

NÁDIA SOFIA ROCHA PAULINO

**FREQUÊNCIA DE DOENÇAS CANINAS
TRANSMITIDAS POR VETORES NUM ABRIGO NO
CONCELHO DE MOURA, ALENTEJO**

Orientadora: Professora Doutora Margarida Alves

Co-orientadora: Doutora Joana Fonseca

UNIVERSIDADE LUSÓFONA DE HUMANIDADES E TECNOLOGIAS

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

LISBOA

2018

NÁDIA SOFIA ROCHA PAULINO

**FREQUÊNCIA DE DOENÇAS CANINAS
TRANSMITIDAS POR VETORES NUM ABRIGO NO
CONCELHO DE MOURA, 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 de Humanidades e Tecnologias, segundo o Despacho Reitoral no. 95/2018, perante a seguinte composição de Júri:

Presidente: Professora Doutora Sofia Van Harten
em representação da Professora Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Professora Doutora Ana Sofia Santos

Orientadora: Professora Doutora Margarida Alves

Co-orientadora: Doutora Joana Fonseca

**UNIVERSIDADE LUSÓFONA DE HUMANIDADES E TECNOLOGIAS
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

LISBOA

2018

EPÍGRAFE

*“Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação,
seja animal ou vegetal, ninguém precisará de o ensinar
a amar o seu semelhante.”*

Albert Schweitzer
Prémio Nobel da Paz - 1952

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, por todo o apoio e carinho
que me deram nestes últimos anos
e principalmente pela paciência
que demonstraram comigo.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Professora Doutora Margarida Alves por me ter aceite como sua orientanda e por toda a ajuda que me ofereceu na última etapa desta longa jornada.

À Doutora Joana Fonseca e à Professora Ana Lúcia Rodrigues pela transmissão de conhecimentos durante os meses de estágio e por toda a paciência e carinho demonstrados.

Aos meus pais e irmão por me apoiarem e incentivarem a seguir um sonho que está prestes a ser tornado realidade.

Aos restantes membros da minha família por todo o amor e apoio incondicional.

A toda a equipa da Clínica Valmivete por me terem recebido e ensinado durante todos os sábados desde o meu 3º ano do curso.

Às responsáveis pelo abrigo SOS dos Animais de Moura pela disponibilidade.

A todos os meus amigos da faculdade, especialmente à Andreia Lagarelhos e à Ana Filipa Oliveira pela amizade e ajuda na recolha das amostras biológicas necessárias à elaboração desta dissertação.

À Madalena Gomes pela companhia no laboratório durante a segunda parte do estágio e pelo bom humor expressado.

Por último, mas não menos importante, aos meus animais Pitucha, Luca e Maria Anita por servirem de inspiração para a realização do curso de Medicina Veterinária.

RESUMO

As doenças caninas transmitidas por vetores têm vindo a aumentar significativamente nos últimos anos. Estas têm uma grande importância a nível médico e veterinário pois, muitas delas, apresentam potencial zoonótico. O aumento tem sido, em grande parte, devido às alterações climáticas que têm ocorrido pelo mundo inteiro. Vetores como os ixodídeos e os flebotomíneos podem transmitir agentes como bactérias e parasitas. Neste trabalho foram abordadas algumas das doenças mais comuns em Portugal, as quais são causadas por *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii* e *Leishmania infantum*.

Esta dissertação teve como principal objetivo determinar a percentagem destes agentes numa população composta por 28 cães residentes num abrigo no concelho de Moura, região do Baixo Alentejo. Para isso, foi feita a colheita de sangue para tubos com EDTA e realizado hemograma, observação de esfregaço de sangue e de *buffy-coat*, reação em cadeia da polimerase, imunofluorescência e ensaio de imunoabsorção enzimática.

Os exames moleculares permitiram identificar 18% dos animais infetados com *Ehrlichia canis* e 7% com *Anaplasma platys*. Não foi amplificado ADN de *Leishmania* spp. nem de *Rickettsia* spp. em nenhum dos cães em estudo. As análises serológicas indicaram uma seroprevalência de 53,6% para *E. canis*, 100% para *R. conorii*, 35,7% para *L. infantum* e 18% para *A. phagocytophilum*.

Os resultados obtidos mostram valores não negligenciáveis para a presença dos agentes em estudo nesta região do País. O conhecimento sobre a distribuição geográfica destes agentes é relevante para o controlo e epidemiovigilância das doenças caninas transmitidas por vetores.

Palavras-chave: *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii*, *Leishmania infantum*, cães, Moura

ABSTRACT

Canine vector-borne diseases have been increasing significantly in recent years. These have great importance in medical and veterinary since many of them have zoonotic potential. The increase has been largely due to climate change that has taken place all over the world. Vectors such as ixodids and sand flies can transmit agents such as bacteria and parasites. In this work we discuss some of the most common diseases in Portugal, which are caused by *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii* and *Leishmania infantum*.

The main objective of this dissertation was to determine the percentage of these agents in a population composed by 28 dogs resident in a shelter in the municipality of Moura, Baixo Alentejo region. For this purpose, blood was collected for EDTA tubes and performed blood count, blood smear and buffy-coat observation, polymerase chain reaction, immunofluorescence and enzyme immunoabsorption assay.

The molecular tests allowed to identify 18% of the animals infected with *Ehrlichia canis* and 7% with *Anaplasma platys*. *Leishmania* spp. DNA was not amplified nor of *Rickettsia* spp. in none of the studied dogs. Serological tests indicated a seroprevalence of 53.6% for *E. canis*, 100% for *R. conorii*, 35.7% for *L. infantum* and 18% for *A. phagocytophilum*.

The results obtained show non negligible values for the presence of agents under study in this region of the country. Knowledge about the geographical distribution of these agents is relevant for the control and epidemiology of vector - borne canine diseases.

Keywords: *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii*, *Leishmania infantum*, dogs, Moura

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ALT/GPT – Alanina aminotransferase, do inglês “Alanine Aminotransferase”

AST/GOT – Aspartato Aminotransferase, do inglês “Aspartate Aminotransferase”

BID – Duas vezes por dia, do latim “*Bis in die*”

CK – Creatinofosfoquinase, do inglês “Creatine Phosphokinase”

EMC – Erlichiose Monocítica Canina

CVBD's – Doenças Caninas Transmitidas por Vetores, do inglês “Canine Vector-Borne Diseases”

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético, do inglês “Ethylenediaminetetraacetic acid”

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

ESCCAP – Conselho Científico Europeu de Parasitas de Animais de Companhia, do inglês “European Scientific Counsel Companion Animal Parasites”

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

EUA – Estados Unidos da América

Fe – Ferro

FeLV – Vírus da leucemia felina, do inglês “Feline Leukemia Virus”

FIV – Vírus da imunodeficiência felina, do inglês “Feline Immunodeficiency Virus”

FMV – Faculdade de Medicina Veterinária

fPLI – Imunorreatividade da lipase pancreática felina, do inglês “Feline Pancreatic Lipase Immunoreactivity”

gADN – ADN genómico

Gama-GT – Gamaglutamiltransferase, do inglês “Gamma-glutamyltransferase”

IFI – Imunofluorescência Indireta

IgG – Imunoglobulina G

LACH – Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia

MSF – Febre escaro-nodular ou febre da carraça, do inglês “Mediterranean Spotted Fever”

nPCR - Reação em Cadeia da Polimerase *nested*, do inglês “Nested Polymerase Chain Reaction”

pb – Par de bases

PBS – Tampão fosfato salino, do inglês “Phosphate Buffered Saline”

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

PO – Via oral, do latim “*Per os*”

PTC – Pancitopenia Tropical Canina

ARN – Ácido ribonucleico

rARN – Ácido ribonucleico ribossômico

s.l. – Em sentido amplo, do latim “sensu lato”

s.s. – Em sentido específico, do latim “sensu stricto”

SID – Uma vez por dia, do latim “*semel in die*”

SRD – Sem Raça Definida

T4 – Tiroxina

TBE – Tris-borato-EDTA

TP – Tempo de Protrombina

TTPA – Tempo de tromboplastina parcial ativada

TSH – Hormona estimulante da tiroide, do inglês “Thyroid-stimulating Hormone”

ULHT – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

UV – Ultravioleta

ompA – Proteína A da membrana externa, do inglês “outer membrane protein A”

OMS – Organização Mundial de Saúde

× g – Aceleração gravitacional (unidade de força centrífuga relativa)

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS	10
ÍNDICE DE FIGURAS	11
RELATÓRIO DE ESTÁGIO	13
INTRODUÇÃO	17
1.1 Agentes	17
1.1.1 <i>Anaplasma phagocytophilum</i> e <i>Anaplasma platys</i>	18
1.1.2 <i>Ehrlichia canis</i>	20
1.1.3 <i>Rickettsia conorii</i>	23
1.1.4 <i>Leishmania infantum</i>	24
1.2. Vetores	26
1.2.1. Ixodídeos	27
1.2.1.1 Ixodes ricinus	28
1.2.1.1 Rhipicephalus sanguineus sensu lato	30
1.2.2 Flebotomíneos	32
1.3 Exames complementares de diagnóstico	34
1.3.1 Hemograma com esfregaço sanguíneo	34
1.3.2 Diagnóstico Molecular	37
1.3.2.1 Anaplasmoses	38
1.3.2.2 Erlichiose	38
1.3.2.3 Rickettsiose	39
1.3.2.4 Leishmaniose	39
1.3.3. Serologia	39
1.3.3.1. Ensaio de imunoabsorção enzimática	40
1.3.3.2. Imunofluorescência Indireta	40
MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1 População estudada	42
2.2 Extração de ADN	42
2.3 Avaliação da integridade física do ADN genómico	43
2.4 Reação em cadeia da polimerase	43
2.4.1 Amplificação de um fragmento do gene da β-actina canina	44
2.4.2 Amplificação de ADN de <i>Leishmania</i> spp.	45
2.4.3 Amplificação de ADN de <i>Anaplasma</i> spp./<i>Ehrlichia</i> spp.	46

2.4.4 Amplificação de ADN de <i>Ehrlichia</i> spp.....	46
2.4.5 Amplificação de ADN de <i>Rickettsia</i> spp.	48
2.5 Purificação e sequenciação dos produtos de PCR.....	49
2.6 Pesquisa de anticorpos por Imunofluorescência Indireta	50
2.7 Pesquisa de anticorpos anti- <i>A. phagocytophilum</i> por ELISA.....	52
RESULTADOS	54
3.1 Caracterização da amostra estudada	54
3.2 Achados no hemograma.....	55
3.3 Esfregaços de Sangue Total.....	57
3.4 Esfregaços de <i>Buffy-coat</i>	57
3.5 Avaliação da integridade física do ADN genómico	57
3.6 Avaliação da ausência de inibidores nas amostras de ADN genómico	57
3.7 Resultados das análises moleculares e serológicas	58
3.7.1 Infecção por <i>Anaplasma</i> spp. e <i>Ehrlichia</i> spp.	58
3.7.2 Infecção por <i>Ehrlichia</i> spp.	60
3.7.3 Infecção por <i>Rickettsia</i> spp.	61
3.7.4 Infecção por <i>Leishmania</i> spp.....	62
3.7.5 Avaliação da presença de co-infecções e/ou co-exposições	63
DISCUSSÃO	65
CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
APÊNDICE I	90
APÊNDICE II	91

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de <i>primers</i> utilizados na amplificação de um fragmento do gene β -actina	44
Tabela 2 – Condições da reação de PCR para amplificação de um fragmento o gene da β -actina	44
Tabela 3 – Sequência de <i>primers</i> utilizados na amplificação de um fragmento do gene do minicírculo do cinetoplasto	45
Tabela 4 – Condições da reação de PCR para amplificação de um fragmento o gene do minicírculo do cinetoplasto para <i>Leishmania</i> spp.	45
Tabela 5 – Sequência de <i>primers</i> utilizados na amplificação do gene 16S <i>rARN</i>	46
Tabela 6 – Condições da reação de PCR para amplificação de um fragmento do gene 16S <i>rARN</i> de <i>Anaplasma</i> spp./ <i>Ehrlichia</i> spp.	46
Tabela 7 – Sequência de <i>primers</i> utilizados na amplificação de um fragmento do gene 16S <i>rARN</i> de <i>Ehrlichia</i> spp.	47
Tabela 8 – Condições da reação de nPCR para amplificação de um fragmento do gene 16S <i>rARN</i> de <i>Ehrlichia</i> spp.	47
Tabela 9 – Sequência de <i>primers</i> utilizados na amplificação do gene que codifica o antígeno 190-kDa de <i>Rickettsia</i> spp.	48
Tabela 10 – Condições da reação de nPCR para amplificação de um fragmento do gene que codifica o antígeno 190-kDa de <i>Rickettsia</i> spp.	49
Tabela 11 – Diluição do plasma para pesquisa de IgG por IFI	50
Tabela 12 – Interpretação dos resultados de ELISA para <i>A. phagocytophilum</i>	53
Tabela 13 – Resumo dos resultados obtidos por ELISA	59
Tabela 14 – Frequência de cães com co-exposição a dois ou mais agentes	63
Tabela 15 – Resultados positivos por PCR e comparação com outros dados adquiridos	64
Tabela 16 – Comparação dos resultados entre as diferentes técnicas serológicas e moleculares	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição dos diversos exames hematológicos executados durante o estágio curricular	13
Figura 2 – Distribuição dos diversos exames de bioquímica sanguínea executados durante o estágio curricular	14
Figura 3 – Distribuição dos diversos exames endocrinológicos executados durante o estágio curricular	14
Figura 4 – Distribuição dos diversos exames de hemostase executados durante o estágio curricular	15
Figura 5 – Distribuição dos diversos exames serológicos executados durante o estágio curricular	15
Figura 6 – Distribuição dos diversos exames urinários executados durante o estágio curricular	16
Figura 7 – Distribuição dos diversos exames parasitológicos executados durante o estágio curricular	16
Figura 8 – Classificação taxonómica dos agentes bacterianos e parasitários em estudo	18
Figura 9 – Classificação taxonómica dos vetores artrópodes	27
Figura 10 – Distribuição de <i>Ixodes ricinus</i> na Europa em janeiro de 2018	28
Figura 11 – Distribuição de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> na Europa em janeiro de 2018	31
Figura 12 – Distribuição de <i>Phlebotomus perniciosus</i> na Europa em janeiro de 2018	33
Figura 13 – Observação de uma mórula de <i>A. phagocytophilum</i> no citoplasma de um neutrófilo	35
Figura 14 – Observação de uma mórula de <i>Ehrlichia canis</i> no citoplasma de um monócito	36
Figura 15 – Observação de amastigotas intracelulares de <i>Leishmania</i> spp. num aspirado de medula óssea	37
Figura 16 – Resultado do controlo positivo de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos IgG anti- <i>E. canis</i>	51
Figura 17 – Resultado do controlo positivo de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos IgG anti- <i>R. conorii</i>	51
Figura 18 – Resultado do controlo positivo de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos IgG anti- <i>L. infantum</i>	52
Figura 19 – Distribuição da amostra relativamente ao género (n=28)	54
Figura 20 – Distribuição da amostra relativamente à faixa etária (n=28)	54

Figura 21 – Distribuição da amostra relativamente ao tempo em que os animais se encontravam no canil (n=28)	55
Figura 22 – Percentagem de animais com alterações nos valores eritrocitários e de hemoglobina (n=28)	55
Figura 23 – Percentagem de animais com alterações nos valores leucocitários (n=28)	56
Figura 24 – Percentagem de animais com alterações nos valores plaquetários (n=28)	56
Figura 25 – Eletroforese em gel de agarose a 0,8% de algumas amostras de ADN genómico isolado	57
Figura 26 – Eletroforese em gel de agarose a 1,5% após amplificação de um fragmento do gene <i>β-actina</i>	58
Figura 27 – Eletroforese em gel de agarose a 1,5% após amplificação de um fragmento do gene <i>16S rARN</i>	58
Figura 28 – Resultados da PCR convencional para <i>Anaplasma</i> spp. e <i>Ehrlichia</i> spp. (n=28) ..	59
Figura 29 – Placa de ELISA para avaliação da presença de anticorpos IgG anti- <i>A. phagocytophilum</i>	59
Figura 30 – Eletroforese em gel de agarose a 1,5% após amplificação de um fragmento do gene <i>16S rARN</i>	60
Figura 31 – Resultados da nPCR para <i>Ehrlichia</i> spp. (n=28)	60
Figura 32 – Resultados da imunofluorescência indireta para <i>E. canis</i> (n=28)	61
Figura 33 – Eletroforese em gel de agarose a 1,5% após amplificação de um fragmento do gene que codifica o antigénio <i>190-kDa</i>	61
Figura 34 – Resultados da nPCR para <i>Rickettsia</i> spp. (n=28)	62
Figura 35 – Resultados da imunofluorescência indireta para <i>R. conorii</i> (n=28)	62
Figura 36 – Resultados da imunofluorescência indireta para <i>L. infantum</i> (n=28)	63
Figura 37 – Questionário preenchido pela responsável pelo canil em relação a cada animal ao qual foi recolhido sangue para análise	90

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

O estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária realizado pela autora da presente dissertação teve lugar no Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia (LACH) da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (ULHT). O estágio teve início a 12 de setembro de 2016 e terminou a 14 de abril de 2017, tendo a duração de sete meses.

Os primeiros cinco meses decorreram no laboratório interno ao Hospital Escolar Veterinário da FMV-ULHT, sob a orientação da Doutora Joana Fonseca. Durante este tempo foram realizadas várias técnicas complementares de diagnóstico como hemograma, bioquímica sérica, ionograma, citologia, urianálise, análise bacteriológica e parasitológica, teste endocrinológico e antibiograma. Os últimos dois meses foram centrados na execução de análises citológicas, moleculares e serológicas necessárias à realização da presente dissertação de mestrado, sob a orientação da Professora Doutora Margarida Alves.

Na área da hematologia realizaram-se seis tipos de análises (Figura 1). A contagem de reticulócitos foi realizada após coloração do esfregaço com o novo azul de metileno, enquanto os esfregaços sanguíneos foram corados com Giemsa (Bio-Optica Index). Os hemogramas foram realizados num equipamento BC-5300Vet (Mindray). As amostras de sangue foram colhidas para tubos com o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, do inglês “Ethylenediaminetetraacetic acid”).

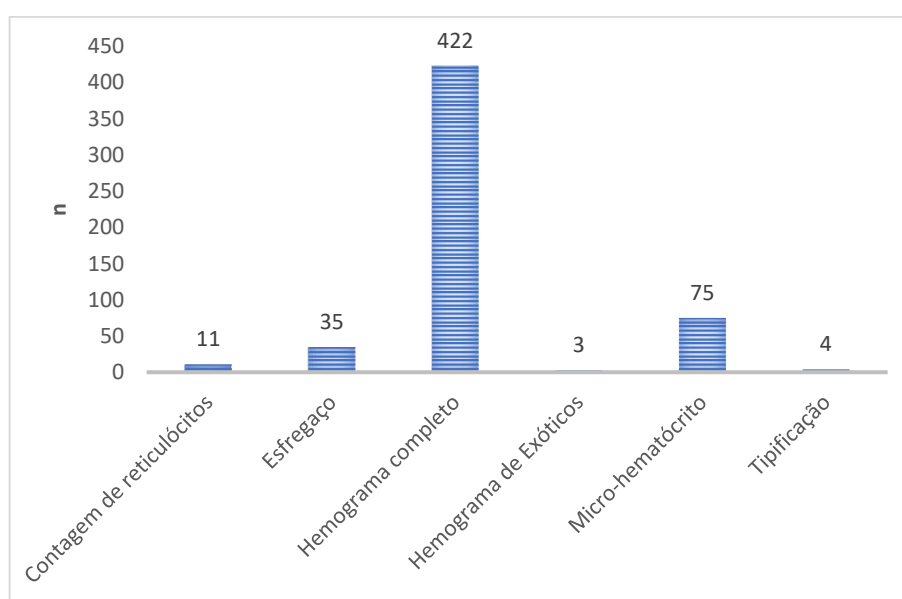


Figura 1 – Distribuição dos diversos exames hematológicos executados durante o estágio curricular.

As análises de bioquímica sanguínea foram realizadas num equipamento Spotchem EZ SP 4430 Arkray (Menarini), em amostras de soro ou plasma heparinizado. Os ionogramas foram efetuados num equipamento Vet Stat Electrolyte and Gas Analyzer (IDEXX). No total foram analisados 21 parâmetros diferentes (Figura 2).

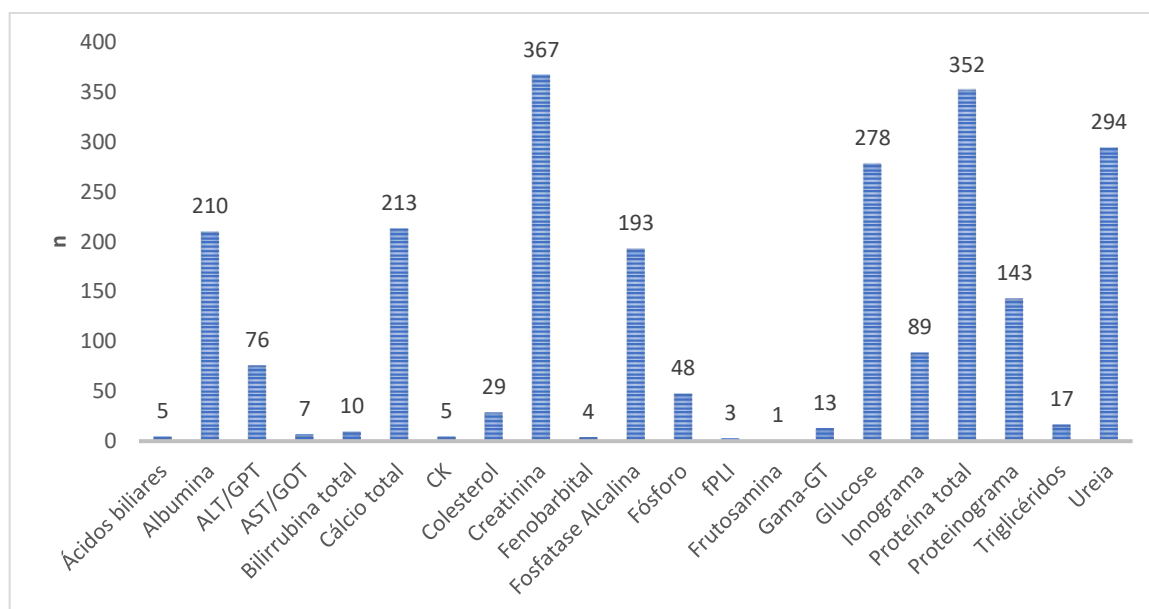


Figura 2 – Distribuição dos diversos exames de bioquímica sanguínea executados durante o estágio curricular.

Os exames endocrinológicos (Figura 3) foram realizados num equipamento Vet Test 8008 (IDEXX), sendo que no caso da T4 total se recorreu ao SNAP T4 Test Kit (IDEXX Laboratories).

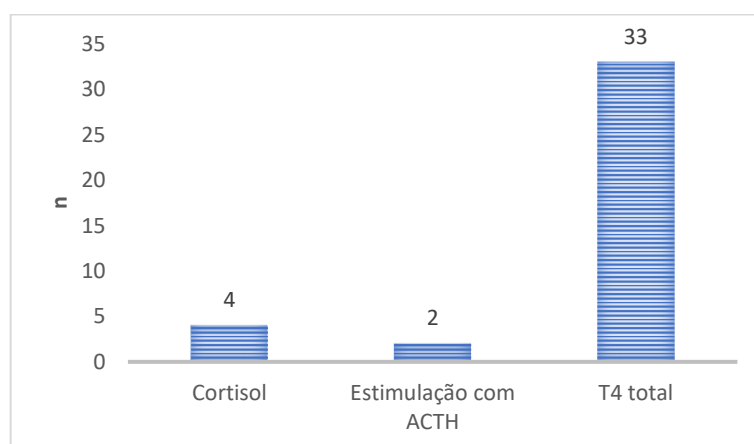


Figura 3 – Distribuição dos diversos exames endocrinológicos executados durante o estágio curricular.

De modo a avaliar a hemostase realizaram-se três análises diferentes (Figura 4).

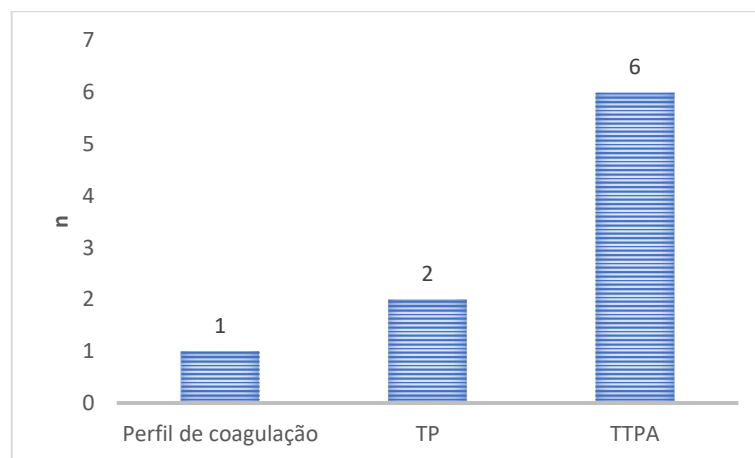


Figura 4 – Distribuição dos diversos exames de hemostase executados durante o estágio curricular.

Foram realizados quatro exames serológicos diferentes, efetuados por imunofluorescência indireta (IFI), ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA) e o teste rápido SNAP Combo Plus FeLV Antigen/FIV Antibody test Kit (IDEXX Laboratories) (Figura 5).

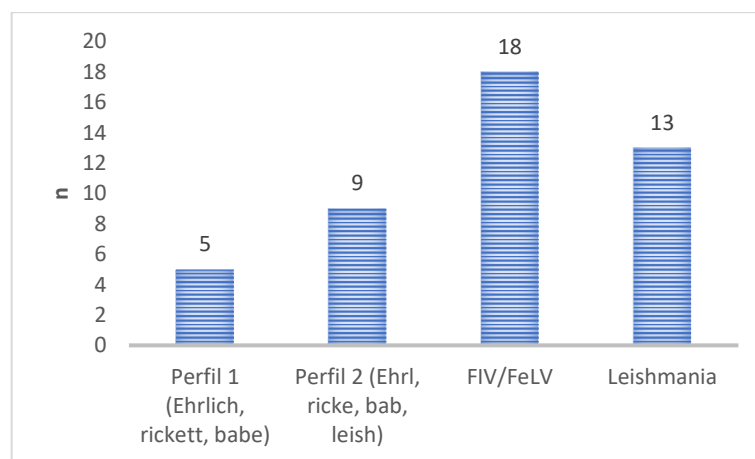


Figura 5 – Distribuição dos diversos exames serológicos executados durante o estágio curricular.

Realizaram-se três exames moleculares, por reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês “Polymerase Chain Reaction”), de modo a avaliar a presença do vírus da leucemia felina (FeLV, do inglês “Feline Leukemia Virus”).

A análise à urina que compreende a visualização do sedimento urinário, com posterior observação ao microscópio ótico Olympus CX22 e o exame de urina tipo II foram realizados manualmente. O rácio proteína/creatinina foi efetuado num equipamento Vet Test 8008 (IDEXX). A casuística destes exames é apresentada na figura 6.

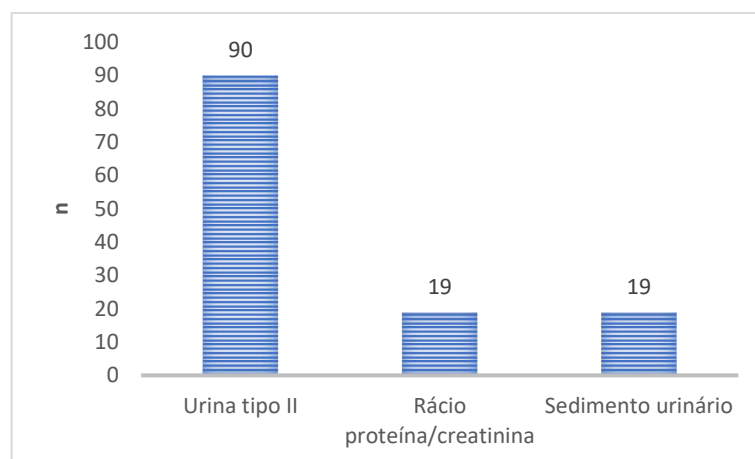


Figura 6 – Distribuição dos diversos exames urinários executados durante o estágio curricular.

Através das técnicas de Willis/flutuação e Baermann pesquisou-se, a presença de parasitas gastrintestinais e pulmonares, respetivamente, em amostras de fezes (Figura 7).

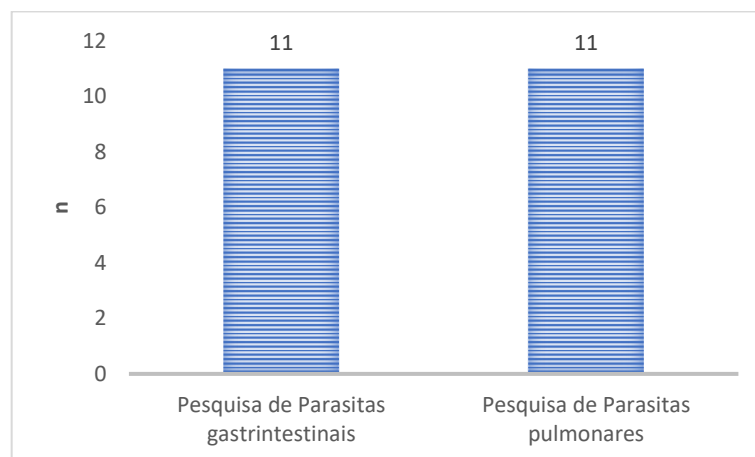


Figura 7 – Distribuição dos diversos exames parasitológicos executados durante o estágio curricular.

Por último, foram realizados exames citológicos que constituem uma grande parte das análises realizadas no LACH, tendo sido efetuadas 218 análises. Tal como nos esfregaços sanguíneos, recorreu-se à coloração com Giemsa (Bio-Optica Index).

INTRODUÇÃO

Desde o final dos anos 80 do século passado tem ocorrido um aumento significativo de Doenças Caninas Transmitidas por Vetores (CVBD's, do inglês "Canine Vector-Borne Diseases") podendo estas apresentar potencial zoonótico. Este aumento pode ser atribuído às mudanças climáticas ou ao aumento da mobilidade do Homem à escala global. Alguns agentes são considerados endémicos de cada região, enquanto outros são exóticos. As técnicas de diagnóstico molecular são o método de eleição em termos da descoberta de novas espécies e estirpes destes agentes patogénicos. O facto de estas doenças poderem ser assintomáticas, talvez por baixa incidência ou suscetibilidade por parte da população, leva a um retardamento no seu diagnóstico, dificultando, assim, o seu controlo e prevenção (Lauzi *et al.*, 2016; Potkonjak *et al.*, 2016).

Dada a crescente proximidade entre os animais domésticos, as espécies pecuárias e os humanos (Proboste *et al.*, 2015), é necessário recorrer a uma abordagem *One Health*, pois o primeiro pode servir de reservatório dos agentes infecciosos que afetam o Homem (Lauzi *et al.*, 2016). De modo a evitar ou prever possíveis surtos de doença, é essencial existir uma vigilância epidemiológica que avalie a sua incidência e prevalência, alertando os médicos e veterinários de cada região (Kamani *et al.*, 2013).

1.1 Agentes

O número de agentes patogénicos transmitidos por vetores que afetam os cães é vasto. Desde modo, no presente trabalho, foram abordados, apenas, alguns dos potencialmente mais comuns em Portugal. Estes são *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia conorii* e *Leishmania infantum* (Figura 8). As três primeiras são bactérias intracelulares obrigatórias infiltrando-se dentro de leucócitos (Çetinkaya *et al.*, 2016), enquanto o último é um protozoário com tropismo para as mesmas células, especificamente, monócitos, macrófagos e neutrófilos (Maia & Campino, 2008).

Em Portugal já foram descritos casos de leishmaniose e febre da carraça em humanos, daí a importância da divulgação de informação sobre este tema entre os tutores dos animais, de modo a prevenir e evitar estas situações (Pereira *et al.*, 2016).

Devido ao elevado número de vetores hematófagos transmissores de doença, como os ixodídeos e os flebotomíneos, e a facilidade com que se alojam nos hospedeiros (Yisaschar-Mekuzas *et al.*, 2013), existe a possibilidade de o mesmo animal apresentar infeções simultâneas provocadas por múltiplos agentes. Esta situação agrava bastante o estado de saúde

dos animais e dificulta o tratamento (Víchová *et al.*, 2014). Um dos principais fatores de risco destas co-infecções é os animais se encontrarem em abrigos onde o controlo de vetores é insuficiente ou, mesmo, inexistente (Pennisi *et al.*, 2012).

Atualmente, para além da transmissão por vetores existe a possibilidade de a infeção ser iatrogénica ocorrendo através de transfusões sanguíneas, pelo que, em zonas endémicas, devem ser realizados testes moleculares para rastreio de agentes infecciosos nos animais dadores (Sainz *et al.*, 2015).

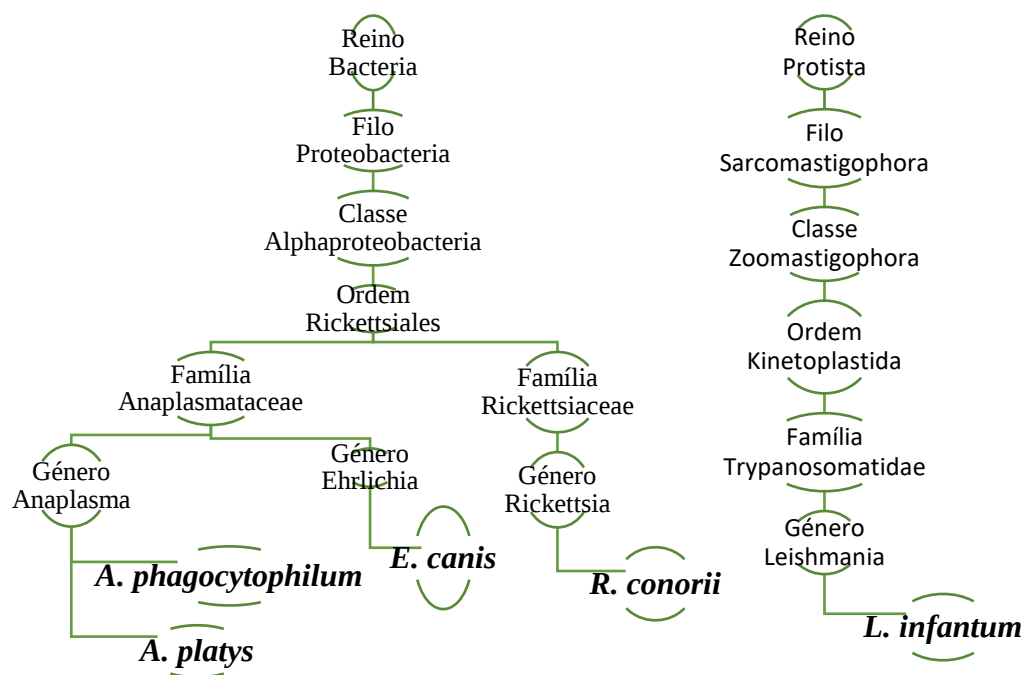


Figura 8 – Classificação taxonómica dos agentes bacterianos e parasitários em estudo (Adaptado de Greene, 2015 e Taylor *et al.*, 2007).

1.1.1 *Anaplasma phagocytophilum* e *Anaplasma platys*

A. phagocytophilum é uma bactéria gram-negativa transmitida pela carraça *Ixodes ricinus* e agente da anaplasmoose granulocítica canina pois infecta células granulares, como neutrófilos e eosinófilos (Almazán *et al.*, 2016; Çetinkaya *et al.*, 2016; Silveira *et al.*, 2015). Estas bactérias unem-se às células-alvo através da sua camada superficial glicoproteica, onde impedem a fusão entre endossomas e lisossomas, e reproduzem-se em vesículas formando mórulas (Pantchev *et al.*, 2015).

A primeira identificação de *A. phagocytophilum* em cães, aconteceu em 1982, na Califórnia. Em 1994, nos Estados Unidos da América (EUA), foi diagnosticada pela primeira vez a infeção por este agente em humanos (Sainz *et al.*, 2015), desmistificando a ideia de que

esta bactéria seria apenas de importância veterinária. Diagnosticar e proceder ao tratamento de infecções subclínicas ou assintomáticas ajuda no controlo desta patologia, pois tal como em outras bacterioses, os cães servem como reservatórios tanto para outros animais como para os humanos (Víchová *et al.*, 2014).

No ano de 2001, com base na sequência do gene que codifica a subunidade 16S do ácido ribonucleico ribossómico (rARN), três espécies diferentes (*E. equi*, *E. phagocytophila* e o agente da erlichiose granulocítica humana) foram agrupadas num só género que hoje conhecemos por *Anaplasma phagocytophilum* (Granick *et al.*, 2009).

Estudos recentes mostraram que a probabilidade de infeção é maior em cães adultos, e que esta ocorre nos meses em que existe um maior número de vetores em fase de ninfa ou adulta em circulação (Santos *et al.*, 2013).

Clinicamente, os sinais observados são letargia, anorexia, hipertermia e, em raros casos, polidipsia, vômitos, diarreia e sintomatologia neurológica (Cardoso *et al.*, 2012). O diagnóstico laboratorial permite detetar um maior número de casos, do que o clínico, pois nem todas as infecções exibem sintomatologia no hospedeiro, sendo assintomáticas (Lee *et al.*, 2017). A claudicação pode, também, ser um sinal clínico relevante pois, em estudos realizados através de citologia do fluido sinovial de animais com poliartrites, foi detetada a presença desta bactéria (Theodorou *et al.*, 2015). A anaplasmosse raramente causa a morte do hospedeiro, embora a ocorrência de coinfeções agrave o quadro clínico do mesmo (Smith & Wall, 2013).

O diagnóstico deve ser realizado através da complementaridade entre diversas técnicas, como a observação em esfregaços sanguíneos, de mórulas em neutrófilos e, mais raramente, em eosinófilos, a deteção de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* por serologia e a deteção, por PCR, de ácido desoxirribonucleico (ADN) do agente (Kohn *et al.*, 2011).

No Brasil, através da técnica de PCR em tempo real, foi possível diagnosticar anaplasmosse por *A. phagocytophilum* em cães, não havendo qualquer informação sobre a deteção de anaplasmosse granulocítica humana (Silveira *et al.*, 2015). Neste país existe igualmente um registo de coinfeção entre *A. phagocytophilum* e *E. canis*. Este estudo é suportado e aprovado pela realização de técnicas moleculares, parasitológicas e hematológicas simultaneamente em 3 ocasiões diferentes (Silveira *et al.*, 2015).

O agente *A. phagocytophilum* encontra-se disperso por todo o continente Europeu, tem como principal hospedeiro o cão, embora possa afetar espécies como cavalos, ruminantes, gatos e o Homem (Scorpio *et al.*, 2011; Silveira *et al.*, 2015; Çetinkaya *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017). Em Portugal foi descrita uma seroprevalência de 4,5% a 9,2% em animais aparentemente

saudáveis ou clinicamente suspeitos, respetivamente (Maia *et al.*, 2015). Em Espanha, foram descritas seroprevalências entre 5% a 19%, em cães com quadro clínico entre subagudo a agudo (Solano-Gallego *et al.*, 2006; Couto *et al.*, 2010; Miró *et al.*, 2013). Na Europa, encontram-se descritas prevalências de infeção, detetadas por PCR, entre 0,8% e 23,6% e seroprevalências detetadas por ELISA ou IFI entre 7,5% e 56,5% (Kohn *et al.*, 2011; Sainz *et al.*, 2015; Starkey *et al.*, 2016).

O tratamento usado em cães com anaplasmosse granulocítica consiste na administração de um antibiótico do grupo das tetraciclinas, a doxiciclina [5 mg/kg por via oral (PO, do latim “*Per os*”) duas vezes por dia (BID, do latim “*Bis in die*”) durante 2 semanas], sendo que a maioria dos animais mostra melhorias 24 a 48 horas após o início da antibioterapia (Carrade *et al.*, 2009).

A prevenção da transmissão de *A. phagocytophilum* em cães tem sido possível através do controlo do vetor, usando uma combinação de vários princípios ativos como imidaclopride, permetrina, fipronil e (S)-metopreno, com resultados até 25 dias após a aplicação no animal (Carrade *et al.*, 2009).

A. platys é outra espécie responsável pela anaplasmosse trombocítica canina que tem como células alvo as plaquetas sanguíneas. Este agente é transmitido pelo ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) tendo sido identificado, pela primeira vez em cães, no ano de 1978, na Florida (Bouzouraa *et al.*, 2016). Esta espécie encontra-se distribuída em todo o mundo e o seu papel como agente zoonótico não foi, ainda, comprovado. Normalmente, os sinais clínicos apresentados pelo hospedeiro são ligeiros, apesar da virulência desta bactéria poder variar de acordo com a região geográfica em que se encontra (Cicuttin *et al.*, 2014). Alguns dias após a exposição ao agente ocorre uma diminuição repentina no número de plaquetas. Dada a natureza cíclica desta bacteremia a maioria dos animais permanecem assintomáticos. Quando ocorre expressão dos sinais clínicos estes podem incluir emese, diarreia, febre, depressão e anorexia (Rufino *et al.*, 2013).

1.1.2 *Ehrlichia canis*

A descoberta de *E. canis* remonta ao ano de 1935 na Argélia, por Donatien e Lestoquard (Harrus & Waner, 2011), quando cães de serviço militar exibiram sinais de anemia e febre ganhando, na altura, o nome de Pancitopenia Tropical Canina (PTC) (Sainz *et al.*, 2015). Mais tarde, em 1995, foi novamente descrita em cães, na Costa Rica, com base na avaliação clínica e em resultados microscópicos e serológicos (Romero *et al.*, 2011).

Esta é uma bactéria gram-negativa transmitida, maioritariamente, pelo vetor *Rhipicephalus sanguineus*, na sua fase de ninfa ou adulta (Cicuttin *et al.*, 2016), veículo da antiga PTC, agora chamada Erlichiose Monocítica Canina (EMC) (Alves *et al.*, 2014). Este agente apresenta tropismo para os monócitos e macrófagos (Aguiar *et al.*, 2016; Ferrolho *et al.*, 2016). Nas carraças podemos encontrar estas bactérias nas glândulas salivares, epitélio intestinal e nas células da hemolinfa (Aguiar *et al.*, 2014). Existem, também, registos de transmissão deste agente pelo vetor *Dermacentor variabilis* (Starkey *et al.*, 2014).

E. canis tem um período de incubação de oito a 20 dias (Waner *et al.*, 2014) e, dependendo da fase da doença em que o animal se encontra - aguda, subaguda ou crónica (Bottari *et al.*, 2016) - os sinais clínicos variam entre febre, letargia, apatia, anorexia, mucosas pálidas, esplenomegalia, distúrbios hemorrágicos (petéquias e/ou equimoses, por exemplo) e uveítes, podendo ocorrer a morte do cão (Cicuttin *et al.*, 2016). Distúrbios gastrintestinais, como vómitos e diarreia tendem a manifestar-se em 10 a 15% da população afetada (Mylonakis *et al.*, 2014). Tal como a anaplasmose, também a EMC pode ser assintomática e os animais serem portadores crónicos da doença (Almazán *et al.*, 2016; Çetinkaya *et al.*, 2016). A gravidade desta doença deriva do fato de existir, ou não, mielossupressão (Mylonakis *et al.*, 2014; Theodorou *et al.*, 2015).

Segundo Sainz *et al.* (2015), a transmissão do agente pelo vetor ocorre passadas três horas do seu contacto com o hospedeiro. O fato de existirem, no mesmo animal, co-infecções com dois agentes diferentes, pode aumentar a probabilidade deste exibir sinais clínicos (Gaunt *et al.*, 2010).

No Mundo, *E. canis* é a bactéria com maior prevalência diagnosticada em cães (Starkey *et al.*, 2016). Esta apresenta uma distribuição geográfica abrangente, tendo sido confirmada a sua presença na América, Europa, Ásia e África. Esta confirmação foi feita através de dois métodos moleculares, por amplificação do gene que codifica a subunidade 16S do *rARN* e/ou do gene *trp36* (Almazán *et al.*, 2016; Cicuttin *et al.*, 2016; Pat-Nah *et al.*, 2015). Apesar da sua larga distribuição geográfica, as sequências do gene 16S *rARN* avaliadas nos vários continentes são praticamente idênticas o que, apesar da pouca informação que isto nos dá sobre este agente, indica um alto nível de conservação (Aguiar *et al.*, 2013).

Em 1986 foi descrito o primeiro caso de EMC em gatos (Braga *et al.*, 2014), continuando a surgir casos em que os hospedeiros são felinos e até canídeos selvagens (Carvalho *et al.*, 2016). Na Venezuela, *E. canis* já foi identificado como agente patogénico em humanos (Cardoso *et al.*, 2015; Lauzi *et al.*, 2016).

Segundo Bottari *et al.* (2016), animais com EMC exibiram alterações no metabolismo do ferro (Fe). Isto foi baseado na hipótese de que *E. canis* tinha desenvolvido métodos próprios na aquisição deste elemento. A importância do estudo prende-se com o fato de um dos sinais clínicos de EMC ser a anemia e de o Fe ter um papel importante no seu desenvolvimento.

O diagnóstico da EMC, pode ser feito recorrendo a vários métodos, como a visualização de mórulas de *E. canis* em esfregaços de sangue total ou *buffy-coat*, serologia para anticorpos imunoglobulina G (IgG) anti-*E. canis*, cultura de tecidos para isolamento do agente e PCR para detecção do ADN do agente patogénico (Waner *et al.*, 2014), normalmente por amplificação do gene que codifica a subunidade 16S rARN (Alexandre *et al.*, 2009).

Ramos *et al.* (2009) realizaram um estudo sobre a diferença no número de diagnósticos realizados por esfregaço sanguíneo quando comparado com uma técnica de PCR *nested* (nPCR), tendo verificado que, por observação do esfregaço, apenas em 9% dos animais estudados foi observada doença, enquanto que por análise molecular o valor aumentou para 57%. Os autores concluíram, que no diagnóstico por esfregaço existe um grande número de resultados falso negativos.

Em Portugal, em animais saudáveis ou assintomáticos foi encontrada uma seroprevalência para *E. canis* de 4,1%, enquanto que em animais com suspeita de doença foi de 16,4% (Maia *et al.*, 2015). Em Espanha, foram descritas seroprevalências entre 3,1% e 19% em animais domésticos (Miró *et al.*, 2013; Sainz *et al.*, 2015) e 54,7% em animais de canil (Amusategui *et al.*, 2008). Devido ao período de seroconversão de até 15 dias podem ocorrer resultados falso negativos nos testes de imunofluorescência (Mylonakis *et al.*, 2009).

O tratamento da EMC consiste na administração oral de um antibiótico como a doxiciclina, na dosagem de 10mg/kg uma vez por dia (SID, do latim “*semel in die*”) (Morar *et al.*, 2015). Após o tratamento, e consequente eliminação de *E. canis*, pode ocorrer uma persistência dos anticorpos durante meses ou mesmo anos (Harrus & Waner, 2011).

Fourie *et al.* (2013) comprovaram a eficácia do uso combinado de imidaclopride e permetrina (Advantix®) na prevenção da transmissão de *E. canis* ao hospedeiro por *R. sanguineus* durante quatro semanas. Num outro estudo foi avaliada a combinação entre fipronil, amitraz e (S)-metopreno (CERTIFECT®) com o mesmo objetivo do anterior; os autores concluíram que este protocolo também é eficaz na prevenção da transmissão deste agente (Fourie *et al.*, 2013).

1.1.3 *Rickettsia conorii*

Rickettsia conorii é uma bactéria gram-negativa, agente da febre escaro-nodular ou febre da carraça (MSF, do inglês “Mediterranean Spotted Fever”) transmitida majoritariamente pelo ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus* (Lauzi *et al.*, 2016). Esta bactéria é endêmica, principalmente, na Bacia Mediterrânea e, em alguns casos, no norte e centro da Europa e Ásia. Nestas áreas a seroprevalência é de 26% a 60%, em cães, com infecção subaguda (Nicholson *et al.*, 2010; Solano-Gallego *et al.*, 2015). Um estudo realizado no Uganda encontrou uma seroprevalência de 95% para *Rickettsia* spp., tendo sido o valor mais alto descrito até ao momento, naquela zona, em relação à *Rickettsia* spp. em animais de meios rurais. Espanha apresenta valores que rondam os 82%. No entanto, os métodos moleculares não detetaram a presença de ADN deste agente (Proboste *et al.*, 2015).

Esta rickettsiose pode ser transmitida da fêmea adulta para os seus ovos (transmissão transovárica) e/ou ao longo das várias fases do ciclo de vida do ectoparasita vetorial (transmissão transtandial). A transmissão em humanos pode ocorrer, também, através da inoculação acidental da membrana mucosa das carraças, após esmagamento aquando da sua remoção dos cães (Nicholson *et al.*, 2010). Os cães são o hospedeiro preferencial embora tenham sido descritos casos em outros mamíferos e aves (Levin *et al.*, 2012). Até ao momento, existe pouca informação sobre a suscetibilidade que os hospedeiros, principalmente os cães, apresentam à infecção por *R. conorii* e a duração desta bacteremia (Solano-Gallego *et al.*, 2015).

A sintomatologia apresentada pelos humanos afetados começa por um episódio agudo de febre alta, com o local da mordida da carraça assinalado por uma escara. Pode, também, apresentar adenopatia regional e erupção maculopapular disseminada com envolvimento das superfícies palmares e plantares. Os casos mais graves podem apresentar falência multiorgânica, manifestações neurológicas e, mesmo, a morte (Levin *et al.*, 2009), possivelmente devido a um diagnóstico errado ou tardio (Kidd *et al.*, 2008).

Após o início da antibioterapia, são raros os casos de mortalidade, embora 6% da população afetada apresente um quadro clínico grave (Levin *et al.*, 2012). Os cães são, normalmente, assintomáticos, apesar de estudos recentes indicarem uma evolução do quadro clínico apresentado pelos animais afetados (Nicholson *et al.*, 2010).

Existem relatos que sugerem que após serem infetados com este agente, os hospedeiros, seja o cão ou o Homem, desenvolvem uma imunidade contra a re-infecção pelo mesmo ou outro agente da mesma família (Levin *et al.*, 2014).

Os meios complementares de diagnóstico utilizados em humanos incluem a imunofluorescência como teste de referência, e mais recentemente, a PCR seguida de sequenciação. Esta última tem auxiliado na melhor caracterização desta bactéria (Sfar *et al.*, 2009).

A MSF foi descrita em humanos, pela primeira vez, em 1909 na Tunísia (Parola *et al.*, 2009). Anualmente, em Itália, são registados, em humanos, mais de 1000 casos. Em países endêmicos como a Itália, a seroprevalência encontra-se entre 15.5% e 74%, em cães (Solano-Gallego *et al.*, 2015).

Em Portugal, é uma doença de notificação obrigatória devida a sua alta incidência com o desenvolvimento de vasculites graves e falência de vários órgãos (Maia *et al.*, 2014).

Em 1998 foram realizados estudos seroepidemiológicos em que os cães eram usados como sentinelas na propagação da doença para os humanos. Estes não tiveram um resultado satisfatório na identificação da espécie envolvida devido à ocorrência de reações cruzadas dentro do seu grupo (Alexandre *et al.*, 2011).

1.1.4 *Leishmania infantum*

Leishmania infantum é um protozoário, agente da leishmaniose, que tem no cão um dos seus principais hospedeiros e reservatórios. Este último pode ter um papel crucial na propagação do agente ao Homem.

Recentemente, ocorreu um surto de leishmaniose visceral humana em Madrid em que os hospedeiros não eram cães mas sim, animais silvestres como coelhos e lebres (Bravo-Barriga *et al.*, 2016). A leishmaniose visceral humana afeta, maioritariamente, crianças e adultos com o sistema imunitário comprometido (Cardoso *et al.*, 2015).

A transmissão de leishmaniose visceral humana poder ocorrer quer pela via zoonótica, em que o cão é o hospedeiro reservatório, quer pela via antroponótica, tendo como único hospedeiro e reservatório do parasita outros humanos. No cão, a patogenia da doença varia consoante a raça, a virulência da estirpe e a resposta imunitária do hospedeiro contra o parasita (Oliveira *et al.*, 2010).

A disseminação do agente acontece, na maior parte das vezes, através de fêmeas de *Phlebotomus perniciosus* (Bourdeau *et al.*, 2014) que se infetam aquando da picada do hospedeiro para realizarem a sua refeição sanguínea (Maia *et al.*, 2013; Miró *et al.*, 2011). *Phlebotomus ariasi* é outro vetor importante presente na Península Ibérica (Bravo-Barriga *et al.*, 2016). Na sua fase infetante de promastigotas, as leishmanias têm como microbiótomo os

gânglios linfáticos, a medula óssea, o baço e o fígado, podendo também ser encontradas na circulação sanguínea, durante a fase de amastigota, embora seja mais raro (Maia *et al.*, 2009).

A Bacia Mediterrânea, que inclui o sul de Portugal, é uma das zonas endêmicas deste parasita tanto em relação aos animais como aos humanos, tendo esta doença uma seroprevalência, a nível nacional, de 6.3% enquanto que no Sul de Portugal a seroprevalência é de 69%, ambas descritas em cães assintomáticos (Maia *et al.*, 2015; Maia *et al.*, 2016). Na década de 80 do século passado, a região do Algarve foi considerada um foco endêmico da leishmaniose visceral humana (Maia *et al.*, 2009).

Estima-se que, no sudoeste da Europa existam pelo menos 2,5 milhões (16,7%) de cães infetados (Bourdeau *et al.*, 2014). Segundo Miró *et al.* (2013), em Espanha a seroprevalência é de 3% no Norte e de 34,6% no Sul.

A leishmaniose é uma doença sistémica crónica em que os animais podem apresentar linfadenomegalia, lesões cutâneas com ou sem ulceração, caquexia, anemia, sinais oculares, epistaxis, onicogribose, insuficiência renal e claudicação (Gómez-Ochoa *et al.*, 2009; Maia *et al.*, 2016). O nível de manifestação dos sinais clínicos depende da resposta imunitária do indivíduo afetado e dos mecanismos patogénicos envolvidos. Tal como as infeções bacterianas expressas anteriormente, a leishmaniose pode ser assintomática, apesar do animal continuar a servir de reservatório para os vetores flebotómicos, embora com uma taxa de infeção menor que os sintomáticos (Maia & Campino, 2008; Miró *et al.*, 2011).

O diagnóstico é feito, principalmente, através da observação dos parasitas microscopicamente, seja por citologia ou histopatologia, e identificação do ADN do parasita por PCR. Os resultados de IFI devem ser acompanhados de uma avaliação clínica consistente com a doença, pois, por si só, não são suficiente para um diagnóstico definitivo (Noli & Auxilia, 2005).

Maia *et al.* (2013) sugerem que a imunossupressão é o principal fator de risco para a suscetibilidade dos humanos para com a doença, apesar da sua prevalência ter diminuído significativamente na última década. Nos últimos anos, principalmente no centro de Espanha foram descritos vários casos de leishmaniose humana visceral e cutânea (Bravo-Barriga *et al.*, 2016).

O tratamento instituído depende do estado clínico do cão. Nos primeiros estágios da doença pode-se administrar, durante pelo menos três semanas, um antimonial pentavalente, o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) ou a miltefosina (Milteforan[®]), caso haja insuficiência renal, associados ao alopurinol, passando no último estágio à administração,

apenas, do alopurinol (Solano-Galego *et al.*, 2011). Este último tem ajudado na remissão de vários animais, apesar de estes continuarem a ser portadores do agente. Estudos feitos através de xenodiagnóstico, apoiam estes dados, confirmando que o grau de infeção, do cão, depois do tratamento diminui significativamente, afirmando mesmo que os animais tornam-se não infecciosos durante a época de transmissão da doença (Gómez-Ochoa *et al.*, 2009; Miró *et al.*, 2011).

Existem algumas limitações no uso destes medicamentos tais como o alto custo, a administração durante um extenso período de tempo, alterações renais irreversíveis por deposição de imuno-complexos, resistências adquiridas e toxicidade. Todos estes fatores, especialmente o alto custo, têm levado à rejeição do tratamento, por parte dos tutores de cães (Gómez-Ochoa *et al.*, 2009).

Um estudo conduzido por Gómez-Ochoa *et al.* (2009) avaliou os efeitos que a administração de domperidona - Leisguard® (antagonista do recetor D2 de dopamina) teve em cães infetados com leishmaniose, tendo chegado à conclusão que este princípio ativo controla e reduz tanto os sinais clínicos como a titulação de anticorpos séricos.

Atualmente, na Europa existem duas vacinas disponíveis. A CaniLeish® que induz imunidade mediada por células, estimulando uma resposta das células Th1 (Bourdeau *et al.*, 2014) e a LetiFend®, que tem por base a avançada tecnologia de ADN recombinante e permite conseguir uma resposta imunitária direcionada, eficaz e com um elevado nível de segurança (Ramalho, 2017).

A leishmaniose é apontada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma doença emergente uma vez que a sua prevalência tem vindo a aumentar, principalmente nos países em vias de desenvolvimento (Gómez-Ochoa *et al.*, 2009).

1.2. Vetores

A prevenção de CVBD's passa, em primeiro lugar, pelo controlo dos parasitas vetoriais como os ixodídeos (carraças) e os flebotomíneos (Figura 9). Deste modo, o Conselho Científico Europeu de Parasitas de Animais de Companhia (ESCCAP, do inglês "European Scientific Counsel Companion Animal Parasites") elaborou um conjunto de diretrizes. Estas são destinadas aos médicos veterinários e aos tutores dos animais de companhia, enfatizando a importância que o controlo destes parasitas e o tratamento das parasitoses associadas têm na saúde pública e na prevenção de zoonoses (Pereira *et al.*, 2016).

Reino Animalia			
Filo Arthropoda			
Classe Arachnida		Classe Insecta	
Ordem Acarina		Ordem Diptera	
Família Ixodidae		Família Psychodidae	
Género Ixodes	Género Rhipicephalus	Género Phlebotomus	
<i>I. ricinus</i>	<i>R. sanguineus</i>	<i>P. perniciosus</i>	<i>P. ariasi</i>

Figura 9 – Classificação taxonómica dos vetores artrópodes (Adaptado de Taylor *et al.*, 2007).

1.2.1. Ixodídeos

Os ixodídeos, mais conhecidos por carraças, são invertebrados hematófagos. Aquando da sua alimentação as carraças podem transmitir aos seus hospedeiros vírus, bactérias e parasitas (Liu *et al.*, 2016). Registos fósseis mostram que estes antecederam os homínídeos existindo desde, pelo menos, a era do Cretáceo há 65-146 milhões de anos (Baneth, 2014).

Atualmente, existe uma elevada disseminação de agentes transmitidos por carraças, especificamente por *Ixodes ricinus* (*Borrelia burgdorferi* e *Anaplasma phagocytophilum*), *Dermacentor reticulatus* (*Babesia canis*) e *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (*Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii* e *Anaplasma platys*). É importante conhecer o ciclo de vida e a distribuição epidemiológica destes ectoparasitas, de modo a controlar o seu aparecimento e o impacto a nível da saúde pública humana e animal dos agentes por estes transmitidos. Este conhecimento irá, também, ajudar a produzir um diagnóstico mais rápido e eficaz, diminuindo a morbilidade e a mortalidade da doença (Estrada-Peña *et al.*, 2017; Starkey *et al.*, 2016).

A transmissão de doença pode ocorrer de forma transestadial, em que o agente infeccioso sobrevive dentro do hospedeiro artrópode entre as diferentes fases do seu ciclo de vida (Larva → Ninf → Adulto) ou transovárica, em que o agente é transmitido verticalmente da fêmea para o ovo e a larva (Almazán *et al.*, 2016; Pfäffle *et al.*, 2013).

O uso de acaricidas de longo espectro é o método de eleição para controlar as populações de carraças, embora o seu uso indevido e excessivo tenha levado ao aparecimento de espécies resistentes (Borges *et al.*, 2015). Estes têm um efeito repelente/irritante que inibe a infestação e a fixação das carraças no hospedeiro, antes destas poderem transmitir qualquer agente. Estas

moléculas atuam no vetor causando uma desordem neurohormonal que afeta a sua fixação e capacidade de alimentação (Fourie *et al.*, 2013).

1.2.1.1 *Ixodes ricinus*

Ixodes ricinus é a espécie de ixodídeo mais cosmopolita e presente em maior número na Europa, distribuindo-se por todo o continente (Figura 10) (Nunes *et al.*, 2015; Sainz *et al.*, 2015). Esta tem a capacidade de transmitir agentes infecciosos com importância na comunidade médica e veterinária como *B. burgdorferi* e *A. phagocytophilum* (Kiewra *et al.*, 2014). Em Portugal existem vários relatos de parasitismo em humanos por parte desta carraça (Carvalho *et al.*, 2008).

I. ricinus é o principal vetor da anaplasmoose granulocítica canina, podendo ser encontrada em locais com uma percentagem de humidade relativamente alta, como florestas e pastos (Sainz *et al.*, 2015). O seu alcance e tempo de atividade tem vindo a aumentar, talvez devido às alterações climáticas que se têm vindo a verificar (Dumont *et al.*, 2015).

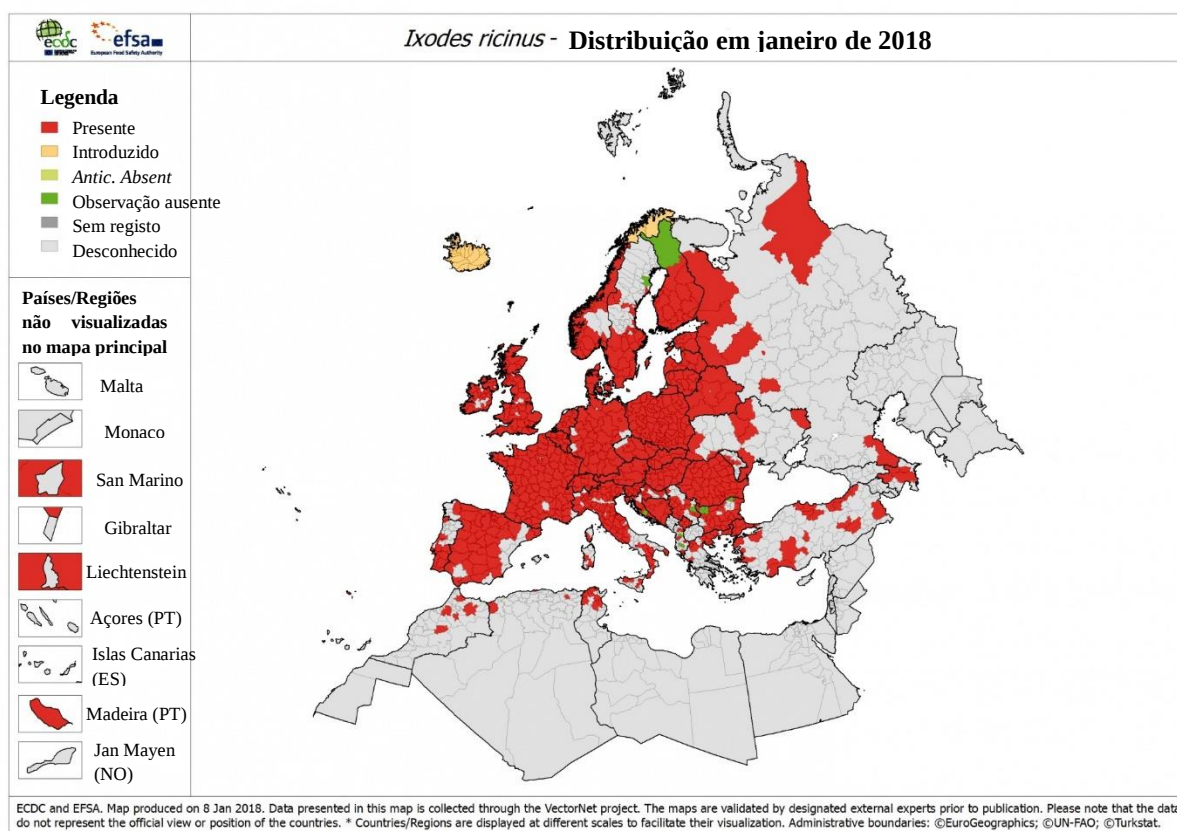


Figura 10 – Distribuição de *Ixodes ricinus* na Europa em janeiro de 2018 (Adaptado de “European centre for Disease Prevention and Control”, 2018).

Sendo sensível às condições climáticas, e como já referido anteriormente, requerendo uma humidade relativa de, pelo menos, 80% para sobreviver quando se encontra livre do hospedeiro, a sua área de implantação está circunscrita a locais de média a alta pluviosidade, com vegetação que retenha um alto nível de humidade. Condições como a existência deste tipo de vegetação e de hospedeiros para as diferentes fases do seu ciclo de vida e a competência para a alta dispersão, são essenciais para a sobrevivência de *Ixodes ricinus* (Gassner *et al.*, 2011; Milne, 1949).

Dada a sua natureza oportunista, é provável que, caso surja a ocasião, parasite o Homem. A abundância e a composição da fauna presente no seu meio envolvente, afeta o ciclo de vida da carraça podendo levar ao seu aumento ou diminuição (Parola & Raoult, 2001).

Cada fase do seu ciclo de vida é realizada em três hospedeiros diferentes. A larva coloca-se em locais altos enquanto espera pelo hospedeiro, agregando-se a este à sua passagem. Antes da mudança à fase seguinte de ninfa, liberta-se, repetindo este processo até à fase adulta em que as fêmeas, posteriormente à sua libertação, colocam os ovos. O seu alto nível de dispersão é provocado pelo transporte destas carraças por aves e mamíferos de grande porte (Medlock *et al.*, 2013).

A incidência de estações de Inverno mais amenas e estações de Verão mais quentes leva a que as carraças surjam mais precocemente, enquanto o excesso de calor e tempo seco provocam uma suspensão da sua atividade (Perret *et al.*, 2000). No final do Verão, após o período de infestação dos hospedeiros a quantidade de carraças livres diminui, aumentando apenas no Outono seguinte quando surgem as novas gerações (Randolph *et al.*, 2002).

Ainda não existem estudos sobre a capacidade deste ixodídeo transmitir os agentes infecciosos para a descendência (transmissão transovárica). Assim, o principal fator que permite a conservação de uma infeção ativa nos diversos focos enzoóticos é, a presença de hospedeiros vertebrados, durante o ciclo de vida da carraça (Víchová *et al.*, 2014).

O uso combinado de acaricidas como o fipronil e a permetrina (Frontline Tri-Act®) quando aplicados no cão, provou ser eficaz a repelir e eliminar esta carraça durante até quatro semanas (Dumont *et al.*, 2015). Nos últimos anos foi lançado um novo ectoparasiticida que tem como princípio ativo o Fluralaner (Bravecto®), com eficácia comprovada contra esta e outros géneros de carraça durante até 12 semanas (Wengenmayer *et al.*, 2014).

1.2.1.1 *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*

De acordo com Estrada-Peña *et al.* (2017) a carraça *Rhipicephalus sanguineus* s.l. é o principal vector de doença dentro do grupo dos ixodídeos, estando presente em mais de metade da população-alvo do seu estudo (53%). As áreas rurais são as mais afectadas existindo um pico de infestação entre os meses de Março a Julho. A infeção pelo agente ocorre após a carraça se alimentar de um hospedeiro que apresente infeção aguda ou crónica, podendo, em refeições subsequentes, infetar novos hospedeiros (Moraes-Filho *et al.*, 2015).

Além dos sinais clínicos resultantes da presença de um ou mais agentes infecciosos, a presença de infestação por este vetor, pode, ainda, resultar em anemia, eczema e paralisia flácida (Borges *et al.*, 2015).

Esta carraça sobrevive adaptando-se a canis, casas de habitação e climas quentes e frios (Parola *et al.*, 2009), sendo que as três fases do seu ciclo de vida ocorrem em três hospedeiros distintos, apesar de pertencerem todos à mesma espécie (Pat-Nah *et al.*, 2015). O ambiente *indoor* revelou ser propício à reprodução e sobrevivência deste ixodídeo dada a sua proximidade com fonte de alimentação permanente, temperatura e humidade ideais. Caso o cão não se encontre devidamente desparasitado externamente, o número de carraças pode atingir valores muito altos (Sainz *et al.*, 2015).

Embora tendo o cão como hospedeiro preferencial, este ixodídeo tem uma alta variedade de hospedeiros, incluindo outros mamíferos, aves, répteis e anfíbios.

Nesta espécie, os machos apresentam placas espiraculares estreitas e compridas, sendo que a largura da extremidade é metade da largura dos festões adjacentes. As fêmeas possuem um poro genital com o formato de U (Coimbra-Dores *et al.*, 2016).

Dada a sua capacidade de infetar tanto animais como humanos e o mercado de antiparasitários existente, *R. sanguineus* tem uma grande importância sanitária e económica, respetivamente (Cicuttin *et al.*, 2015).

Em relação à sua epidemiologia, esta espécie encontra-se dispersa pelos vários continentes, sendo uma das mais cosmopolitas de entre todas as espécies de ixodídeos (Borges *et al.*, 2015) (Figura 11). Recentemente, a sua distribuição tem vindo a modificar-se devido às alterações climáticas e ao uso dado aos terrenos, seja para os urbanizar ou, apenas, desflorestar. O comércio de animais entre países e continentes é outro fator para esta alteração epidemiológica (Dantas-Torres *et al.*, 2017).

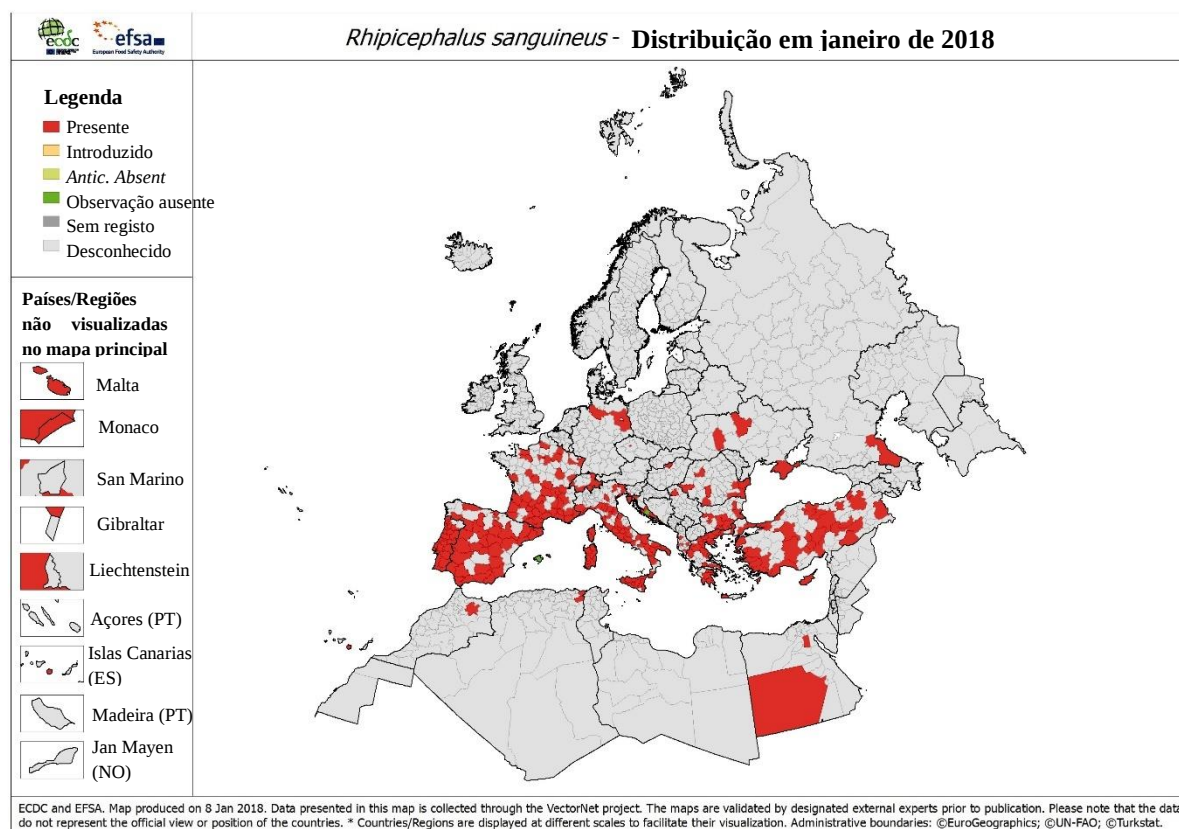


Figura 11 – Distribuição de *Rhipicephalus sanguineus* na Europa em janeiro de 2018 (Adaptado de “European centre for Disease Prevention and Control”, 2018).

O conjunto denominado de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. é composto por um variado número de espécies. Este número varia entre 11 (Gray *et al.*, 2013), 12 (Moraes-Filho *et al.*, 2015; Nava *et al.*, 2015) ou 17 (Dantas-Torres & Otranto, 2015) espécies, consoante o autor. Esta divergência entre autores deve-se ao desconhecimento da sua constituição morfológica, genética e, consequente, taxonomia (Borges *et al.*, 2015). Estudos recentes, baseados em análises moleculares, biológicas e morfológicas (Moraes-Filho *et al.*, 2015), sugerem que esta apresente duas linhagens diferentes: nortenha (temperada) e sulista (tropical), sendo que existe uma forte probabilidade de, em Portugal, apenas subsistir a linhagem temperada (Dantas-Torres *et al.*, 2017; Hekimoğlu *et al.*, 2016). De acordo com algumas informações genéticas iniciais, certos autores sugerem que a linhagem do sul representa a verdadeira espécie *R. sanguineus* sensu stricto (s.s.) (Dantas-Torres *et al.*, 2013).

Segundo Moraes-Filho *et al.* (2015) enquanto não existir um consenso sobre a designação desta espécie, o nome *Rhipicephalus sanguineus* s.s. deve ser substituído por grupo *R. sanguineus*. Enquanto isso, carraças identificadas como *R. sanguineus* podem, na verdade, estar a ser confundidas com outra espécie muito similar, *Rhipicephalus turanicus* (Latrofa *et*

al., 2014) que, apesar da semelhança, morfologicamente apresenta características comportamentais, ecológicas e vetoriais diferentes (Gray *et al.*, 2013).

Existe quem defenda a ideia de que a linhagem tropical é a única com a capacidade de se encontrar infetada com o agente da EMC ao contrário da linhagem temperada (Cicuttin *et al.*, 2015). Esta hipótese foi testada e, recorrendo a exames moleculares, foi detetado ADN de *E. canis* em cães provenientes de quase toda a região do Brasil (presença da espécie tropical), exceto no Rio Grande do Sul (presença da espécie temperada). Foram, também, realizados exames serológicos que revelaram uma seroprevalência de 30% a 75% nas zonas tropicais e de 5% na zona temperada do Rio Grande do Sul (Moraes-Filho *et al.*, 2015).

Segundo Borges *et al.* (2015), existem opiniões divergentes em relação à possibilidade de os cães desenvolverem resistência contra *R. sanguineus*. Autores como Bechara *et al.* (1994) e Ferreira e Bechara (1995) defendem que essa possibilidade não existe. Mais tarde, estudos conduzidos por Inokuma *et al.* (1997), Jittapalapong *et al.* (2000) e Louly *et al.* (2009) acreditam que a possibilidade existe, embora possa variar de acordo com a raça do animal.

1.2.2 Flebotomíneos

Os flebotomíneos são hematófagos (fêmeas) e os principais vetores de *Leishmania infantum* (Muñoz *et al.*, 2017). Em Portugal, predominam as espécies *Phlebotomus perniciosus* e *Phlebotomus ariasi* que dada a sua natureza zoofílica, têm o cão como principal hospedeiro. Quando comparada com a taxa de infeção em cães, Cortes e colaboradores (2007) observaram que, em Lisboa o número de flebotomíneos infetados é pequeno, mostrando a necessidade de estudos mais extensos sobre este vetor.

Os animais de rua são o alvo preferencial deste vetor devido à sua má condição física e vida ao ar livre (Cortes *et al.*, 2007). As fêmeas de flebótomo alimentam-se do sangue dos cães, nas zonas com pouco pêlo, como a cabeça, o focinho, as orelhas e as zonas inguinais e perianais (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

O primeiro registo de flebotomos em Portugal foi feito em 1913, pelo autor França (Afonso *et al.*, 2007). Dada a predileção por climas quentes, a sua distribuição geográfica inclui, principalmente, o sul da Europa, Ásia, África, Austrália e América do Sul, podendo ser encontrada em outros locais, em menor quantidade (Alten *et al.*, 2015) (Figura 12).

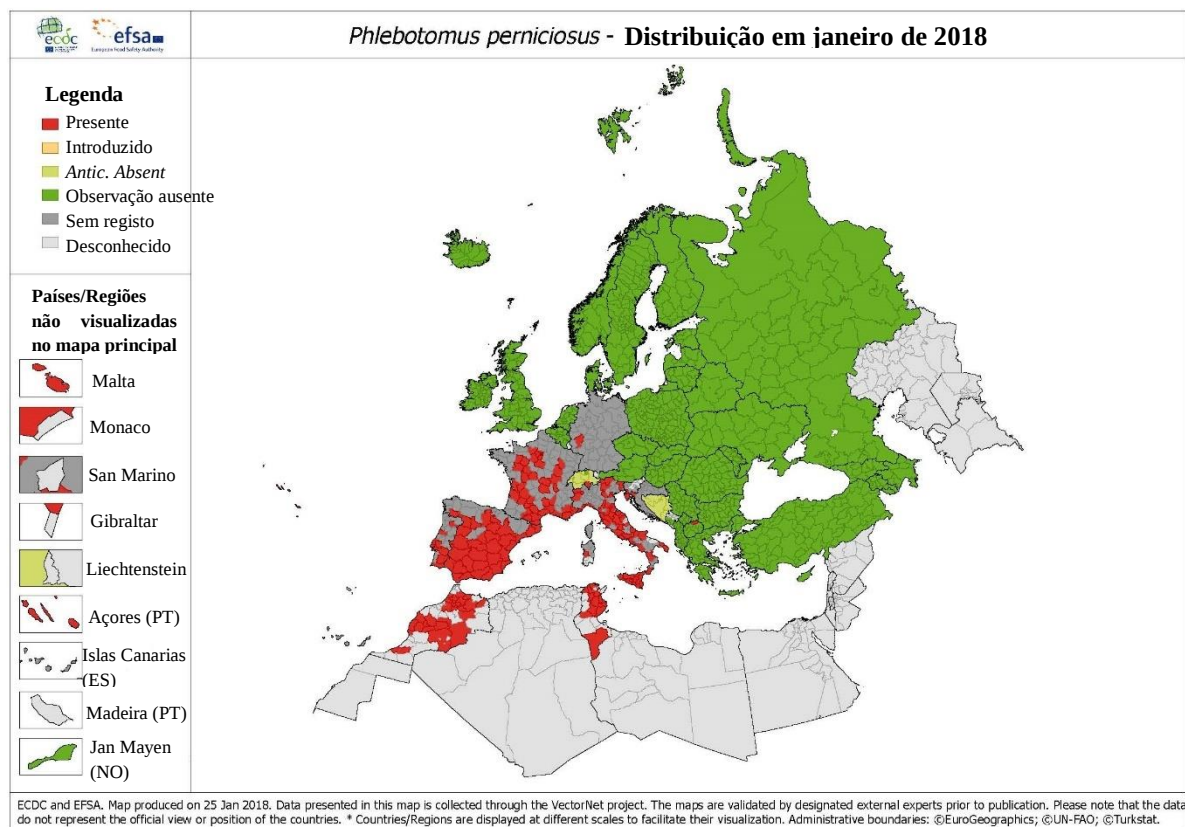


Figura 12 – Distribuição de *Phlebotomus perniciosus* na Europa em janeiro de 2018 (Adaptado de “European centre for Disease Prevention and Control”, 2018).

Na Bacia Mediterrânica o seu pico de atividade é entre o pôr e o nascer do sol, normalmente desde o início da Primavera até o final do Outono; na América do Sul é anual, sendo a temperatura ótima entre os 15°C e os 28,8°C, a humidade alta e ausência de vento e chuva as condições ideais. As distâncias percorridas por estes vetores podem atingir os 2,5 km, e devido ao seu fototropismo positivo, são atraídas para as casas familiares durante a noite (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Os flebótomos são essenciais na transmissão de leishmaniose pelo mundo inteiro, incluindo na Bacia Mediterrânica. Em Madrid foram encontrados lagomorfos, como coelhos e lebres, que apresentam elevada seroprevalência, a desempenhar o papel de reservatórios selvagens da doença, devido à sua capacidade de transmitirem o parasita às colónias de flebótomos da região. Tudo isto sugere dois ciclos de vida independentes, um centrado na infeção de animais selvagens e outro de animais domésticos. Estudos recentes referem algumas mudanças a nível da distribuição dos flebótomos, assim como a possibilidade do seu aparecimento em locais onde anteriormente não se encontravam (González *et al.*, 2017).

Estes vetores podem ser encontrados em caves, edifícios abandonados, lixeiras, paredes de pedra, cavernas e tocas de animais. De modo a estudar a sua distribuição é necessário apanhá-los e, para isso, recorre-se a armadilhas de luz ou de óleo de rícino. As primeiras são as mais eficazes e atraem espécies fototrópicas como o *P. perniciosus* e *P. ariasi*, apesar da amostra poder não ser representativa da população. A segunda é a mais usada prendendo-os em folhas de papel viscosas embebidas com o óleo. Estas técnicas são dependentes do estado meteorológico e da luminosidade do local (Muñoz *et al.*, 2017).

Dado o potencial zoonótico da leishmaniose é essencial apostar na prevenção e tratamento precoce desta doença. O uso de coleiras repelentes de insetos com deltametrina (Scalibor®), lactonas macrocíclicas (Advocate®) e permetrinas spot-on (Advantix®) são alguns dos métodos profiláticos atualmente disponíveis (Maia *et al.*, 2013, 2016; Noli & Auxilia, 2005).

1.3 Exames complementares de diagnóstico

Dada a crescente emergência das CVBD's, atualmente podem encontrar-se, na maior parte das clínicas e hospitais veterinários, diversos métodos relativamente simples e rápidos para as diagnosticar (Liu *et al.*, 2016).

O exame complementar escolhido deve ter em conta vários fatores como a epidemiologia do local onde o animal vive, se é um exame de diagnóstico ou de controlo da doença, a especificidade e sensibilidade de cada método, o seu custo e a facilidade ou não de executar cada um (Maia & Campino, 2008). O diagnóstico não deve ser feito tendo como base apenas os sinais clínicos pois estes podem ser influenciados pela presença de co-infecções, podendo mesmo diferir dependendo da localização geográfica (Cicuttin *et al.*, 2016).

O diagnóstico da doença pode ser realizado a partir da observação e avaliação dos sinais clínicos e identificação microscópica de agentes infecciosos observados em esfregaços sanguíneos. Porém, apenas, recorrendo ao uso de PCR se poderá confirmar a identidade do agente causador, pois morfológicamente visualizados ao microscópio são muito semelhantes. A serologia também é um método bastante utilizado embora não permita diferenciar uma infeção ativa de uma exposição prévia (Aktas *et al.*, 2015).

1.3.1 Hemograma com esfregaço sanguíneo

As patologias bacterianas podem ser diagnosticadas através da realização de hemogramas e esfregaços sanguíneos, de preferência de *buffy-coat* em detrimento de sangue

total. Nestes, caso o animal esteja infectado, poderão ser visíveis pequenas mórulas no citoplasma das células. Na maior parte dos casos, o hemograma deverá acusar trombocitopenia, anemia e leucopenia (Çetinkaya *et al.*, 2016).

Normalmente, um animal infectado com *A. phagocytophilum* pode apresentar anemia normocítica normocrômica não regenerativa, anemia regenerativa (raro), linfopenia, neutropenia, neutrofilia com desvio à esquerda e trombocitopenia (Sainz *et al.*, 2015). O esfregaço, por si só, é considerado insuficientemente nesta deteção devido à sua baixa sensibilidade (Silveira *et al.*, 2015). A identificação de mórulas presentes no citoplasma de neutrófilos (Figura 13) surge em 60% dos casos clínicos (Sainz *et al.*, 2015). O seu tamanho encontra-se entre 4 a 6 µm e podem ser observadas 4 a 18 dias após a infeção, permanecendo neste local durante 4 a 8 dias (Tsachev, 2011).

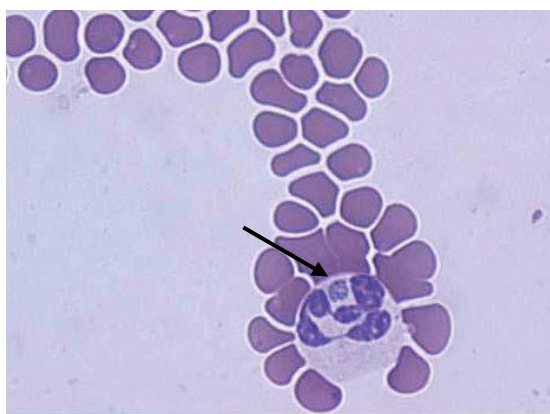


Figura 13 – Observação de uma mórula de *A. phagocytophilum* (seta) no citoplasma de um neutrófilo (Shaw *et al.*, 2001).

Numa infeção por *A. platys* é possível observar, ao hemograma, trombocitopenia cíclica, anemia normocítica não regenerativa e leucopenia ligeira. No esfregaço sanguíneo, de sangue total ou *buffy-coat*, podemos encontrar inclusões basófilas no interior das plaquetas, mas devido à ciclicidade deste agente, a tarefa da sua deteção torna-se mais árdua (Rufino *et al.*, 2013).

No caso de *E. canis* os achados laboratoriais podem envolver anemia normocítica normocrômica não regenerativa, neutropenia, neutrofilia, linfopenia, monocitose, trombocitopenia, pancitopenia e no esfregaço sanguíneo podem ser visíveis linfócitos granulares (Sainz *et al.*, 2015). O esfregaço sanguíneo tem uma baixa sensibilidade e especificidade pois as mórulas de *E. canis* podem ser confundidas com plaquetas sanguíneas, grânulos linfocíticos azurofílicos, corpos linfoglandulares ou material nuclear fagocitado (Cicuttin *et al.*, 2016). Normalmente, podem ser encontradas no citoplasma de monócitos e

macrófagos (Figura 14). A sua detecção ocorre em, apenas, 4% a 6% dos casos clínicos encontrados, podendo este valor ser aumentado, como já foi referido anteriormente, ao realizar esfregaços de *buffy-coat* (Sainz *et al.*, 2015).

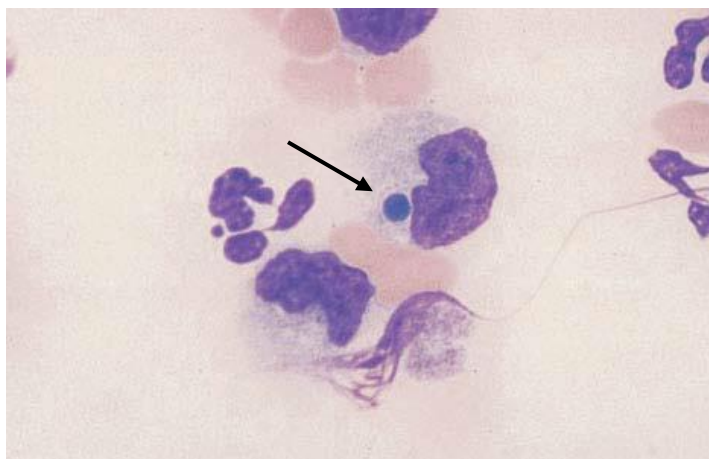


Figura 14 – Observação de uma mórula de *Ehrlichia canis* (seta) no citoplasma de um monócito (Shaw *et al.*, 2001).

Ao diagnosticar um animal suspeito de erlichiose e sem sinais de outras doenças, muitos membros da comunidade veterinária confiam nos resultados laboratoriais como a existência de trombocitopenia para chegar ao diagnóstico final e iniciar o tratamento. Alguns consideram trombocitopenia quando o número de plaquetas é inferior a $100 \times 10^9/L$ enquanto outros argumentam que deve ser inferior a $200 \times 10^9/L$. Considerando este último, como valor de referência, o número de animais infetados, será mais elevado (Santos *et al.*, 2009).

Na fase inicial de infeção por *R. conorii*, os resultados do hemograma podem ser algo inespecíficos. O achado mais comum é a trombocitopenia, sendo que, numa fase aguda, pode apresentar leucopenia seguida de leucocitose e leucograma de *stress* moderados. Caso o animal ostente uma necrose tecidual grave, pode ser observado um desvio à esquerda e neutrófilos tóxicos (Shaw *et al.*, 2001).

A observação de *L. infantum* na sua forma de amastigota, pode ser feita através da realização de esfregaços com aspirados de medula óssea, gânglio linfático ou sangue infetados. Após a coloração destes com o corante Giemsa é possível observar, microscopicamente, as amastigotas livres ou no interior do citoplasma de monócitos, macrófagos e neutrófilos. Estas apresentam um corpo oval ou redondo com aproximadamente 2 a 4 μm de diâmetro, com o citoplasma azul, o núcleo de grandes dimensões corado de violeta e da mesma cor uma pequena haste denominada cinetoplasto. Ao usar um aspirado de medula óssea (Figura 15) a

probabilidade de observar estas formas é maior, em relação ao aspirado de gânglio linfático. A observação de *buffy-coat* é preferível ao sangue total, pois este apresenta uma maior percentagem de células nucleadas por campo visual (Maia & Campino, 2008).

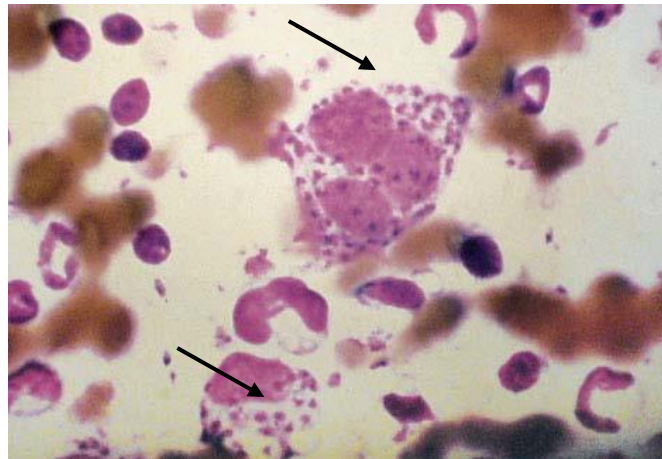


Figura 15 – Observação de amastigotas intracelulares de *Leishmania* spp. (setas) num aspirado de medula óssea (Shaw *et al.*, 2001).

O hemograma de um animal com leishmaniose pode apresentar trombocitopenia e anemia não regenerativa (Noli & Auxilia, 2005).

1.3.2 Diagnóstico Molecular

O diagnóstico molecular tem como base a amplificação de pequenas quantidades de ADN do agente infeccioso ou parasita (Nelson & Couto, 2010). A PCR é um método mais sensível e específico para o diagnóstico de uma infeção aguda (Çetinkaya *et al.*, 2016). A subsequente sequenciação do ADN identifica e diferencia entre as várias espécies de cada agente transmissor de doença (Cardoso *et al.*, 2010). A PCR em tempo real possibilita quantificar a carga bacteriana presente no animal a dado momento (Sainz *et al.*, 2015).

A amplificação da sequência certa depende do desenho cuidadoso dos *primers* específicos do gene em causa. A amplificação de fragmentos pequenos é mais eficiente do que de fragmentos maiores (Wang *et al.*, 2012).

O sucesso da amplificação por PCR depende de vários fatores como o protocolo a ser aplicado, os *primers* usados, as condições da reação, o método pelo qual foi extraído o ADN da amostra e a integridade do material biológico a ser testado (Maia & Campino, 2008).

Podem ocorrer resultados falso positivos devido a uma deficiente higienização dos laboratórios com consequente contaminação das amostras por ADN exógeno. Alguns fatores

como a presença de inibidores de PCR presentes na amostra (Maggi *et al.*, 2014), a bacteremia intermitente ou abaixo do nível de detecção da reação e a administração de antibioterapia pode causar a ocorrência de resultados falso negativos (Sainz *et al.*, 2015).

A PCR é um método específico, simples, direto (Wang *et al.*, 2012) embora deva ser realizada por técnicos devidamente qualificados e em laboratórios com material especializado (Waner *et al.*, 2014). A existência de co-infecções pode, também, limitar o resultado da PCR ao detetar apenas o agente que se encontre em maior concentração (Maggi *et al.*, 2014).

A nPCR é uma modificação da PCR convencional e tem como principal objetivo a redução da amplificação inespecífica (Li *et al.*, 2012). Nesta ocorre a amplificação de ADN em duas fases diferentes, usando dois conjuntos de *primers* distintos, sendo que o segundo par de *primers* é interno ao primeiro. O produto resultante da primeira parte é utilizado como ADN alvo e amplificado na segunda parte, com o segundo par de *primers*. Assim, este método é mais sensível e específico em relação à PCR convencional (Lilenbaum *et al.*, 2012).

A sequenciação, subsequente à PCR, é útil na correta interpretação dos resultados, permitindo a detecção de resultados falso positivos e confirmando a espécie do agente infeccioso (Harrus & Waner, 2011).

1.3.2.1 Anaplasmosse

Esta bactéria é detetável por PCR, na circulação sanguínea, durante mais tempo do que por microscopia. As amostras utilizadas para este teste podem ser, além do sangue, líquido sinovial e cefalorraquidiano (Shaw *et al.*, 2001).

1.3.2.2 Erlichiose

Apesar de a PCR ser um método mais sensível e específico do que a observação de esfregaços sanguíneos para o diagnóstico de *E. canis*, este deve ser complementado com a serologia. Dado que a PCR mostra se existe infeção e a serologia confirma a exposição ao agente é, assim, possível fazer a distinção entre animais com uma infeção aguda (PCR e serologia positiva) ou crónica (PCR negativo e serologia positiva) (Cicuttin *et al.*, 2016).

A nPCR provou ser um método mais eficaz e sensível do que a reação simples para a detecção de *E. canis* (Pat-Nah *et al.*, 2015).

É possível obter um resultado de PCR positivo para *E. canis* em, apenas, quatro a dez dias após o início da infeção. A maior parte dos testes de nPCR têm como alvo o gene *16S rARN* ou o *p30*. Ao amplificar o gene *p30* aumenta-se a sensibilidade do teste pois *E. canis*

apenas apresenta uma cópia do *16S rARN* enquanto que do *p30* apresenta várias, aumentando a probabilidade da sua deteção. A utilização de amostras de baço para este teste revelou ter uma maior sensibilidade, quando comparado com amostras de sangue ou medula óssea (Harrus & Waner, 2011).

1.3.2.3 Rickettsiose

Dado que durante a fase aguda da doença, as rickettsias circulam em baixo número no sangue, a PCR é útil para ajudar ao diagnóstico previamente à seroconversão ajudando na diferenciação entre exposição e infeção ativa. Em cães existem poucos estudos que avaliem a especificidade e a sensibilidade deste teste. O gene-alvo amplificado é a proteína A da membrana externa (*ompA*, do inglês “outer membrane protein A”) devido à possibilidade de permitir distinguir entre as diferentes espécies de *Rickettsia* (Kidd *et al.*, 2008).

1.3.2.4 Leishmaniose

A PCR é um método de diagnóstico relativamente rápido, sendo que, no caso de *Leishmania infantum* os materiais biológicos que podem ser utilizados são um aspirado do gânglio linfático poplíteo, e caso este não esteja disponível, uma amostra de medula óssea, sangue total ou *buffy-coat*, uma amostra de pele ou uma zaragatoa conjuntival (Maia & Campino, 2008; Maia *et al.*, 2009).

Existem algumas informações divergentes em relação ao uso de sangue total ou mesmo de *buffy-coat*. Deste modo, na procura de um método não invasivo mais sensível, a zaragatoa conjuntival apresentou uma sensibilidade de 92% e especificidade de 100% (Strauss-Ayali *et al.*, 2014).

A PCR é usada, não só para diagnosticar a presença do parasita em patologias agudas, como também para monitorizar a sua presença após o início da terapêutica. Dada a pequena quantidade de amostra biológica necessária para se proceder à PCR, um resultado negativo não é suficiente para descartar a presença do agente. O mesmo pode ser dito em relação ao sangue total e *buffy-coat*, pois ainda não é conhecida a duração, consistência e intensidade da parasitemia (Maia & Campino, 2008).

1.3.3. Serologia

A serologia estuda, *in vitro*, as interações entre os antígenos e os anticorpos (Day, 2015). Ao avaliar os níveis de anticorpos, num dado momento, tem a vantagem de detetar

infecções crônicas em que o agente ou se encontra abaixo do limiar de detecção por PCR, ou está isolado em tecidos que, normalmente, não são recolhidos (Maggi *et al.*, 2014). Contudo, a falta de padronização entre os diferentes laboratórios de análises veterinárias, limita a comparação dos resultados obtidos. O período de incubação e o fato de alguns animais poderem estar na fase aguda da infecção, pode levar à ocorrência de resultados falso negativos (Sainz *et al.*, 2015).

Os testes serológicos, como a IFI e o ELISA, dependem de uma resposta imunitária apropriada da parte do hospedeiro contra os diferentes agentes patogênicos e carecem na competência de distinguir se os anticorpos detetados são o resultado de uma infecção presente ou passada (Maggi *et al.*, 2014).

1.3.3.1. Ensaio de imunoabsorção enzimática

Atualmente, o ELISA é um dos testes mais específicos e sensíveis disponíveis. Tem a capacidade de detetar uma determinada substância, seja anticorpo ou antígeno (O'Connor, 2015) e fornece dados semiquantitativos, por exemplo, dos anticorpos IgG para anti-*Anaplasma phagocytophilum*, no soro ou plasma sanguíneo. A sua sensibilidade na detecção deste agente encontra-se nos 97% sendo específico em 96% dos casos (Carrade *et al.*, 2009; Tsachev, 2009).

Neste teste utilizam-se microplacas, constituídas por um número variável de poços, a cujo fundo foi adsorvido um antígeno para o qual é feita a pesquisa de anticorpos da amostra em estudo (Day, 2015). Também é possível pesquisar antígeno nas amostras sendo que, neste caso, são adsorvidos anticorpos no fundo dos poços. Deste modo, o ELISA tem, como principal vantagem a possibilidade de testar um elevado número de amostras ao mesmo tempo (Maia & Campino, 2008). O protocolo experimental, no caso da pesquisa de anticorpos, compreende a ligação destes últimos, quando presentes na amostra, ao antígeno presente no poço, a junção de um anticorpo conjugado com uma enzima e a adição do respetivo substrato. Caso haja presença de anticorpos no soro ou plasma, vai acontecer uma reação colorimétrica, sendo os resultados determinados através da leitura da absorvância em cada poço, num espectrofotómetro (Callahan & Yates, 2014; Day, 2015; O'Connor, 2015).

1.3.3.2. Imunofluorescência Indireta

A IFI consiste na detecção de anticorpos, no soro ou plasma, cuja visualização, num microscópio de fluorescência, ocorre após a ligação de um segundo anticorpo conjugado com um fluorocromo (Janeway *et al.*, 2001).

Oito dias após a primeira exposição a *A. phagocytophilum* ou dois a cinco dias após o aparecimento de mórulas no citoplasma das células granulares é possível detetar, por IFI, anticorpos IgG no soro ou plasma (Kohn *et al.*, 2011).

Este teste é considerado como referência para a deteção de anticorpos IgG anti-*E. canis*. Os resultados são considerados positivos com titulações de IgG superiores a 1:40 (*cut-off*). Em caso de infeção aguda, a IFI deve ser repetida num intervalo de sete a 14 dias, sendo que um aumento de quatro vezes nos títulos de anticorpos é indicativo de uma infeção ativa (Harrus & Waner, 2011). Tem como desvantagens o fato de poder apresentar uma reatividade cruzada entre as várias espécies de *Ehrlichia* spp. e o género *Anaplasma* (Cicuttin *et al.*, 2016).

No caso da pesquisa de anticorpos de *Rickettsia conorii*, podem ocorrer reações cruzadas entre esta e as várias espécies do género *Rickettsia*, o que pode conduzir a resultados sobrevalorizados, aquando do estudo de apenas uma espécie em concreto (Parola *et al.*, 2005).

Dado que a maior parte dos cães com leishmaniose apresenta uma resposta imunitária humoral específica, os testes serológicos são a escolha de eleição para o seu diagnóstico (Shaw *et al.*, 2001).

A presente dissertação teve como objetivo avaliar a taxa de infeção por agentes transmitidos por vetores num canil no concelho de Moura, região do Alentejo. Recorreu-se a técnicas hematológicas (hemograma e esfregaço sanguíneo), moleculares (PCR) e serológicas (ELISA e IFI) para pesquisar o contacto ou presença de *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii* e *Leishmania infantum* nos cães que habitam o canil. Durante o Verão, o concelho de Moura exhibe temperaturas altas com humidade relativamente baixa, sendo uma zona endémica para os agentes acima referidos.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 População estudada

A amostra estudada compreendeu 31 cães sem raça definida (SRD) pertencentes à Associação SOS dos Animais de Moura, tendo a recolha de sangue decorrido no dia 12 de janeiro de 2017. Estes apenas se encontravam desparasitados internamente sendo que a desparasitação externa é efetuada, somente, no Verão. Dos animais em estudo, já tinha sido realizado o diagnóstico de leishmaniose a três.

A cada animal foi atribuído um número de identificação e todos os tubos foram identificados com o respetivo número. Foi, também, preenchida uma ficha com alguns dados epidemiológicos dos animais envolvidos no estudo (Figura 37 no Apêndice I).

As amostras de sangue foram recolhidas da veia jugular ou da veia cefálica, para tubos com EDTA e acondicionadas num saco térmico durante o transporte até ao LACH. Após a chegada ao laboratório, foram armazenadas no frigorífico à temperatura de 4°C, até à realização do hemograma e esfregaços, o que aconteceu no dia seguinte. Os animais com os números quatro, cinco e 30 foram excluídos, devido à formação de coágulos sanguíneos no tubo de EDTA.

Depois de realizados, para cada amostra, o hemograma e esfregaço de sangue total e *buffy-coat*, foi feita a separação dos vários componentes do sangue (plasma e *buffy-coat*), para microtubos de 1,5ml, que foram congelados a -20°C. O plasma foi usado para os testes serológicos e o *buffy-coat* para os testes moleculares. A camada eritroide foi descartada.

2.2 Extração de ADN

A extração de ADN foi realizada com recurso ao kit “ISOLATE II Genomic DNA”, (Bioline®), de acordo com as instruções do fabricante, a seguir descritas.

Num microtubo de 1,5ml, juntaram-se 200 µl de *buffy-coat*, 25 µl de Proteinase K e 200 µl de Buffer G3. Agitou-se no vórtex para homogeneizar e incubou-se a mistura a 70°C, durante 10 a 15 minutos. Fez-se um *short spin* e adicionaram-se 210 µl de etanol a 96%. Agitou-se no vórtex, durante alguns segundos, realizando, de seguida, um *short spin*. Colocou-se uma coluna dentro de um tubo coletor de 2 ml, adicionou-se toda a amostra preparada anteriormente e centrifugou-se a $11.000 \times g$, durante 1 minuto. Rejeitou-se o líquido do tubo coletor e, após colocar a coluna, de novo, no tubo, adicionaram-se 500 µl de Buffer GW1. Centrifugou-se a $11.000 \times g$, durante 1 minuto. Rejeitou-se o líquido do tubo coletor e, reutilizando-o, adicionaram-se à coluna 600 µl de Buffer GW2. Centrifugou-se a $11.000 \times g$ durante 1 minuto.

Rejeitou-se o líquido do tubo coletor, colocou-se a coluna, de novo, no tubo e centrifugou-se a $11.000 \times g$ durante 1 minuto, de modo a remover qualquer resíduo de reagentes. Colocou-se a coluna num novo microtubo de 1,5 ml e adicionaram-se 100 µl de água desionizada estéril diretamente no centro da membrana da coluna, tendo o cuidado de não a danificar. Incubou-se à temperatura ambiente durante 1 minuto e centrifugou-se a $11.000 \times g$, durante 1 minuto. Rejeitou-se a coluna e o ADN contido no tubo foi armazenado a -20°C .

2.3 Avaliação da integridade física do ADN genómico

A avaliação da integridade física do ADN genómico (gADN) isolado foi feita por eletroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v) em tampão Tris-Borato (90 mM) – EDTA (2mM), pH 8,3 (TBE 1×), num sistema Enduro Horizontal Gel Box-Electrophoresis, (Labnet®) de acordo com o procedimento a seguir descrito.

Numa balança técnica EK-600H (AND®), pesou-se, num erlenmeyer, a massa de agarose SeaKem® LE Agarose, (Lonza®) necessária. De seguida, adicionou-se o tampão TBE 1×. Levou-se a mistura ao micro-ondas (600 watts) até esta ficar translúcida, homogeneizando conforme necessário. Deixou-se arrefecer ligeiramente e adicionou-se GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium®) (0,42 µl/100 ml gel). Colocou-se o gel de agarose ainda em estado líquido, num suporte de eletroforese e aguardou-se a sua polimerização. Prepararam-se as amostras para aplicar no gel adicionando 1,5 µl de *loading buffer* 10× [6ml glicerol + 6ml água + 0,25% (m/v) de azul bromofenol] a 8µl de gADN. Após homogeneização, aplicaram-se as amostras nos poços do gel de agarose já solidificado e ligou-se a fonte de alimentação (Pharmacia LKB-GPS 200/400). A eletroforese foi realizada a 100-120 V durante, aproximadamente, 60 minutos. A visualização do ADN foi feita num transiluminador de luz ultravioleta (UV) Alfa Gene, por emissão de fluorescência do GelRed.

2.4 Reação em cadeia da polimerase

Antes de cada análise de PCR procedeu-se à higienização das bancadas e do material utilizado como a minicentrífuga, pipetas, pontas, microtubos e suportes, com lixívia a 10%. De seguida, todos eles foram expostos à luz UV numa câmara de fluxo laminar Bio48M, (Faster®), durante aproximadamente 20 minutos, para descontaminar eventuais aerossóis de ADN exógeno.

2.4.1 Amplificação de um fragmento do gene da β -actina canina

Começou-se por avaliar a ausência de inibidores de ADN nas amostras, amplificando um fragmento do gene da β -actina canina. Preparou-se a mistura reacional para a reação de PCR convencional num volume final de 25 μ l. A mesma era composta por uma concentração final de 1 $\times$ MyTaq Reaction Buffer (Bioline[®]), uma solução tampão que contém 1mM da mistura de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTP`s) e 3 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), por 1 U de My Taq DNA Polimerase (Bioline[®]), 10 pmol de cada *primer forward* e *reverse*, 100 ng de gADN e água desionizada estéril até perfazer o volume final. Para cada uma das reações de PCR realizadas para amplificação do gene da β -actina foram preparados e incluídos um controlo positivo e um negativo. Os *primers* utilizados e a sua sequência, estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Sequência de *primers* utilizados na amplificação de um fragmento do gene β -actina (Maia *et al.*, 2010).

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

A reação de PCR foi realizada num termociclador Rotor Gene-Q series, (QIAGEN[®]), de acordo com as condições apresentadas na tabela 2.

Tabela 2 – Condições da reação de PCR para amplificação de um fragmento o gene da β -actina.

	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	7 minutos	1 Ciclo
Desnaturação	94°C	30 segundos	30 Ciclos
Ligação dos <i>primers</i> /Anealing	66°C	30 segundos	
Extensão	72°C	30 segundos	
Extensão final	72°C	7 minutos	1 Ciclo

A visualização dos produtos de PCR foi feita submetendo 10 μ l dos mesmos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v), de acordo com o procedimento descrito em 2.3.

2.4.2 Amplificação de ADN de *Leishmania* spp.

Para a identificação de ADN de *Leishmania* spp. foi amplificado um fragmento de 447 pares de bases (pb) do gene minicírculo do cinetoplasto. A amplificação foi efetuada por PCR convencional com 25 µl de mistura reacional. Esta continha 1× MyTaq Reaction Buffer (Bioline®), 1 U MyTaqTMDNA Polymerase (Bioline®), 10 pmol de cada *primer* e 10 µl de ADN de cada amostra. O MyTaq Reaction Buffer é a solução tampão que contém 1mM de mistura de dNTP`s e 3 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂). Para cada uma das reações de PCR realizadas foram preparados e incluídos um controlo positivo e um negativo. Os *primers* utilizados e a sua sequência, estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 – Sequência de *primers* utilizados na amplificação de um fragmento do gene do minicírculo do cinetoplasto (Cortes *et al.*, 2004).

<i>Primers</i>	Sequência (5' → 3')
MC1	GTT AGC CGA TGG TGG TCT TG
MC2	CAC CCA TTT TTC CGA TTT TG

A reação de PCR foi realizada num termociclador Rotor Gene-Q series, (QIAGEN®), de acordo com as condições apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 – Condições da reação de PCR para amplificação de um fragmento o gene do minicírculo do cinetoplasto para *Leishmania* spp.

	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5 minutos	1 Ciclo
Desnaturação	95°C	30 segundos	30 Ciclos
Ligação dos <i>primers</i> /Anealing	56°C	30 segundos	
Extensão	72°C	30 segundos	
Extensão final	72°C	7 minutos	1 Ciclo
	25°C	5 minutos	1 Ciclo

A visualização dos produtos de PCR foi feita submetendo 10 µl das mesmas a eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v), de acordo com o procedimento descrito em 2.3.

2.4.3 Amplificação de ADN de *Anaplasma* spp./*Ehrlichia* spp.

Para a detecção de organismos dos géneros *Anaplasma* e *Ehrlichia*, foi realizada uma PCR convencional que teve como alvo uma região de 300 pb do gene *16S rARN*. A mistura reacional foi feita num volume de 25µl com a seguinte constituição: 1× MyTaq Reaction Buffer (Bioline®), 12 pmol de cada *primer forward* e *reverse*, 1 U de My Taq DNA Polimerase (Bioline®) e água desionizada estéril até perfazer o volume final. Para cada uma das reações de PCR realizadas foram preparados e incluídos um controlo positivo e um negativo. Os *primers* utilizados e a sua sequência, estão descritos na tabela 5.

Tabela 5 – Sequência de *primers* utilizados na amplificação do gene *16S rARN* (Maggi *et al.*,2006).

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

A reação de PCR foi realizada num termociclador Rotor Gene-Q series, (QIAGEN®), de acordo com as condições apresentadas na tabela 6.

Tabela 6 – Condições da reação de PCR para amplificação de um fragmento do gene *16S rARN* de *Anaplasma* spp./*Ehrlichia* spp.

	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	10 minutos	1 Ciclo
Desnaturação	94°C	15 segundos	55 Ciclos
Ligação dos <i>primers</i> /Anealing	60°C	15 segundos	
Extensão	72°C	15 segundos	
Extensão final	72°C	1 minuto	1 Ciclo
	25°C	5 minutos	1 Ciclo

A visualização dos produtos de PCR foi feita submetendo 10 µl das mesmas a eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v), de acordo com o procedimento descrito em 2.3.

2.4.4 Amplificação de ADN de *Ehrlichia* spp.

Para amplificação de ADN de organismos do género *Ehrlichia*, foi realizada uma reação de nPCR, dirigida para um fragmento, com 300 a 400 pb, do gene *16S rARN*. A mistura

reacional foi feita num volume final de 25µl constituída por 1× MyTaq Reaction Buffer (Bioline®), 20 µmol de cada *primer forward* e *reverse*, que diferiam da 1ª para a 2ª parte, 1 U de MyTaq DNA Polimerase (Bioline®), 10 µl de ADN e água desionizada estéril até perfazer o volume final. Para cada uma das reações de PCR realizadas, foram preparados e incluídos um controlo positivo e dois negativos, um da 1ª parte e outro da 2ª, ambos com 10 µl de água destilada em detrimento do ADN. Os *primers* utilizados e a sua sequência, estão descritos na tabela 7.

Tabela 7 – Sequência de *primers* utilizados na amplificação de um fragmento do gene *16S rARN* de *Ehrlichia* spp. (Dawson *et al.*, 1996).

	Primers	Sequência (5' → 3')
Parte I	ECC Fw	AGA ACG AAC GCT GGC GGC AAG C
	ECB Rev	CGT ATT ACC GCG GCT GCT GGC A
Parte II	HE3 Fw	TAT AGG TAC CGT CAT TAT CTT CCC TAT
	ECAN5 Rev	CAA TTA TTT ATA GCC TCT GGC TAT AGG A

A reação de PCR foi realizada num termociclador Rotor Gene-Q series, (QIAGEN®), de acordo com as condições apresentadas na tabela 8.

Tabela 8 – Condições da reação de nPCR para amplificação de um fragmento do gene *16S rARN* de *Ehrlichia* spp.

	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
1ª Parte			
Desnaturação inicial	94°C	3 minutos	1 Ciclo
Desnaturação	94°C	1 minuto	40 Ciclos
Ligação dos <i>primers</i> /Anealing	45°C	2 minutos	
Extensão	72°C	30 segundos	
Extensão final	72°C	5 minutos	1 Ciclo
	25°C	5 minutos	1 Ciclo
2ª Parte			
Desnaturação inicial	94°C	3 minutos	1 Ciclo
Desnaturação	94°C	1 minuto	40 Ciclos
Ligação dos <i>primers</i> /Anealing	55°C	2 minutos	

Extensão	72°C	15 segundos	
Extensão final	72°C	5 minutos	1 Ciclo
	25°C	5 minutos	1 Ciclo

A visualização dos produtos de PCR foi feita submetendo 10 µl das mesmas a eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v), de acordo com o procedimento descrito em 2.3.

2.4.5 Amplificação de ADN de *Rickettsia* spp.

Para amplificação de ADN de organismos do género *Rickettsia*, foi realizada uma reação de nPCR, dirigida para um fragmento, com 532 pb, do gene que codifica o antígeno 190-kDa. A mistura reacional foi feita num volume final de 25µl constituída por 1× MyTaq Reaction Buffer (Bioline®), 20 µmol de cada *primer*, *forward* e *reverse*, que diferiam da 1ª para a 2ª parte, 1 U de MyTaq DNA Polimerase (Bioline®), 10 µl de ADN na 1ª parte e 10 µl do produto de PCR da 1ª parte na 2ª parte e água desionizada estéril até perfazer o volume final. Para cada uma das reações de PCR realizadas, foram preparados e incluídos um controlo positivo e dois negativos, um da 1ª parte e outro da 2ª, ambos com 10 µl de água destilada em detrimento do ADN. Os *primers* utilizados e a sua sequência, estão descritos na tabela 9.

Tabela 9 – Sequência de *primers* utilizados na amplificação do gene que codifica o antígeno 190-kDa de *Rickettsia* spp. (Regnery, *et al.*, 1991; Sousa, *et al.*, 2005).

	<i>Primers</i>	Sequência (5' → 3')
1ª Parte	Fw Rr19O.70p	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA
	Rev Rr19O.602n	AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT
2ª Parte	ompA FW1	CGCAGCGATAATGCTGAGTA
	ompA RV2	CACCAAAACCATGATTTGCAG

A reação de PCR foi realizada num termociclador Rotor Gene-Q series, (QIAGEN®), de acordo com as condições apresentadas na tabela 10.

Tabela 10 – Condições da reação de nPCR para amplificação de um fragmento do gene que codifica o antígeno 190-kDa de *Rickettsia* spp.

	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
1ª Parte			
Desnaturação inicial	95°C	3 minutos	1 Ciclo
Desnaturação	94°C	30 segundos	35 Ciclos
Ligação dos primers/Anealing	54°C	30 segundos	
Extensão	72°C	90 segundos	
Extensão final	25°C	2 minutos	1 Ciclo
2ª Parte			
Desnaturação inicial	95°C	3 minutos	1 Ciclo
Desnaturação	94°C	30 segundos	35 Ciclos
Ligação dos primers/Anealing	56°C	30 segundos	
Extensão	72°C	90 segundos	
Extensão final	25°C	2 minutos	1 Ciclo

A visualização dos produtos de PCR foi feita submetendo 10 µl das mesmas a eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v), de acordo com o procedimento descrito em 2.3.

2.5 Purificação e sequenciação dos produtos de PCR

Os fragmentos amplificados por PCR foram purificados e, posteriormente, submetidos a reação de sequenciação para identificação/confirmação do agente infeccioso. A purificação foi realizada com o kit comercial “Jetquick PCR Product Purification Spin Kit” (Genomed®), de acordo com as instruções do fabricante, a seguir descritas.

1. Preparou-se uma mistura com 100 µl de solução H1 e 25 µl do produto de PCR;
2. Colocou-se uns segundos no vórtex para homogeneizar e fez-se *short spin*;
3. Colocou-se uma coluna dentro de um tubo coletor de 2 ml e adicionou-se toda a amostra preparada anteriormente;
4. Centrifugou-se a $12.000 \times g$, durante 1 minuto, rejeitou-se o filtrado no tubo coletor e reutilizou-se o tubo;
5. Adicionaram-se 125 µl de solução H2 e centrifugou-se a $12.000 \times g$, durante 1 minuto;

6. Rejeitou-se, novamente, o filtrado do tubo coletor, reutilizou-se o mesmo e procedeu-se a uma centrifugação à velocidade máxima, durante 1 minuto, para remoção de etanol residual;
7. Colocou-se a coluna num microtubo de 1,5ml e adicionaram-se 30µl de água estéril diretamente no centro da membrana da coluna, tendo o cuidado de não a danificar;
8. Centrifugou-se a $12.000 \times g$, durante 2 minutos, rejeitou-se a coluna e guardou-se o produto de PCR purificado à temperatura de 4°C.

Os produtos de PCR assim purificados foram enviados para a empresa STABVida, onde foram submetidos a reação de sequenciação pelo método de Sanger. As sequências de ADN foram determinadas em ambos os sentidos, tendo sido obtida uma sequência consenso, por comparação das sequências direta e reversa.

As sequências nucleotídicas consenso foram, depois, analisadas através do programa “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) (disponível em https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch).

2.6 Pesquisa de anticorpos por Imunofluorescência Indireta

A deteção de anticorpos IgG anti-*Ehrlichia canis*, anti-*Leishmania infantum* e anti-*Rickettsia conorii*, foi realizada com recurso aos kits comerciais “MegaFLUO® EHRlichia canis” (Megacor), “MegaFLUO® RICKETTSIA conorii” (Megacor) e “MegaFLUO® LEISHMANIA infantum” (Megacor), respetivamente. Para cada agente, foram realizadas diluições do plasma em tampão fosfato salino (PBS, do inglês “*Phosphate-Buffered Saline*”) de acordo com a tabela 11.

Tabela 11 – Diluição do plasma para pesquisa de IgG por IFI.

	<i>Ehrlichia canis</i>	<i>Leishmania infantum</i>	<i>Rickettsia conorii</i>
1ª Diluição	1:40	1:80	1:64
2ª Diluição	1:80	1:160	1:128

O procedimento experimental que se seguiu foi igual para todos os agentes.

1. Colocou-se uma gota de controlo positivo e outra de controlo negativo nos dois primeiros poços da lâmina;

2. Colocaram-se 20 µl da 2ª diluição nos cinco poços inferiores e 20 µl da 1ª diluição nos cinco poços superiores;
3. Incubou-se a lâmina, em câmara húmida, a 37°C, durante 30 minutos;
4. Lavou-se a lâmina com PBS 1×, e adicionou-se uma gota de conjugado em cada poço;
5. Incubou-se, em câmara húmida, a 37°C, durante 30 minutos;
6. Lavou-se a lâmina com PBS 1×, colocou-se o meio de montagem e, por cima, uma lamela de 5cm, tendo o cuidado de retirar as bolhas e absorver com papel o meio em excesso;
7. Observou-se num microscópio de fluorescência Olympus BX51, com uma ampliação de 400×.

O resultado foi considerado positivo quando era observada uma fluorescência de intensidade igual ou superior à do controlo positivo (Figuras 16, 17 e 18). Para cada um dos agentes em estudo, o *cut-off* correspondeu ao valor da 1ª diluição da amostra.

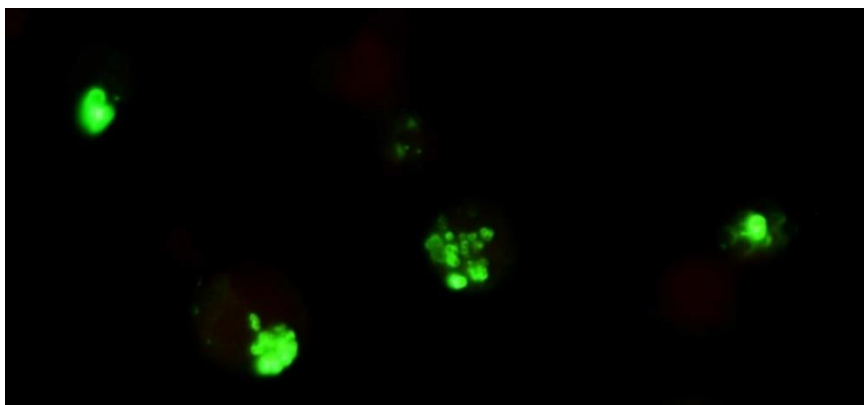


Figura 16 – Resultado do controlo positivo de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos IgG anti-*E. canis* (400×) (original da autora).

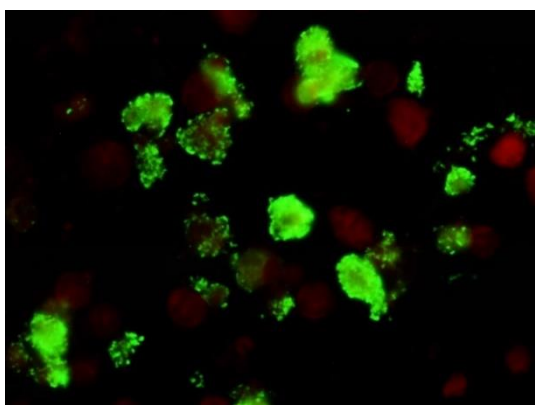


Figura 17 – Resultado do controlo positivo de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos IgG anti-*R. conorii* (400×) (original da autora).

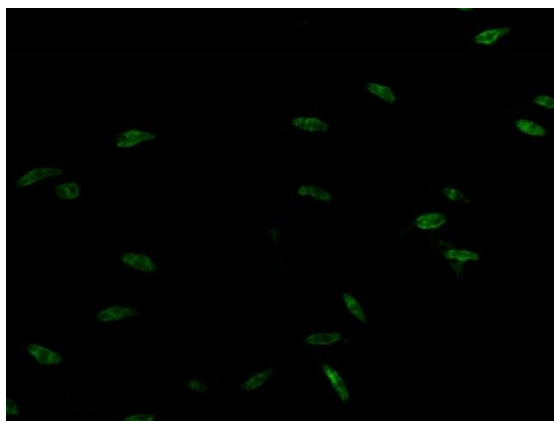


Figura 18 – Resultado do controlo positivo de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos IgG anti-*L. infantum* (400×) (original da autora).

2.7 Pesquisa de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* por ELISA

A ELISA foi a técnica laboratorial utilizada para a detecção de anticorpos IgG anti-*Anaplasma phagocytophilum*, tendo sido utilizado o kit comercial “Anti-*Anaplasma phagocytophilum* ELISA Dog (IgG)” (EUROIMMUN®). Todas as amostras foram testadas nas diluições 1:50 e 1:100.

O procedimento experimental foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, a seguir descritas.

1. Diluíram-se as amostras em PBS 1×;
2. Dilui-se o tampão de lavagem em água desionizada, na proporção de 1:10;
3. Pipetaram-se 100 µl do calibrador, controlo positivo, controlo negativo e das amostras nos poços da microplaca;
4. Protegeu-se com papel e incubou-se a 37°C ± 1°C, durante 30 minutos;
5. Removeu-se o papel, esvaziaram-se os poços e lavou-se três vezes com 300 µl de tampão de lavagem, cada. A cada lavagem deixou-se o tampão nos poços durante 30 a 60 segundos. No final, virou-se a microplaca com força em cima de papel absorvente, para remover todo o líquido residual;
6. Pipetaram-se 100 µl de conjugado em todos os poços, protegeu-se com papel e incubou-se a 37°C ± 1°C, durante 30 minutos;
7. Repetiu-se o ponto 5;
8. Pipetaram-se 100 µl de solução de substrato em cada poço e incubou-se à temperatura ambiente durante 15 minutos, dentro de uma gaveta para proteger da luz solar direta;
9. No final, pipetaram-se 100 µl da solução de paragem em cada poço, pela mesma ordem e à mesma velocidade que foi introduzido o substrato;

10. No espectrofotômetro Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Fisher Scientific), mediu-se a absorvância no comprimento de onda de 450nm, com agitação da placa antes da medição;
11. Fez-se o cálculo do rácio, de acordo com a equação 1 e interpretaram-se os resultados, de acordo com o estabelecido pelo fabricante (Tabela 12). A diluição considerada para avaliação dos resultados foi a 1:100, conforme definido pelo fabricante do kit.

$$\text{Rácio} = \frac{\text{Absorvância Controle ou Amostra}}{\text{Absorvância Calibrador}} \quad (\text{Equação 1})$$

Tabela 12 – Interpretação dos resultados de ELISA para *A. phagocytophilum*.

Resultado	Rácio (r)
Negativo	< 0,8
Indeterminado	$0,8 \leq r < 1,1$
Positivo	$\geq 1,1$

RESULTADOS

3.1 Caracterização da amostra estudada

A amostra analisada era constituída por 28 cães de canil, sem manifestações clínicas e cuja aplicação de antiparasitários externos era, apenas, realizada no Verão.

Na amostra estudada, 75% (21/28) cães eram machos e, apenas, 25% (7/28) eram fêmeas (Figura 19).

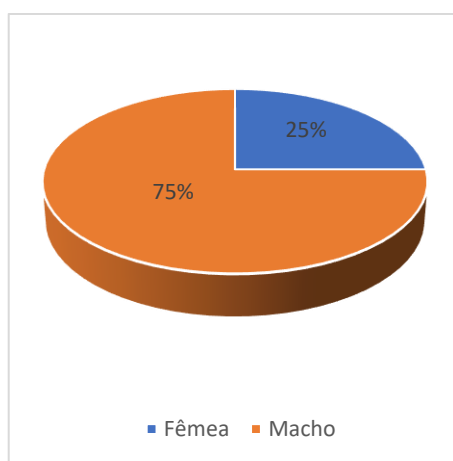


Figura 19 – Distribuição da amostra relativamente ao género (n=28).

Em relação à idade, 5,6% (2/28) eram cães jovens com idade inferior ou igual a um ano, 85,7% (24/28) eram adultos entre os dois e os nove anos e 5,6% (2/28) tinham mais de dez anos (Figura 20).

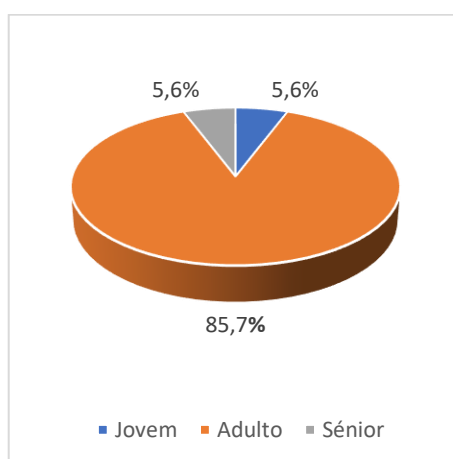


Figura 20 – Distribuição da amostra relativamente à faixa etária (n=28).

No que respeita ao tempo de presença no canil, 21,4% (6/28) encontravam-se há menos de um ano, 32,1% (9/28) entre dois a cinco anos e 46,4% (13/28) entre seis e dez anos (Figura 21).

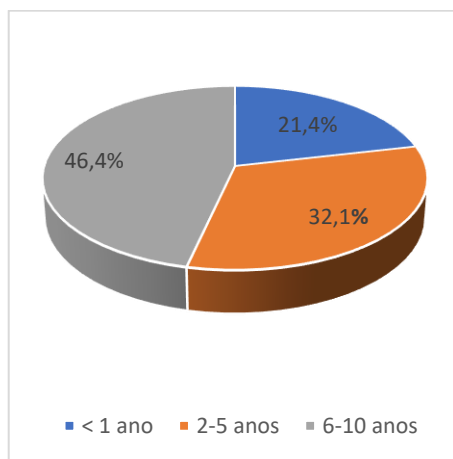


Figura 21 – Distribuição da amostra relativamente ao tempo em que os animais se encontravam no canil (n=28).

3.2 Achados no hemograma

Os valores eritrocitários encontravam-se normais em quase todos os animais, havendo apenas 3,6% (1/28) com ligeira eritrocitose. Os níveis de hemoglobina sanguínea apresentavam-se ligeiramente elevados em 32,1% (9/28) dos cães (Figura 22).

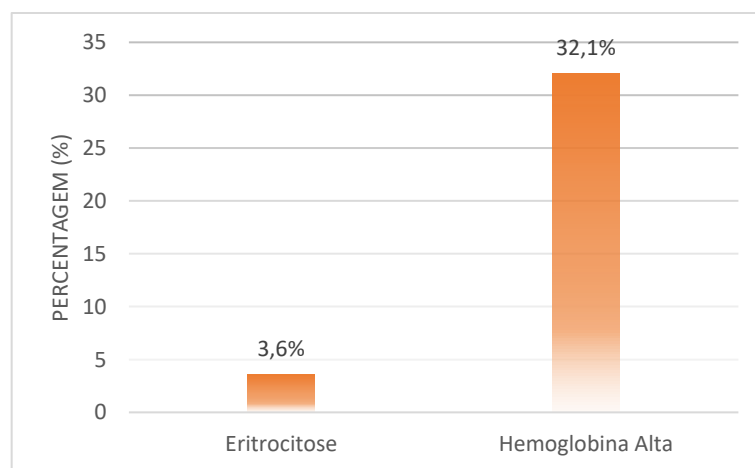


Figura 22 – Percentagem de animais com alterações nos valores eritrocitários e de hemoglobina (n=28).

Dos 28 animais estudados, 17 não apresentavam qualquer alteração a nível leucocitário. Dos restantes 11 cães, 3,6% (1/28) apresentava neutrofilia, 3,6% (1/28) neutropenia, 7,1%

(2/28) eosinopenia, 17,9% (5/28) eosinofilia, 10,7% (3/28) linfocitose e 14,3% (4/28) monocitopenia. Alguns animais apresentavam até duas alterações em simultâneo, sendo que, apenas um apresentava quatro alterações. O gráfico a seguir expressa estes valores (Figura 23).

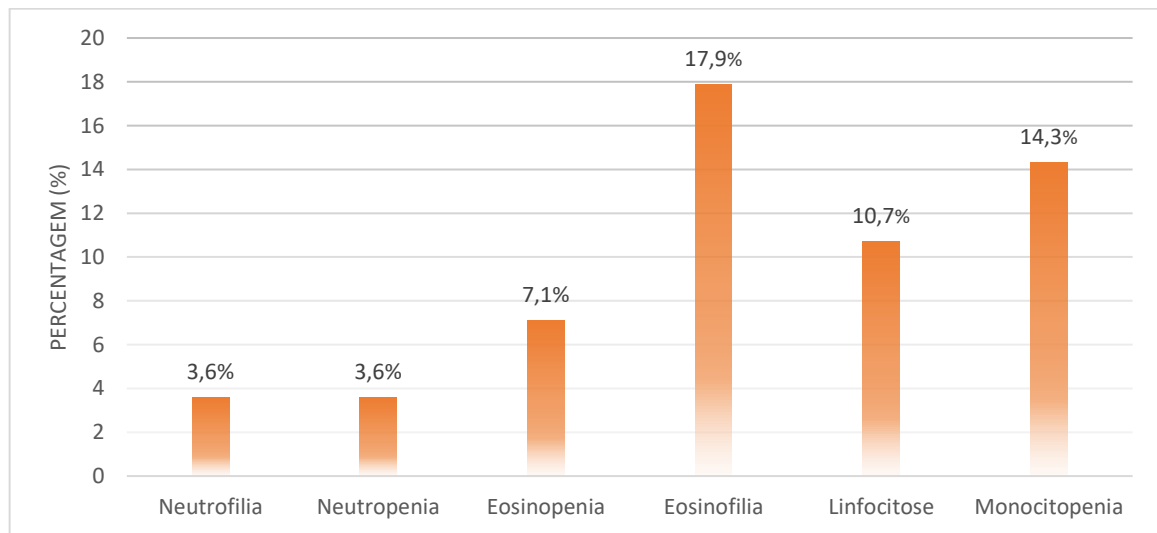


Figura 23 – Percentagem de animais com alterações nos valores leucocitários (n=28).

Em relação aos valores plaquetários, dos 28 animais, apenas 11 não apresentavam qualquer alteração. Dos restantes 17 cães, 57,1% (16/28) apresentavam trombocitopenia com valores de plaquetas inferiores a $200 \times 10^9/L$, havendo apenas 3,6% (1/28) com trombocitose ligeira. O gráfico que se segue expressa estes resultados em percentagem (Figura 24).

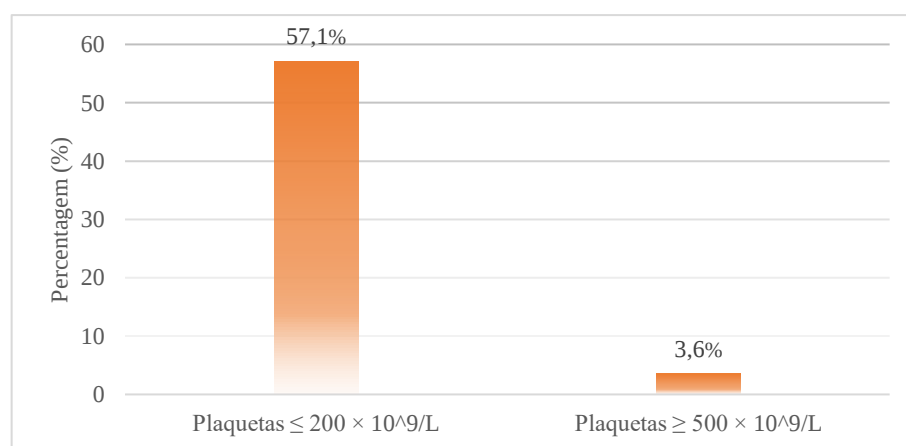


Figura 24 – Percentagem de animais com alterações nos valores plaquetários (n=28).

3.3 Esfregaços de Sangue Total

Após observação ao microscópio ótico dos esfregaços de sangue total, não foi observada a presença de quaisquer formas infetantes dos diversos agentes estudados.

Foi, também, realizada a visualização das plaquetas ao microscópio, em que se observou que 12 dos 16 animais com plaquetas inferiores a $200 \times 10^9/L$, possuíam agregados plaquetares. Após esta correção, apenas se confirmou a trombocitopenia em 14% (4/28) dos animais.

3.4 Esfregaços de *Buffy-coat*

Após observação ao microscópio ótico dos esfregaços de *buffy-coat* não foram observadas formas infetantes dos agentes em estudo.

3.5 Avaliação da integridade física do ADN genómico

As amostras de ADN isoladas das amostras apresentavam boa integridade física, uma vez que foi observada a presença de bandas de elevado peso molecular e a ausência de arrastamentos (Figura 25).

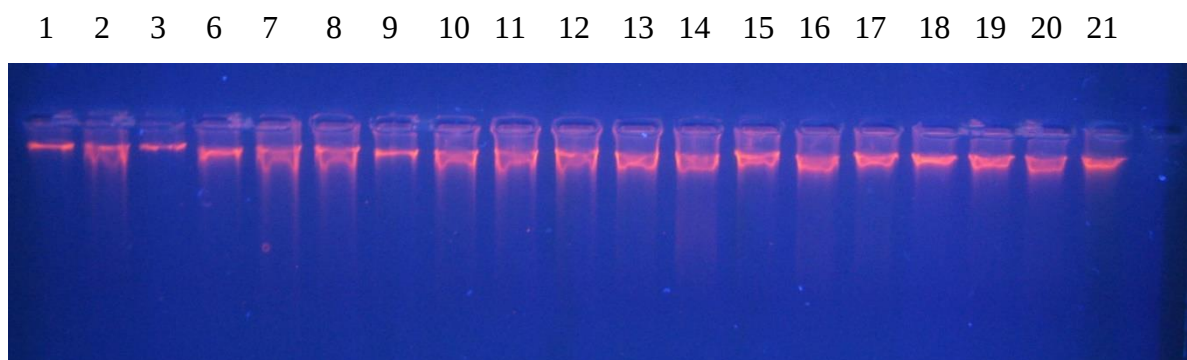


Figura 25 – Eletroforese em gel de agarose a 0,8% de algumas amostras de ADN genómico isolado.

3.6 Avaliação da ausência de inibidores nas amostras de ADN genómico

A amplificação de um fragmento do gene da β -actina foi bem-sucedida em todas as amostras de gADN, confirmando, assim, a ausência de inibidores da ADN polimerase (Figura 26).

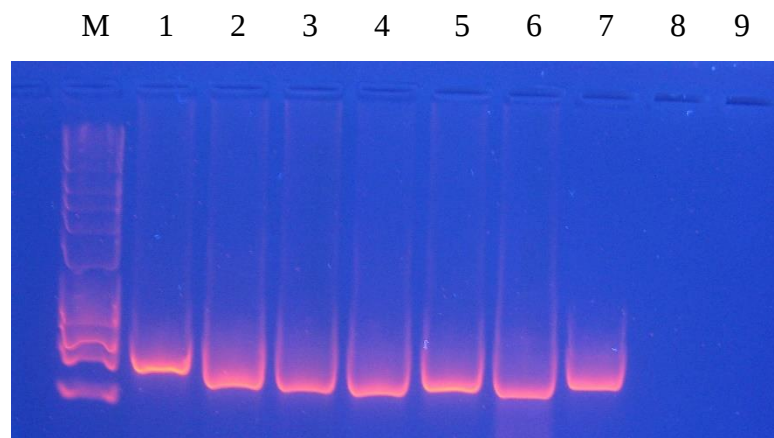


Figura 26 – Eletroforese em gel de agarose a 1,5% após amplificação de um fragmento do gene β -actina. M – Marcador de pesos moleculares (Hypper Ladder 100pb, Bioline®); 1-6 – Amostras em estudo; 7 – Controlo positivo; 8,9 – Controlos negativos.

3.7 Resultados das análises moleculares e serológicas

3.7.1 Infecção por *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp.

Após a realização da PCR convencional para amplificação de um fragmento do gene 16S rARN, específico dos géneros *Anaplasma* e *Ehrlichia*, foi observada a presença de ADN em 11% (3/28) dos cães estudados (Figuras 27 e 28).

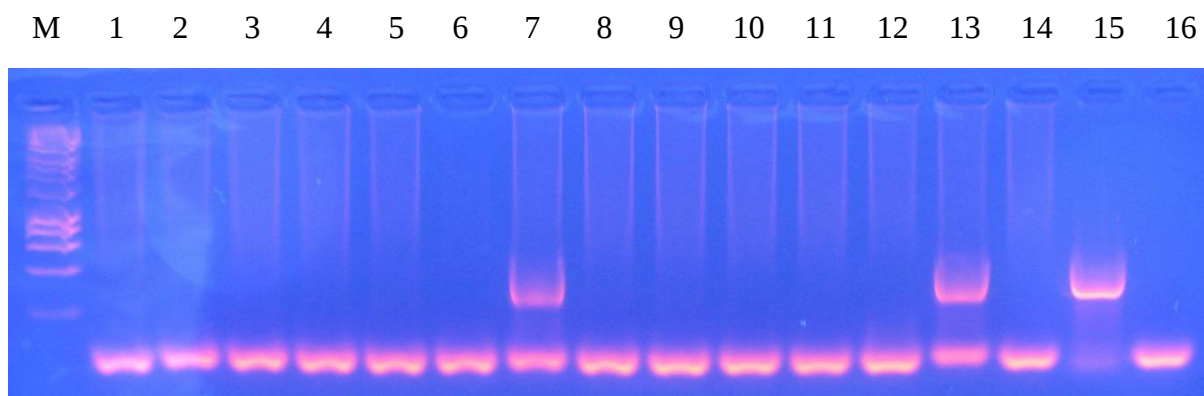


Figura 27 – Eletroforese em gel de agarose a 1,5% após amplificação de um fragmento do gene 16S rARN. M - Marcador de pesos moleculares (Hypper Ladder 100pb, Bioline®); 7,13 – Amostras positivas; 1-6,8-12,14 – Amostras negativas; 15 – Controlo positivo; 16 – Controlo negativo.

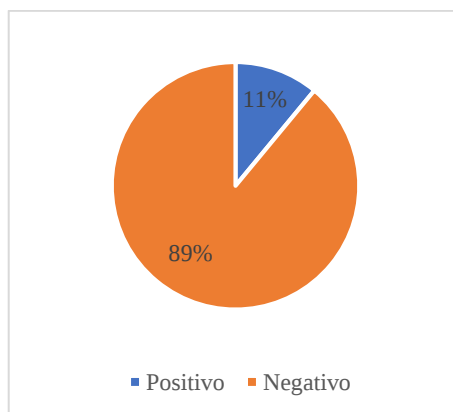


Figura 28 – Resultados da PCR convencional para *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp. (n=28).

Após a sequenciação do ADN amplificado confirmou-se que, dos três animais positivos, dois estavam infetados por *Anaplasma platys* e um por *Ehrlichia canis*.

Pela técnica de ELISA, na pesquisa de anticorpos IgG anti-*A. phagocytophilum*, foram identificados, na diluição de 1:50, 25% (7/28) de animais positivos e 11% (3/28) com resultado indeterminado. Na diluição de 1:100, 18% (5/28) eram positivos e 11% (3/28) apresentavam um resultado indeterminado (Tabela 13 e Figura 29).

Tabela 13 – Resumo dos resultados obtidos por ELISA.

	Resultados					
	Positivo		Indeterminado		Negativo	
	n	%	n	%	n	%
Diluição 1:50	7	25	3	11	18	64
Diluição 1:100	5	18	3	11	20	71

Como as instruções do fabricante definem a diluição 1:100 como o adequado para a avaliação dos resultados, foram identificados, na totalidade da amostra em estudo, 18% de positivos.

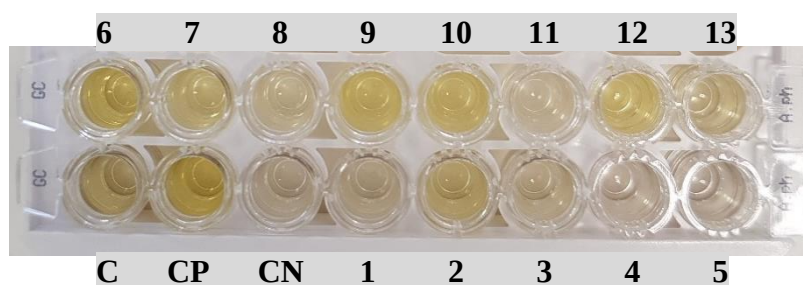


Figura 29 – Placa de ELISA para avaliação da presença de anticorpos IgG anti-*A. phagocytophilum*. C – Calibrador; CP – Controlo Positivo; CN – Controlo Negativo; 1-13 – Amostras em estudo.

3.7.2 Infecção por *Ehrlichia* spp.

Após a realização da PCR *nested* (nPCR) para amplificação do gene *16S rARN*, foi possível detetar a presença de ADN de *Ehrlichia* spp. em 18% (5/28) dos cães estudados (Figuras 30 e 31).

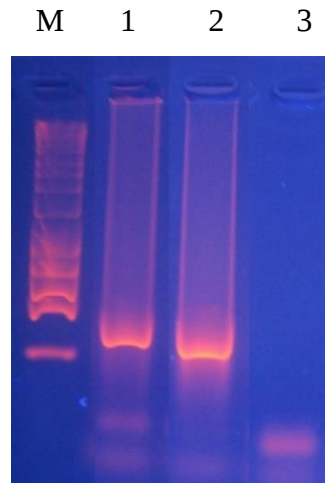


Figura 30 – Eletroforese em gel de agarose a 1,5% após amplificação de um fragmento do gene *16S rARN*. M - Marcador de pesos moleculares (Hypper Ladder 100pb, Bioline®); 1 – Amostra positiva; 2 – Controlo positivo; 3 – Controlo negativo.

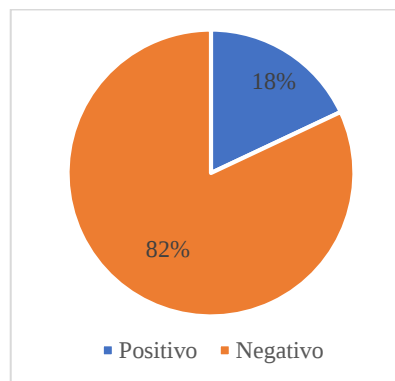


Figura 31 – Resultados da nPCR para *Ehrlichia* spp.(n=28).

Após a sequenciação do ADN das amostras positivas confirmou-se a infeção dos cinco cães com a bactéria *Ehrlichia canis*. Sendo que um deles já tinha sido confirmado ao sequenciar as amostras do PCR convencional para *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp.

Os resultados da IFI indicaram maior número de resultados positivos com 53,6% (15/28) dos animais positivos na diluição de 1:40 (*cut-off*) e 39% (11/28) positivos na diluição de 1:80 (Figura 32).

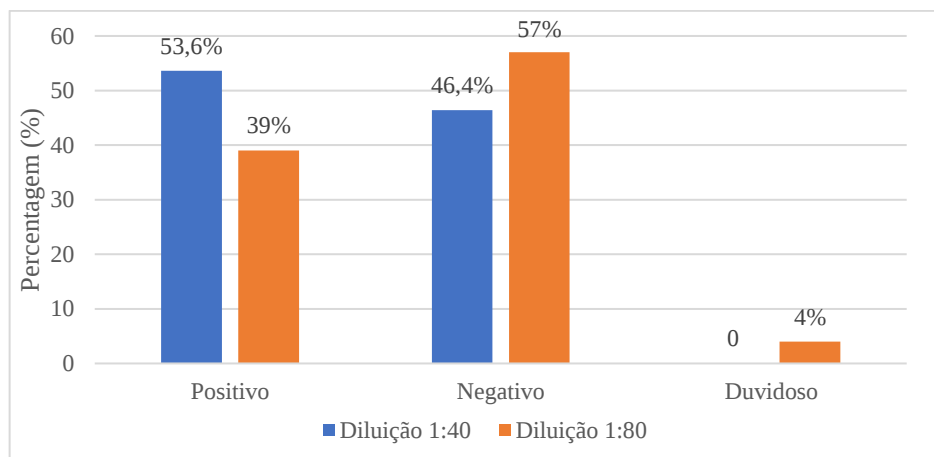


Figura 32 – Resultados da imunofluorescência indireta para *E. canis* (n=28).

3.7.3 Infecção por *Rickettsia* spp.

Após a realização da nPCR para amplificação de um fragmento do gene que codifica o antígeno 190-kDa, foi possível detectar a presença de ADN de *Rickettsia* spp. em 11% (3/28) dos cães estudados (Figuras 33 e 34).

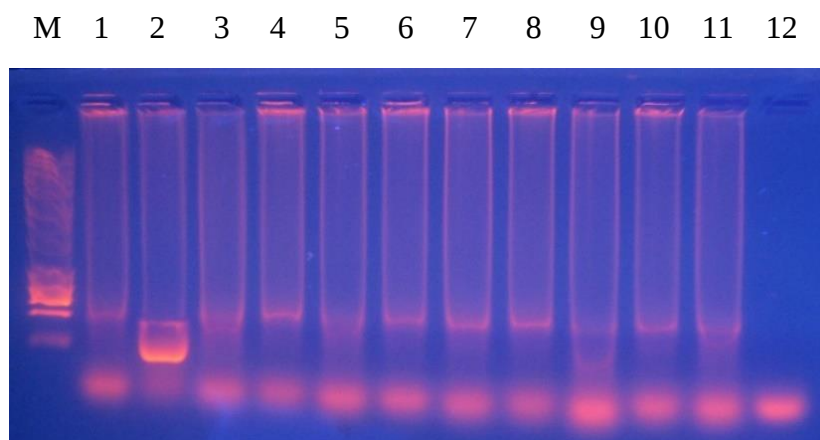


Figura 33 – Eletroforese em gel de agarose a 1,5% após amplificação de um fragmento do gene que codifica o antígeno 190-kDa. M - Marcador de pesos moleculares (Hypper Ladder 100pb, Bioline®); 2 – Amostra positiva; 1,3-10 – Amostras negativas; 11 – Controlo negativo (Parte II); 12 – Controlo negativo (Parte I).

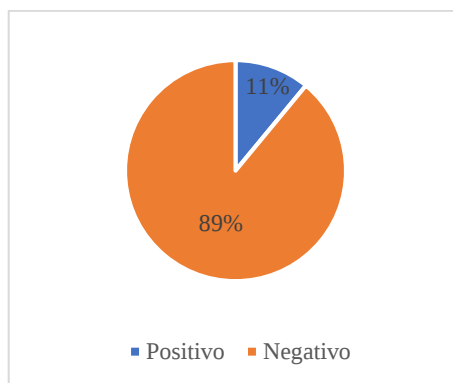


Figura 34 – Resultados da nPCR para *Rickettsia* spp. (n=28).

Após a sequenciação dos produtos de PCR, o ADN amplificado foi identificado como pertencente à espécie *Rickettsia rickettsi*. Como esta espécie não se encontra descrita em Portugal e o ADN desta havia sido utilizado anteriormente, no LACH, como controlo positivo da PCR, assumiu-se que estas amplificações se deviam a contaminação com esse ADN sendo, por isso, resultados falso positivos.

Tal como na erlichiose, os resultados da IFI indicaram uma maior frequência de resultados positivos com todos os animais positivos em ambas as diluições testadas (Figura 35).

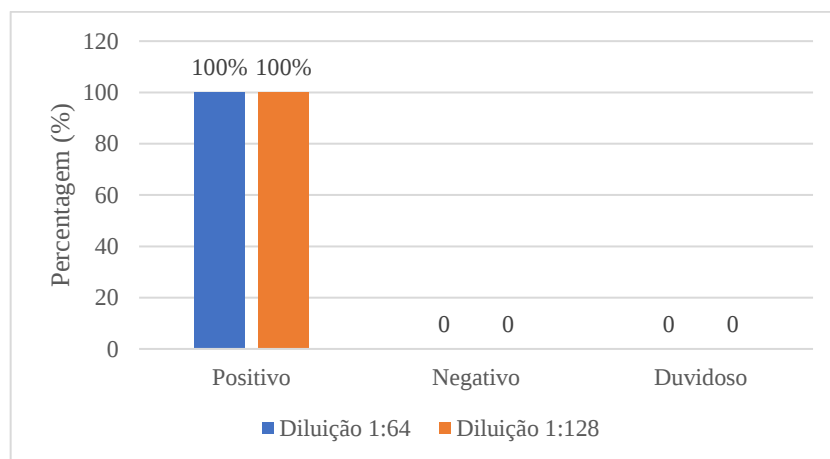


Figura 35 – Resultados da imunofluorescência indireta para *R. conorii* (n=28).

3.7.4 Infecção por *Leishmania* spp.

Após a realização da PCR convencional para amplificação de um fragmento do gene que codifica o minicírculo do cinetoplasto, não foi possível detetar a presença de ADN de *Leishmania* spp. em nenhum dos 28 cães estudados.

Os resultados da IFI, na diluição 1:80, permitiram identificar anticorpos em 35,7% (10/28) dos animais, tendo em 10,7% (3/28) o resultado sido duvidoso. Na diluição 1:160, apenas 28,6% (8/28) se apresentaram positivos e 3,6% (1/28) duvidoso (Figura 36).

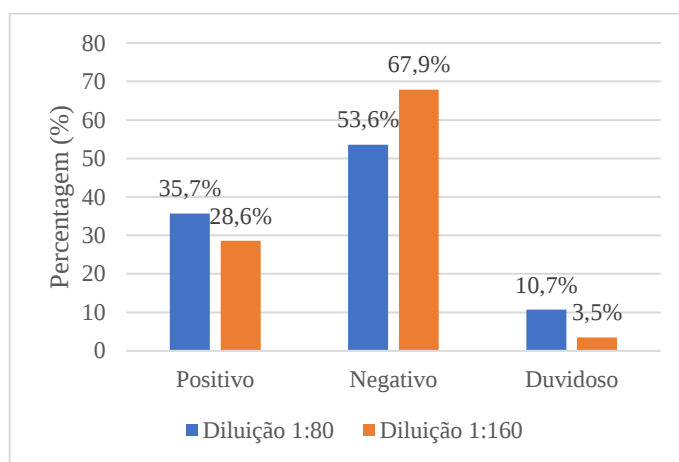


Figura 36 – Resultados da imunofluorescência indireta para *L. infantum* (n=28).

3.7.5 Avaliação da presença de co-infecções e/ou co-exposições

Analisando em conjunto os resultados da sequenciação para os agentes *Ehrlichia* spp., *Rickettsia* spp. e *Anaplasma* spp. observou-se que em nenhum dos animais havia presença de co-infecção.

Os resultados da serologia evidenciam a presença de anticorpos, contra dois ou mais dos agentes em estudo, em 79% (22/28) dos animais (Tabela 14).

Tabela 14 – Frequência de cães com co-exposição a dois ou mais agentes.

	Co-exposição	
	Frequência absoluta (n)	Frequência relativa (%)
Dois agentes	15	54
Três agentes	4	14
Quatro agentes	3	11
Total	22	79

Tabela 15 – Resultados positivos por PCR e comparação com outros dados adquiridos.

	Idade (anos)	Tempo de permanência no canil	Achados leucocitários	Achados plaquetários	PCR positiva	Serologia positiva
Cão 7 ♂	6	Desde cachorro	-	-	<i>E. canis</i>	<i>R. conorii</i> e <i>E. canis</i>
Cão 11 ♂	5 – 6	Desde cachorro	Eosinopenia	-	<i>E. canis</i>	<i>R. conorii</i> , <i>L. infantum</i> , <i>E. canis</i> e <i>A. phagocytophilum</i>
Cão 21 ♀	5	3 – 4 anos	Neutropenia e monocitopenia	-	<i>E. canis</i>	<i>R. conorii</i> , <i>E. canis</i> e <i>A. phagocytophilum</i>
Cão 23 ♀	8	Desde cachorro	Monocitopenia e eosinofilia	-	<i>A. platys</i>	<i>R. conorii</i> e <i>E. canis</i>
Cão 24 ♂	8	Desde cachorro	Monocitopenia	-	<i>E. canis</i>	<i>R. conorii</i> e <i>E. canis</i>
Cão 28 ♂	7 – 8	6 anos	-	-	<i>E. canis</i>	<i>R. conorii</i> e <i>L. infantum</i>
Cão 29 ♂	6	4 anos	-	-	<i>A. platys</i>	<i>R. conorii</i> , <i>E. canis</i> e <i>A. phagocytophilum</i>

Na tabela 16 no Apêndice II encontram-se em paralelo, alguns dados epidemiológicos e os resultados obtidos nas diferentes técnicas realizadas nos cães em estudo.

DISCUSSÃO

As CVBD's abordadas neste estudo são preocupantes para a saúde pública a nível mundial. A ocorrência de alterações climáticas, o aquecimento global, as viagens e comércio internacionais, as novas práticas agrícolas e as mudanças de populações de zonas rurais para urbanas, têm vindo a causar variações na distribuição mundial de cada agente e respetivos vetores, originando a sua disseminação para áreas onde outrora não se encontravam (Lauzi *et al.*, 2016; Potkonjak *et al.*, 2016). O presente trabalho foi realizado numa região endémica para as CVBD's em estudo (Cardoso *et al.*, 2012). A pesquisa dos agentes foi realizada com base na complementaridade entre as técnicas hematológicas, moleculares e serológicas, tal como já descrito por outros autores (Kohn *et al.*, 2011).

Os resultados, apresentados pelo hemograma, de eosinopenia, neutropenia, monocitopenia e trombocitopenia (Figura 5) estão, na generalidade, de acordo com o estudo realizado por Çetinkaya *et al.* (2016), os quais descreveram a presença de trombocitopenia, anemia e leucopenia na maioria dos animais infetados com estes agentes. Contudo, neste trabalho, a presença de trombocitopenia foi refutada, na maioria dos casos, através da observação dos esfregaços sanguíneos.

O esfregaço sanguíneo, tal como descreveram Silveira *et al.* (2015), tem uma baixa sensibilidade e deve ser considerado insuficiente na deteção de agentes bacterianos e parasitários. Neste trabalho, não foram observadas mórulas bacterianas, nem quaisquer formas amastigotas de *L. infantum*. No caso de *A. platys*, uma das razões desta incapacidade de deteção pode ser a natureza cíclica da presença do agente em circulação (Rufino *et al.*, 2013). Outras razões, de acordo com Cicuttin *et al.* (2016) é o fato das mórulas de *E. canis* se confundirem com plaquetas sanguíneas, grânulos linfocíticos azurófilos, corpos linfoglandulares e material nuclear fagocitado. Sainz *et al.* (2015) descreveram esta deteção, em animais sintomáticos, apenas em 4 a 6% dos casos. Todos os animais em estudo no presente trabalho eram assintomáticos, diminuindo a já baixa sensibilidade da deteção, o que pode justificar os resultados obtidos. Maia & Campino (2008) descrevem que a probabilidade de se observarem leishmanias no esfregaço aumenta ao usar uma amostra de medula óssea. Contudo, dada a natureza invasiva dessa recolha, tal não foi possível de realizar no presente trabalho. Encontrar amastigotas na circulação sanguínea pode suceder, apesar de ser um evento raro (Maia *et al.*, 2009).

A PCR, com posterior sequenciação, é um método sensível, específico e útil para detetar e diferenciar entre as várias espécies dos agentes infecciosos (Çetinkaya *et al.*, 2016; Cardoso *et*

al., 2010), tendo a capacidade de detetar a infeção durante um maior período de tempo, quando comparada com a microscopia (Shaw *et al.*, 2001). No presente trabalho, foi possível identificar, por estas técnicas, *Anaplasma platys* em dois e *Ehrlichia canis* em cinco dos 28 animais estudados. Contrastando com estes resultados, na visualização do esfregaço ao microscópio ótico, não foram observadas quaisquer formas infetantes, amastigotas ou mórulas, dos agentes em estudo.

Dado que a PCR convencional para pesquisa de *Anaplasma spp./Ehrlichia spp.*, apenas detetou infeção por *Ehrlichia spp.* num animal, enquanto que a nPCR específica para esta espécie encontrou cinco animais com este agente, confirma-se o descrito por Pat-Nah *et al.* (2015), que a nPCR é um método mais sensível do que a técnica convencional, para a deteção de *E. canis*. Estes cinco animais positivos para *E. canis*, vão ao encontro da literatura, onde está descrito ser esta a bactéria diagnosticada, tanto por PCR como por serologia, com maior prevalência em cães (Starkey *et al.*, 2016). Os resultados falso positivos na amplificação de ADN de *Rickettsia spp.* são, por vezes, atribuídos a uma deficiente higienização dos laboratórios, com consequente contaminação das amostras (Maggi *et al.*, 2014). No caso do presente estudo, foram tidos todos os cuidados e cumpridas as boas práticas de laboratório no sentido de evitar a contaminação por ADN exógeno. Não obstante, não foi possível evitar a presença de contaminação.

Os resultados negativos na PCR, para deteção de ADN de *Leishmania spp.*, não permitem afirmar que o parasita não se encontra presente, uma vez que é, ainda, limitado o conhecimento sobre a duração, consistência e intensidade desta parasitemia (Maia & Campino, 2008). Também não é possível excluir a possibilidade de resultados falso negativos pois, segundo Maia & Campino (2008), o protocolo de PCR aplicado, os *primers* usados, o número de réplicas, o método de extração do ADN da amostra e o estado do material biológico a ser testado têm influência nos resultados deste teste molecular. Os testes moleculares, na generalidade, são, ainda, influenciados por fatores como a carga do agente em circulação, a sua intermitência ou a eventual administração de fármacos (Sainz *et al.*, 2015). A sensibilidade do teste molecular poderia ter sido aumentada caso tivesse sido possível colher amostras de medula óssea ou gânglio linfático, o que não aconteceu.

Cardoso e colaboradores (2012) descreveram uma seroprevalência para *A. phagocytophilum*, em animais aparentemente saudáveis com proprietário, de 4,5% em Portugal Continental e mais especificamente na região do Alentejo de 3,5%. Em Espanha, para o mesmo tipo de animais, o valor de seroprevalência foi de 5%, similar ao encontrado em Portugal

(Solano-Gallego *et al.*, 2006; Couto *et al.*, 2010; Miró *et al.*, 2013). No presente estudo, através da técnica de ELISA, foi encontrada uma seroprevalência de 18%. A diferença entre a literatura e os resultados encontrados neste estudo, pode ser justificada pelo fato de os proprietários dos animais, eventualmente, realizarem, com mais regularidade, a aplicação de ectoparasiticidas o que, devido à falta de meios financeiros, não acontece no canil alvo do presente estudo. Para além disso, a elevada densidade populacional no canil, facilita a transmissão pelos vetores. O fato de terem sido identificados alguns animais positivos na diluição de 1:50 (Figura 13) pode significar, que se encontram, ainda, na fase aguda da infeção, em que a resposta imunitária se encontra numa fase inicial, em resultado de uma exposição recente.

Num estudo realizado em Portugal, cães assintomáticos com proprietário apresentavam seroprevalência para *E. canis* de 4,1% (Maia *et al.*, 2015). Num outro estudo efetuado por Cardoso e colaboradores (2012) em 85 cães com proprietário, aparentemente saudáveis da região do Alentejo, observou uma seroprevalência de 2,4% para *E. canis*, em que o principal fator de risco encontrado foi a não aplicação de desparasitantes externos. Em Espanha, foram descritas seroprevalências entre 3,1% e 19%, também em cães com proprietário, (Miró *et al.*, 2013; Sainz *et al.*, 2015) e 54,7% em animais de canil (Amusategui *et al.*, 2008) todos, aparentemente, saudáveis. Neste estudo foram identificados 53,6% de animais seropositivos, sendo 39% seropositivos, também, na segunda diluição. Estes valores elevados, em que mais de metade da população do canil foi exposta, podem ser fundamentados com o fato da região onde decorreu o estudo ser endémica para este agente infeccioso e o seu vetor (Cardoso *et al.*, 2012), a aplicação de ectoparasiticidas ser reduzida e inconstante e a elevada densidade populacional de cães no abrigo.

A seroprevalência de 100%, em ambas as diluições, obtida na IFI para *R. conorii*, indicam uma forte presença do agente naquela região. Em Itália, apesar de ser um país endémico, a maior seroprevalência descrita foi 74% (Solano-Gallego *et al.*, 2015); em Espanha, o valor mais alto foi de 82% (Proboste *et al.*, 2015). Alexandre e colaboradores (2011) realizaram um estudo que abrangem 400 cães saudáveis com proprietário da região do Algarve, no qual encontraram uma seroprevalência de 38,5% para o agente *R. conorii*. Os valores mais baixos de seroprevalência em estudos anteriores podem ser explicados, tal como para *A. phagocytophilum*, por os estudos terem sido realizados em animais com proprietários, em que o uso de desparasitantes externos é provável que seja mais frequente. Contudo, é necessária alguma cautela na comparação destes resultados, dado o reduzido número de cães do presente estudo e o fato de todos eles habitarem o mesmo e restrito espaço físico. Existe também a

possibilidade de ocorrerem reações cruzadas entre as diferentes espécies do género *Rickettsia*, o que pode sobrevalorizar os resultados da IFI para o agente *Rickettsia conorii* (Parola *et al.*, 2005).

A bacia mediterrânica é uma área endémica para a leishmaniose, com uma seroprevalência de 6,3% (Maia *et al.*, 2015). Cardoso e colaboradores (2012) descrevem, após um estudo na região do Alentejo que abrangia 85 cães com proprietário, aparentemente saudáveis, uma seroprevalência de 5,9% para *Leishmania infantum* enquanto que, no sul de Espanha, Miró e colaboradores (2013) descreveram uma seroprevalência de 34,6%. No presente trabalho foram avaliados animais de um canil no concelho de Moura, tendo sido encontrada uma frequência de anticorpos anti-*L. infantum* de 35,7%, valor próximo ao encontrado no sul de Espanha. Este valor permite-nos obter um panorama sobre a exposição destes animais ao parasita, apesar de não poder ser feita uma extrapolação dos resultados para a restante população canina do concelho de Moura e para a região do Alentejo.

Os testes serológicos, quando realizados durante o período de incubação da doença ou durante a fase aguda da mesma, podem apresentar resultados falso negativos (Sainz *et al.*, 2015). O cão 28 (Tabela 15) parece encontrar-se na fase aguda da infeção, pois apresenta resultado positivo na PCR e negativo na IFI para *Ehrlichia canis*, o que sugere poder encontrar-se no período de seroconversão, o qual pode durar até 15 dias (Mylonakis *et al.*, 2009).

Lee *et al.* (2017), afirmam que, quando comparado com o diagnóstico ao exame clínico, o diagnóstico laboratorial deteta um maior número de infeções presentes em animais assintomáticos. Na avaliação clínica, todos os animais em estudo estavam, aparentemente, saudáveis, não exibindo manifestações clínicas compatíveis com as doenças em estudo ou outras patologias. Os resultados laboratoriais permitiram identificar cinco animais infetados com *E. canis* e dois com *A. platys*, o que corrobora o descrito pelos referidos autores.

No presente trabalho não podemos excluir a hipótese de existirem co-infeções em que ocorreu amplificação, apenas, do agente presente em maior quantidade, tal como descrito por Maggi *et al.* (2014). Sendo que um dos maiores fatores de risco para este acontecimento é o fato dos animais serem de canil, onde o controlo de vetores é insuficiente ou mesmo inexistente (Pennisi *et al.*, 2012), o que é o caso do canil em estudo, onde a utilização de ectoparasiticidas é limitada, acontecendo de forma irregular. Também, considerando todos estes fatores, justifica-se a presença de co-exposição na maior parte dos animais, sendo que 54% foram expostos a dois agentes, 14% a três agentes e 11% aos quatro agentes em estudo (Tabela 14).

Uma limitação do presente estudo foi ter sido feita uma recolha única de sangue, o que pode ter levado a resultados falso negativos na serologia, caso os cães se encontrassem no período de seroconversão. Devido à bacteriemia poder ser intermitente, podem ter sido obtidos resultados falso negativos na PCR (Harrus & Waner, 2011).

O fato de em alguns animais a colheita de sangue ter sido na veia cefálica e não na veia jugular pode ter dado origem às alterações observadas no hemograma, nomeadamente a baixa contagem de plaquetas que, após observação do esfregaço sanguíneo ao microscópio, revelaram ser artefactos. Isto porque a recolha na veia jugular é mais fácil e rápida, reduzindo, assim, a probabilidade de se obter trombocitopenia como consequência de uma colheita lenta.

De acordo com a Tabela 15, os animais com infeção ativa, ou seja, cujos resultados por PCR foram positivos, encontravam-se no canil há quatro anos ou mais. Este fato, aliado à carência na administração de ectoparasiticidas e/ou inseticidas, a próxima convivência dos animais, o tipo de vegetação do local propício à proliferação de ixodídeos e a endemicidade da região para estes agentes e seus vetores, podem justificar os resultados encontrados.

Na avaliação de animais de abrigo existe sempre algum grau de desconhecimento em relação ao seu historial médico, tipo de habitação e aplicação de antiparasitários anterior à sua vinda para aquele local. Pode, também, ter havido uma escassez de informação relativamente aos sinais clínicos que os cães pudessem demonstrar. O tamanho reduzido da amostra e o fato de os animais analisados estarem confinados a um reduzido espaço físico, impede a extrapolação dos resultados para a restante população canina do concelho de Moura e para a região do Alentejo.

Em estudos futuros, seria aconselhada a recolha do material biológico ideal para cada teste, utilizar técnicas de nPCR para pesquisa de ADN e fazer, pelo menos, duas recolhas de amostras, com um intervalo de duas semanas.

Este estudo mostrou o quão importante é realizar uma correta vigilância e controlo da presença de vetores como os ixodídeos e os flebotomíneos no ambiente. Os resultados serológicos e moleculares obtidos, evidenciam a dimensão da presença dos agentes infecciosos e seus vetores no local, alertando para a urgência de se proceder à devida profilaxia por parte dos responsáveis do abrigo.

CONCLUSÃO

As CVBD's apresentam potencial zoonótico e são endémicas no Sul de Portugal, local onde decorreu o presente estudo.

A prevenção e o tratamento destas bacterioses e parasitoses são cruciais para o bem-estar animal, antecipando a infeção e a transmissão de doença. O seu potencial zoonótico exige maior atenção a esta realidade, no sentido de serem tomadas as corretas medidas de prevenção.

O objetivo de avaliar a frequência de doenças caninas transmitidas por vetores num abrigo no concelho de Moura, região do Alentejo foi alcançado ao terem sido identificados *E. canis* e *A. platys*, em 25% dos animais, e à evidência serológica de exposição, a pelo menos dois agentes, em 79% dos cães. O facto de todos estes cães se apresentarem assintomáticos, mostra a importância e a dimensão do problema. Os resultados obtidos por serologia, alertam para a elevada exposição dos animais em estudo a estes agentes, muitos deles, durante a maior parte da sua longa vida no canil.

Os resultados obtidos evidenciam a importância de, em zonas endémicas como o Alentejo, existir uma maior consciência por parte da população sobre a existência destes agentes patogénicos e seus vetores e da possibilidade da sua transmissão ao ser humano. Reveste-se, assim, de grande importância a aposta na partilha desta informação com os tutores de animais domésticos. O controlo de ixodídeos e flebotomíneos através do uso de antiparasitários e inseticidas, respetivamente, são o primeiro passo na redução de infeções causadas por estes agentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afonso, M. O., Cardoso, L., Anastácio, S., Janz, J. G., Sousa, S., Rodrigues, J., *et al.* (2007). The Phlebotomine Sand Flies of Portugal - XI. Ecology of the Leishmaniosis Vectors in Alijó Municipality, Alto Douro Region, 2001. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 14(1/2),19–22.
- Aguiar, D. M., Zhang, X., Melo, A. L. T., Pacheco, T. A., Meneses, A. M. C., Zanutto, M. S., *et al.* (2013). Genetic diversity of *Ehrlichia canis* in Brazil. *Veterinary Microbiology*, 164(3–4),315–321.
- Aguiar, D. M., Ziliani, T. F., Zhang, X., Melo, A. L. T., Braga, I. A., Witter, R., *et al.* (2014). A novel Ehrlichia genotype strain distinguished by the TRP36 gene naturally infects cattle in Brazil and causes clinical manifestations associated with ehrlichiosis. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(5),537–544.
- Aguiar, D. M., Zhang, X., Braga, I. A., Taques, I. I. G. G., & McBride, J. W. (2016). Detection of genotype-specific *Ehrlichia canis* exposure in Brazilian dogs by TRP36 peptide ELISA. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(1),142–145.
- Aktas, M., Özübek, S., Altay, K., Ipek, N., Balkaya, İ., Utuk, A., *et al.* (2015). Molecular detection of tick-borne rickettsial and protozoan pathogens in domestic dogs from Turkey. *Parasites & Vectors*, 8(1),157.
- Alexandre, N., Santos, A. S., Nuncio, M. S., Sousa, R. de, Boinas, F., & Bacellar, F. (2009). Detection of *Ehrlichia canis* by polymerase chain reaction in dogs from Portugal. *Veterinary Journal*, 181(3),343–344.
- Alexandre, N., Santos, A. S., Bacellar, F., Boinas, F. J., Nuncio, M. S., & de Sousa, R. (2011). Detection of *Rickettsia conorii* strains in Portuguese dogs (*Canis familiaris*). *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 2(2),119–122.

- Almazán, C., González-Álvarez, V. H., Fernández de Mera, I. G., Cabezas-Cruz, A., Rodríguez-Martínez, R., & de la Fuente, J. (2016). Molecular identification and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs in Mexico. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(2), 276–283.
- Alten, B., Ozbel, Y., Ergunay, K., Kasap, O. E., Cull, B., Antoniou, M., *et al.* (2015). Sampling strategies for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Europe. *Bulletin of Entomological Research*, 105(6), 664–678.
- Alves, R. N., Rieck, S. E., Ueira-Vieira, C., Labruna, M. B., & Beletti, M. E. (2014). Isolation, in vitro propagation, genetic analysis, and immunogenic characterization of an *Ehrlichia canis* strain from southeastern Brazil. *Journal of Veterinary Science*, 15(2), 241–248.
- Amusategui, I., Tesouro, M. A., Kakoma, I., Sainz, A. (2008). Serological reactivity to *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Neorickettsia risticii*, *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia conorii* in dogs from northwestern Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 8(6), 797–803.
- Baneth, G. (2014). Tick-borne infections of animals and humans: A common ground. *International Journal for Parasitology*, 44(9), 591–596.
- Bechara, G. H., Szabó, M. P. J., Mukai, L. S., Rosa, P. C. S. (1994). Immunization of dogs, hamsters and guinea pigs against *Rhipicephalus sanguineus* using crude unreleased adult tick extracts. *Vet. Parasitol.* 1, 79–90.
- Borges, L. M. F., de Oliveira Filho, J. G., Ferreira, L. L., Louly, C. C. B., Pickett, J. A., & Birkett, M. A. (2015). Identification of non-host semiochemicals for the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae), from tick-resistant beagles, *Canis lupus familiaris*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 6(5), 676–682.
- Bottari, N. B., Crivellenti, L. Z., Borin-Crivellenti, S., Oliveira, J. R., Coelho, S. B., Contin, C. M., *et al.* (2016). Iron metabolism and oxidative profile of dogs naturally infected by *Ehrlichia canis*: Acute and subclinical disease. *Microbial Pathogenesis*, 92, 26–29.

- Bourdeau, P., Saridomichelakis, M. N., Oliveira, A., Oliva, G., Kotnik, T., Gálvez, R., *et al.* (2014). Management of canine leishmaniosis in endemic SW European regions: a questionnaire-based multinational survey. *Parasites & Vectors*, 7,110.
- Bouzouraa, T., René-Martellet, M., Chêne, J., Attipa, C., Lebert, I., Chalvet-Monfray K., *et al.* (2016). Clinical and laboratory features of canine *Anaplasma platys* infection in 32 naturally infected dogs in the Mediterranean basin. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 7(6),1256-1264.
- Braga, Í. A., dos Santos, L. G. F., Ramos, D. G. de S., Melo, A. L. T., Mestre, G. L. da C., & de Aguiar, D. M. (2014). Detection of *Ehrlichia canis* in domestic cats in the central-western region of Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2),641–645.
- Bravo-Barriga, D., Parreira, R., Maia, C., Afonso, M. O., Blanco-Ciudad, J., Serrano, F. J., *et al.* (2016). Detection of *Leishmania* DNA and blood meal sources in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in western of Spain: Update on distribution and risk factors associated. *Acta Tropica*, 164,414–424.
- Cardoso, L., Mendão, C., & Madeira De Carvalho, L. (2012). Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal - a national serological study. *Parasites & Vectors*, 5,62.
- Cardoso, L., Gilad, M., Cortes, H. C. E., Nachum-Biala, Y., Lopes, A. P., Vila-Viçosa, M. J., *et al.* (2015). First report of *Anaplasma platys* infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) and molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* in foxes from Portugal. *Parasites & Vectors*, 8,144.
- 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.

- Carvalho, I. L. De, Milhano, N., Santos, A. S., Almeida, V., Barros, S. C., Sousa, R. *et al.* (2008). Detection of *Borrelia lusitaniae*, *Rickettsia* sp. IRS3, *Rickettsia monacensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* Collected in Madeira Island, Portugal. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 8(4),575–580.
- Carvalho, L., Armua-Fernandez, M. T., Sosa, N., Félix, M. L., & Venzal, J. M. (2016). *Anaplasma platys* in dogs from Uruguay. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 8(2),241-245.
- Çetinkaya, H., Matur, E., Akyazi, İ., Ekiz, E. E., Aydin, L., & Toparlak, M. (2016). Serological and molecular investigation of *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. in ticks and blood of dogs, in the Thrace Region of Turkey. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(5),706–714.
- Cicuttin, G. L., Brambati, D. F., Eugui, J. I. R., Lebrero, C. G., De Salvo, M. N., Beltrán, F. J., *et al.* (2014). Molecular characterization of *Rickettsia massiliar* and *Anaplasma platys* infecting *Rhipicephalus sanguineus* ticks and domestic dogs, Buenos Aires (Argentina). *Ticks and Tick Borne Diseases*, 5(5),484-488.
- Cicuttin, G. L., Tarragona, E. L., De Salvo, M. N., Mangold, A. J., & Nava, S. (2015). Infection with *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in two lineages of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) from Argentina. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 6(6),724–729.
- Cicuttin, G. L., De Salvo, M. N., & Gury Dohmen, F. E. (2016). Molecular characterization of *Ehrlichia canis* infecting dogs, Buenos Aires. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(5),954–957.
- Coimbra-Dores, M. J., Nunes, T., Dias, D., & Rosa, F. (2016). *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) species complex: morphometric and ultrastructural analyses. *Experimental and Applied Acarology*, 70(4),455–468.

- Cortes, S., Rolão, N., Ramada, J., Campino, L. (2004). PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l. specific kinetoplastid primers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98,12-17
- Cortes, S., Afonso, M. O., Alves-Pires, C., & Campino, L. (2007). Stray dogs and leishmaniasis in urban areas, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 13(9),1431–1432.
- Couto, C. G., Lorentzen, L., Beall, M. J., Shields, J., Bertolone, N., Couto, J. I., *et al.* (2010). Serological study of selected vector-borne diseases in shelter dogs in central Spain using point-of-care assays. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 10(9),885–888.
- Dantas-Torres, F., Latrofa, M., Annoscia, G., Giannelli, A., Parisi, A., & Otranto, D. (2013). Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. *Parasites & Vectors*, 6(1),213.
- Dantas-Torres, F., & Otranto, D. (2015). Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. *Veterinary Parasitology*, 208(1–2),9–13.
- Dantas-Torres, F., Maia, C., Latrofa, M. S., Annoscia, G., Cardoso, L., & Otranto, D. (2017). Genetic characterization of *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato) ticks from dogs in Portugal. *Parasites & Vectors*, 10(1),133.
- Dawson, J., E., Biggie, K., L., Warner, C., K., Cookson, K., Jenkins, S., Levine, J., F., *et al.* (1996). Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, an etiologic agent of human ehrlichiosis, in dogs from southeast Virginia. *American Journal of Veterinary Research*, 57(8),1175-9.
- Day. M., J. (2015). Introduction to Antigen and Antibody Assays. *Topics in Companion Animal Medicine*, 30(4),128-31

- Dumont, P., Liebenberg, J., Beugnet, F., & Fankhauser, B. (2015). Repellency and acaricidal efficacy of a new combination of fipronil and permethrin against *Ixodes ricinus* and *Rhipicephalus sanguineus* ticks on dogs. *Parasites & Vectors*, 8(1),531.
- Estrada-Peña, A., Roura, X., Sainz, A., Miró, G., & Solano-Gallego, L. (2017). Species of ticks and carried pathogens in owned dogs in Spain: Results of a one-year national survey. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 8(4),443–452.
- European centre for Disease Prevention and Control (2017). *Ixodes ricinus* - current known distribution: January 2018. Acedido em Janeiro de 2018 em <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/ixodes-ricinus-current-known-distribution-january-2018>
- European centre for Disease Prevention and Control (2017). *Phlebotomus perniciosus* - current known distribution: January 2018. Acedido em Janeiro de 2018 em <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/phlebotomus-perniciosus-current-known-distribution-january-2018>
- European centre for Disease Prevention and Control (2017). *Rhipicephalus sanguineus* - current known distribution: January 2018. Acedido em Janeiro de 2018 em <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/rhipicephalus-sanguineus-current-known-distribution-january-2018>
- Ferreira, B. R., Bechara, G. H. (1995). Imunidade a carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Acarina: Ixodidae) em cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* (Linnaeus) e no cão doméstico. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 32,232–237.
- Ferrolho, J., Simpson, J., Hawes, P., Zweggarth, E., & Bell-Sakyi, L. (2016). Growth of *Ehrlichia canis*, the causative agent of canine monocytic ehrlichiosis, in vector and non-vector ixodid tick cell lines. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(4),631–637.

- Fourie, J. J., Luus, H. G., Stanneck, D., & Jongejan, F. (2013). The efficacy of Advantix® to prevent transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Parasite*, 20,36.
- Fourie, J. J., Ollagnier, C., Beugnet, F., Luus, H. G., & Jongejan, F. (2013). Prevention of transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks to dogs treated with a combination of fipronil, amitraz and (S)-methoprene (CERTIFECT®). *Veterinary Parasitology*, 193(1–3),223–228.
- Fourie, J. J., Stanneck, D., Luus, H. G., Beugnet, F., Wijnveld, M., & Jongejan, F. (2013). Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks feeding on dogs and on artificial membranes. *Veterinary Parasitology*, 197(3–4),595–603.
- Gassner, F., van Vliet, A. J. H., Burgers, S. L. G. E., Jacobs, F., Verbaarschot, P., Hovius, E. K. E., *et al.* (2011). Geographic and Temporal Variations in Population Dynamics of *Ixodes ricinus* and Associated *Borrelia* Infections in The Netherlands. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(5),523–532.
- Gaunt, S., Beall, M., Stillman, B., Lorentzen, L., Diniz, P., Chandrashekar, R., *et al.* (2010). Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasites & Vectors*, 3(1),33.
- Gómez-Ochoa, P., Castillo, J. A., Gascón, M., Zarate, J. J., Alvarez, F., & Couto, C. G. (2009). Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: A clinical trial. *Veterinary Journal*, 179(2),259–263.
- González, E., Jiménez, M., Hernández, S., Martín-Martín, I., & Molina, R. (2017). Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis in Madrid, Spain (2012–2014): seasonal dynamics, *Leishmania infantum* infection rates and blood meal preferences. *Parasites & Vectors*, 10(1),368.
- Granick, J. L., Armstrong, P. J., & Bender, J. B. (2009). *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs: 34 cases (2000-2007). *J Am Vet Med Assoc*, 234(12),1559–1565.

- Gray, J., Dantas-Torres, F., Estrada-Peña, A., & Levin, M. (2013). Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 4(3),171–180.
- Harrus, S., & Waner, T. (2011). Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. *Veterinary Journal*, 187(3),292–296.
- Harrus, S., Waner, T., Neer, T. M. (2015) Neorickettsia and Wolbachia Infections & *Ehrlichia* and *Anaplasma* Infections. In: C.E. Greene (Eds) *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (4^aEd., pp. 219-256) Elsevier.
- Hekimoğlu, O., Sağlam, İ. K., Özer, N., & Estrada-Peña, A. (2016). New molecular data shed light on the global phylogeny and species limits of the *Rhipicephalus sanguineus* complex. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(5),798–807.
- Inokuma, H., Tamura, K., Onishi, T. (1997). Dogs develop resistance to *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet. Parasitol.* 68,295–297.
- Murphy, K., Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. (2012). The Immunologist's Toolbox. In: *Janeway's Immunobiology* (8^aEd., pp. 723-755) Garland Science
- Jittapalapong, S., Stich, R. W., Gordon, J. C., Wittum, T. E., Barriga, O. O. (2000). Performance of female *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fed on dogs exposed to multiple infestations or immunization with tick salivary glands or midgut tissues. *J. Med. Entomol.* 37,601–611.
- Kamani, J., Baneth, G., Mumcuoglu, K. Y., Waziri, N. E., Eyal, O., Guthmann, Y., *et al.* (2013). Molecular Detection and Characterization of Tick-borne Pathogens in Dogs and Ticks from Nigeria. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(3),1–8.

- Kidd, L., Maggi, R., Diniz, P. P. V. P., Hegarty, B., Tucker, M., & Breitschwerdt, E. (2008). Evaluation of conventional and real-time PCR assays for detection and differentiation of Spotted Fever Group Rickettsia in dog blood. *Veterinary Microbiology*, 129(3–4),294–303.
- Kiewra, D., Stanczak, J., & Richter, M. (2014). *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Borrelia miyamotoi* in Lower Silesia, Poland - Preliminary study. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(6),892–897.
- Kohn, B., Silaghi, C., Galke, D., Arndt, G., & Pfister, K. (2011). Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Research in Veterinary Science*, 91(1),71–76.
- Lappin M. R. (2010) Diagnóstico Laboratorial de Doenças Infecciosas. In: R. W. Nelson & C. G. Couto (Eds.), *Medicina Interna de Pequenos Animais* (4ªed., pp. 1281-1290). Elsevier Editora Ltda.
- Latrofa, M. S., Dantas-Torres, F., Giannelli, A., & Otranto, D. (2014). Molecular detection of tick-borne pathogens in *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(6),943–946.
- Lauzi, S., Maia, J. P., Epis, S., Marcos, R., Pereira, C., Luzzago, C., *et al.* (2016). Molecular detection of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* and *Rickettsia monacensis* in dogs from Maio Island of Cape Verde archipelago. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(5),964–969.
- Lee, S., Kim, N., & Kwak, D. (2017). First clinical case of canine granulocytic anaplasmosis in Korea and genotypic analyses of *Anaplasma phagocytophilum*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 8(4),462-465.
- Levin, M. L., Killmaster, L., Zemtsova, G., Grant, D., Mumcuoglu, K. Y., Ereemeeva, M. E., *et al.* (2009). Incongruent effects of two isolates of *Rickettsia conorii* on the survival of *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Experimental and Applied Acarology*, 49(4),347–359.

- Levin, M. L., Killmaster, L. F., & Zemtsova, G. E. (2012). Domestic Dogs (*Canis familiaris*) as Reservoir Hosts for *Rickettsia conorii*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(1),28–33.
- Levin, M. L., Zemtsova, G. E., Montgomery, M., & Killmaster, L. F. (2014). Effects of homologous and heterologous immunization on the reservoir competence of domestic dogs for *Rickettsia conorii* (israelensis). *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(1),33–40.
- Li, Y., Ahluwalia, S. K. & Freeman, M. D. (2012). PCR Detection of Viruses in Veterinary Medicine. *Veterinary PCR diagnostics*, 5,80-97.
- Lilenbaum, W., Rabello, R. F & Dias, R. C. da S. (2012). PCR-Based Diagnosis of Veterinary Bacterial Pathogens. *Veterinary PCR Diagnostics*, 4,59-79.
- Liu, X., Gong, X., Zheng, C., Song, Q., Chen, T., Wang, J., *et al.* (2016). Molecular epidemiological survey of bacterial and parasitic pathogens in hard ticks from eastern China. *Acta Tropica*, 167,26-30.
- Louly, C. C. B., Soares, S. F., Silveira, D. N., Silveira Neto, O. J., Silva, A. C., Borges, L. M. F. (2009). Differences in the susceptibility of two breeds of dogs. English cocker spaniel and beagle, to *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Int. J. Acarol.* 35,25–32.
- Maggi, R. G., Diniz, P. P., Cadenas, M. B. & Breitschwerdt, E.B. (2006) The Use of Molecular Diagnostic Techniques to detect *Anaplasma*, *Bartonella* and *Ehrlichia* Species in Arthropods or Patients. *International CVBD Symposium*.
- Maggi, R. G., Birkenheuer, A. J., Hegarty, B. C., Bradley, J. M., Levy, M. G., & Breitschwerdt, E. B. (2014). Comparison of serological and molecular panels for diagnosis of vector-borne diseases in dogs. *Parasites & Vectors*, 7(1),127.
- Maia, C., & Campino, L. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 158(4),274–287.

- Maia, C., Afonso, M. O., Neto, L., Dionísio, L., & Campino, L. (2009). Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve Region, Portugal. *Journal of Vector Borne Diseases*, 46(4),268–272.
- Maia, C., Ramada, J., Cristóvão, J. M., Gonçalves, L., & Campino, L. (2009). Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. *The Veterinary Journal*, 179(1),142–144.
- Maia, C., Nunes, M., Cristóvão, J., Campino, L. (2010). Experimental canine leishmaniasis: Clinical, parasitological and serological follow-up. *Acta Tropica* 116,193–199
- Maia, C., Dionísio, L., Afonso, M. O., Neto, L., Cristóvão, J. M., & Campino, L. (2013). *Leishmania* infection and host-blood feeding preferences of phlebotomine sandflies and canine leishmaniasis in an endemic European area, the Algarve Region in Portugal. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(4),481–487.
- Maia, C., Ferreira, A., Nunes, M., Vieira, M. L., Campino, L., & Cardoso, L. (2014). Molecular detection of bacterial and parasitic pathogens in hard ticks from Portugal. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(4),409–414.
- Maia, C., Almeida, B., Coimbra, M., Fernandes, M. C., Cristóvão, J. M., Ramos, C., *et al.* (2015). Bacterial and protozoal agents of canine vector-borne diseases in the blood of domestic and stray dogs from southern Portugal. *Parasites & Vectors*, 8,138.
- Maia, C., Coimbra, M., Ramos, C., Cristóvão, J. M., Cardoso, L., & Campino, L. (2015). Serological investigation of *Leishmania infantum*, *Dirofilaria immitis* and *Angiostrongylus vasorum* in dogs from southern Portugal. *Parasites & Vectors*, 8(1),152.
- Maia, C., Altet, L., Serrano, L., Cristóvão, J. M., Tabar, M. D., Francino, O., *et al.* (2016). Molecular detection of *Leishmania infantum*, filariae and *Wolbachia* spp. in dogs from southern Portugal. *Parasites & Vectors*, 9(1),170.

- Medlock, J. M., Hansford, K. M., Bormane, A., Derdakova, M., Estrada-Peña, A., George, J.-C., *et al.* (2013). Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasites & Vectors*, 6(1),1.
- Milne, A. (1949). The ecology of the sheep tick, *Ixodes ricinus* L. Host relationships of the tick: Part 1. Review of previous work in Britain. *Parasitology*, 39(3–4),167–172.
- Miró, G., Gálvez, R., Fraile, C., Descalzo, M. A., & Molina, R. (2011). Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. *Parasites & Vectors*, 4(1),52.
- Miró, G., Montoya, A., Roura, X., Gálvez, R., & Sainz, A. (2013). Seropositivity rates for agents of canine vector-borne diseases in Spain: a multicentre study. *Parasites & Vectors*, 6(1),117.
- Moraes-Filho, J., Krawczak, F. S., Costa, F. B., Soares, J. F., & Labruna, M. B. (2015). Comparative evaluation of the vector competence of four South American populations of the *Rhipicephalus sanguineus* group for the bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of canine monocytic ehrlichiosis. *PLoS ONE*, 10(9),1–16.
- Morar, D., Darabus, G., Imre, M., Ilie, M. S., & Imre, K. (2015). First record of autochthonous canine ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis* in Romania. *Veterinary Clinical Pathology*, 44(2),200–204.
- Muñoz, C., Risueño, J., Yilmaz, A., Pérez-Cutillas, P., Goyena, E., Ortuño, M., *et al.* (2017). Investigations of *Phlebotomus perniciosus* sand flies in rural Spain reveal strongly aggregated and gender-specific spatial distributions and advocate use of light-attraction traps. *Medical and Veterinary Entomology*.
- Mylonakis M. E., Siarkou V. I., Leontides, L., Bourtzi-Hatzopoulou, E., Kontos, V. I., & Koutinas, A., F. (2009). Evaluation of a serum-based PCR assay for the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Microbiology*, 138(3-4), 390-393.

- Mylonakis, M. E., Xenoulis, P. G., Theodorou, K., Siarkou, V. I., Steiner, J. M., Harrus, S., *et al.* (2014). Serum canine pancreatic lipase immunoreactivity in experimentally induced and naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). *Veterinary Microbiology*, 169(3–4),198–202.
- Nava, S., Estrada-Peña, A., Petney, T., Beati, L., Labruna, M. B., Szabó, M. P. J., *et al.* (2015). The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). *Veterinary Parasitology*, 208(1–2),2–8.
- Nicholson, W. L., Allen, K. E., McQuiston, J. H., Breitschwerdt, E. B., & Little, S. E. (2010). The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends in Parasitology*, 26(4),205–212.
- Noli, C., & Auxilia, S. T. (2005). Treatment of canine old world visceral leishmaniasis: A systematic review. *Veterinary Dermatology*, 16(4),213–232.
- Nunes, M., Parreira, R., Lopes, N., Maia, C., Carreira, T., Sousa, C., *et al.* (2015). Molecular Identification of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes ricinus* from Portugal. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 15(8),515–517.
- O'Connor, T., P. (2015). SNAP Assay Technology. *Topics in Companion Animal Medicine*, 30(4), 132-38
- Oliveira, A. M., Diaz, S., Santos, C., Bourdeau, P., & Pereira, I. (2010). Geographical distribution , clinical presentation , treatment and prevention of canine leishmaniosis in Portugal : a 2007 field survey. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 109(573–576),21–29.
- Pantchev, N., Pluta, S., Huisinga, E., Nather, S., Scheufelen, M., Vrhovec, M. G., *et al.* (2015). Tick-borne Diseases (Borreliosis, Anaplasmosis, Babesiosis) in German and Austrian Dogs: Status quo and Review of Distribution, Transmission, Clinical Findings, Diagnostics and Prophylaxis. *Parasitology Research*, 114(1),19-54.

- Parola, P., & Raoult, D. (2001). Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 7(2),80–83.
- Parola, P., Paddock, C.D., Raoult, D. (2005). Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev*, 18,719-756.
- Parola, P., Socolovschi, C., & Raoult, D. (2009). Deciphering the relationships between *Rickettsia conorii conorii* and *Rhipicephalus sanguineus* in the ecology and epidemiology of mediterranean spotted fever. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1166,49–54.
- Pat-Nah, H., Rodriguez-Vivas, R. I., Bolio-Gonzalez, M. E., Villegas-Perez, S. L., & Reyes-Novelo, E. (2015). Molecular diagnosis of *Ehrlichia canis* in dogs and ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Yucatan, Mexico. *Journal of Medical Entomology*, 52(1),101–104.
- Pennisi, M. G., Caprì, A., Solano-Gallego, L., Lombardo, G., Torina, A., & Masucci, M. (2012). Prevalence of antibodies against *Rickettsia conorii*, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma phagocytophilum* antigens in dogs from the Stretto di Messina area (Italy). *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 3(5–6),315–318.
- Pereira, A., Martins, Â., Brancal, H., Vilhena, H., Silva, P., Pimenta, P., *et al.* (2016). Parasitic zoonoses associated with dogs and cats: a survey of Portuguese pet owners' awareness and deworming practices. *Parasites & Vectors*, 9(1),245.
- Perret, J.-L., Guigoz, E., Rais, O., & Gern, L. (2000). Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). *Parasitology Research*, 86(7),554–557.
- Pfäffle, M., Littwin, N., Muders, S. V., & Petney, T. N. (2013). The ecology of tick-borne diseases. *International Journal for Parasitology*, 43(12–13),1059–1077.

- Potkonjak, A., Gutiérrez, R., Savic, S., Vracar, V., Nachum-Biala, Y., Jurisic, A., et al. (2016). Molecular detection of emerging tick-borne pathogens in Vojvodina, Serbia. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(1),199–203.
- Proboste, T., Kalema-Zikusoka, G., Altet, L., Solano-Gallego, L., Fernández de Mera, I. G., Chirife, A. D., et al. (2015). Infection and exposure to vector-borne pathogens in rural dogs and their ticks, Uganda. *Parasites & Vectors*, 8,306.
- Ramalho, S., (2017). Como atua a Letifend, a nova vacina contra a Leishmaniose Canina? Acedido em Novembro de 2017 em <https://www.veterinaria-atual.pt/na-clinica/atua-letifend-nova-vacina-leishmaniose-canina/>
- Ramos, C. A. N., Ramos, R. A. N., Araújo, F. R., Guedes Jr, D. S., Souza I. I. F., Ono, T. M. (2009). Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18(1),58–62.
- Randolph, S. E., Green, R. M., Hoodless, A. N., & Peacey, M. F. (2002). An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. *International Journal for Parasitology*, 32(8),979–989.
- Regnery, R., Spruill, C. L., Plikaytis, B., D. (1991). Genotypic identification of rickettsiae and estimation of interspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *Journal of Bacteriology*, 173 (5),1576-1589.
- Romero, L. E., Meneses, A. I., Salazar, L., Jiménez, M., Romero, J. J., Aguiar, D. M., et al. (2011). First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Costa Rica, Central America. *Research in Veterinary Science*, 91(1),95–97.
- Rufino, C. P., Moraes, P. H., Reis, T., Campos, R., Aguiar, D. C., McCulloch, J. A., et al. (2013) Detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* DNA using multiplex PCR. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 13(12),846-850.

- Sainz, Á., Roura, X., Miró, G., Estrada-Peña, A., Kohn, B., Harrus, S., *et al.* (2015). Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasites & Vectors*, 8(1),75.
- Santos, F., Coppede, J. S., Pereira, A. L. A., Oliveira, L. P., Roberto, P. G., Benedetti, R. B. R., *et al.* (2009). Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. *Veterinary Journal*, 179(1),145–148.
- Santos, H. A., Thomé, S. M., Baldani, C. D., Silva, C. B., Peixoto, M. P., Pires, M. S., *et al.* (2013). Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. *Parasites & Vectors*, 6(1),348.
- Scorpio, D. G., Dumler, J. S., Barat, N. C., Cook, J. A., Barat, C. E., Stillman, B. A., *et al.* (2011). Comparative strain analysis of *Anaplasma phagocytophilum* infection and clinical outcomes in a canine model of granulocytic anaplasmosis. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 11(3),223–9.
- Sfar, N., Kaabia, N., Letaïef, A., Rolain, J. M., Parola, P., Bouattour, A., *et al.* (2009). First molecular detection of *R. conorii* subsp. *conorii* 99 years after the conor description of Mediterranean spotted fever, in Tunisia. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(2),309–310.
- Shasheen, B. W., Nayak, R & Boothe, D. M. (2012). Antimicrobial Resistance in Bacterial Pathogens: Mechanisms and PCRBased Detection Technologies. *Veterinary PCR Diagnostics*, 3,33-58.
- Shaw, S. E., Day, M. J., Birtles, R. J., & Breitschwerdt, E. B. (2001). Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends in Parasitology*, 17(2),74–80.

- 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.
- Smith, F. D., & Wall, L. E. R. (2013). Prevalence of *Babesia* and *Anaplasma* in ticks infesting dogs in Great Britain. *Veterinary Parasitology*, 198(1–2),18–23.
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Osso, M., Hegarty, B., Breitschwerdt, E. (2006). A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Vet Res*, 37(2),231–244.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., *et al.* (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165(1–2),1–18.
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., *et al.* (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, 4,86.
- Solano-Gallego, L., Caprì, A., Pennisi, M. G., Caldin, M., Furlanello, T., & Trotta, M. (2015). Acute febrile illness is associated with *Rickettsia* spp. infection in dogs. *Parasites & Vectors*, 8(1),216.
- Sousa, R., Ismail, N., Dória-Nóbrega, S., Costa, P., Abrey, T., França, A., *et al.* (2005). The presence of eschars, but not greater severity, in portuguese patients infected with israeli spotted fever. *Annals of The New York Academy of Sciences*, 1063,197-202.
- Starkey, L. A., Barrett, A. W., Chandrashekar, R., Stillman, B. A., Tyrrell, P., Thatcher, B., *et al.* (2014). Development of antibodies to and PCR detection of *Ehrlichia* spp. in dogs following natural tick exposure. *Veterinary Microbiology*, 173(3–4),379–384.

- Starkey, L. A., Newton, K., Brunner, J., Crowdis, K., Edourad, E. J. P., Meneus, P., *et al.* (2016). Prevalence of vector-borne pathogens in dogs from Haiti. *Veterinary Parasitology*, 224,7–12.
- Strauss-Ayali, D., Jaffe, C. L., Burshtain, O., Gonen, L., & Baneth, G. (2014). Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *The Journal of Infectious Diseases*, 189(9),1729–1733.
- Taylor, M. A., Coop, R. L., & Wall, R. L. (2007). Parasite taxonomy and morphology - Protozoology. In: *Veterinary parasitology* (3rded., p.133). Blackwell publishing
- Theodorou, K., Leontides, L., Siarkou, V. I., Petanides, T., Tsafas, K., Harrus, S., *et al.* (2015). Synovial fluid cytology in experimental acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). *Veterinary Microbiology*, 177(1–2),224–227.
- Tsachev, I. (2009). Canine Granulocytic Anaplasmosis. *Trakia Journal of Sciences*, 7(1),2–5.
- Víchová, B., Majláthová, V., Nováková, M., Stanko, M., Hviščová, I., Pangráčová, L., *et al.* (2014). Anaplasma infections in ticks and reservoir host from Slovakia. *Infection, Genetics and Evolution*, 22,265–272.
- Waner, T., Nachum-Biala, Y., & Harrus, S. (2014). Evaluation of a commercial in-clinic point-of-care polymerase chain reaction test for *Ehrlichia canis* DNA in artificially infected dogs. *Veterinary Journal*, 202(3),618–621.
- Warren, A. L. (2014). Veterinary Clinical Laboratory Immunology. In: G.N. Callahan & R.M. Yates (Eds). *Basic Veterinary Immunology* (1stEd., pp. 300-302). University Press of Colorado.
- Wengenmayer, C., Williams, H., Zschiesche, E., Moritz, A., Langenstein, J., Roepke, R. K., *et al.* (2014). The speed of kill of fluralaner (BravectoTM) against *Ixodes ricinus* ticks on dogs. *Parasites & Vectors*, 7(1),525.

Yisaschar-Mekuzas, Y., Jaffe, C. L., Pastor, J., Cardoso, L., & Baneth, G. (2013). Identification of *Babesia* species infecting dogs using reverse line blot hybridization for six canine piroplasms, and evaluation of co-infection by other vector-borne pathogens. *Veterinary Parasitology*, 191(3–4), 367–373.

APÊNDICE I

Projeto “SOS dos Animais de Moura”
12 de Janeiro de 2016

Identificação do animal: _____

Idade aproximada: Jovem (<1 ano) ____ Adulto (>1 ano) ____ Sênior (>10 anos) ____

Sexo: Fêmea ____ Macho ____

Há quanto tempo o animal se encontra no canil? _____

Doenças/Cirurgias anteriores. _____

Uso de desparasitante externo? Sim ____ Não ____ Qual? _____

Uso de desparasitante interno? Sim ____ Não ____ Qual? _____

Presença de carrapatos? Sim ____ Não ____

Presença de pulgas? Sim ____ Não ____ Talvez ____

Figura 37 – Questionário preenchido pela responsável pelo canil em relação a cada animal ao qual foi recolhido sangue para análise.

APÊNDICE II

Tabela 16 – Comparação dos resultados obtidos nas diferentes técnicas serológicas e moleculares para todos os cães em estudo.

	Idade (anos)	Tempo de permanência no canil	Achados leucocitários	Achados plaquetários	PCR positiva	Serologia positiva
Cão 1 (♂)	1,5 – 2	24 horas	Leucocitose, neutrofilia, linfocitose e monocitopenia	Trombocitopenia	-	<i>R. conorii</i>
Cão 2 (♂)	8	Desde cachorro	Eosinopenia	-	-	<i>R. conorii</i> e <i>L. infantum</i>
Cão 3 (♂)	1	2 semanas	-	Trombocitopenia	-	<i>R. conorii</i> , <i>L. infantum</i> , <i>E. canis</i> e <i>A. phagocytophilum</i>
Cão 6 (♂)	5 – 6	3 anos	-	-	-	<i>R. conorii</i>
Cão 7 (♂)	6	Desde cachorro	-	-	<i>E. canis</i>	<i>R. conorii</i> e <i>E. canis</i>
Cão 8 (♂)	3 – 4	Desde cachorro	-	-	-	<i>R. conorii</i>
Cão 9 (♂)	10	7 anos	-	-	-	<i>R. conorii</i>
Cão 10 (♂)	7	5 – 6 anos	-	-	-	<i>R. conorii</i>

Cão 11 (♂)	5 – 6	Desde cachorro	Eosinopenia	-	<i>E. canis</i>	<i>R. conorii, L. infantum, E. canis e A. phagocytophilum</i>
Cão 12 (♂)	6	4 – 5 anos	-	-	-	<i>R. conorii e E. canis</i>
Cão 13 (♂)	4 – 5	Desde cachorro	-	-	-	<i>R. conorii, L. infantum e E. canis</i>
Cão 14 (♂)	4	Desde cachorro	-	-	-	<i>R. conorii, E. canis e A. phagocytophilum</i>
Cão 15 (♀)	9	7 – 8 anos	Linfocitose	-	-	<i>R. conorii, L. infantum, E. canis e A. phagocytophilum</i>
Cão 16 (♂)	2	1 ano	Eosinofilia	Trombocitopenia	-	<i>R. conorii e L. infantum</i>
Cão 17 (♀)	3 – 4	1 mês	Linfocitose e eosinofilia	-	-	<i>R. conorii e A. phagocytophilum</i>
Cão 18 (♀)	5 – 6	6 meses	-	Trombocitopenia	-	<i>R. conorii e L. infantum</i>
Cão 19 (♀)	10	Desde cachorro	-	-	-	<i>R. conorii e E. canis</i>
Cão 20 (♂)	6 – 7	4 anos	-	-	-	<i>R. conorii e E. canis</i>

Cão 21 (♀)	5	3 – 4 anos	Neutropenia e monocitopenia	-	<i>E. canis</i>	<i>R. conorii</i> , <i>E. canis</i> e <i>A. phagocytophilum</i>
Cão 22 (♂)	8 – 9	7 anos	-	-	-	<i>R. conorii</i> e <i>E. canis</i>
Cão 23 (♀)	8	Desde cachorro	Monocitopenia e eosinofilia	-	<i>A. platys</i>	<i>R. conorii</i> e <i>E. canis</i>
Cão 24 (♂)	8	Desde cachorro	Monocitopenia	-	<i>E. canis</i>	<i>R. conorii</i> e <i>E. canis</i>
Cão 25 (♂)	7	5 – 6 anos	Eosinofilia	-	-	<i>R. conorii</i> e <i>L. infantum</i>
Cão 26 (♀)	6	5 anos	Eosinofilia	-	-	<i>R. conorii</i> e <i>E. canis</i>
Cão 27 (♂)	4	3 anos	-	-	-	<i>R. conorii</i> e <i>L. infantum</i>
Cão 28 (♂)	7 – 8	6 anos	-	-	<i>E. canis</i>	<i>R. conorii</i> e <i>L. infantum</i>
Cão 29 (♂)	6	4 anos	-	-	<i>A. platys</i>	<i>R. conorii</i> , <i>E. canis</i> e <i>A. phagocytophilum</i>
Cão 31 (♂)	1	Desde cachorro	-	-	-	<i>R. conorii</i>