter presente que, embora estas substâncias apresentem capacidade de reduzir a infestação nos animais, não conferem qualquer proteção contra a transmissão de agentes patogénicos (Stuen et al., 2012).

Para além disso, é necessário repetir o tratamento diversas vezes durante a época de maior prevalência do vetor, (Brodie et al., 1986; Samish et al., 2004) o que pode comprometer a saúde animal, humana e ambiental e representa um problema devido à resistência crescente das carraças aos carracidas (Samish et al., 2004).

A possibilidade de se desenvolver uma vacina de forma a mitigar o problema das resistências aos antibióticos e acaricidas tem vindo a ser estudada (Stuen et al., 2015); todavia, ainda são escassos os estudos que demonstraram eficácia na proteção contra as infeções transmitidas por carraças (Contreras et al., 2017; Ducken et al., 2015; Shkap et al., 2002; Stuen et al., 2015).

Um dos problemas no desenvolvimento de vacinas é a existência de múltiplas variantes do agente, e a dificuldade de obter uma vacina capaz de conferir proteção contra todas (Stuen et al., 1998). Em 1998, Stuen et al. inocularam uma variante de *A. phagocytophilum* responsável por causar doença em equinos em borregos; porém, esta não conferiu proteção contra a variante tipicamente isolada dos ovinos. Mais tarde, Stuen et al. (2003) demonstraram que uma variante altamente virulenta isolada de ovinos conseguiu gerar imunidade contra variantes menos virulentas nos mesmos animais; contudo, o inverso não se verificou (Stuen et al., 2003a). Posteriormente, os mesmos autores prepararam uma vacina inativada a partir do agente isolado de neutrófilos de ovinos, mas a vacinação de borregos não protegeu os animais contra a infecção quando expostos à bactéria (Stuen et al., 2015). O estado imunológico inicial dos animais utilizados para os estudos mencionados não era, no entanto, devidamente conhecido e por este motivo os autores consideraram ser necessária uma maior compreensão da interação entre o agente e o hospedeiro bem como dos mecanismos de imunidade envolvidos (Eskeland et al., 2019). Em 2020, num estudo realizado na Noruega, a vacinação de ovinos com uma variante de *A. phagocytophilum* geneticamente modificada conferiu aos animais uma proteção parcial, mas baixa, contra a infecção (Eskeland et al., 2021).

O controlo biológico dos vetores de *A. phagocytophilum*, recorrendo a determinadas bactérias, fungos e nemátodos, é outra opção que tem vindo a ser investigada (Samish et al., 2004).

A seleção de animais geneticamente mais resistentes à infecção poderá vir a ser outra possibilidade a ser explorada no futuro, tendo Stuen et al. (2011) já observado diferenças na manifestação de febre entre borregos das raças *Old Norse* e *Norwegian White* (Stuen et al., 2011).

O presente trabalho teve como objetivo determinar a prevalência e fatores de risco da infecção por *A. phagocytophilum* em ovinos das raças Merina Branca e Merina Preta, e também avaliar a sua relação com o hemograma e parâmetros bioquímicos nos animais infetados. Os estudos relativos à epidemiologia de *A. phagocytophilum* em Portugal são escassos, sendo que, até à data, não existem dados sobre a sua prevalência nestas raças. A necessidade de abordar este tema resultou da relevância deste agente, quer em termos do seu impacto na saúde animal, quer devido ao seu carácter zoonótico com potencial patogénico para a saúde humana.

2. Material e Métodos

2.1 Caracterização da amostra

2.1.1 Amostra inicial total

As amostras de sangue analisadas foram obtidas no âmbito do projeto MERINOParasite PTDC/CVT-CVT/28798/2017 entre setembro de 2019 e dezembro de 2021 em 35 explorações na região do Alentejo. As amostras foram colhidas na sua totalidade pela Associação Nacional de Criadores da Raça Merina (ANCORME) para efeitos de testes de paternidade dos animais e inscrição no livro genealógico das raças Merina Branca e Merina Preta, tendo parte da amostra sido utilizada neste trabalho. A colheita foi realizada por punção da veia jugular com ajuda de tubos Vacutainer® (Sarstedt), devidamente identificados com o número de registo do animal e transportados no frio num período máximo de 24 horas para o Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), onde foram conservadas a -20 °C graus até ao seu processamento. No dia da colheita das amostras, foi também preenchido um questionário online para recolha de dados individuais dos animais, incluindo a raça, o sexo, a idade, bem como dados de manejo da exploração, entre os quais a prática de pastoreio misto com outras espécies animais e de vazio das pastagens. O sangue recolhido de cada animal foi ainda submetido a análise de diversos parâmetros hematológicos e bioquímicos no laboratório de análises clínicas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-ULisboa). Todos os resultados laboratoriais, dados do questionário e informação geográfica das explorações encontram-se integrados numa base de dados única e foram disponibilizados para análise.

2.1.2 Amostras selecionadas

Para efeitos do presente trabalho, selecionaram-se, aleatoriamente, entre 10 e 20 amostras de 27 das explorações intervencionadas, perfazendo um total de 409 amostras de sangue.

O pastoreio misto com animais de outras espécies era praticado em 10 das explorações incluídas no estudo, enquanto nas restantes os animais não pastavam juntamente com outras espécies. Em nenhuma das explorações havia períodos de vazio das pastagens.

Todas as amostras de sangue foram submetidas a extração de ADN total.

2.2 Caracterização das explorações

Por exploração foram testadas, em média, amostras de sangue de 15 animais. As amostras incluídas no estudo foram recolhidas de um total de 27 explorações pertencentes a 23 freguesias na região do Alentejo. Estas freguesias pertenciam a 3 distritos distintos, sendo que 10 das explorações se localizavam no distrito de Évora, 7 no distrito de Portalegre 6 no distrito de Beja.

2.3 Extração de ADN total

O ADN foi extraído a partir de amostras de sangue total com recurso ao Kit de Purificação de ADN genómico “Citogene[®] Cell and Tissue Kit” de acordo com o seguinte protocolo:

1. A um tubo contendo 900 μL de “Red Blood Cell Lysis”, adicionaram-se 300 μL de sangue total. De seguida, o tubo foi invertido 10 vezes e procedeu-se à incubação durante 1 minuto à temperatura ambiente.
2. De seguida procedeu-se à centrifugação a 16.000 g numa centrífuga durante 1 minuto. Removeu-se o sobrenadante com uma pipeta, deixando no tubo o *pellet* correspondente à fração celular do sangue e cerca de 10-20 μL do líquido residual.
3. Agitou-se o tubo num vórtex durante 10 segundos, de forma a ressuspender o pellet no líquido residual, a fim de facilitar o passo da lise celular.
4. Foram adicionados 300 μL de solução “Cell Lysis” à suspensão celular e levou-se ao vórtex a alta velocidade durante 10 segundos.
5. Adicionou-se 100 μL de solução “Protein Precipitation” ao lisado celular.
6. Agitou-se no vórtex a velocidade elevada durante 20 segundos para homogeneizar uniformemente a solução “Protein Precipitation” com o lisado celular.

7. Centrifugou-se durante 1 minuto a 16.000 g, obtendo-se um *pellet* proteico de coloração castanha.
8. Decantou-se o sobrenadante contendo o ADN para um novo tubo de 1,5 mL contendo 300 µL de Isopropanol a 100%, deixando para trás o *pellet* proteico de coloração castanha.
9. Misturou-se a amostra invertendo com cuidado 50 vezes.
10. Centrifugou-se 1 minuto a 16.000 g. Após este passo o ADN ficou visível sob a forma de um pequeno *pellet* branco.
11. De seguida eliminou-se o sobrenadante e deixou-se o tubo escorrer num papel absorvente. Foram depois adicionados 300 µL de etanol a 70% e inverteu-se o tubo várias vezes para lavar o *pellet*.
12. O tubo foi novamente centrifugado durante 1 minuto a 16.000 g e o etanol cuidadosamente eliminado, deixando para trás o *pellet*.
13. De seguida, o tubo foi invertido e deixado escorrer em papel absorvente durante cerca de 5 segundos.
14. Adicionou-se 100 µL de “DNA Hydration” e levou-se ao vórtex durante 5 segundos, de forma a obter uma concentração aproximada de 100 µg/mL, para um rendimento aproximado de 10 µg de ADN.
15. As amostras foram incubadas a 65 °C durante 10 minutos para acelerar a reidratação.
16. No final da extração, as amostras de ADN foram conservadas a -20 °C.

2.4 Amplificação do gene 16S rRNA de *Anaplasma phagocytophilum* por nested PCR

Para evitar contaminação das amostras com aerossóis de ADN exógeno, foi realizada higienização das bancadas, bem como de todo o material utilizado, nomeadamente das micropipetas automáticas e suportes, com recurso a lixívia a 10% e álcool a 70%. Após a higienização e antes de se proceder à realização da PCR, todo o material, incluindo as pontas de pipetas bem como a água utilizada na reação, foram submetidas a luz UV numa câmara de fluxo laminar durante 20 minutos. A preparação da mistura reacional foi realizada numa sala separada, de forma a minimizar a contaminação com aerossóis de ADN. Todos os restantes

procedimentos da PCR (adição do ADN, reação de amplificação e eletroforese), foram realizadas numa segunda sala.

De forma a detetar a presença de ADN de *A. phagocytophilum* nas amostras de sangue total recolhidas dos ovinos, foi realizada uma *nested* PCR tendo como alvo molecular um fragmento do gene 16S rRNA de *A. phagocytophilum*.

A *nested* PCR foi utilizada neste trabalho de forma a aumentar a especificidade e a sensibilidade da PCR na amplificação do gene alvo, uma vez que permite a realização de um maior número de ciclos. A maior especificidade desta reação advém da ligação de dois pares de *primers* diferentes ao mesmo *template* alvo. A *nested* PCR geralmente envolve duas reações de amplificação sequenciais, cada uma com um par de *primers* diferente, servindo o produto da primeira amplificação, como *template* para a segunda reação de PCR (Green & Sambrook 2019). Esta reação representa assim um método eficaz de amplificar segmentos de *templates* mais longos (Green & Sambrook 2019)

O alvo molecular para a deteção *A. phagocytophilum* nas amostras de sangue por *nested* PCR foi um fragmento de 641 pares de base do gene 16S rRNA desta bactéria.

Inicialmente foi preparada uma mistura reacional com um volume final de 25 µL, contendo 8,5 µL de água desionizada estéril, 12,5 µL de MasterMix Nzytech (2X) e 1 µL de cada um dos *primers* EC9 e EC12a. Para cada reação de PCR realizada, foram preparados e incluídos um controlo positivo para *A. phagocytophilum* proveniente de cultura de macrófagos [cedido pelo Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infeciosas (CEVDI)] e um controlo negativo contendo água destilada. A amplificação foi realizada num termociclador MJ Mini™ Personal Thermal. O protocolo da PCR foi iniciado com um ciclo de pré-desnaturação a 95 °C durante 5 minutos, seguindo-se 35 ciclos de desnaturação a 95 °C com duração de 20 segundos, uma etapa de *annealing* a 58 °C por 30 segundos, uma etapa de extensão a 72 °C durante 45 segundos e por fim uma etapa de extensão final a 72 °C durante 10 minutos. Para a realização da segunda PCR, utilizou-se 2 µL do produto de cada reação da primeira PCR como material inicial, ao qual foi adicionado o segundo par de *primers* SSAP2f/SSAP2r e os mesmos constituintes da primeira reação, também num volume total de 25 µL. Para esta segunda amplificação foram utilizadas condições de protocolo de PCR semelhantes às da amplificação anterior.

De forma a observar os produtos da amplificação, 8ml de cada reação de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) em tampão TBE 1x, corados com GreenSafe (NZYTech).

Tabela 1 :Sequência dos primers utilizados na amplificação por nested-PCR do gene 16S rRNA de *Anaplasma phagocytophilum*.

Gene	Primers	Sequência (5' – 3')	Produto de amplificação	Referência
16S rRNA	EC9	TACCTTGTTACGACTT	1,462 pb	Kawahara et al., 2006
	EC12a	TGATCCTGGCTCAGAACGAACG		
	SSAP2f	GCTGAATGTGGGGATAATTTAT	641 pb	
	SSAP2r	ATGGCTGCTTCCTTTCGGTTA		

2.5 Amplificação do gene β -actina por PCR convencional

Das 409 amostras de ADN extraído, foi selecionado um grupo de forma a proceder-se à avaliação da qualidade da extração de ADN. Selecionou-se aleatoriamente uma amostra por cada dia de extração e procedeu-se à amplificação de um fragmento do gene da β -actina por PCR convencional. O objetivo desta etapa foi verificar a qualidade do ADN anteriormente extraído de forma a evitar a ocorrência de falsos-negativos na PCR para *A. phagocytophilum*.

Foi preparada uma mistura reacional com um volume total de 25 μ L, contendo 8,5 μ L de água desionizada estéril, 12,5 μ L de MasterMix Nzytech (2X), 1 μ L do *primer* ACT1005F e 1 μ L do *primer* ACT1135R. Como controlo positivo foi utilizada uma amostra de bovino do Laboratório de Parasitologia do INIAV, anteriormente extraída e quantificada, e como controlo negativo, utilizou-se água destilada. A amplificação foi realizada num termociclador MJ

Mini™ Personal Thermal. O protocolo de PCR iniciou-se com um ciclo de pré-desnaturação a 95 °C durante 5 minutos, seguindo de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, uma etapa de *annealing* a 55 °C durante 45 segundos, uma etapa de extensão a 72 °C por 1 minuto e terminando com uma etapa de extensão final a 72 °C durante 10 minutos.

De forma a observar os produtos da amplificação, 8ml de cada reação de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) em tampão TBE 1x, corados com GreenSafe (NZYTech).

Tabela 2: Sequência dos primers utilizados na amplificação por PCR do gene β -actina de ovino.

Gene	Primers	Sequência (5' – 3')	Produto de amplificação	Referência
β -actina	ACT1005F	CAGCACAATGAAGATCAAGATC ATC	191 pb	Toussaint et al., 2007
	ACT1135R	CGGACTCATCGTACTCCTGCTT		

2.6 Observação dos produtos amplificados

Os produtos resultantes da *nested* PCR para detecção de *A. phagocytophilum*, bem como os produtos obtidos da PCR convencional realizada para o gene da β -actina, foram corridos em gel de agarose a 1,5% (p/v), em tampão Tris-Borato (90mM) - EDTA (2mM), pH 8,3 (TBE 1X), num sistema de eletroforese horizontal de acordo com o procedimento a seguir descrito:

1- Para preparar o gel, pesaram-se numa balança de precisão 1,5 g de agarose para um copo Erlenmeyer.

2- De seguida, adicionaram-se 50 mL de tampão TBE 1X ao Copo Erlenmeyer contendo a agarose.

3- De seguida, montou-se o suporte do gel e inseriram-se os pentes para criar os poços no gel de agarose.

4- O copo Erlenmeyer foi levado ao micro-ondas (700 W) o tempo necessário para garantir a completa fusão da agarose, visível pela homogeneidade e translucidez do conteúdo.

5- De seguida, a agarose foi ligeiramente arrefecida, agitando o copo Erlenmeyer sob água corrente e misturada com 3 μ L de GreenSafe (NZYTech).

6- A agarose foi vertida no suporte e aguardou-se a sua polimerização

7- Concluída a polimerização, o gel de agarose foi transferido para a tina de eletroforese previamente enchida com tampão TBE 1X.

8- Ao primeiro poço do gel foram adicionados 5 μ L do marcador de pesos moleculares Nzytech™ NZYDNA Ladder VI para a PCR convencional e do marcador de pesos moleculares NZYTech NZYDNA Ladder VI para a *nested* PCR, tendo os produtos de PCR para o gene da β -actina ovina ou para o 16sRNA de *A. phagocytophilum* sido aplicados nos poços seguintes, num volume de 8 μ L.

9- Após a aplicação das amostras nos poços do gel, ligou-se a fonte de alimentação Bio Rad PowerPac™ Basic Power Supply e realizou-se a eletroforese a 90 V, durante 50 minutos.

Os produtos amplificados foram posteriormente visualizados com o sistema Gel Doc™ Ez com recurso ao software Image Lab™ Software. Através do *software* mencionado foram capturadas e analisadas imagens geradas a partir do gel de eletroforese. A presença de ADN alvo foi confirmada pela visualização de bandas com cerca de 191 pares de base para a PCR convencional e 641 pares de base para a *nested* PCR.

2.7 Análise estatística

Os resultados obtidos através da técnica de PCR para deteção de *A. phagocytophilum* foram utilizados para o cálculo da prevalência com um intervalo de confiança de 95% com recurso à plataforma online *Epitool*.

De forma a tornar a variável idade, que se encontrava registada em meses, numa variável qualitativa, foram criadas duas categorias: animais com idade inferior ou igual a 6 meses e animais com idade superior a 6 meses. A data de recolha de cada amostra foi avaliada e classificada como pertencendo ou não ao período do ano entre os meses de abril e setembro. Para as variáveis qualitativas raça e tipo de pastoreio, foram considerados, respetivamente, animais pertencentes à raça Merina Branca ou Merina Preta e animais criados em explorações onde o pastoreio com outras espécies era ou não uma prática comum.

Toda a estatística descritiva aplicada a cada variável, assim como os testes estatísticos descritos adiante foram obtidos com recurso ao software IBM® SPSS® Statistics 20.

Também a associação entre a infecção por *A. phagocytophilum* e as variáveis idade, raça, sexo, prática de pastoreio misto e época de recolha das amostras, foi avaliada utilizando o Teste Exato de Fisher.

De forma a comparar os diversos parâmetros hematológicos e bioquímicos entre animais positivos à infecção por *A. phagocytophilum* e os animais negativos, foi aplicado o teste não-paramétrico U de Mann-Whitney. Posteriormente, para as variáveis correspondentes aos parâmetros hematológicos e bioquímicos foi ainda utilizado o software IBM® SPSS® Statistics 20 de forma a obter a mediana de cada parâmetro nos animais positivos e nos animais negativos.

3. Resultados

3.1 Caracterização da amostra

As amostras analisadas eram provenientes de animais com idades compreendidas entre os 4 e os 12 meses. Em relação ao sexo dos animais, 385 pertenciam a animais de sexo feminino e 24 pertenciam a animais de sexo masculino. Quanto à raça, 257 eram de raça Merina Branca e 152 de raça Merina Preta.

3.1.1 Idade

Relativamente à idade, esta variou entre os 4 e os 12 meses. De forma a facilitar a análise estatística, os animais foram divididos em dois grupos: “6 meses ou menos” e “mais de 6 meses”. Desta forma, 100 (24%) ovinos tinham idade inferior ou igual a 6 meses e 309 (76%) superior a 6 meses (Figura 1).

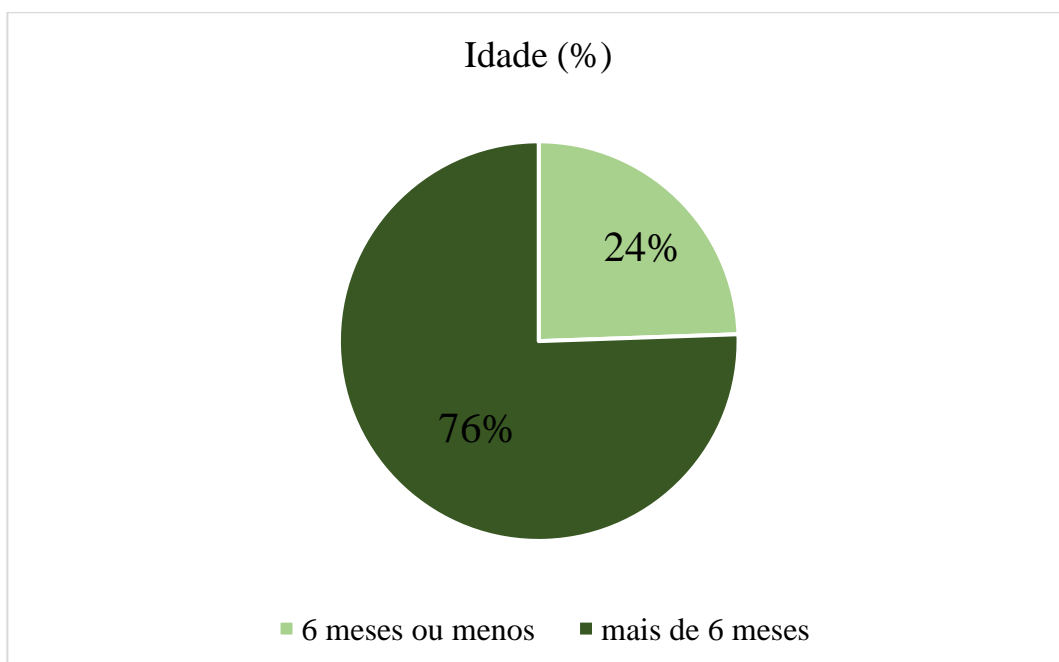


Figura 1: Distribuição (%) dos animais por grupos etários (n=409).

3.1.2 Sexo

No que diz respeito ao sexo, 383 animais (94%) eram do sexo feminino e apenas 26 (6%) do sexo masculino (Figura 2).

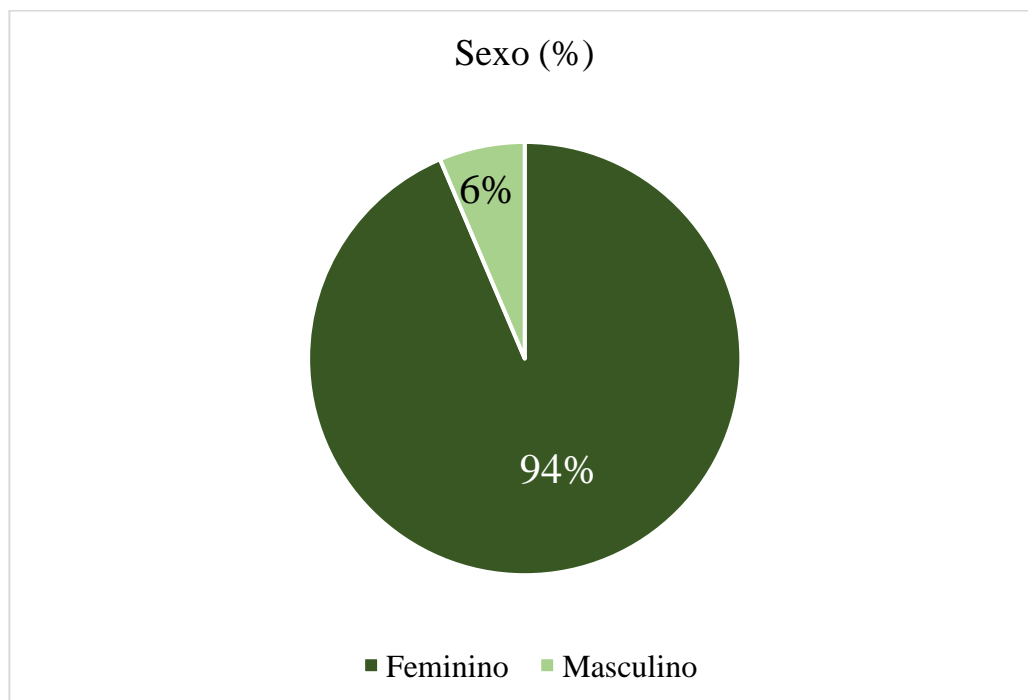


Figura 2: Distribuição (%) dos animais relativamente ao sexo (n=409).

3.1.3 Raça

Dos 409 ovinos incluídos no estudo, 255 (62%) eram da raça Merina Branca e 154 (38%) da raça Merina Preta (Figura 3).

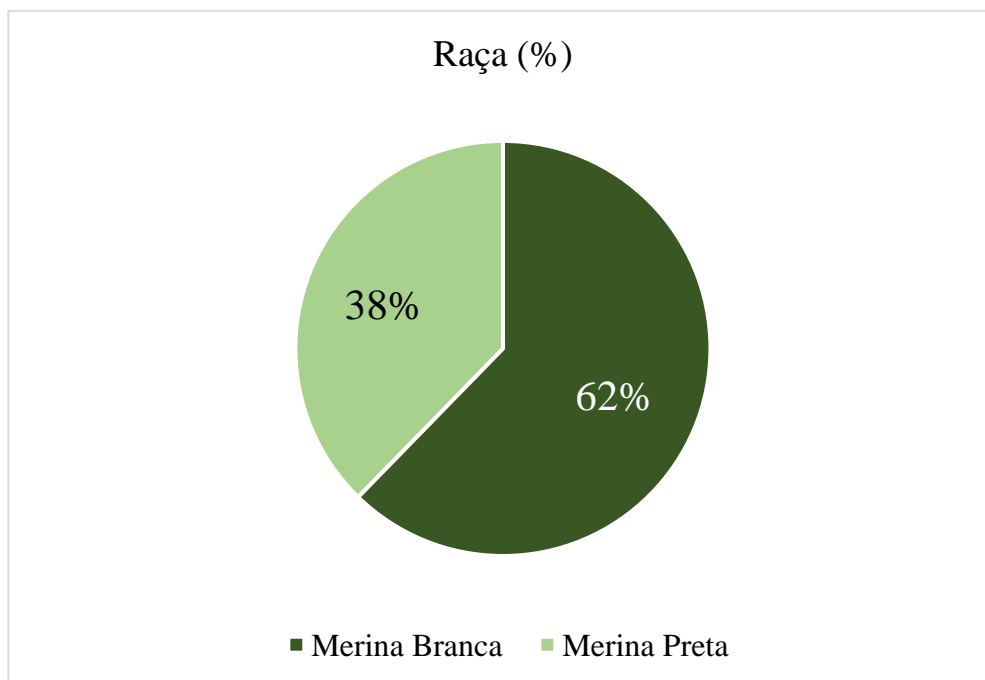


Figura 3: Distribuição (%) dos animais relativamente à raça (n=409).

3.1.4 Tipo de pastoreio

No que diz respeito ao pastor tipo de pastoreio misto, 136 animais (33%) pertenciam a explorações nas quais havia pastoreio misto e 270 (67%) pertenciam a explorações nas quais não havia pastoreio misto (Figura 4).

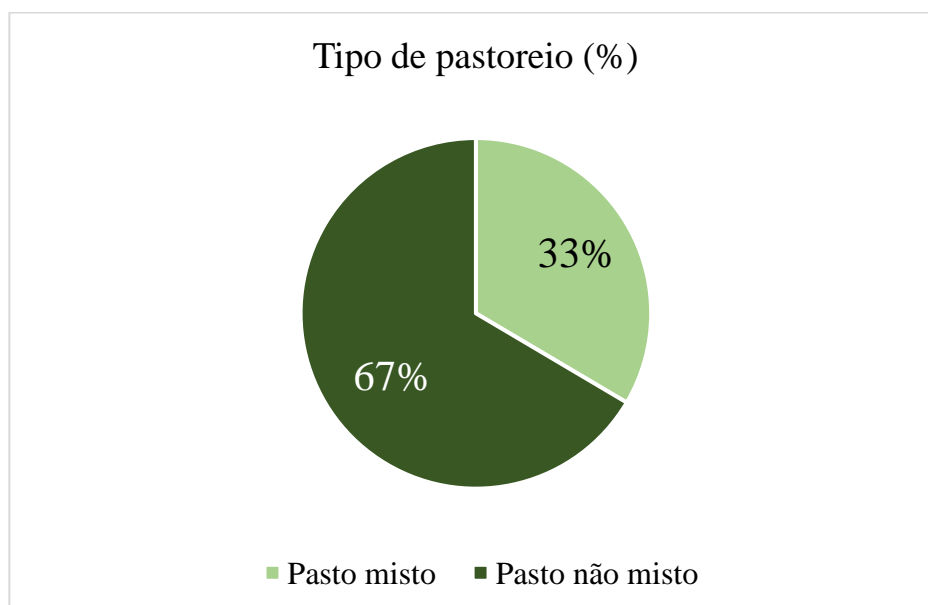


Figura 4: Distribuição (%) dos animais relativamente à prática de pastoreio misto (n=409).

3.1.5 Época do ano

Relativamente à época do ano durante a qual as amostras foram obtidas, 213 (52%) tinham sido recolhidas entre os meses de abril e setembro e 196 (48%) entre outubro e março (Figura 5).

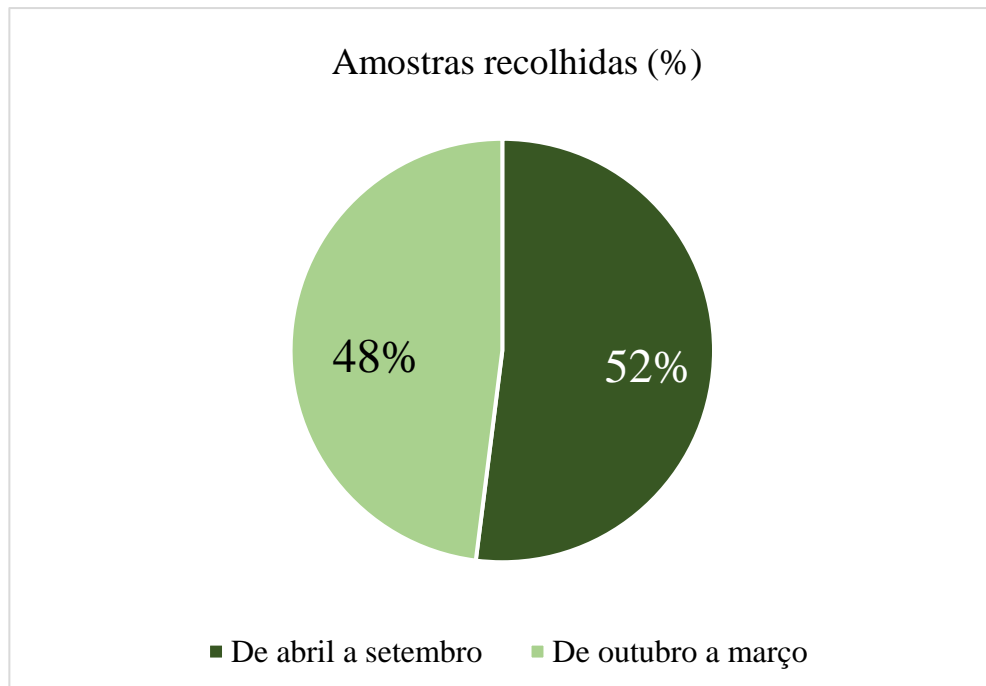


Figura 5: Distribuição (%) das amostras relativamente à época de recolha (n=409).

3.2 Amplificação do gene da β -actina por PCR

O gene da β -actina ovina foi amplificado em todas as amostras de cada um dos grupos de amostras testados. Esta PCR permitiu demonstrar o sucesso da extração de ADN, bem como a ausência de inibidores com potencial interferência nas reações de PCR, minimizando assim a ocorrência de resultados falsos negativos para *A. phagocytophilum*.

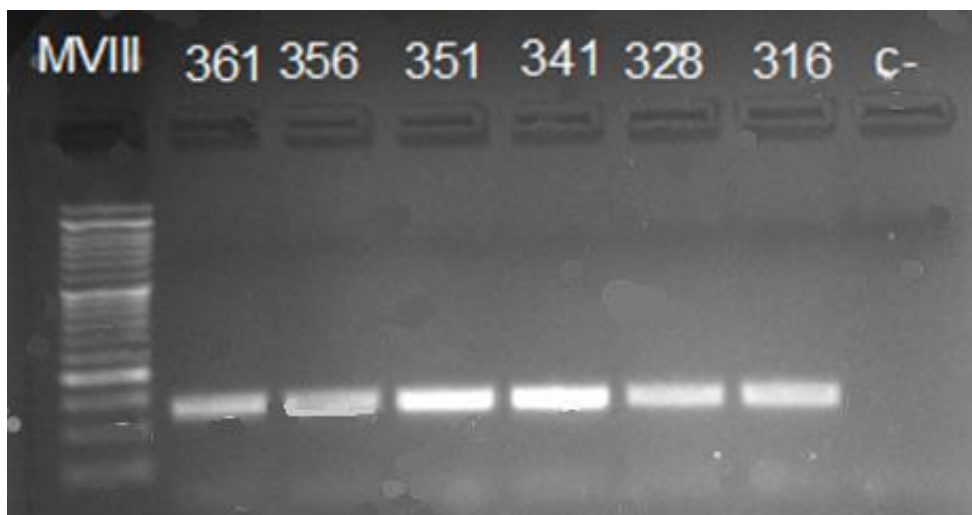


Figura 6: Amplificação do gene da β -actina ovina. Imagem de eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GreenSafe® mostrando os produtos de amplificação do gene da beta-actina ovina. MVII: Marcador de peso molecular NZYTech NZYDNA VI; Poços identificados com 361, 356, 351, 341, 328, 316 correspondentes a amostras positivas (191 pb); C-: controlo negativo.

3.3 Pesquisa de *Anaplasma phagocytophilum*

Relativamente à *nested* PCR para deteção de ADN de *A. phagocytophilum* foram obtidos resultados positivos em 16 das 409 amostras testadas. Em todas as reações de PCR realizadas foi observada a amplificação do controlo positivo e também ausência de ADN no controlo negativo o que validou os resultados obtidos.

A prevalência obtida para o agente na amostra em estudo foi de aproximadamente 3,9% (IC95%: 2,03% - 5,79%).

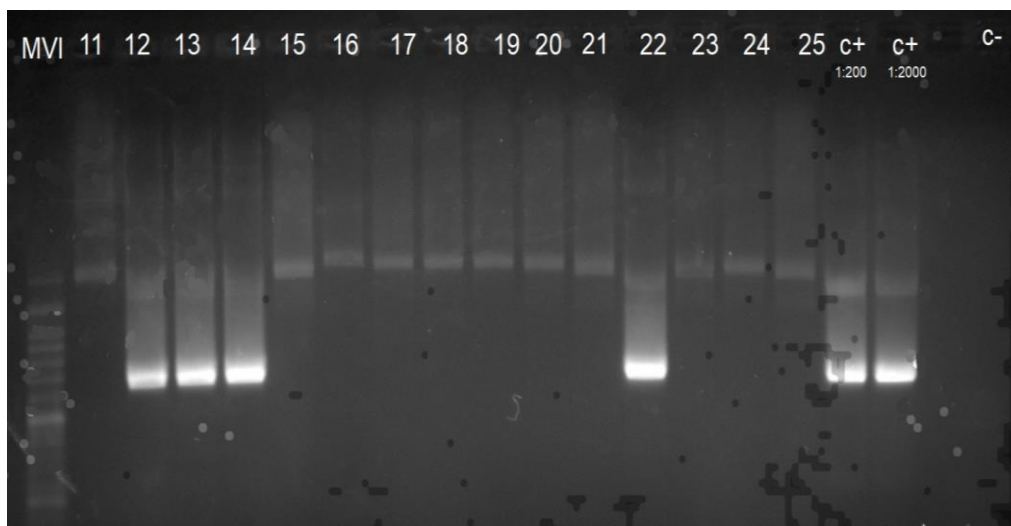


Figura 7: Amplificação do gene 16S rRNA para detecção de *Anaplasma phagocytophilum*. Imagem representativa da electroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de nested PCR para detecção de *Anaplasma phagocytophilum* em 15 das amostras em estudo; MVI – Marcador de peso molecular NZYTech NZYDNA Ladder VI; Poços identificados como 12,13,14 e 22 -Amostras com amplificação positiva (641 pb); Poços 11,15,16,17,18,19,20,21,23,24,25 – Amostras com amplificação negativa; C+ – Controlo positivo (ADN de *A. phagocytophilum* em cultura de macrófagos); C-: Controlo negativo correspondente à reação de PCR sem ADN.

3.3.1 Distribuição de animais positivos por exploração

Foram obtidos resultados positivos a *A. phagocytophilum* em 7 das explorações incluídas no estudo as quais pertenciam a 6 freguesias distintas. A tabela 3 apresenta a distribuição dos resultados positivos nestas explorações.

Tabela 3: Número de animais testados, número de animais positivos e respetivas prevalências intraexploração, nas explorações nas quais se obteve resultados positivos.

Exploração	Nº de animais testados	Nº de animais positivos	Prevalência intraexploração	IC95%
A	15	5	33,33%	9,48% – 57,19%
B	15	1	6,66%	5,96% – 19,29%

C	15	3	20,00%	0,24% – 40,24%
D	15	4	26,66%	4,29% – 49,05%
E	15	1	6,66%	5,96% – 19,29%
F	15	1	6,66%	5,96% – 19,29%
G	15	1	6,66%	5,96% – 19,29%

3.3.2 Distribuição de animais positivos por freguesia

Entre as freguesias onde foram identificados animais positivos à infeção, aquela na qual foram testados mais animais foi Pavia (30 animais). Nas restantes 6 freguesias, foram testados 15 animais. A percentagem de animais positivos à infeção em cada freguesia encontra-se representada na tabela 4.

Tabela 4: Distribuição (%) dos animais positivos e negativos em função da freguesia.

Freguesia	Número de animais testados	% de Positivos
Fronteira	15	6,67%
Montargil	15	6,67%

Pavia	30	26,67%
Seda	15	26,67%
União das freguesias de Arez e Amieira do Tejo	15	33,33%
União das freguesias de S. Sebastião da Giesteira e N. Sra. da Boa-fé	15	6,67%

3.3.3 Relação entre a prevalência de infeção e os fatores de risco

A Tabela 5 apresenta o número de animais testados, número de animais positivos à infeção por *A. phagocytophilum* e prevalência de animais infetados em relação aos diferentes fatores de risco e categorias analisados.

Dos 16 animais que testaram positivo a *A. phagocytophilum*, 3 tinham idade igual ou inferior a 6 meses e 13 tinham idade superior a 6 meses. Obteve-se assim uma prevalência de infeção de 3,00 % e 3,56 % nos animais de idade inferior ou igual a 6 meses e nos animais com mais de 6 meses, respetivamente.

Relativamente ao sexo, 15 dos animais positivos eram do sexo feminino e 1 do sexo masculino. Desta forma, a prevalência obtida em fêmeas foi de 3,92 % e nos machos foi de 3,85 %. Dos 16 animais que testaram positivo, 12 eram da raça Merina Branca e 4 da raça Merina Preta, correspondendo a prevalências de 4,94 % e 2,67 % respetivamente. No que diz respeito ao tipo de pastoreio, 9 dos animais positivos eram provenientes de explorações com pastoreio

misto e 7 de explorações sem pastoreio misto, correspondendo a prevalências de 6,47% e 2,59%, respetivamente.

Ao analisar os dados relativos aos meses do ano nos quais se procedeu à recolha das amostras, verificou-se que no período decorrido entre os meses de abril e setembro a prevalência foi substancialmente mais elevada comparativamente aos restantes meses do ano.

Nas amostras recolhidas entre abril e setembro, a prevalência de infeção obtida foi de 6,57% e nas amostras recolhidas entre outubro e março, a prevalência obtida foi de 1,02%.

Tabela 5: Prevalência de *A. phagocytophilum* em função das variáveis em estudo.

Variável	Categoria	Nº de animais	Nº de animais positivos	Prevalência (%) (IC 95%)
Idade	< 6 meses	100	3	3,00 % (0,34% - 6,34%)
	> 6 meses	309	13	3,56 % (1,97% - 6,45%)
Sexo	Feminino	383	15	3,92 % (1,97% - 5,86%)
	Masculino	26	1	3,85 % (3,55% - 11,24%)
Raça	Merina Branca	243	12	4,94 % (2,21% - 7,66%)
	Merina Preta	150	4	2,67 %

				(0,08% - 5,24%)
Tipo de pastoreio	Pastoreio	139	9	6,47%
	misto			(2,38% - 10,57%)
Sem pastoreio		270	7	2,59 %
	misto			(0,70% - 4,49%)
Época do ano	abril –	213	14	6,57%
	setembro			(3,24% - 9,90%)
		196	2	1,02%
	outubro -			(0,39% - 2,43%)
	março			

3.3.4 Relação entre a prevalência de infecção e os parâmetros do hemograma

A Tabela 6 descreve as alterações do hemograma observadas nos animais analisados e respectiva percentagem de animais positivos em cada categoria (parâmetro diminuído, normal ou aumentado relativamente aos valores de referência). Uma vez que na base de dados não estavam disponíveis os valores do hemograma de 35 dos animais, a tabela 6 mostra os resultados referentes a 376 dos 409 animais analisados. Dos ovinos que testaram positivo à infecção, 1 apresentou linfocitose, 1 apresentou eosinopenia, e 1 apresentou hemoglobinemia.

Tabela 6: Alterações do hemograma observadas nos animais testados para *A. phagocytophilum* e percentagem de animais infetados em cada categoria.

Variável	Categoria	Nº de animais	Nº de positivos	% de positivos
Hematócrito	Diminuído	26	0	0,00%
	Normal	350	16	100,00%
	Aumentado	0	0	0,00%
Hemoglobina	Diminuída	42	1	6,25%
	Normal	334	15	93,75%
	Aumentado	0	0	0,00%
Neutrófilos	Diminuído	4	0	0,00%
	Normal	353	16	100,00%
	Aumentado	19	0	0,00%
Linfócitos	Diminuído	10	0	0,00%
	Normal	314	15	93,75%
	Aumentado	52	1	6,25%
Monócitos	Diminuído	0	0	0,00
	Normal	372	16	100,00%
	Aumentado	4	0	0,00%
	Diminuído	0	0	0,00

Eosinófilos	Normal	360	15	93,75%
	Aumentado	16	1	6,25%
Basófilos	Diminuído	0	0	0,00
	Normal	375	16	100,00%
	Aumentado	1	0	0,00%

3.3.5 Relação entre a prevalência de infecção e os parâmetros bioquímicos

A Tabela 7 descreve as alterações dos parâmetros bioquímicos observadas nos animais analisados e respectiva percentagem de animais positivos em cada categoria (parâmetro diminuído, normal ou aumentado relativamente aos valores de referência). Observou-se que dos animais que testaram positivo à infecção, 2 apresentaram uma diminuição do número de proteínas totais e 1 apresentou um aumento deste parâmetro.

Tabela 7: Alterações dos parâmetros bioquímicos observados nos animais testados para *A. phagocytophilum* e percentagem de animais infetados em cada categoria.

Variável	Categoria	Nº de animais	Nº de positivos	% de positivos
Proteínas totais	Diminuído	66	2	12,5%
	Normal	339	13	81,25%
	Aumentado	4	1	6,25%
	Diminuído	7	0	0,00%

Albumina	Normal	400	16	100,00%
	Aumentado	2	0	0,00%
Fosfatase alcalina	Diminuído	0	0	0,00%
	Normal	388	16	100,00%
	Aumentado	21	0	0,00%

3.4 Análise estatística

3.4.1 Associação entre os potenciais fatores de risco e a infecção por *Anaplasma phagocytophilum*

O teste Exato de Fisher aplicado às variáveis idade, tipo de pastoreio, raça e sexo não revelou associações estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Já para a variável época do ano, o valor de $p = 0,004$, sugere que o período do ano tem um efeito estatisticamente significativo sobre a prevalência de *A. phagocytophilum*, tendo esta sido maior entre os meses de abril a setembro, comparativamente aos meses entre outubro e março.

3.4.2 Associação entre a infecção por *Anaplasma phagocytophilum* e os parâmetros hematológicos e bioquímicos

A análise da associação entre a infecção por *A. phagocytophilum* e os parâmetros hematológicos e bioquímicos pelo teste U de Mann-Whitney revelou uma relação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para a percentagem de neutrófilos e eosinófilos (Tabela 8). A mediana determinada para a percentagem de neutrófilos (28,5%) foi menor nos animais positivos à infecção comparativamente aos animais negativos (31%). Quanto à percentagem de eosinófilos, a mediana foi superior nos animais positivos (5%) comparativamente aos animais

negativos (2%). A distribuição da percentagem de neutrófilos e de eosinófilos nos animais positivos e negativos, encontra-se representada nas figuras 8 e 9 respetivamente.

Tabela 8: Parâmetros hematológicos e bioquímicos analisados, valores medianos, intervalos de referência e respetivos valores de *p*.

Parâmetro	Mediana Positivos	Mediana Negativos	<i>p</i>	Intervalos Referência
Hematócrito	31,40	31,80	0,61	27 – 45 %
Hemoglobina	10,40	10,60	0,52	9 – 15 g/dL
Leucócitos totais	7,58	7,40	0,07	4,000 – 12,000 (Valor absoluto)
Neutrófilos	25,50	31,00	0,04	10 – 50 %
Linfócitos	68,50	62,00	0,09	40 – 75 %
Monócitos	2,00	2,00	0,72	0 – 6 %
Eosinófilos	5,00	2,00	0,01	0 – 10 %
Basófilos	0,00	0,00	0,70	0 – 3%
Proteínas totais	6,28	6,43	0,55	6 – 7,9 g/dL
Albumina	3,11	3,27	0,06	2,6 - 4,2 g/dL

Fosfatase alcalina	139,30	168,00	0,65	0 - 387 U/L

(Kaneko, J.J.; Harvey, J.W.; Bruss, M.L. (eds.) Clinical biochemistry of domestic animals. 5th ed. New York: Academic Press, 1997)

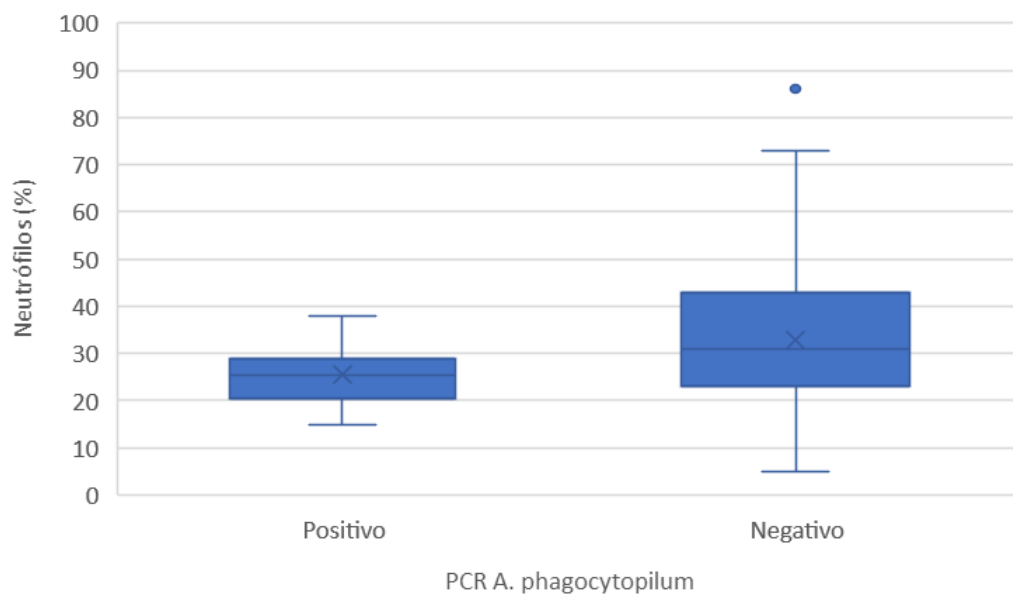


Figura 8: Boxplot- Distribuição da percentagem de neutrófilos nos animais positivos e negativos. A linha horizontal que divide a caixa indica o valor mediano, a linha inferior o valor mínimo e a superior o valor máximo. Os valores atípicos encontram-se representados por um círculo.

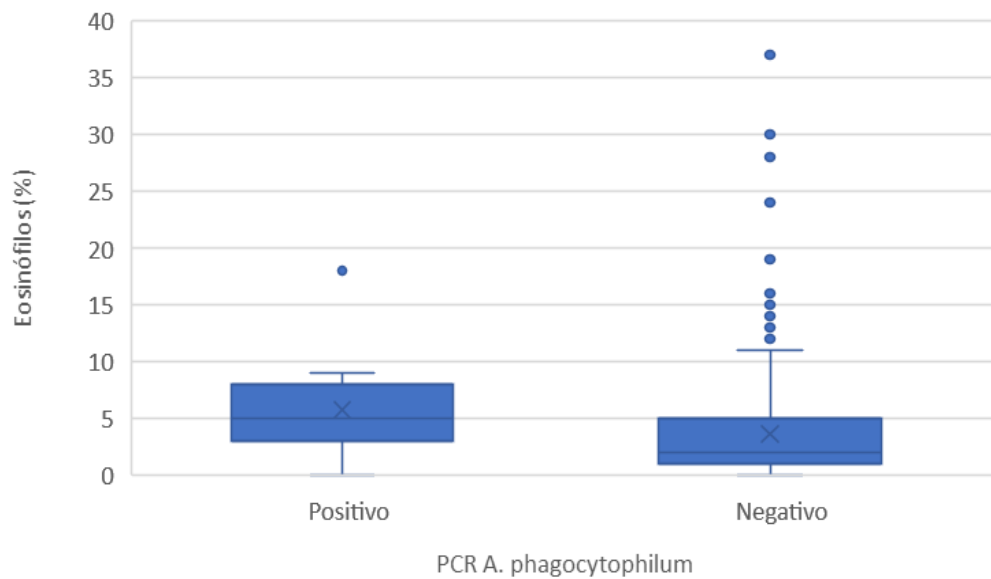


Figura 9: Boxplot- Distribuição da percentagem de eosinófilos nos animais positivos e negativos. A linha horizontal que divide a caixa indica o valor mediano, a linha inferior o valor mínimo e a superior o valor máximo. Os valores atípicos encontram-se representados por um círculo.

4. Discussão de resultados

A incidência de casos de doença provocada por agentes cujos vetores são carrças, tem vindo a aumentar nos seres humanos ao longo do tempo (Jaenson et al., 2012). Tendo em conta o potencial zoonótico de *Anaplasma phagocytophilum*, bem como a ameaça que representa para a indústria ovina (Stuen et al., 2013), o diagnóstico precoce e eficaz da infeção nestes animais torna-se indispensável para a prevenção e para a avaliação do risco em programas de controlo de doenças transmitidas por carrças (Said et al., 2017).

Em Portugal, os estudos sobre a prevalência e fatores de risco de *A. phagocytophilum* em ovinos são escassos, assim como estudos que investiguem o impacto da infeção nos parâmetros hematológico e bioquímico. Como tal, o presente trabalho pretendeu contribuir para o conhecimento nestas áreas.

A prevalência de *A. phagocytophilum* de 3,91 % identificada em ovinos neste trabalho foi próxima daquela relatada em estudos realizados noutros países europeus. Assim, Scharf et al. (2011) determinaram uma prevalência de 4% numa população de ovinos na Alemanha através da técnica de *nested* PCR para o gene 16S rRNA de *A. phagocytophilum*. Num estudo publicado em 2016, foi identificada uma prevalência de 2,8% numa população de ovinos na Eslováquia e República Checa, utilizando a técnica de PCR para o gene *msp4* de *A. phagocytophilum* (Venclíková et al., 2016).

No entanto, existem outros estudos em que a prevalência foi mais elevada. Assim, num trabalho realizado na Tunísia, a prevalência de *A. phagocytophilum* e/ou espécies relacionadas, determinada através da técnica de PCR visando o gene 16S rRNA de *A. phagocytophilum* foi de 7,7% (Said et al., 2015). Mais recentemente, foi descrita uma prevalência de 25%, determinada pela técnica de PCR em tempo real, na Alemanha (Bauer et al., 2021). Já na Tunísia e Sardenha, a prevalência de *A. phagocytophilum* ou variantes de *A. phagocytophilum* em amostras de sangue de ovinos chegou a 38% (Zobba et al., 2020).

As diferentes prevalências reportadas na literatura podem resultar de um conjunto de fatores. Um dos principais, é a presença de vetores competentes (Said et al., 2018). Os vetores são afetados pela temperatura, humidade e o tipo de hospedeiros presentes (Medlock et al., 2013; Randolph, 2004). Estas condições podem variar entre países e até mesmo entre diferentes regiões no mesmo país, originando diferenças significativas na disponibilidade do vetor de local para local e de época para época e consequentemente prevalências muito distintas de *A.*

phagocytophilum (Stuen et al., 2002, Stuen et al., 2009). Como resultado das alterações climáticas, constatou-se uma expansão da distribuição de *I. ricinus* em latitude e altitude ao longo do tempo (Gray 2008; Gray et al. 2009). Assim, tal como observado noutros países europeus como a Suécia (Eisen 2008), República Checa (Materna et al. 2008) e Alemanha (Dautel et al. 2008), também em Portugal continental, o aparecimento de condições climáticas mais favoráveis permitiu ao vetor colonizar novas áreas, tendo a sua presença sido assinalada em todos os distritos (Silva et al., 2011) e levou a modificações no padrão da sua ocorrência sazonal. Por outro lado, o aumento da prevalência de *I. ricinus* foi também associado a uma maior abundância de potenciais hospedeiros decorrente do desenvolvimento urbano (Estrada-Peña 2008). A prevalência de *A. phagocytophilum* pode ser ainda influenciada pelo tipo de manejo dos animais praticado na exploração, a vigilância deste agente e os diferentes métodos de diagnóstico utilizados (Stuen et al., 2009).

No presente estudo não foi possível estabelecer uma relação entre a idade dos animais e a infeção. Apesar de a distribuição etária de *A. phagocytophilum* estar pouco estudada nos ovinos, noutros trabalhos com *Anaplasmatacea* verificou-se que a prevalência de *A. marginale* e *A. ovis* nos pequenos ruminantes aumentava significativamente com a idade (Belkahia et al., 2014, M'ghirbi et al., 2016, Said et al., 2015). Esta relação poderá estar associada a uma maior exposição ao vetor ao longo do tempo, uma vez que os animais mais velhos atravessaram mais períodos favoráveis à presença de carraças e, por conseguinte, tiveram mais oportunidade de se infetarem (Said et al., 2015).

Embora não tenha sido possível incluir a variável sexo na análise estatística, uma vez que a maioria dos animais eram fêmeas, alguns autores estabeleceram uma relação do género com a infeção por *A. phagocytophilum* (Said et al., 2015, Belkahia et al., 2014, Hamzah et al., 2019). Assim, num estudo realizado em pequenos ruminantes na Tunísia, Said et al. (2015) observaram uma prevalência de 95.7% em fêmeas, que foi estatisticamente superior à prevalência de 86.0% registada nos machos. Um estudo mais recente confirma esta tendência, constatando uma prevalência ligeiramente superior nas fêmeas, comparativamente aos machos (Hamzah et al., 2019). Vários autores sugerem que as diferenças observadas se devem ao facto de as fêmeas estarem sujeitas a alterações fisiológicas que aumentam a sua suscetibilidade às infeções, incluindo os períodos de stress induzidos pela gestação, parto e lactação (Weiss & Wardrop, 2011, Hamzah 2019). A permanência mais longa das fêmeas nas explorações, em comparação aos machos, comercializados mais cedo, é outro fator a ter em conta nesta análise,

uma vez que a exposição prolongada ao vetor aumenta a probabilidade da infecção (Said et al., 2015).

Neste estudo, a análise da prevalência de *A. phagocytophilum* em relação à raça não mostrou diferenças significativas entre animais da raça Merina Preta e Merina Branca. Em estudos experimentais envolvendo borregos das raças norueguesas Norwegian White e Old Norse (Stuen et al. 2011), não se observaram diferenças quanto ao período de incubação, magnitude da febre e ganho de peso, após inoculação de *A. phagocytophilum*. Por sua vez, Stuen et al. (2013) verificaram que a resposta clínica, serológica e hematológica à infecção por *A. phagocytophilum* variava entre as raças estudadas. Em raças ovinas britânicas foram reportadas diferenças na manifestação de sinais clínicos, sendo estes menos graves na raça Blackface e seus cruzamentos, comparativamente às outras raças estudadas (Scott, 1983). Crê-se que estas diferenças sejam o resultado de infecções ancestrais (Martin & Aitken, 2000) e que possam estar relacionadas com a resistência genética a este agente. A possibilidade de fazer uso desta resistência natural em programas de reprodução é um tema atual; no entanto, apesar dos estudos nesta área, os avanços são ainda incipientes e requerem mais investigação (Stuen et al., 2011).

O tipo de pastoreio foi outra variável analisada no estudo, observando-se uma maior percentagem de animais infetados nas explorações onde era praticado pastoreio misto. No entanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas e não permitiram confirmar o efeito desta prática no risco de infecção por *A. phagocytophilum*. Sabe-se, porém, que o agente infecta diversas outras espécies que podem servir de reservatório do agente, entre os quais caprinos, bovinos e equinos (Ebani et al., 2008; Savidge et al., 2015; Stuen et al., 2013). Esta realidade poderá contribuir para que a infecção seja facilitada em locais de pasto partilhados com outros animais de produção, dado estes podem servir de hospedeiros. Também a aquisição de novos animais para a exploração pode resultar na introdução de carraças infetadas com novas variantes, com diferente grau de virulência (Khal et al., 2002, Stuen et al., 2003, Stuen et al., 2013).

O clima é um fator importante na distribuição espacial e temporal dos vetores e agentes patogénicos, tendo as alterações climáticas um impacto importante na ecologia das populações de vetores, podendo levar a variações na incidência e sazonalidade das doenças associadas aos mesmos (Silva et al., 2011). Por outro lado, a ocorrência de extremos climáticos pode ainda ter impacto na abundância de carraças e hospedeiros influenciando a incidência de doenças transmitidas por estes vetores (Gray et al., 2009; Semenza & Menne, 2009). Em

Portugal, as carraças *I. ricinus* adultas podem estar ativas durante todo o ano, especialmente durante o outono e o inverno, enquanto as suas larvas e ninfas têm maior atividade na primavera e no verão (Santos-Silva et al., 2018). No presente trabalho, a prevalência de *A. phagocytophilum* mostrou estar associada à época do ano em que as amostras de sangue foram colhidas, verificando-se uma maior percentagem de animais infetados entre os meses de abril a setembro. Estes resultados corroboram os dados obtidos em estudos anteriores que apontam para a ocorrência sazonal de *A. phagocytophilum*. Assim, Chvostáč et al. (2018) observaram uma maior percentagem de carraças infetadas com *A. phagocytophilum* na Eslováquia durante os meses de março e abril e Knoll et al. (2021) detetaram igualmente uma maior prevalência do agente em carraças colhidas na Alemanha no mês de abril, sendo esta, no global, mais elevada na primeira metade do ano.

Para além da análise das variáveis relacionadas com a epidemiologia da doença, o presente estudo pretendeu avaliar também o efeito da infeção sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais amostrados. Sendo *A. phagocytophilum* uma bactéria intracelular obrigatória que reside primariamente nos granulócitos circulantes, a infeção por este agente está associada a citopenias variadas, tanto em animais, como no ser humano (Dumler et al., 2001; Carrade et al., 2009; Nováková e Vichová, 2010; Diniz & Breitschwerdt, 2012; Silveira et al., 2015). Neste estudo, a análise estatística do hemograma revelou uma associação entre a infeção e a contagem de neutrófilos e eosinófilos. Assim, a contagem de neutrófilos foi mais baixa nos animais positivos à infeção, comparativamente aos negativos, o que está de acordo com trabalhos publicados anteriormente, indicando a neutropenia como uma das principais alterações do hemograma a considerar no diagnóstico de *A. phagocytophilum* em ovinos (Woldehiwet, 2010, Stuen et al., 2010). Ao contrário do esperado, a contagem de eosinófilos nas amostras de sangue de ovinos positivos à infeção foi superior à determinada nos animais negativos. Este resultado contrasta com os dados da literatura, que descrevem uma redução da totalidade dos leucócitos nos animais infetados (Katsogiannou et al., 2021 Abdulah et al., 2020, Nasreen et al., 2016) e requer uma investigação mais profunda para averiguar as possíveis causas. Não obstante as observações feitas, importa ressaltar que os valores medianos de neutrófilos e eosinófilos se encontravam dentro dos intervalos de referência para ovinos, tanto nos animais negativos, como positivos. Embora a análise estatística não tenha revelado qualquer associação entre a infeção e os restantes parâmetros hematológicos, vários estudos sugerem a existência de correlação. Assim, para além da neutropenia, as alterações do hemograma mais frequentemente associadas à infeção são trombocitopenia e monocitopenia,

tanto em ovinos, como noutras espécies, entre elas, cavalos e cães (Chirek et al., 2018, Franzén et al., 2005, Gokce & Woldehiwet, 1999), bem como bovinos com febre da carraça associada à infecção por *A. phagocytophilum* (Silaghi et al., 2018). Apesar de *A. phagocytophilum* não infectar os glóbulos vermelhos, ao contrário de outras bactérias da família *Anaplasmatacea*, como *A. ovis*, (Yasini et al., 2012), noutros estudos observou-se a presença de anemia nos animais infetados (Katsogiannou et al., 2021).

As medianas das concentrações de proteínas totais foram idênticas nos animais positivos a *A. phagocytophilum* e nos negativos. Já as medianas das concentrações de albumina foram mais baixas nos animais positivos a *A. phagocytophilum*, comparativamente aos animais negativos; contudo, as diferenças não foram estatisticamente significativas. Estes parâmetros foram também avaliados por Abdullah et al. (2020) em ovinos no Iraque, que constatou resultados similares nos animais infetados comparativamente aos animais não-infetados. Hipoproteinemia e hipoalbuminemia foram ainda reportadas em cães com anaplasmoose granulocítica canina (Chirek et al., 2018).

Em Portugal são escassos os estudos sobre a epidemiologia e diagnóstico de *A. phagocytophilum*, sendo este o primeiro que procurou saber mais sobre a sua prevalência e potenciais fatores de risco em ovinos. Embora o estudo tenha sido geograficamente limitado, restringindo-se à região do Alentejo, tendo em conta o impacto deste agente na saúde animal e saúde pública, a sua identificação numa população jovem de ovinos em Portugal requer atenção, sendo importante aprofundar o conhecimento sobre a sua prevalência, distribuição geográfica e fatores de risco. Estes dados permitirão conhecer melhor o ciclo da bactéria nos seus hospedeiros, identificar as condições propícias à sua transmissão e tomar medidas de prevenção e controlo adequadas. Este estudo teve algumas limitações, pois baseou-se numa amostra de conveniência, não tendo sido possível estabelecer uma relação entre a infecção e alguns dos parâmetros analisados. Com tal, serão necessários mais estudos, com uma amostra mais representativa, que permita analisar melhor potenciais fatores de risco, quer a nível individual, como a raça, sexo, aptidão e idade dos animais, como a nível do manejo, condições geográficas, edafoclimáticas ou outras.

Por outro lado, de forma a mitigar as consequências para a saúde animal e humana é preciso fazer um diagnóstico preciso desta doença, de forma a detetá-la precocemente e prevenir potenciais complicações. Assim, é essencial conhecer melhor a patogenia desta bactéria bem como os sinais clínicos comumente associados e incluí-la no diagnóstico diferencial em caso de suspeita de hemoparasitoses. Na continuação do estudo será fundamental também identificar

os genótipos de *A. phagocytophilum* envolvidos. Isto permitirá avaliar a circulação de estirpes potencialmente patogénicas e seu risco para os animais e o ser humano e conhecer melhor o papel dos ovinos como reservatórios destes agentes.

5. Conclusão

O estudo desenvolvido no presente trabalho alcançou o objetivo inicialmente determinado, ao permitir que fossem obtidos dados relativos à prevalência de *A. phagocytophilum* em ovinos das raças Merina Branca e Merina Preta na região do Alentejo, dados estes que contribuem para o conhecimento da epidemiologia deste agente em Portugal. A relevância deste trabalho é reforçada pela atual escassez de informação relativa a este tema, em particular a nível nacional.

Os resultados do estudo mostram que os ovinos destas raças apresentam uma prevalência baixa de *A. phagocytophilum* no Alentejo, tendo a época do ano sido identificada como um fator de risco para a infeção, contribuindo assim para um melhor conhecimento da dinâmica epidemiológica do agente em Portugal. Atendendo às alterações climáticas registadas, torna-se importante monitorizar a dinâmica dos vetores de *A. phagocytophilum* em Portugal, de forma a definir estratégias de prevenção e combate a este agente. Também a associação entre a presença de *A. phagocytophilum* e determinadas alterações hematológicas foi identificada, reforçando a relevância de um diagnóstico clínico precoce.

Ainda que o número total de animais positivos não tenha sido expressivo, é de salientar a importância zoonótica do agente bem como o impacto de *A. phagocytophilum* noutras espécies pecuárias e animais de companhia, em especial o cão. Tendo em conta que a economia da região alentejana depende consideravelmente da produção animal, a infeção por este agente não deve ser negligenciada.

6. Referências bibliográficas

Abdullah, D. A., Ali, F. F., Jasim, A. Y., Ola-Fadunsin, S. D., Gimba, F. I., & Ali, M. S. (2020). Clinical signs, prevalence, and hematobiochemical profiles associated with *Anaplasma* infections in sheep of North Iraq. *Veterinary World*, *13*(8), 1524.

Aktaş, M., Özübek, S., & Uluçeşme, M. C. (2021). Molecular detection and phylogeny of *Anaplasma phagocytophilum* and related variants in small ruminants from Turkey. *Animals*, *11*(3), 1–11.

Alberti, A., Zobba, R., Chessa, B., Addis, M. F., Sparagano, O., Parpaglia, M. L. P., Cubeddu, T., Pintori, G., & Pittau, M. (2005). Equine and canine *Anaplasma phagocytophilum* strains isolated on the island of Sardinia (Italy) are phylogenetically related to pathogenic strains from the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(10), 6418–6422.

Atif, F. A. (2016). Alpha proteobacteria of genus *Anaplasma* (*Rickettsiales: Anaplasmataceae*): Epidemiology and characteristics of *Anaplasma* species related to veterinary and public health importance. *Parasitology*, *143*(6), 659–685.

Bakken, J. S., Dumler, J. S., Chen, S. M., Eckman, M. R., Van Etta, L. L., & Walker, D. H. (1994). Human Granulocytic Ehrlichiosis in the Upper Midwest United States: A New Species Emerging? *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, *272*(3), 212–218.

Bashiribod, H. (2004). First Molecular Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in. *J Med Sci*, *4*(4), 282-6.

Bauer, B. U., Răileanu, C., Tauchmann, O., Fischer, S., Ambros, C., Silaghi, C., & Ganter, M. (2021). *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma ovis* – emerging pathogens in the german sheep population. *Pathogens*, *10*(10), 1–20.

Belkahia, H., Said, M. B., El Hamdi, S., Yahiaoui, M., Gharbi, M., Daaloul-Jedidi, M., ... & Messadi, L. (2014). First molecular identification and genetic characterization of *Anaplasma ovis* in sheep from Tunisia. *Small Ruminant Research*, *121*(2-3), 404-410.

Bergey, D. H. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Lippincott Williams & Pilins.

Blanco, J. R., & Oteo, J. A. (2002). Human granulocyte ehrlichiosis in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, *8*(12), 763–772.

Brodie, T. A., Holmes, P. H., & Urquhart, G. M. (1988). Prophylactic use of long-acting tetracycline against tick-borne fever (*Cytoecetes phagocytophila*) in sheep. *Veterinary Record*, 122(2), 43-44.

Brodie, T. A., Holmes, P. H., & Urquhart, G. M. (1986). Some aspects of tick-borne diseases of British sheep. *The Veterinary Record*, 118(15), 415-418.

Carrade, D. D., Foley, J. E., Borjesson, D. L., & Sykes, J. E. (2009). Canine granulocytic anaplasmosis: a review. *Journal of veterinary internal medicine*, 23(6), 1129-1141.

Granick, J. L., Reneer, D. V., Carlyon, J. A., & Borjesson, D. L. (2008). *Anaplasma phagocytophilum* infects cells of the megakaryocytic lineage through sialylated ligands but fails to alter platelet production. 416–423.

Chen, S. M., Dumler, J. S., Bakken, J. S., & Walker, D. H. (1994). Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(3), 589–595.

Chirek, A., Silaghi, C., Pfister, K., & Kohn, B. (2018). Granulocytic anaplasmosis in 63 dogs: clinical signs, laboratory results, therapy and course of disease. *journal of small animal practice*, 59(2), 112-120.

Chvostáč, M., Špitalská, E., Václav, R., Vaculová, T., Minichová, L., & Derdáková, M. (2018). Seasonal patterns in the prevalence and diversity of Tick-Borne *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. in an Urban temperate forest in Southwestern Slovakia. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(5).

Contreras, M., Alberdi, P., Mateos-Hernández, L., Fernández de Mera, I. G., García-Pérez, A. L., Vancová, M., Villar, M., Ayllón, N., Cabezas-Cruz, A., Valdés, J. J., Stuen, S., Gortazar, C., & de la Fuente, J. (2017). *Anaplasma phagocytophilum* MSP4 and HSP70 proteins are involved in interactions with host cells during pathogen infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(JUL), 1–16.

Daniel, R. G., Carson, A., Evans, C., Cookson, R., & Wessels, M. (2016). *Pathological observations of tick-borne fever and intercurrent bacterial infections in lambs*. 2–5.

Dantas-Torres, F., Chomel, B. B., & Otranto, D. (2012). Ticks and tick-borne diseases: A One Health perspective. *Trends in Parasitology*, 28(10), 437–446.

Dautel, H., Dippel, C., Kämmer, D., Werkhausen, A., & Kahl, O. (2008). Winter activity of *Ixodes ricinus* in a Berlin Forest. *International Journal of Medical Microbiology*, 298, 50-54.

De Sousa, R., de Carvalho, I. L., Santos, A. S., Bernardes, C., Milhano, N., Jesus, J., Menezes, D., & Nuncio, M. S. (2012). Role of the lizard *Teira dugesii* as a potential host for *Ixodes ricinus* tick-borne pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(10), 3767–3769.

des Vignes, F., Piesman, J., Heffernan, R., Schulze, T. L., Stafford, K. C., & Fish, D. (2001). Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* Nymphs. *Journal of Infectious Diseases*, 183(5), 773–778.

Diaferia, M., Veronesi, F., Moretta, I., Moretti, A., Piergili Fioretti, D., 2008. *Anaplasma phagocytophilum* in animali domestici e selvatici della regione Umbria: indagine di sieroprevalenza.

Diniz, PP. & Breitschwerdt, EB. (2012). *Anaplasma phagocytophilum* infection (Canine Granulocytotropic Anaplasmosis) In: Greene infectious Diseases of the Dog and Cat (4ªEd, pp. 244-254). Elsevier Saunders.

dos Santos, A.S.P. (2007). *Anaplasma phagocytophilum* and human granulocytic anaplasmosis in Portugal. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

Drancourt, M., & Raoult, D. (1994). Taxonomic position of the *Rickettsiae*: Current knowledge. *FEMS Microbiology Reviews*, 13(1), 13–24.

Ducken, D. R., Brown, W. C., Alperin, D. C., Brayton, K. A., Reif, K. E., Turse, J. E., Palmer, G. H., & Noh, S. M. (2015). Subdominant outer membrane antigens in *Anaplasma marginale*: Conservation, antigenicity, and protective capacity using recombinant protein. *PLoS ONE*, 10(6), 1–21.

Dugat, T., Lagrée, A. C., Maillard, R., Boulouis, H. J., & Haddad, N. (2015). Opening the black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: Current situation and future perspectives. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5(AUG), 1–18.

Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P. J., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., Rikihisa, Y., & Rurangirwa, F. R. (2001). Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: Unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*,

descriptions of six new species combi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(6), 2145–2165.

Dumler, J. S., Choi, K. S., Garcia-Garcia, J. C., Barat, N. S., Scorpio, D. G., Garyu, J. W., ... & Bakken, J. S. (2005). Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerging infectious diseases*, 11(12), 1828.

Dumler, J. S. (2012). The biological basis of severe outcomes in *Anaplasma phagocytophilum* infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 64(1), 13-20.

Ebani, V., Cerri, D., Fratini, F., Ampola, M., & Andreani, E. (2008). in domestic and wild animals from central Italy. *New York*, 371–375.

Eberts, M. D., Diniz, P. P. V. de P., Beall, M. J., Stillman, B. A., Chandrashekar, R., & Breitschwerdt, E. B. (2011). Typical and atypical manifestations of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 47(6), 86–94.

Eisen, L. (2008). Climate change and tick-borne diseases: a research field in need of long-term empirical field studies. *International Journal of Medical Microbiology*, 298, 12-18.

Eskeland, S., Stuen, S., Crosby, F. L., Lybeck, K., Barbet, A. F., Lindgren, P. E., Tollefsen, S., Wilhelmsson, P., Tollersrud, T. S., Makvandi-Nejad, S., & Granquist, E. G. (2019). Assessing the clinical and bacteriological outcomes of vaccination with recombinant Asp14 and OmpA against *A. phagocytophilum* in sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 218(April), 109936.

Eskeland, S., Stuen, S., Munderloh, U. G., Barbet, A., Crosby, L., Lybeck, K., Wilhelmsson, P., Lindgren, P. E., Makvandi-Nejad, S., Tollefsen, S., & Granquist, E. G. (2021). Clinical and immunological responses in sheep after inoculation with Himar1-transformed *Anaplasma phagocytophilum* and subsequent challenge with a virulent strain of the bacterium. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 231(December 2020), 110165.

FOGGIE, A. (1951). Studies on the infectious agent of tick-borne fever in sheep. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 63(1), 1–15.

Franzén, P., Aspan, A., Egenvall, A., Gunnarsson, A., Åberg, L., & Pringle, J. (2005). Acute clinical, hematologic, serologic, and polymerase chain reaction findings in horses experimentally infected with a European strain of *Anaplasma phagocytophilum*. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19(2), 232-239.

Galindo, R. C., Ayllán, N., Smrdel, K. S., Boadella, M., Beltrán-Beck, B., Mazariegos, M., García, N., De La Lastra, J. M. P., Avsic-Zupanc, T., Kocan, K. M., Gortazar, C., & De La

Fuente, J. (2012). Gene expression profile suggests that pigs (*Sus scrofa*) are susceptible to *Anaplasma phagocytophilum* but control infection. *Parasites and Vectors*, 5(1), 1–14.

Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. G. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York.

Gokce, H. I., Genc, O., Akca, A., Vatansever, Z., Unver, A., & Erdogan, H. M. (2008). Molecular and serological evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection of farm animals in the Black Sea Region of Turkey. *Acta Veterinaria Hungarica*, 56(3), 281–292.

Gokce, H. I., & Woldehiwet, Z. (1999). Differential haematological effects of tick-borne fever in sheep and goats. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 46(2), 105-115.

Gordon, W. S., Brownlee, A., Wilson, D. R., & MacLeod, J. (1932). " Tick-borne Fever"(A hitherto undescribed Disease of Sheep). *Journal of Comparative Pathology*, 45(pt. 4).

Gortázar, C., Ferroglio, E., Höfle, U., Frölich, K., & Vicente, J. (2007). Diseases shared between wildlife and livestock: A European perspective. *European Journal of Wildlife Research*, 53(4), 241–256.

Gray, J. S., Dautel, H., Estrada-Peña, A., Kahl, O., & Lindgren, E. (2009). Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2009.

Gray, J. S. (2008). *Ixodes ricinus* seasonal activity: implications of global warming indicated by revisiting tick and weather data. *International Journal of Medical Microbiology*, 298, 19-24.

Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Nested polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(2), 175–179.

Gribble D. H. (1969). Equine ehrlichiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 155(2), 462–469.

Hamzah, K. J., & Hasso, S. A. (2019). Molecular prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in sheep from Iraq. *Open Veterinary Journal*, 9(3), 238–245.

Inokuma, H., Brouqui, P., Drancourt, M., & Raoult, D. (2001b). Citrate synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysis and identification of *Ehrlichia*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), 3031-3039.

Inokuma, H., Terada, Y., Kamio, T., Raoult, D., & Brouqui, P. (2001a). Analysis of the 16S rRNA gene sequence of *Anaplasma centrale* and its phylogenetic relatedness to other ehrlichiae. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(2), 241-244.

Jaarsma, R. I., Sprong, H., Takumi, K., Kazimirova, M., Silaghi, C., Mysterud, A., Rudolf, I., Beck, R., Földvári, G., Tomassone, L., Groenevelt, M., Everts, R. R., Rijks, J. M., Ecke, F., Hörnfeldt, B., Modrý, D., Majerová, K., Votýpka, J., & Estrada-Peña, A. (2019). *Anaplasma phagocytophilum* evolves in geographical and biotic niches of vertebrates and ticks. *Parasites and Vectors*, *12*(1), 1–17.

Jaenson, T. G. T., Hjertqvist, M., Bergström, T., & Lundkvist, Å. (2012). Why is tick-borne encephalitis increasing? A review of the key factors causing the increasing incidence of human TBE in Sweden. *Parasites and Vectors*, *5*(1), 1–13.

Kaneko, J. J., Harvey, J. W., & Bruss, M. L. (Eds.). (2008). *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic press.

Kang, Y. J., Diao, X. N., Zhao, G. Y., Chen, M. H., Xiong, Y., Shi, M., Fu, W. M., Guo, Y. J., Pan, B., Chen, X. P., Holmes, E. C., Gillespie, J. J., Dumler, S. J., & Zhang, Y. Z. (2014). Extensive diversity of *Rickettsiales* bacteria in two species of ticks from China and the evolution of the *Rickettsiales*. *BMC Evolutionary Biology*, *14*(1), 1–12.

Katsogiannou, E. G., Katsoulos, P. D., Christodouloupoulos, G., Polizopoulou, Z. S., Papadakis, S. M., Kokkinaki, K. C., ... & Athanasiou, L. V. (2021). Quantitative and Morphological Blood Cell Findings Associated with the Presence of Antigen and/or Antibodies Against *Anaplasma phagocytophilum* in Sheep. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *21*(5), 321-329.

Kawahara, M., Rikihisa, Y., Lin, Q., Isogai, E., Tahara, K., Itagaki, A., Hiramitsu, Y., & Tajima, T. (2006). Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a novel *Ehrlichia* sp. in wild deer and ticks on two major islands in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(2), 1102–1109.

Kiss, T., Cadar, D., Krupaci, F. A., Bordeanu, A. D., & Spînu, M. (2014). Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in European wild boar (*Sus scrofa*) populations from Transylvania, Romania. *Epidemiology and Infection*, *142*(2), 246–250.

Knoll, S., Springer, A., Hauck, D., Schunack, B., Pachnicke, S., & Strube, C. (2021). Regional, seasonal, biennial and landscape-associated distribution of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. infections in Ixodes ticks in northern Germany and implications for risk assessment at larger spatial scales. *Ticks and tick-borne diseases*, *12*(3), 101657.

Kohn, B., Galke, D., Beelitz, P., & Pfister, K. (2008). Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(6), 1289–1295.

Ladbury, G. A. F., Stuen, S., Thomas, R., Bown, K. J., Woldehiwet, Z., Granquist, E. G., Bergström, K., & Birtles, R. J. (2008). Dynamic transmission of numerous *Anaplasma phagocytophilum* genotypes among lambs in an infected sheep flock in an area of anaplasmosis endemicity. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(5), 1686–1691.

Langenwalder, D. B., Silaghi, C., Nieder, M., Pfeffer, M., & Von Loewenich, F. D. (2020). Co-infection, reinfection and superinfection with *Anaplasma phagocytophilum* strains in a cattle herd based on ankA gene and multilocus sequence typing. *Parasites and Vectors*, 13(1), 1–12.

Leblond, A., Pradier, S., Pitel, P. H., Fortier, G., Boireau, P., Chadoeuf, J., & Sabatier, P. (2005). Enquête épidémiologique sur l'anaplasmose équine (*Anaplasma phagocytophilum*) dans le Sud de la France. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 24(3), 899–908.

Maeda, K. (1987). Human Infection with *Ehrlichia Canis*, a Leukocytic *Rickettsia*. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 6(10), 947.

Martin, W. B., & Aitken, I. D. (2000). *Diseases of sheep* (No. Ed. 3). Blackwell science.

Masuzawa, T., Uchishima, Y., Fukui, T., Okamoto, Y., Muto, M., Koizumi, N., & Yamada, A. (2011). Detection of *Anaplasma phagocytophilum* from wild boars and deer in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 64(4), 333–336.

Materna, J., Daniel, M., Metelka, L., & Harčarik, J. (2008). The vertical distribution, density and the development of the tick *Ixodes ricinus* in mountain areas influenced by climate changes (The Krkonoše Mts., Czech Republic). *International Journal of Medical Microbiology*, 298, 25-37.

Matsumoto, K., Joncour, G., Davoust, B., Pitel, P. H., Chauzy, A., Collin, E., Morvan, H., Vassallo, N., & Brouqui, P. (2006). *Anaplasma phagocytophilum* infection in cattle in France. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078, 491–494.

Medlock, J. M., Hansford, K. M., Bormane, A., Derdakova, M., Estrada-Peña, A., George, J. C., Golovljova, I., Jaenson, T. G. T., Jensen, J. K., Jensen, P. M., Kazimirova, M., Oteo, J. A., Papa, A., Pfister, K., Plantard, O., Randolph, S. E., Rizzoli, A., Santos-Silva, M. M., Sprong, H., ... Van Bortel, W. (2013). Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasites and Vectors*, 6(1), 1–11.

M'ghirbi, Y., Bèji, M., Oporto, B., Khrouf, F., Hurtado, A., & Bouattour, A. (2016). *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in cattle in Tunisia. *Parasites & vectors*, 9(1), 1-8.

Misao, T., & Kobayashi, Y. (1955). Studies on Infectious Mononucleosis (Glandular Fever). I. Isolation of Etiologic Agent from Blood, Bone Marrow and Lymph Node of a Patient with Infectious Mononucleosis by using Mice. *Kyushu Journal of Medical Science*, 6(2), 145-52.

Moretta, I., Veronesi, F., Diaferia, M., Morganti, G., Giusepponi, V., Sechi, P., Ciampelli, A., & Cenci-Goga, B. (2019). Epidemiological survey on the occurrence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in sheep reared in central Italy. *Small Ruminant Research*, 181, 103–106.

Moulder, J. W. (1974). Intracellular parasitism: life in an extreme environment. *The Journal of infectious diseases*, 130(3), 300-306.

Munderloh, U. G., Lynch, M. J., Herron, M. J., Palmer, A. T., Kurtti, T. J., Nelson, R. D., & Goodman, J. L. (2004). Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and. *101*, 53–64.

Nahayo, A., Bardiau, M., Volpe, R., Pirson, J., Paternostre, J., Fett, T., & Linden, A. (2014). Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in wild boar (*Sus scrofa*) in Belgium. *BMC Veterinary Research*, 10, 1–5.

Nasreen, K. S., Khan, A., Niaz, S., & Akhtar, N. (2016). Serodiagnosis and haematological effect of anaplasmosis in goats and sheep of district Mardan, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *World J Zool*, 11(2), 67-80.

Noaman, V., & Moradi, M. (2019). Molecular Epidemiology and Risk Factors Assessment of *Anaplasma spp.* on Dairy Cattle in Southwest of Iran. *Acta Veterinaria Eurasia*, 46(1), 30-37.

Noaman, V., & Shayan, P. (2009). Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in carrier cattle of Iran-first documented report.

Nováková, M., & Víchová, B. (2010). Granulocytic anaplasmosis - emerging tick-borne disease of humans and animals. *Biologia*, 65(6), 925–931.

Paules, C. I., Marston, H. D., Bloom, M. E., & Fauci, A. S. (2018). Tickborne Diseases-Confronting a Growing Threat. *New England Journal of medicine*, 379(8), 701–703.

Pereira, A., Parreira, R., Nunes, M., Casadinho, A., Vieira, M. L., Campino, L., & Maia, C. (2016). Molecular detection of tick-borne bacteria and protozoa in cervids and wild boars from Portugal. *Parasites and Vectors*, 9(1).

Petrovec, M., Furlan, S. L., Zupanc, T. A., Strle, F., Brouqui, P., Roux, V., & Dumler, J. S. (1997). Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(6), 1556–1559.

Popov, V. L., Han, V. C., Chen, S. M., Dumler, J. S., Feng, H. M., Andreadis, T. G., Tesh, R. B., & Walker, D. H. (1998). Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. *Journal of Medical Microbiology*, 47(3), 235–251.

Randolph, S. E. (2004). Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. *Parasitology*, 129(S1), S37-S65.

Rogan, W. J., & Gladen, B. (1978). Estimating prevalence from the results of a screening test. *American journal of epidemiology*, 107(1), 71-76.

Said, M. B., Belkahia, H., Alberti, A., Zobba, R., Bousrih, M., Yahiaoui, M., ... & Messadi, L. (2015). Molecular survey of *Anaplasma* species in small ruminants reveals the presence of novel strains closely related to *A. phagocytophilum* in Tunisia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 15(10), 580-590.

Said, M. B., Belkahia, H., El Mabrouk, N., Saidani, M., Hassen, M. B., Alberti, A., ... & Messadi, L. (2017). Molecular typing and diagnosis of *Anaplasma spp.* closely related to *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants from Tunisia. *Ticks and tick-borne diseases*, 8(3), 412-422.

Said, M. B., Belkahia, H., & Messadi, L. (2018). *Anaplasma spp.* in North Africa: a review on molecular epidemiology, associated risk factors and genetic characteristics. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 9(3), 543-555.

Samish, M., Ginsberg, H., & Glazer, I. (2004). Biological control of ticks. *Parasitology*, 129(SUPPL.).

Santos, A. S., Amaro, F., Santos-Silva, M. M., De Sousa, R., Mathias, M. L., Ramalhinho, M. G., ... & Dumler, J. S. (2009a). Detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum* in Algerian mice (*Mus spretus*), Portugal. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9(6), 663-669.

Santos, A. S., Bacellar, F., & Dumler, J. S. (2009b). A 4-year study of *Anaplasma phagocytophilum* in Portugal. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 46-47.

Santos, A. S., Santos-Silva, M. M., Almeida, V. C., Bacellar, F., & Dumler, J. S. (2004). Detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in Ixodes ticks (Acari: Ixodidae) from Madeira Island and Setubal district, mainland Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 10(9), 1643.

Santos-Silva, M. M., Beati, L., Santos, A. S., De Sousa, R., Nuncio, M. S., Melo, P., ... & Bacellar, F. (2011). The hard-tick fauna of mainland Portugal (Acari: Ixodidae): an update on geographical distribution and known associations with hosts and pathogens. *Experimental and Applied Acarology*, 55(1), 85-121.

Sargison, N., & Edwards, G. (2009). Tick infestations in sheep in the UK. *In Practice*, 31(2), 58–65.

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.

Scharf, W., Schauer, S., Freyburger, F., Petrovec, M., Schaarschmidt-Kiener, D., Liebisch, G., Runge, M., Ganter, M., Kehl, A., Dumler, J. S., Garcia-Perez, A. L., Jensen, J., Fingerle, V., Meli, M. L., Ensser, A., Stuen, S., & Von Loewenich, F. D. (2011). Distinct host species correlate with *Anaplasma phagocytophilum* ankA gene clusters. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(3), 790–796.

Scott, G. R. (1983). Tick-associated infections. *Diseases of sheep. 1st ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford*, 209-213.

Semenza, J. C., & Menne, B. (2009). Climate change and infectious diseases in Europe. *The Lancet infectious diseases*, 9(6), 365-375.

Shkap, V., Molad, T., Fish, L., & Palmer, G. (2002). Detection of the *Anaplasma centrale* vaccine strain and specific differentiation from *Anaplasma marginale* in vaccinated and infected cattle. *Parasitology Research*, 88(6), 546–552.

Silaghi, C., Hamel, D., Thiel, C., Pfister, K., Passos, L. M. F., & Rehbein, S. (2011). Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in wild caprine and cervid ungulates from the Alps in Tyrol, Austria. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(4), 355–362.

Silaghi, C., Kohn, B., Chirek, A., Thiel, C., Nolte, I., Liebisch, G., & Pfister, K. (2011). Relationship of molecular and clinical findings on *Anaplasma phagocytophilum* involved in natural infections of dogs. *Journal of clinical microbiology*, 49(12), 4413-4414.

Silaghi, C., Nieder, M., Sauter-Louis, C., Knubben-Schweizer, G., Pfister, K., & Pfeffer, M. (2018). Epidemiology, genetic variants and clinical course of natural infections with *Anaplasma phagocytophilum* in a dairy cattle herd. *Parasites & vectors*, *11*(1), 1-13.

Silveira, J. A. G., Valente, P. C. L. G., Paes, P. R. O., Vasconcelos, A. V., Silvestre, B. T., & Ribeiro, M. F. B. (2015). The first clinical and laboratory evidence of co-infection by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in a Brazilian dog. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *6*(3), 242–245.

Sonenshine, D. E., & Roe, R. M. (Eds.). (2013). *Biology of ticks, volume 2* (Vol. 2). Oxford University Press.

Song, J., Zhao, S., Li, Y., Wang, H., Zhang, L., Wang, J., Ning, C., & Peng, Y. (2020). Duplex TaqMan real-time PCR assay for simultaneous detection and quantification of *Anaplasma capra* and *Anaplasma phagocytophilum* infection. *Molecular and Cellular Probes*, *49*, 101487.

Strasek Smrdel, K., Bidovec, A., Malovrh, T., Petrovec, M., Duh, D., & Avsic Zupanc, T. (2009). Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in wild boar in Slovenia. *Clinical Microbiology and Infection*, *15*(SUPPL. 2), 50–52.

Strle, F. (2004). Mini-Review Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Int. J. Med. Microbiol.*, *37*(293), 27–35.

Stuen, S., Artursson, K., & Engvall, E. O. (1998). Experimental Infection of Lambs with an Equine Granulocytic *Ehrlichia* Species Resembling the Agent that Causes Human Granulocytic Ehrlichiosis (HGE). *Acta Veterinaria Scandinavica*, *39*(4), 491–497.

Stuen, S., & Bergström, K. (2001). The Effect of Two Different Oxytetracycline Treatments in Experimental Ehrlichia phagocytophila Infected Lambs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *42*(3), 1-8.

Stuen, S., Bergström, K., Petrovec, M., Van de Pol, I., & Schouls, L. M. (2003a). Differences in clinical manifestations and hematological and serological responses after experimental infection with genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in sheep. *Clinical and Vaccine Immunology*, *10*(4), 692-695.

Stuen, S., Enemark, J., Artursson, K., & Nielsen, B. (2012). Prophylactic treatment with flumethrin, a pyrethroid (Bayticol®, Bayer), against *Anaplasma phagocytophilum* infection in lambs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *54*(1), 1-5.

Stuen, S., Granquist, E. G., & Silaghi, C. (2013). *Anaplasma phagocytophilum*-a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(JUL), 1–33.

Stuen, S., Grøva, L., Granquist, E. G., Sandstedt, K., Olesen, I., & Steinshamn, H. (2011). A comparative study of clinical manifestations, haematological and serological responses after experimental infection with *Anaplasma phagocytophilum* in two Norwegian sheep breeds. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53(1), 1-8.

Stuen, S., Nevland, S., & Moum, T. (2003b). Fatal cases of tick-borne fever (TBF) in sheep caused by several 16S rRNA gene variants of *Anaplasma phagocytophilum*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990(1), 433-434.

Stuen, S., Okstad, W., Artursson, K., Al-Khedery, B., Barbet, A., & Granquist, E. G. (2015). Lambs immunized with an inactivated variant of *Anaplasma phagocytophilum*. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 57(1), 4–7.

Stuen, S., Okstad, W., & Sagen, A. M. (2018). Intrauterine transmission of *Anaplasma phagocytophilum* in persistently infected lambs. *Veterinary Sciences*, 5(1).

Stuen, S., Scharf, W., Schauer, S., Freyburger, F., Bergström, K., & Von Loewenich, F. D. (2010). Experimental infection in lambs with a red deer (*Cervus elaphus*) isolate of *Anaplasma phagocytophilum*. *Journal of Wildlife Diseases*, 46(3), 803-809.

Stuen, S. (2016). Tick-Borne Fever (*Anaplasma phagocytophilum* Infection) in Sheep – A Review. *Journal of Veterinary Medicine and Research*, 3(5), 1062.

Stuen, S., Torsteinbø, W. O., Bergström, K., & Bårdsen, K. (2009). Superinfection occurs in *Anaplasma phagocytophilum* infected sheep irrespective of infection phase and protection status. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 51(1), 1-6.

Stuen, S., Van De Pol, I., Bergström, K., & Schouls, L. M. (2002). Identification of *Anaplasma phagocytophila* (formerly *Ehrlichia phagocytophila*) variants in blood from sheep in Norway. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(9), 3192-3197.

Süss, J., Klaus, C., Gerstengarbe, F. W., & Werner, P. C. (2008). What makes ticks tick? Climate change, ticks, and tick-borne diseases. *Journal of travel medicine*, 15(1), 39-45.

Taylor, L. H., Latham, S. M., & Woolhouse, M. E. J. (2001). Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 356(1411), 983–989.

Teglas, M. B., & Foley, J. (2006). Differences in the transmissibility of two *Anaplasma phagocytophilum* strains by the North American tick vector species, *Ixodes pacificus* and *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Experimental & applied acarology*, 38(1), 47-58.

Theiler, A. (1911). Further Investigations into Anaplasmosis of South African Cattle. *First Report of the Director of Veterinary Research, Union of South Africa.*, 7–46.

Torina, A., Agnone, A., Blanda, V., Alongi, A., Agostino, R. D., Caracappa, S., Marino, A. M. F., Di, V., & De, J. (2012). Ticks and Tick-borne Diseases Development and validation of two PCR tests for the detection of and differentiation between *Anaplasma ovis* and *Anaplasma marginale*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 3(5–6), 282–286.

Torina, A., Galindo, R. C., Vicente, J., Di Marco, V., Russo, M., Aronica, V., ... & de la Fuente, J. (2010). Characterization of *A. phagocytophilum* and *A. ovis* infection in a naturally infected sheep flock with poor health condition. *Tropical animal health and production*, 42(7), 1327-1331.

Toussaint, J. F., Sailleau, C., Breard, E., Zientara, S., & De Clercq, K. (2007). Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *Journal of virological methods*, 140(1-2), 115-123.

Venclíková, K., Mendel, J., Betášová, L., Blažejová, H., Jedličková, P., Straková, P., ... & Rudolf, I. (2016). Neglected tick-borne pathogens in the Czech Republic, 2011–2014. *Ticks and tick-borne diseases*, 7(1), 107-112.

Walker, D. H., & Dumler, J. S. (1996). Emergence of the Ehrlichioses as Human Health Problems. *Emerging Infectious Diseases*, 2(1), 18–29.

Wang, Y., Chen, C., & Zhang, L. (2013). Molecular Characterization of msp2/p44 of *Anaplasma phagocytophilum* Isolated from Infected Patients and *Haemaphysalis longicornis* in Laizhou Bay, Shandong Province, China. *PLoS ONE*, 8(10), 1–9.

Weiss, D. J., & Wardrop, K. J. (Eds.). (2011). *Schalm's veterinary hematology*. John Wiley & Sons.

Woldehiwet, Z. (2006). *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants in Europe. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078(1), 446-460.

Woldehiwet, Z. (1987). Depression of lymphocyte response to mitogens in sheep infected with tick-borne fever. *Journal of comparative pathology*, 97(6), 637-643.

Woldehiwet, Z. (2010). The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Veterinary parasitology*, 167(2-4), 108-122.

Wormser, G. P. (2016). Human granulocytic anaplasmosis and Lyme disease. *JAMA*, *316*(1), 98-99.

Yang, J., Li, Y., Liu, Z., Liu, J., Niu, Q., Ren, Q., Chen, Z., Guan, G., Luo, J., & Yin, H. (2015). Molecular detection and characterization of *Anaplasma spp.* in sheep and cattle from Xinjiang, northwest China. *Parasites and Vectors*, *8*(1), 1–7.

Yasini, S. P., Khaki, Z., Rahbari, S., Kazemi, B., Amoli, J. S., Gharabaghi, A., & Jalali, S. M. (2012). Hematologic and clinical aspects of experimental ovine anaplasmosis caused by *Anaplasma ovis* in Iran. *Iranian journal of parasitology*, *7*(4), 91.

Ybañez, A. P., & Inokuma, H. (2016). Anaplasma species of veterinary importance in Japan. *Veterinary World*, *9*(11), 1190–1196.

Ybañez, A. P., Matsumoto, K., Kishimoto, T., & Inokuma, H. (2012). Molecular analyses of a potentially novel Anaplasma species closely related to *Anaplasma phagocytophilum* detected in sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in Japan. *Veterinary Microbiology*, *157*(1–2), 232–236.

Yoshimoto, K., Matsuyama, Y., Matsuda, H., Sakamoto, L., Matsumoto, K., Yokoyama, N., & Inokuma, H. (2010). Detection of *Anaplasma bovis* and *Anaplasma phagocytophilum* DNA from *Haemaphysalis megaspinosa* in Hokkaido, Japan. *Veterinary Parasitology*, *168*(1–2), 170–172.

Yousefi, A., Chaechi Nosrati, M. R., Golmohammadi, A., & Azami, S. (2019). Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* as a zoonotic agent in owned and stray dogs in Tehran, Iran. *Archives of Razi Institute*, *74*(1), 33–38.

Zhang, J. Z., Popov, V. L., Gao, S., Walker, D. H., & Yu, X. J. (2007). The developmental cycle of *Ehrlichia chaffeensis* in vertebrate cells. *Cellular microbiology*, *9*(3), 610-618.

Zobba, R., Ben Said, M., Belkahia, H., Pittau, M., Cacciotto, C., Pinna Parpaglia, M. L., Messadi, L., & Alberti, A. (2020). Molecular epidemiology of *Anaplasma spp.* related to *A. phagocytophilum* in Mediterranean small ruminants. *Acta Tropica*, *202*(November 2019), 105286.

Apêndice A

Tabela A1: Resultados do Teste Exato de Fisher aplicado aos fatores de risco analisados.

Fator de risco	Teste Exato de Fisher <i>P</i>
Idade	0,771
Sexo	1,000
Raça	0,431
Tipo de pastoreio	0,063
Época do ano	0,004*

Tabela A2: Resultados do Teste Mann-Witney U aplicado aos parâmetros hematológicos e bioquímicos analisados.

Parâmetro	Resultado Mann-Witney U <i>P</i>
Hematócrito	0,609
Hemoglobina	0,517
Neutrófilos	0,035*

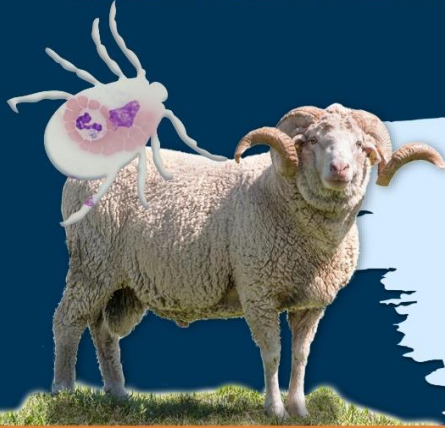
Linfócitos	0,092
Monócitos	0,722
Eosinófilos	0,014*
Basófilos	0,698
Proteínas totais	0,546
Albumina	0,057
Fosfatase alcalina	0,652

Apêndice B

Deteção molecular de *Anaplasma phagocytophilum* em ovinos no Alentejo

Ana Paula Dutra¹, Joana Valério², Jacinto Gomes^{3,4}, David W. Ramilo^{2,4}, Tiago Perloiro⁵, Helga Waap^{1,4}

1 Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Oeiras, Portugal
2 Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal
3 Escola Superior Agrária de Elvas, Instituto Politécnico de Portalegre, Elvas, Portugal
4 Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal
5 Associação Nacional de Criadores de Ovinos de Raça Merina (ANCORME), Évora, Portugal



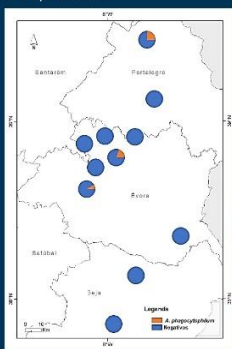
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

As doenças transmitidas por carrças causam perdas económicas significativas nos ruminantes a nível mundial. *Anaplasma phagocytophilum* é uma riquetsia associada à febre da carrça em ovinos, manifestando-se por febre elevada e neutropenia. Embora raramente fatal, pode ser um fator predisponente para outras doenças. A infeção por este agente está associada a abortos e diminuição da espermatogénese em ovinos e bovinos adultos, assim como perdas produtivas em borregos. A *A. phagocytophilum* pode infectar várias espécies, incluindo o Homem, causando anaplasmosose granulocítica humana. O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência de *A. phagocytophilum* em ovinos provenientes da região do Alentejo.

METODOLOGIA E RESULTADOS

As amostras de sangue foram recolhidas no período entre fevereiro 2020 e outubro de 2021 de 150 borregos das raças Merina Branca (n=96) e Merina Preta (n=54), em 11 explorações distribuídas por 9 concelhos nas regiões Alto Alentejo, Alentejo Central e Baixo Alentejo.

- Os animais apresentavam uma média de $8 \pm 2,3$ meses de idade, variando entre 4-18 meses.
- As amostras foram submetidas a extração de DNA pelo Citogene - Genomic DNA purification Kit (Citomed, Portugal) e a presença de *A. phagocytophilum* foi detetada por PCR de uma sequência parcial do gene 16S RNA.
- Oito dos animais testaram positivo para a presença de DNA de *A. phagocytophilum*, traduzindo-se numa prevalência global de 5,3% (IC95%:2,7-10,2%).
- Seis dos animais infetados eram da raça Merina Branca (6,3%; IC95%:2,7-10,2%) e 2 da raça Merina Preta (3,7%; IC95%:1-12,5%).
- Os animais positivos eram provenientes de 3 explorações (27,3%) localizadas em 3 dos concelhos amostrados (27,3%).
- A percentagem de animais infetados nas explorações variou entre 9,1 e 25%.



DISTRIBUIÇÃO DA INFEÇÃO POR *A. PHAGOCYTOPHILUM* EM BORREGOS DAS RAÇAS MERINA BRANCA E MERINA PRETA


Raça	% Infeções	Número borregos analisados
MERINA BRANCA	6,3	96
MERINA PRETA	3,7	54
TOTAL	5,3	150



PRINCIPAIS CONCLUSÕES

Este trabalho é o primeiro a relatar a presença de *A. phagocytophilum* em ovinos em Portugal. Tendo em conta a importância deste agente, tanto na produção animal como em termos de Saúde Pública, na continuação deste estudo será fundamental identificar os genótipos envolvidos. Isto permitirá avaliar a circulação de estirpes potencialmente patogénicas e seu risco para os animais e o ser humano e conhecer melhor o papel dos ovinos enquanto reservatórios deste agente.

Agradecimentos: As amostras testadas neste trabalho foram obtidas no âmbito do projeto MERINOparasite PTDC/CVT-CVT-28798/2017



13^ª JORNADAS HOSPITAL VETERINÁRIO MURALHA ÉVORA

Figura B: Poster: “Deteção molecular de *Anaplasma phagocytophilum* em ovinos no Alentejo”.