



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

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

DETEÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS E PARASITAS EM
Rhipicephalus sanguineus sensu lato DE PORTUGAL

Dissertação apresentada a provas públicas para a obtenção do grau de mestre em
Medicina Veterinária, orientada por Professora Doutora Inês Delgado.

Andreia Filipa Das Neves Ferreira, nº 20062361

2024

www.ulusofona.pt



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

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

DETEÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS E PARASITAS EM
Rhipicephalus sanguineus sensu lato DE PORTUGAL

VERSÃO FINAL

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa, no dia 11/04/2024, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação n.º 770/2024, de 18 de Março, com a seguinte composição:

Presidente: Professor Doutor Pedro Faísca

Arguente: Professora Doutora Ana Munhoz (FMV-Ulusófona)

Orientador: Professora Doutora Inês Delgado

Este trabalho também foi orientado por Investigadora Doutora Carla Maia (orientador externo).

Andreia Filipa Das Neves Ferreira, n.º 20062361

2024

Agradecimentos

Depois de muito trabalho e longas horas de dedicação, aquela que sempre foi e sempre será a minha grande paixão, a Medicina Veterinária, encontro-me preenchida por um enorme sentimento de gratidão porque sem as pessoas que em baixo passo a citar nada disto seria possível.

À Professora Doutora Laurentina Pedroso, por todo o total apoio e disponibilidade que me incentivaram durante todo o meu percurso académico e que deram força para seguir em frente, muitas vezes em situações desesperantes no trabalho. Um obrigado gigante que ficará registado sempre no meu coração.

À Professora Doutora Carla Maia devo não só o tempo disponibilizado e os conhecimentos científicos transmitidos como também o entusiasmo e dedicação que sempre me contagiaram e me fizeram ter uma admiração enorme pela força e pelo amor que a Professora tem a esta profissão. Os meus mais sinceros agradecimentos por ter feito parte de forma tão marcante do meu percurso académico e me fazer querer ser sempre melhor seguindo o seu exemplo. Como resultado desta dissertação, tivemos o privilégio e o orgulho de partilhar as conclusões/evidências obtidas num artigo científico na revista internacional com arbitragem científica *Ticks and Tick-Borne Diseases*. O que me deixou tremendamente realizada e com a certeza que escolhi as pessoas certas e por isso reforço o meu sincero agradecimento.

À Doutora Inês Delgado pela disponibilidade demonstrada e apoio incansável nesta dissertação, como se nos conhecessemos desde sempre e o grande à vontade que senti desde que começamos esta etapa juntas.

À Mestre Cláudia Ramos devo o exemplo do que é ser uma excelente profissional.

Ao Dr. Mauro Bragança, por me ter ajudado na análise estatística.

Às Mestres Mónica Nunes e Nádía Gomes, do grupo de leptospirose e borreliose de Lyme, unidade de Microbiologia Médica, Instituto de Higiene e Medicina Tropical (UNL) pela colaboração na identificação taxonómica dos ixodídeos deste estudo.

Ao Professor Gad Baneth da Faculdade de Medicina Veterinária de Israel (Hebrew University), à Professora Margarida Alves da Faculdade de Medicina Veterinária (Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia), à Doutora Krystina Venclikova da Academia de Ciências da República Checa e ao Professor Domenico Otranto do Departamento de Medicina Veterinária de Itália (Universidade de Bari) pela cedência dos controlos positivos de *Ehrlichia canis*, *Bartonella henselae*, *Rickettsia* spp., *Cercopithifilaria* sp., respetivamente, utilizados na parte prática desta dissertação.

À Professora Doutora Lenea Campino, líder do grupo de Leishmanioses do IHMT e à sua equipa, Doutora Sofia Cortes, Mestre José Cristóvão e Mestre Andreia Albuquerque agradeço a oportunidade, apoio e amizade.

Ao meu pai, Joaquim, por todo o seu apoio, generosidade e exemplo. "Dedico-te esta etapa que tanto ansiamos. És o motor da minha vida, o meu orgulho e foste tu que me ensinaste a não parar de sonhar e eu sei que hoje celebras comigo esta alegria de encerrar esta etapa abrindo portas para as novas jornadas".

Ao meu avô Vicente e avó Alice por me terem ajudado quando mais precisei. "Querido avô até há pouco tempo eras um centenário, cumpri o prometido".

Ao meu filho Diego, que és o meu presente de Deus e sua maior dádiva, o meu significado da palavra amor.

Aos meus queridos animais que me acompanham e aos que já partiram porque o enorme amor que sinto por eles fez-me chegar até aqui! Muito obrigada.

Os resultados incluídos na presente Dissertação foram aceites para publicação na revista internacional com arbitragem científica *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 2014, 5: 409-414: Maia C., **Ferreira A.**, Nunes M., Vieira ML., Campino L., Cardoso L. **Molecular detection of bacterial and parasitic pathogens in hard ticks from Portugal**, e foram apresentados no “Joint Irish Society for Parasitology, British Association for Veterinary Parasitology and European Veterinary Parasitology College Conference meeting” que teve lugar nos dias 12 e 13 Junho de 2014 em Dublin, Irlanda.

Resumo

As carraças são artrópodes hematófagos obrigatórios não permanentes de vertebrados terrestres, sendo responsáveis pela manutenção e transmissão de vários agentes patogénicos (bactérias, parasitas e vírus), afetando uma grande variedade de animais, incluindo o ser humano. Como a informação acerca dos agentes causadores de doença que circulam nas carraças é limitada em Portugal, o objectivo do presente estudo foi detetar, através da técnica de reacção em cadeia da polimerase e sequenciação, a presença de bactérias e parasitas com importância veterinária e zoonótica em carraças colhidas de cães, gatos e da vegetação.

Um total de 919 *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, compreendendo 882 (96,0%) adultos, 8 (1,0%) ninfas e 29 (3,0%) larvas foram colhidos em quatro distritos de Portugal (Guarda, Lisboa, Setúbal e Faro). Entre estes, 620 (67,5%) foram removidos de cães naturalmente infestados, 36 (3,9%) de gatos e 263 (28,6%) foram colhidas da vegetação.

Os agentes bacterianos *Rickettsia* sp., *Rickettsia conorii* e *Rickettsia massiliae* foram identificados em 41 (4,5%) de 919 carraças analisadas. Foi detetado ADN de *Hepatozoon felis* (n=4), *Hepatozoon canis* (n=2), *Anaplasma platys* (n=3), *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia vogeli* (n=1), *Borrelia burgdorferi* sensu lato (n=1) e *Cercopithifilaria* spp. (n=1), incluindo uma co-infecção por *Hepatozoon felis* e *Rickettsia massiliae*. Não se detetou a presença de ADN de *Bartonella* sp. ou de *Leishmania infantum* em nenhuma carraça. Esta foi a primeira vez que se amplificou ADN de *Cercopithifilaria* spp., *B. vogeli*, *H. canis* e *H. felis* em carraças em Portugal.

A ampla gama de agentes patogénicos transmitidos por carraças identificados, alguns com potencial zoonótico, sugere um risco para os animais domésticos e seres humanos em Portugal. Estudos adicionais sobre estes e outros agentes transmitidos por carraças devem ser realizados para compreender melhor a sua importância epidemiológica e clínica, e para permitir a implementação de medidas de controlo eficazes.

Palavras-chave: agentes patogénicos transmitidos por carraças; *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato; cão; gato; Portugal; reacção em cadeia da polimerase.

Abstract

Ticks are hematophagous arthropods, being responsible for the maintenance and transmission of various pathogens (bacteria, parasites and viruses) that affect a variety of animals, including humans. Information about tick-borne agents circulating in Portugal is limited, hence the aim of the present study was to detect, by polymerase chain reaction and sequencing, the presence of bacteria and parasites with veterinary and zoonotic importance in ticks collected from dogs, cats and field vegetation.

A total of 919 *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.), comprising 882 (96.0%) adults, eight (1.0%) nymphs and 29 (3.0%) larvae, were collected in four districts of Portugal (Guarda, Lisbon, Setubal and Faro). Among those, 620 (67.5%) were removed from naturally infested dogs, 36 (3.9%) from cats and 263 (28.6%) were questing ticks obtained from the vegetation.

Rickettsia sp., *Rickettsia conorii* and *Rickettsia massiliae* were identified in 41 (4.5%) out of the 919 analyzed ticks. Four *R. sanguineus* s.l. specimens were found infected with *Hepatozoon felis*, two with *Hepatozoon canis*, three with *Anaplasma platys*, one with *Anaplasma phagocytophilum*, one with *Babesia* spp., one with *Babesia vogeli*, one with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and one with *Cercopithifilaria* spp., including one tick co-infected with *H. felis* and *R. massiliae*. None of the tested ticks was positive by PCR for *Bartonella* sp. or *Leishmania infantum*.

To the best of our knowledge, this was the first time that *Cercopithifilaria* spp., *B. vogeli*, *H. canis*, and *H. felis* have been detected in ticks from Portugal. The wide range of identified tick-borne pathogens, some of zoonotic concern, suggests a risk of tick-borne diseases in domestic animals and humans in Portugal. Further studies on these and other tick-borne agents should be performed to better understand their epidemiological and clinical importance, and to allow the implementation of effective control measures.

Keywords: tick-borne pathogens; *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato; dog; cat; Portugal; polymerase chain reaction.

Lista de abreviaturas

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

AGH - Anaplasrose Granulocítica Humana

AGC - Anaplasrose Granulocítica Canina

ARN - Ácido Ribonucléico

BL – Borreliose de Lyme

CMF - Câmara Municipal de Faro

CML - Câmara Municipal de Lisboa

CMG - Câmara Municipal da Guarda

CMS - Câmara Municipal de Setúbal

DDBJ - “DNA Data Bank of Japan” (Base de dados de ADN do Japão)

Et al. - E outros, da locução latina “*et alii*”

EUA - Estados Unidos da América

FEN - Febre Escaro-Nodular

IGEOE - Instituto Geográfico do Exército

IHMT - Instituto de Higiene e Medicina Tropical

INE - Instituto Nacional de Estatística

ITS - Internal Transcribed Spacer

Km² -quilómetro quadrado

LC - Leishmaniose cutânea

MSF - “Mediterranean Spotted Fever” (Febre botonosa ou escaro-nodular)

mg - Miligrama

mA - Miliampere

ml - Mililitro

mm - Milimetro

min. - Minuto

µg - Micrograma

µl - Microlitro

mA - miliampere

ml - mililitro

mtDNA - ADN mitocondrial

°C - Graus Celcius

pb - Pares de bases

PCR - “Polymerase Chain Reaction” (Reação em Cadeia da Polimerase)

“Primer” - Sequência iniciadora

RML - Região Metropolitana de Lisboa

Seg. - Segundos

s.l. - Sensu lato

s.s. - Sensu stricto

Taq - *Thermophilus aquaticus*

TCC - Trombocitopénia Cíclica Canina

UV - Ultra Violeta

µl - microlitro

VIH - Vírus da Imunodeficiência Humana

V - Volt

® - Marca registada

Índice Geral

Agradecimentos	2
Resumo	5
Abstract	6
Lista de abreviaturas	7
Índice Geral	9
Índice de Tabelas	13
Índice de Figuras	14
Casuística do estágio	16
I. Introdução	18
I.1. Ixodídeos	18
I.1.1. Morfologia e identificação	19
I.1.1.1. Complexo <i>Rhipicephalus sanguineus</i> sensu lato	20
I.1.1.1. A. Hospedeiros	23
I.1.1.1. B. Ciclo de vida	23
I.2. Bactérias transmitidas por carraças	26
I.2.1. <i>Anaplasma</i> spp./ <i>Ehrlichia</i> spp.	26
I.2.1.1. Taxonomia	26
I.2.1.1.A. <i>Anaplasma platys</i>	27
I.2.1.1.A.1. Etiologia	27
I.2.1.1.A.2. Hospedeiro invertebrado	27
I.2.1.1.A.3. Hospedeiro vertebrado	27
I.2.1.1.A.4. Ciclo de vida	27
I.2.1.1.A.5. Saúde pública	28
I.2.1.1.B. <i>Ehrlichia canis</i>	28
I.2.1.1.B.1. Etiologia	28
I.2.1.1.B.2. Hospedeiro invertebrado	29
I.2.1.1.B.3. Hospedeiro vertebrado	29
I.2.1.1.B.4. Ciclo de vida	29
I.2.1.1.B.5. Saúde pública	30
I.2.2. <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	31
I.2.2.1. Etiologia	31
I.2.2.1.2. Hospedeiro invertebrado	31
I.2.2.1.3. Hospedeiro vertebrado	32
I.2.2.1.4. Ciclo de vida	33

I.2.2.1.5. Saúde pública	35
I.2.3. <i>Rickettsia</i> spp.	36
I.2.3.1. Etiologia	36
I.2.3.2. Hospedeiro invertebrado	36
I.2.3.3. Hospedeiro vertebrado	37
I.2.3.4. Ciclo de vida	37
I.2.3.5. Saúde pública	39
I.3. Bactérias transmitidas por pulgas	39
I.3.1. <i>Bartonella</i> spp.	39
I.3.1.1. Etiologia	39
I.3.1.2. Hospedeiro invertebrado	39
I.3.1.3. Hospedeiro vertebrado	40
I.3.1.4. Ciclo de vida	41
I.3.1.5. Saúde pública	41
I.4. Filarídeos transmitidos por carraças	42
I.4.1. <i>Cercopithifilaria</i> spp.	42
I.4.1.1. Etiologia	42
I.4.1.2. Hospedeiro invertebrado	42
I.4.1.3. Hospedeiro vertebrado	43
I.4.1.4. Ciclo de vida	43
I.4.1.5. Saúde pública	43
I.5. Protozoários transmitidos por carraças	44
I.5.1. <i>Babesia</i> spp.	44
I.5.1.1 Etiologia	44
I.5.1.2. Hospedeiro invertebrado	44
I.5.1.3. Hospedeiro vertebrado	45
I.5.1.4. Ciclo de vida	45
I.5.1.5. Saúde pública	47
I.5.2. <i>Hepatozoon</i> spp.	47
I.5.2.1. Etiologia	47
I.5.2.2. Hospedeiro invertebrado	48
I.5.2.3. Hospedeiro vertebrado	48
I.5.2.4. Ciclo de vida	48
I.5.2.5. Saúde pública	50
I.6. Protozoários transmitidos por flebótomos	50
I.6.1. <i>Leishmania infantum</i>	50

I.6.1.1. Etiologia	50
I.6.1.2. Hospedeiro invertebrado	51
I.6.1.3. Hospedeiro vertebrado	51
I.6.1.4. Ciclo de vida	52
I.6.1.5. Saúde pública	53
I.7. Controlo de ixodídeos	54
I.8 Objetivos	55
II. Materiais e métodos	56
II.1. Áreas geográficas de estudo	56
II.1.1. Caracterização das áreas geográficas das amostras	57
II.2. Métodos de captura dos ixodídeos	58
II.3. Identificação de carraças do complexo <i>R. sanguineus</i> sensu lato	59
II.4. Pesquisa de ADN de <i>Anaplasma</i> spp./ <i>Ehrlichia</i> spp., <i>Bartonella</i> spp., <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato. e <i>Rickettsia</i> spp., <i>Cercopithifilaria</i> spp., <i>Babesia</i> spp., <i>Hepatozoon</i> spp. e <i>Leishmania infantum</i>	59
II.4.1. Extração de ADN dos ixodídeos	60
II.4.2. Controlo de Extração de ADN – Amplificação parcial do gene <i>16S rDNA</i>	61
II.4.3. Pesquisa de ADN de <i>Anaplasma</i> spp./ <i>Ehrlichia</i> spp.	61
II.4.4. Pesquisa de ADN de <i>Babesia</i> spp.	62
II.4.5. Pesquisa de ADN da <i>Bartonella</i> spp.	62
II.4.6. Pesquisa de ADN do complexo <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	63
II.4.7. Pesquisa de ADN de <i>Cercopithifilaria</i> spp.	63
II.4.8. Pesquisa de ADN de <i>Hepatozoon</i> spp.	64
II.4.9. Pesquisa de ADN de <i>Leishmania infantum</i>	64
II.4.10. Pesquisa de ADN de <i>Rickettsia</i> spp.	65
II.5. Purificação de fragmentos de ADN a partir do gel de agarose	66
II.6. Sequenciação e análise dos segmentos de ADN purificados	66
III. Resultados	67
III.1 Caracterização da amostra	67
III.2. Pesquisa de ADN dos agentes patogénicos em estudo através da técnica de PCR	68
III.2.1 <i>Anaplasma</i> spp.	68
III.2.2. <i>Babesia</i> spp.	69
III.2.3. <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	70
III.2.4. <i>Cercopithifilaria</i> spp.	70
III.2.5. <i>Hepatozoon</i> spp.	70
III.2.6. <i>Rickettsia</i> spp.	71

IV. Discussão	73
IV.1. <i>Anaplasma phagocytophilum</i> e <i>Anaplasma platys</i>	73
IV.2. <i>Babesia</i> spp.	74
IV.3. <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	75
IV.4. <i>Cercopithifilaria</i> spp.	75
IV.5. <i>Hepatozoon</i> spp.	75
IV.6. <i>Rickettsia</i> spp.	76
IV.7. Co-infecção	77
V. Conclusão	78
VI. Referências bibliográficas	79

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Chave taxonómica para os principais géneros de ixodídeos presentes em Portugal	20
Tabela 2 - Número de ixodídeos colhidos nos distritos da Guarda, Lisboa, Setúbal e Faro	67
Tabela 3 - Agentes detetados por PCR e resultados da sequenciação em ixodídeos de Portugal de acordo com a região geográfica, hospedeiro vertebrado, sexo e número de espécimens	72

Índice de Figuras

Figura 1 - Caraterização da amostra quanto à fase de desenvolvimento (n=919)	16
Figura 2 - Caraterização da amostra quanto ao sexo (n=882)	16
Figura 3 - Caraterização da amostra quanto às áreas geográficas de estudo (n=919)	16
Figura 4 - Caraterização da amostra quanto à sua proveniência (n=919)	16
Figura 5 - Caraterização da amostra quanto à sua região geográfica em relação com a sua colheita no hospedeiro vertebrado/vegetação	17
Figura 6 - Algumas espécies de carraças de corpo duro existentes em Portugal	19
Figura 7 - Macho e fêmea do complexo <i>R. sanguineus</i> sensu lato	22
Figura 8 - Dois estágios imaturos (<i>Rhipicephalus</i> spp.). A: larva; B: ninfa	22
Figura 9 - Ciclo de vida da carraça pertencente ao complexo <i>R. sanguineus</i> sensu lato	24
Figura 10 - Formas adultas do complexo <i>R. sanguineus</i> sensu lato. A: fêmea engorgitada; B: fêmea na fase final da postura	25
Figura 11 - Esfregaços sanguíneos de dois cães, com inclusões basófilas de <i>Anaplasma platys</i> dentro de plaquetas. A: mórulas no interior de três plaquetas; B: mórula numa plaqueta	28
Figura 12 - A: Esfregaço de medula óssea de um cão onde se visualiza um macrófago contendo uma mórula de <i>E. canis</i> ; B: Esfregaço de sangue onde se observa uma mórula de <i>E. canis</i> no citoplasma de um monócito	30
Figura 13 - Duas fêmeas de <i>Ixodes ricinus</i> , vetor, espécie vetor de <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato na Europa. A: fêmea não alimentada; B: fêmea engorgitada	32
Figura 14 - Ciclo de vida de <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato através dos três estádios de desenvolvimento dos ixodídeos (larva, ninfa e adultos)	34
Figura 15 - Espiroquetas de <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato visualizadas por microscopia electrónica (A); por microscopia de fundo escuro (B)	35
Figura 16 - Ciclo de vida para as riquétsias do grupo das febres exantemáticas	38
Figura 17 - Pulga do gato, <i>Ctenocephalides felis</i> , principal vetor artrópode de <i>Bartonella henselae</i>	40
Figura 18 - A: larva infetante (L3) de <i>Cercopithifilaria</i> sp. numa ninfa de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> ; B: terceiro estágio larvar (L3) de <i>Cercopithifilaria Baina</i> detetado numa carraça adulta	43
Figura 19 - Esfregaços sanguíneos de cães infetados com <i>Babesia</i> spp.. A: Eritrócitos infetados com <i>Babesia canis</i> ; B: Eritrócitos com dois trofozoítos de <i>Babesia vogeli</i>	44
Figura 20 - Fêmea (A) e macho (B) da espécie <i>Dermacentor reticulatus</i>	45
Figura 21 - Ciclo de vida de <i>Babesia canis</i>	46

Figura 22 – Esfregaços de sangue periférico corados por Giemsa, infetados por <i>Hepatozoon canis</i> , onde se visualiza um gamonte no citoplasma de um neutrófilo (A) e de um monócito (b); C: Oocisto maduro de <i>H. canis</i> no hemocelio de <i>R. sanguineus</i> s.l.	49
Figura 23 - Ciclo de vida de <i>Hepatozoon canis</i>	50
Figura 24 - <i>Phlebotomus perniciosus</i> , fêmea engorgitada	51
Figura 25 - Formas amastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	52
Figura 26 - Mapa representativo dos quatro distritos de Portugal onde foram capturados os ixodídeos	56
Figura 27 - Técnica de arrasto com flanela branca para a colheita de ixodídeos no meio ambiente	58
Figura 28 - Diagrama de execução	59
Figura 29 - Procedimento de extração de ADN de ixodídeos. A: uso de uma lâmina esterilizada para cortar metade do ixodídeo fêmea engorgitada; B: ebulição a 100° C durante 20 minutos (B)	60
Figura 30 - Caraterização da amostra quanto à fase de desenvolvimento	67
Figura 31 - Caraterização da amostra quanto ao sexo	67
Figura 32 - Eletroforese em gel de agarose com os resultados da amplificação do gene 16S <i>rRNA</i> mitocondrial da carraça	68
Figura 33 - Eletroforese em gel de agarose com os resultados da amplificação parcial do gene 16S <i>rDNA</i> de <i>Anaplasma</i> spp.	69
Figura 34 - Eletroforese em gel de agarose com os resultados da amplificação parcial do gene 18S <i>rDNA</i> de <i>Babesia</i> spp.	69
Figura 35 - Eletroforese em gel de agarose com os resultados da amplificação do gene <i>cox1</i> de <i>Cercopithifilaria</i> spp.	70
Figura 36 - Eletroforese em gel de agarose com os resultados da amplificação parcial do gene 18S <i>rDNA</i> de <i>Hepatozoon</i> spp.	71
Figura 37 - Eletroforese em gel de agarose com os resultados da amplificação parcial do gene <i>gltA</i> de <i>Rickettsia</i> spp.	71

Casuística do estágio

A presente dissertação foi desenvolvida no âmbito do Mestrado Integrado de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona e baseou-se no estágio curricular realizado na Unidade de Parasitologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, na área da investigação, Universidade Nova de Lisboa.

O estágio curricular do autor teve início a dia um de Março de 2013 e o término deu-se a dia 30 de Setembro de 2013.

A amostra recolhida no âmbito do estágio incluiu a recolha de um total de 919 espécimes do complexo *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: 882 adultos, 8 ninfas e 29 larvas (Fig.1). Dos 882 ixodídeos adultos, 307 eram exemplares masculinos e 580 eram exemplares femininos (Fig. 2).

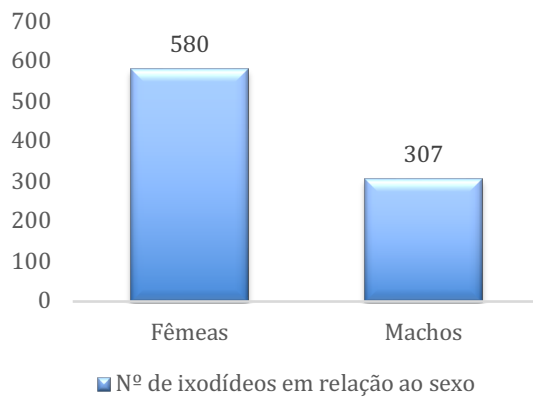


Figura 1 – Caraterização da amostra quanto à fase de desenvolvimento (n=919).

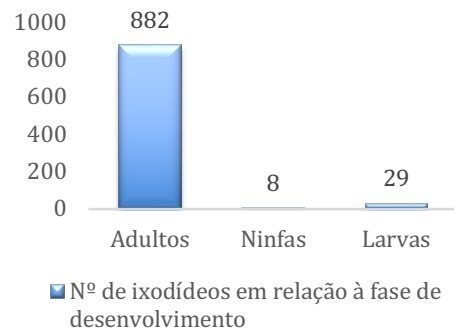


Figura 2 – Caraterização da amostra quanto ao sexo (n=882).

Especificamente, foram colhidos 60 espécimes no distrito da Guarda, 77 no distrito de Lisboa, 191 no distrito de Setúbal e 591 no distrito de Faro (Fig. 3).

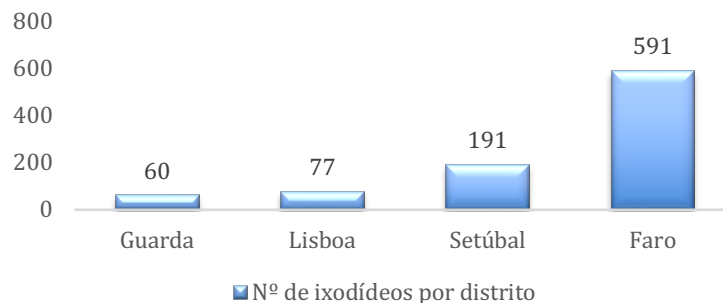


Figura 3 – Caraterização da amostra quanto às áreas geográficas de estudo (n=919).

Seiscentos e vinte ixodídeos foram removidos de 116 cães, 36 de oito gatos e 263 da vegetação (Fig. 4).

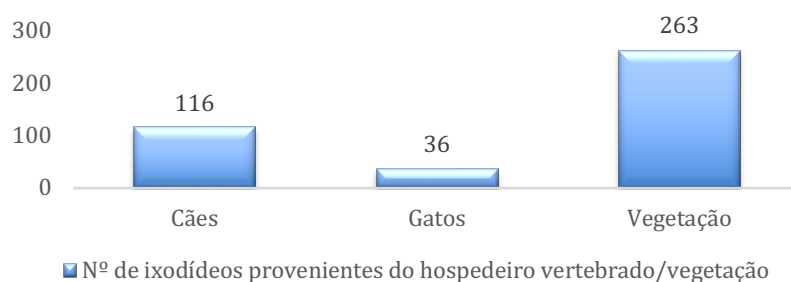


Figura 4 – Caraterização da amostra quanto à sua proveniência (n=919).

Os ixodídeos colhidos da vegetação eram todos provenientes do distrito de Faro (Fig.5).

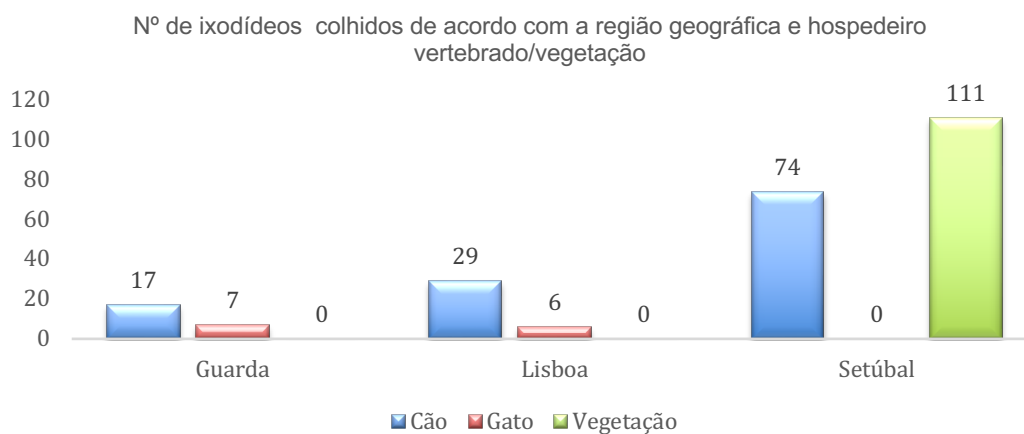


Figura 5 – Caraterização da amostra quanto à sua região geográfica em relação com a sua colheita no hospedeiro vertebrado/vegetação (n=919).

I. Introdução

As carraças são artrópodes hematófagos obrigatórios não permanentes de vertebrados terrestres, sendo responsáveis pela manutenção e transmissão de vários agentes patogénicos (bactérias, parasitas e vírus), afetando uma grande variedade de animais, incluindo o ser humano (Chomel, 2011; Dantas-Torres, 2008a; de Almeida *et al.*, 2013; Ionita *et al.*, 2013; Kamani *et al.*, 2013a; Maia *et al.*, 2015a; Radulovic *et al.*, 2011; Reye *et al.*, 2010; Santos-Silva *et al.*, 2006; 2010; Satta *et al.*, 2011; Silva, 2014; Smith *et al.*, 2013; Trotta *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2013). Muitos destes agentes são patógenos emergentes e reemergentes, alguns com potencial zoonótico (Gray *et al.*, 2013; Halos *et al.*, 2005; Vilhena *et al.*, 2013).

I.1. Ixodídeos

Entre os diversos membros do filo Arthropoda, classe Arachnida, subclasse Acarina, as carraças constituem a ordem Ixodida (Dantas-Torres, 2008a; National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2009b; Silva, 2014).

Atualmente são reconhecidas 898 espécies de carraças, distribuídas em três famílias: Nuttalliellidae, Argasidae e Ixodidae (Gray *et al.*, 2013). Da família Nuttalliellidae faz parte apenas uma espécie existente na África do Sul, a espécie *Nuttalliella namaqua*. Na família Argasidae são conhecidas 194 espécies designadas por “carraças de corpo mole” ou argasídeos, pela ausência do escudo dorsal. Na família Ixodidae, fazem parte 703 espécies que, pela presença de um escudo dorsal são conhecidas por ixodídeos ou “carraças de corpo duro” (Silva *et al.*, 2006), sendo a família que se reveste de maior importância médica e veterinária (Núncio *et al.*, 2022; Silva, 2014).

A família Ixodidae é a mais comum em Portugal (Santos-Silva, 2011) estando representada por 22 espécies de carraças, distribuídas em cinco géneros, nomeadamente *Dermacentor* (*Dermacentor marginatus* e *Dermacentor reticulatus*), *Haemaphysalis* (*Haemaphysalis hispanica*, *Haemaphysalis inermis* e *Haemaphysalis punctata*), *Hyalomma* (*Hyalomma lusitanicum* e *Hyalomma marginatum*), *Ixodes* (*Ixodes acuminatus*, *Ixodes arboricola*, *Ixodes bivari*, *Ixodes canisuga*, *Ixodes frontalis*, *Ixodes hexagonus*, *Ixodes ricinus*, *Ixodes simplex*, *Ixodes ventalloi* e *Ixodes vespertilionis*) e *Rhipicephalus* [*Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus pusillus* e *Rhipicephalus sanguineus* s.l.] (Núncio *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2006) (Figura 6).

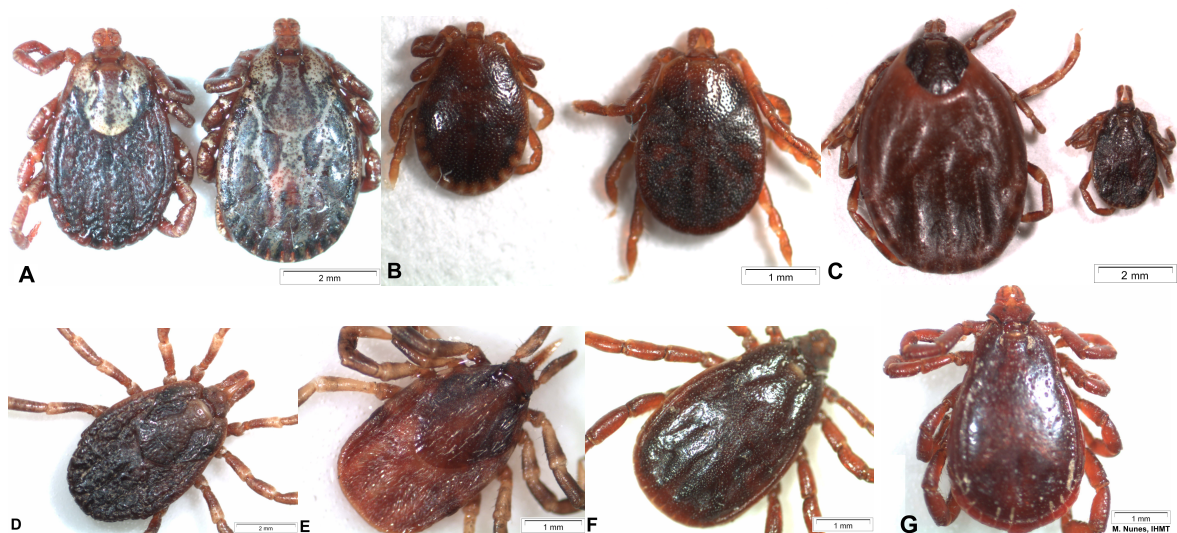


Figura 6 - Algumas espécies de carrças de corpo duro existentes em Portugal. A: fêmea e macho *D. marginatus*; B: macho e fêmea *Ha. inermis*; C: fêmea e macho *Hy. marginatum*; D: fêmea *Hy. lusitanicum*; E: fêmea *I. acuminatus*; F: macho *R. bursa*; G: macho do complexo *R. sanguineus* s.l. (Fotos retiradas por M. Nunes, UEI Microbiologia Médica, IHMT).

Os ixodídeos do género *Rhipicephalus* englobam uma espécie principal, *Rhipicephalus sanguineus*, que em termos nacionais é a espécie mais abundante (Núncio *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2021;).

I.1.1. Morfologia e identificação

As carrças da família Ixodidae são denominadas de carrças duras devido à presença de um escudo fortemente quitinoso em todas as fases do desenvolvimento. Morfologicamente os machos possuem o escudo proeminente que se estende por toda a superfície dorsal, enquanto nas fêmeas e estádios imaturos esta estrutura esclerotizada reveste apenas uma pequena porção anterior do dorso. Os ixodídeos (excepto nos géneros *Ixodes* e *Haemaphysalis*) têm a presença de olhos lateralmente no escudo e o seu capítulo é sempre terminal em todos os estádios. Contudo, para a identificação dos principais géneros de ixodídeos de corpo duro existentes em Portugal deve-se ter em conta diversos aspetos morfológicos que variam de acordo com o género em causa (Tabela 1) (Estrada-Peña, 2004d).

Tabela 1: Chave taxonómica para os principais géneros de ixodídeos adultos presentes em Portugal (Estrada-Peña, 2004d).

Caracteres	Género				
	<i>Ixodes</i>	<i>Hyalomma</i>	<i>Dermacentor</i>	<i>Rhipicephalus</i>	<i>Haemaphysalis</i>
Palpos	Longos e delgados	Longos	Médios e amplos	Médios	Pequenos, 2º segmento alargado lateralmente
Cor padrão	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
Olhos	Ausentes	Convexos	Presentes	Planos ou convexos	Ausentes
Festões	Ausentes	Presentes	Presentes	Presentes	Presentes
Sulco anal	Anterior	Posterior	Posterior	Posterior	Posterior
Placas adanais	Placas planas ventrais	Anais, acessórias e sub-anais	Ausentes	Anais e acessórias	Ausentes
Patas	Delgadas e cor uniforme	Anéis esbranquiçados	Cor uniforme	Anéis esbranquiçados	Delgadas e cor uniforme
Outros			Coxa IV larga	Processo caudal	Delgadas e cor uniforme

I.1.1.1. Complexo *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (s.l.)

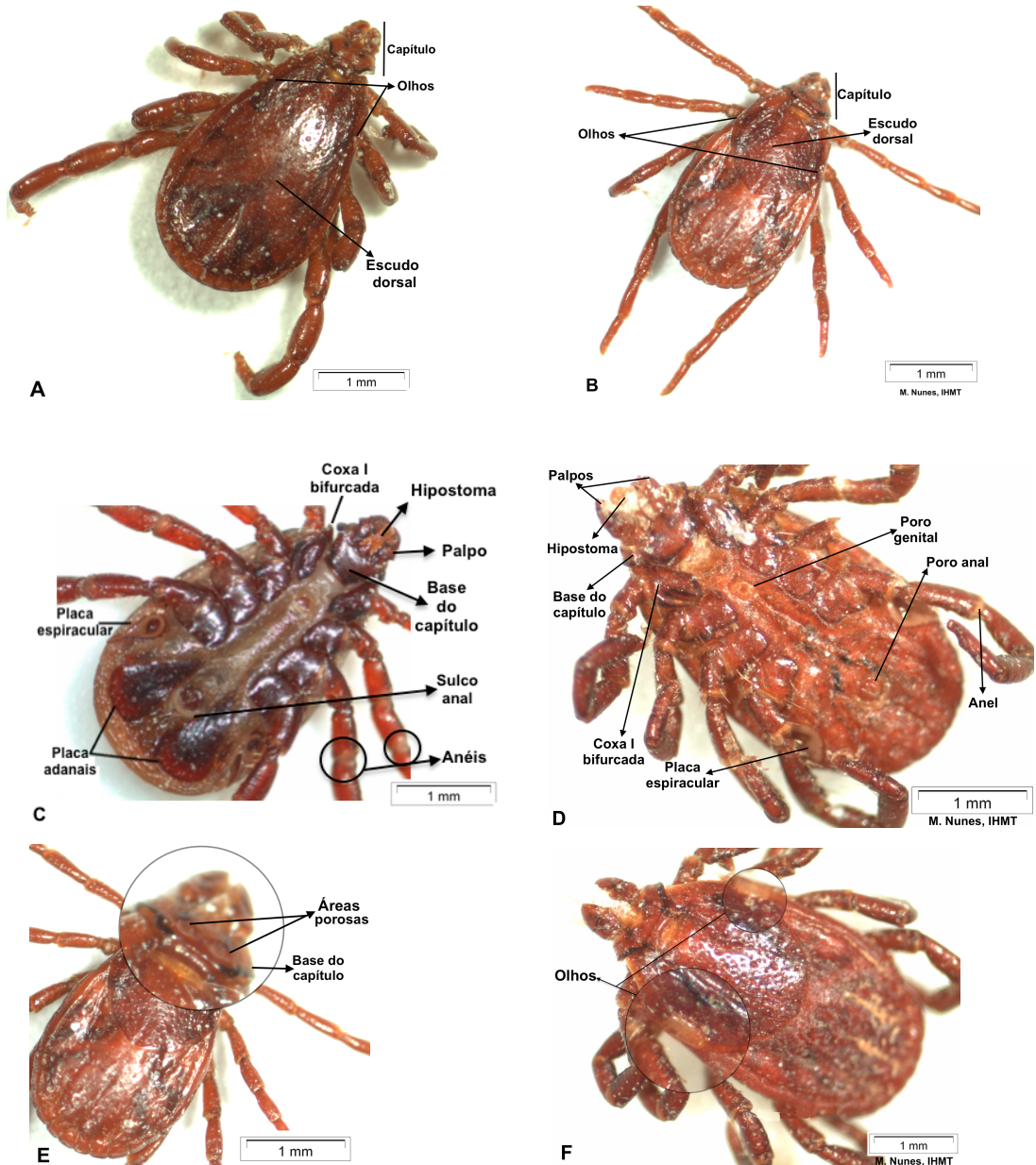
Dos vários géneros e espécies de carraças de corpo duro, destaca-se o complexo de espécies *Rhipicephalus sanguineus*, com grande importância ao nível veterinário e humano, devido ao seu papel como vetor de diversos agentes patogénicos.

O complexo *Rhipicephalus sanguineus* s.l. inclui 12 espécies, nomeadamente *R. sanguineus sensu stricto* (s.s.), *Rhipicephalus sulcatus*, *Rhipicephalus rossicus*, *Rhipicephalus schulzei*, *Rhipicephalus pumilio*, *R. pusillus*, *Rhipicephalus turanicus*, *Rhipicephalus leporis*, *Rhipicephalus guilhoni*, *Rhipicephalus moucheti*, *Rhipicephalus bergeoni* e *Rhipicephalus camicasi* (Moraes-Filho *et al.* 2011; Nava *et al.*, 2014; 2015; Rosa *et al.*, 2012). As suas semelhanças morfológicas fazem com que a sua identificação seja uma tarefa difícil, mesmo com taxonomistas experientes (Dantas-Torres *et al.*, 2013). Como tal, e até que a espécie seja redescrita baseada num consenso entre os taxonomistas, o termo “grupo/complexo de espécies de *R. sanguineus*” ou “*R. sanguineus sensu lato*” deve ser empregue e o uso do nome “*R. sanguineus sensu stricto*” deve ser evitado (Dantas-Torres *et al.*, 2013; Nava *et al.*, 2014). Desta forma, no decorrer deste trabalho o termo complexo *R. sanguineus* s.l. irá ser empregue.

O complexo de espécies *R. sanguineus*, também conhecido como “carraça do cão” ou “carraça castanha do cão”, devido à sua distribuição em canídeos e à sua cor base predominante, é considerada a carraça de maior difusão mundial devido à sua capacidade de adaptação a áreas com clima relativamente quente e invernos suaves (Anatriello *et al.*, 2010; Dantas-Torres *et al.*, 2013; Farkas *et al.*, 2014; Venzal, 2017) apresentando uma maior prevalência em regiões tropicais e subtropicais (Dantas-Torres, 2010). De acordo com

o Concelho Europeu para o Controlo das Parasitoses dos Animais de Companhia (ESCCAP, 2012), o complexo *R. sanguineus* s.l. ocorre com maior frequência nos países do Sul da Europa. Em Portugal, este artrópode encontra-se reportado em todos os distritos do País (Cardoso et al., 2012; Santos-Silva et al., 2011; Silva et al., 2006; Sousa et al., 2011).

A identificação de espécies do complexo *R. sanguineus* s.l. pode ser feita com base na combinação dos seguintes aspetos morfológicos: corpo alongado, escudo não ornamentado com olhos ligeiramente convexos (Fig. 7.F) palpos curtos, base do capítulo hexagonal, áreas porosas pequenas e distanciadas (Fig. 7.E), e festões, pontuações pequenas a médias e dispersas ao longo do escudo (Fig. 7.G), placa espiracular em forma de vírgula com o prolongamento dorsal, com largura igual ou menor que a metade do festão adjacente e coxa I bifurcada (Fig. 7.H) (Estrada-Peña, 2004d; Dantas-Torres, 2008a).



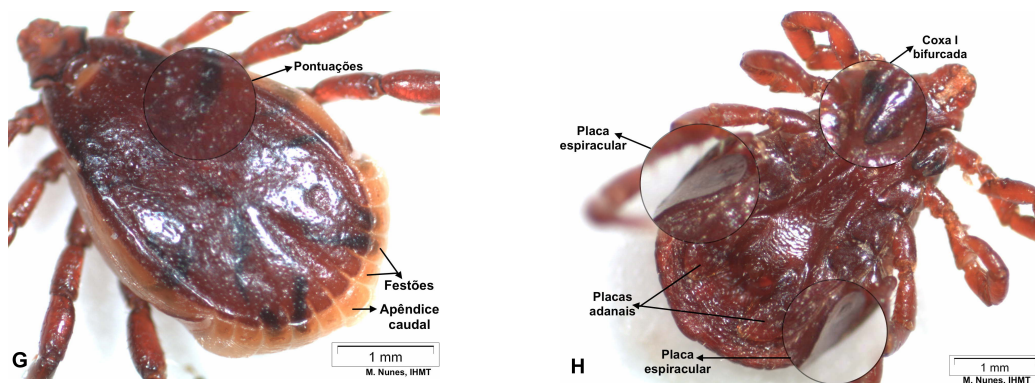


Figura 7 - Macho (A, B, C e G) e fêmea (B, D, E e F) do complexo *R. sanguineus* s.l.. A: capítulo, escudo dorsal (estende-se por toda a superfície dorsal) e olhos – vista dorsal; B: capítulo, escudo (equivale à pequena porção anterior do dorso) e olhos – vista dorsal; C: palpos e hipostoma, base do capítulo hexagonal posterior, espiráculos, placas adanais e anéis nas patas – vista ventral; D: palpos, hipostoma, base do capítulo, poro genital, poro anal, placa espiracular, coxa I bifurcada e poro anal – vista ventral; E: base do capítulo hexagonal e áreas porosas distanciadas e grandes – vista dorsal; F: olhos ampliados ligeiramente convexos – vista dorsal; G: pontuações no escudo, festões e apêndice caudal – vista dorsal; H: coxa I bifurcada, placas adanais e espiraculares ampliadas – vista ventral (Foto de M. Nunes, UEI Microbiologia Médica, IHMT).

Os estádios larval e ninfal têm em comum o facto de serem sexualmente imaturos, o que é determinado por não apresentarem abertura genital, ao contrário das formas adultas que apresentam acentuado dimorfismo sexual (Dantas-Torres, 2008a). As larvas possuem três pares de patas (hexápodes) (Silva, 2014) e são pequenas, com comprimento de 0,54 mm e 0,39 mm de largura (Dantas-Torres, 2009); apresentam ângulos pequenos e laterais na base do capítulo, largura dos palpos na junção com a base do capítulo igual à largura da base, escudo convexo apenas posteriormente (Fig. 8.A), coxa I não apresenta bifurcação, coxa II com pequeno esporão e coxa III com um esporão muito suave (Pegram *et al.*, 1987). As ninfas possuem quatro pares de patas (octópodes), assemelhando-se aos ixodídeos adultos, no entanto são menores que estes (comprimento de 1,14 a 1,3 mm; largura de 0,57 a 0,66 mm) (Dantas-Torres, 2008a). O capítulo é um pouco mais largo do que longo e as margens anterolaterais da base do capítulo e as margens externas dos palpos são ligeiramente curvas. Ventralmente, a coxa I apresenta já uma ligeira bifurcação, as coxas I e III apresentam um pequeno esporão e a coxa IV apresenta um leve indício de um esporão (Fig. 8.B).

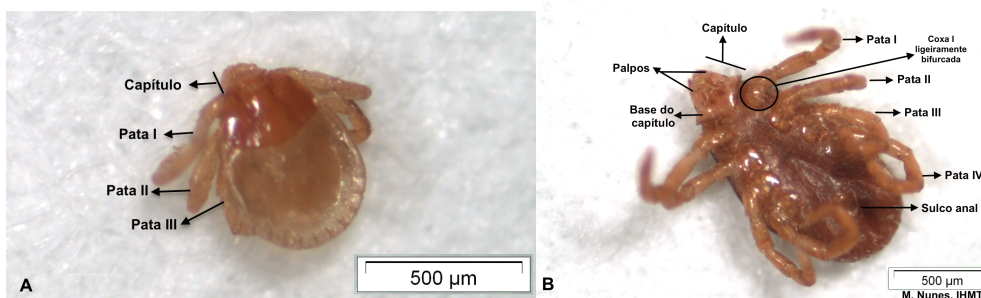


Figura 8 - Dois estádios imaturos (*Rhipicephalus* spp.). A: larva - vista dorsal; B: ninfa - vista ventral (Foto de M. Nunes, UEI Microbiologia Médica, IHMT).

I.1.1.1.A. Hospedeiros

Os cães domésticos são os hospedeiros primários das carraças pertencentes ao complexo *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Dantas-Torres, 2010; Levin *et al.*, 2012). Contudo, estas carraças parasitam uma vasta gama de hospedeiros vertebrados (Núncio *et al.*, 2022), tais como gatos, coelhos, bovinos, caprinos, cavalos, ovelhas, répteis, pássaros e seres humanos (Anatriello *et al.*, 2010; Dantas-Torres, 2010; Levin *et al.*, 2012; Rosa *et al.*, 2010). O aparecimento deste ixodídeo noutros animais, para além do cão, está associado sobretudo à presença de cães muito infestados ou a ambientes onde espécies do complexo *R. sanguineus* s.l. existam em grande abundância (Dantas-Torres, 2008a). Estas carraças são pouco antropofílicas (Morais, 2009), alimentando-se no homem apenas quando os canídeos domésticos ou silváticos não estão disponíveis (ou estão protegidos com acaricidas) (Harrus *et al.*, 2007; Marquez *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2006).

Em Portugal os ixodídeos adultos já foram encontrados em carnívoros, insectívoros, ungulados e roedores, enquanto as ninfas foram detectadas em seres humanos, cães e ouriços e as larvas em carnívoros e insectívoros (Santos-Silva *et al.*, 2011).

O tipo de biótopo desta espécie é diversificado, encontrando-se tanto no interior das habitações humanas, como no ambiente exterior, em jardins públicos ou privados, em canis e em áreas envolventes das habitações, podendo permanecer ativa durante todo o ano em proporções variáveis (Beugnet *et al.*, 2011).

I.1.1.1.B. Ciclo de vida e transmissão de agentes patogénicos

O ciclo biológico das carraças da família Ixodidae compreende quatro fases evolutivas ou estádios: uma fase inativa, o ovo e três fases ativas: larva, ninfa e adulto (Gray *et al.*, 2013; Silva, 2014), apresentando esta última dimorfismo sexual (Estrada-Peña, 2004a). O complexo *R. sanguineus* s.l. possui um ciclo trioxeno, ou seja, necessita de se alimentar de um hospedeiro diferente em cada fase evolutiva, executando no ambiente a ecdise (ou muda) para o próximo estádio (Silva, 2014). O ciclo inicia-se quando as fêmeas depositam os ovos (o número de ovos depositado por cada fêmea pode ir até aos 5000) diretamente no solo (Fig. 9.1) ou em locais estratégicos (tais como paredes, em frestas e fendas ou perto do local de descanso do hospedeiro) pois este facto permite que assim que as larvas eclodam, encontrem mais facilmente o hospedeiro (Dantas-Torres, 2008a; Núncio *et al.*, 2022; Silva, 2014). As fêmeas morrem após a oviposição (Silva, 2014; Stich *et al.*, 2008). Após várias semanas de incubação, eclode uma larva de cada ovo (Fig. 9.2) (Dantas-Torres, 2010), que irá procurar um hospedeiro para efetuar uma refeição sanguínea (Fig. 9.3). Após completar a refeição, a larva engorgitada desprende-se do hospedeiro

executando no ambiente a ecdise (Fig. 9.4) para o seguinte estágio, ninfa (Fig. 9.5). Tal como a larva, a ninfa irá procurar um novo hospedeiro onde efetuar uma refeição sanguínea (Fig. 9.6). Após terminar a refeição a ninfa engorgitada desprender-se-á do hospedeiro e a muda para o estágio adulto ocorrerá no solo (Fig. 9.7). Tanto as fêmeas como os machos (Fig. 9.8) irão procurar novo hospedeiro para realizar uma refeição sanguínea e para copular (Fig. 9.9) (Dantas-Torres, 2008a; Silva, 2014).

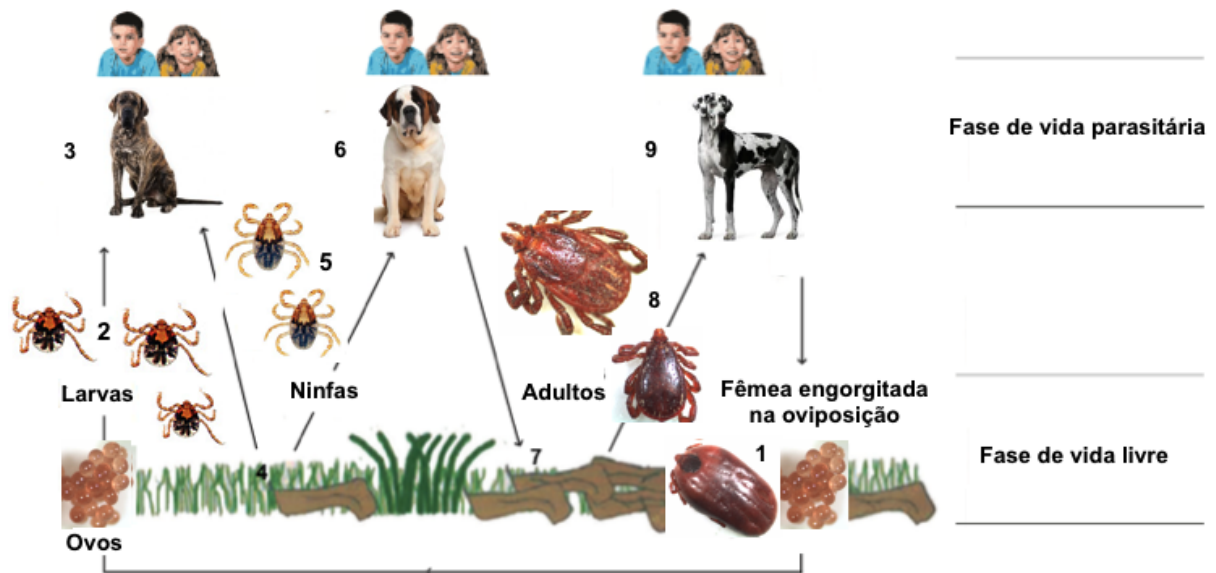


Figura 9 – Ciclo de vida da carrça pertencente ao complexo *R. sanguineus* s.l (esquema com imagens originais de M. Nunes, IHMT, adaptado de Santos-Silva *et al.*, 2012). Legenda: 1-oviposição; 2-larvas; 3, 6 e 9-hospedeiro vertebrado; 4 e 7-solo; 5-ninfas; 8: macho e fêmea.

Nas primeiras 24-36 horas após a ligação do ixodídeo ao hospedeiro, não há praticamente ingestão de sangue, sendo a penetração na pele a sua principal atividade. As secreções salivares produzidas incluem um cimento, que fixa as peças bucais à pele do hospedeiro, bem como enzimas e substâncias vasodilatadoras, anti-inflamatórias, anti-hemostáticas, imunossupressoras e anestésicas, que facilitam a hematofagia (Figueiredo, 2008). A refeição sanguínea tem a duração média de 2 a 5 dias para as larvas, de 3 a 6 dias para as ninfas e de 5 a 21 dias no caso das fêmeas (Gray *et al.*, 2013). Os machos podem realizar uma pequena ingestão de sangue para terminar a espermatogénese, embora habitualmente não necessitem de o fazer, pois o desenvolvimento dos gâmetas masculinos é completado no estágio ninfal (Dantas-Torres, 2009, Silva, 2014).

As fêmeas necessitam de ingerir grandes quantidades de sangue para garantir a postura dos ovos pelo que o seu tamanho e peso corporais aumentam gradualmente à medida que vão realizando a refeição sanguínea podendo atingir 50 a 100 vezes o tamanho que apresentavam em jejum (Fig. 10.A) (Anatriello *et al.*, 2010, Silva, 2014). As fêmeas

engorgitadas e fertilizadas desprendem-se do hospedeiro para realizar no solo a digestão sanguínea e a maturação e postura dos ovos (Fig. 10.B) (Dantas-Torres, 2008a).

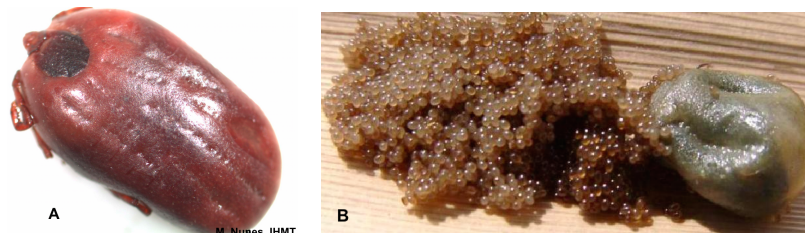


Figura 10 – Formas adultas do complexo *R. sanguineus* s.l.. A: fêmea engorgitada (Vista dorsal) (Foto retirada por M. Nunes, UEI Microbiologia Médica, IHMT); B: fêmea na fase final da postura (adaptado de <http://dermatocaoegato.blogspot.pt>).

A transmissão de um agente infeccioso a um hospedeiro vertebrado ocorre, de um modo geral, devido à fixação de um ixodídeo infetado, com a consequente inoculação de secreções salivares contendo o agente. Mas também pode ocorrer quando o ixodídeo efetua a sua refeição sanguínea e contamina o novo hospedeiro com sangue infetado proveniente de um hospedeiro ao qual se fixou anteriormente. Outras formas de transmissão do agente infeccioso consistem no momento em que o ixodídeo liberta as suas fezes contaminadas, sobre a superfície cutânea do hospedeiro vertebrado quando se está a alimentar, quando ocorre o seu esmagamento, ou pela deglutição do ixodídeo infetado (Silva *et al.*, 2006). Por último, outra forma de transmissão, é realizada pelo “cofeeding”, que consiste num processo pelo qual carraças infetadas e não infetadas, se alimentam num determinado hospedeiro e a distância que as separa é inferior a um centímetro, o que as obriga a partilhar a mesma área alimentar e facilita a transmissão do patógeno à carraça não infetada (Silva *et al.*, 2006; Voordouw, 2015).

Quando não estão no hospedeiro, estes artrópodes dependem profundamente das condições ambientais. Os ixodídeos passam 94 - 97% da vida no ambiente e estão sob a influência de vários fatores bióticos (a sua predileção para o cão como hospedeiro é apresentada como um biótopo) e abióticos (temperatura e humidade do ambiente) (Gray *et al.*, 2013). Quando aparecem determinadas condições de temperatura, de humidade e luminosidade, esta espécie coloca-se na parte mais alta da vegetação onde permanece em espera. Quando o hospedeiro passa no local, o ixodídeo agarra-se ao corpo do mesmo, fixando-se de seguida à sua pele utilizando as suas peças bucais especializadas (Estrada-Peña, 2004a).

A duração do ciclo de vida das espécies do complexo *R. sanguineus* s.l. varia de país para país e de região para região; por exemplo, em Portugal, as alterações climáticas verificadas na última década, nomeadamente a subida das temperaturas médias anuais e a capacidade de adaptação de espécies do complexo *R. sanguineus* s.l. ao ambiente familiar, parecem ter influenciado o seu ciclo de vida e a sua dinâmica sazonal, permitindo-lhe não só

completar mais um ciclo de vida por ano, como manter-se ativo durante todo o ano (incluindo o Inverno) (Núncio *et al.*, 2022; Sousa, 2008). Apesar deste ixodídeo ser encontrado por todos os distritos de Portugal, a maior incidência é no sul do país, onde as condições ambientais são mais favoráveis ao desenvolvimento de dois a três ciclos anuais, nomeadamente: temperaturas mínimas anuais acima dos 10-14°C, temperaturas máximas acima dos 20°C (durante oito a nove meses) e humidade relativa entre 60-75% (Silva, 2010). As maiores densidades populacionais são encontradas em Portugal nos meses mais quentes (Julho e Agosto), pelo que esta espécie aparenta estar adaptada a temperaturas altas, sendo muito resistente ao calor, e não ser muito exigente quanto à humidade relativa (Berrada *et al.*, 2009; Estrada-Peña, 2004a; Santos-Silva *et al.*, 2014). As formas adultas estão ativas durante todo o ano, com um aumento na Primavera/Verão e as formas imaturas (larvas e ninfas) são identificadas, sobretudo, nos meses de Verão (Núncio *et al.*, 2022).

I.2. Bactérias transmitidas por carraças

I.2.1. *Anaplasma* spp. / *Ehrlichia* spp.

I.2.1.1. Taxonomia

Os membros da família Anaplasmataceae são bactérias gram-negativas, de crescimento intracelular obrigatório (Dumler *et al.*, 2001; NCBI, 2009a). Os géneros *Anaplasma* e *Ehrlichia* infectam uma ampla variedade de mamíferos (Vieira *et al.*, 2011).

O género *Ehrlichia* incluiu inicialmente 10 espécies classificadas com base na célula hospedeira infetada: monócitos (*Ehrlichia canis*, *Ehrlichia risticii*, *Ehrlichia sennetsu*), granulócitos (*Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila* e o agente da erliquiose granulocítica humana) e plaquetas (*Ehrlichia platys*). Com base em estudos filogenéticos (Beugnet *et al.*, 2009), o género *Ehrlichia* foi reorganizado sendo atualmente composto por cinco espécies: *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia muris* e *Ehrlichia ruminantium* (anteriormente designado *Cowdria ruminantium*) (Stuen *et al.*, 2013).

Os restantes organismos foram reclassificados nos géneros *Anaplasma* e *Neorickettsia*, nomeadamente *Anaplasma platys* (anteriormente designada por *Ehrlichia platys*), *Anaplasma phagocytophilum* (uma combinação de organismos anteriormente conhecida como *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila* e agente da erliquiose granulocítica humana), *Neorickettsia helminthoeca*, *Neorickettsia risticii* (anteriormente designado *Ehrlichia risticii*) e *Neorickettsia sennetsu* (anteriormente *Ehrlichia sennetsu*) (Allison *et al.*, 2013a, Vieira *et al.*, 2011).

I.2.1.1.A. *Anaplasma platys*

I.2.1.1.A.1. Etiologia

A espécie *A. platys* surge no interior das plaquetas do hospedeiro vertebrado (Harvey, 2012). Esta bactéria é o agente etiológico da trombocitopenia cíclica canina (Abarca *et al.*, 2007; Alleman, 2005; Beaufils *et al.*, 2002; Baneth, 2010; Dyachenko *et al.*, 2012; Mokhtar *et al.*, 2013; Ulutas *et al.*, 2007) sendo endêmica nos países da bacia do Mediterrâneo (Couto, 2011; Dyachenko *et al.*, 2012).

I.2.1.1.A.2. Hospedeiro invertebrado

As espécies do complexo *R. sanguineus* s.l. são consideradas vectores putativos de *A. platys* (Andersson *et al.*, 2013; Baneth, 2010; Cardoso *et al.*, 2012; Dyachenko *et al.*, 2012; Maggi *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2014b). O ADN desta bactéria já foi detectado noutras espécies de ixodídeos, tais como: *Dermacentor auratus* na Tailândia (Parola *et al.*, 2003), *Haemaphysalis flava* e *Ixodes ovatus* no Japão (Inokuma *et al.*, 2003), *Haemaphysalis longicornis* e *Ixodes persulcatus* na Coreia (Harvey, 2012), *R. turanicus* em Israel (Harrus *et al.*, 2011) e em *Dermacentor nuttalli* e *I. persulcatus* na Mongólia (Javkhlan *et al.*, 2014).

I.2.1.1.A.3. Hospedeiro vertebrado

Os cães são considerados os principais hospedeiros de *A. platys* (Cohn, 2003; ESCCAP, 2012b; Maggi *et al.*, 2013) na Ásia, nos EUA e na Europa (Andersson *et al.*, 2013). Na Europa, a ocorrência da infecção por *A. platys* em cães foi reportada em Espanha (Aguirre *et al.*, 2006), França (Beaufils *et al.*, 2002), Grécia (Andersson *et al.*, 2013), Itália (de la Fuente *et al.*, 2006) e Portugal (Cardoso *et al.*, 2010a; Maia *et al.*, 2015a; René-Martellet *et al.*, 2015). Contudo, esta espécie bacteriana conhecida por infetar sobretudo cães, também foi detetada por técnicas moleculares em gatos no Brasil (Lima *et al.*, 2010; Maggi *et al.*, 2013), e em Portugal em raposas (Cardoso *et al.*, 2015) e em javalis (Pereira *et al.*, 2016). Também foi detetado ADN de *Anaplasma* spp./*Ehrlichia* spp. em gatos domésticos em Portugal (Maia *et al.*, 2014a; Vilhena *et al.*, 2013).

I.2.1.1.A.4. Ciclo de vida

O modo natural de transmissão de *A. platys* ainda não foi demonstrado experimentalmente em ixodídeos do complexo *R. sanguineus* s.l. (Dyachenko *et al.*, 2012; Harvey, 2012). Contudo, o ciclo de vida desta espécie é semelhante ao de *A. phagocytophilum*, diferindo nas células alvo (Ramos *et al.*, 2014b). A bactéria *A. platys*

surge no interior das plaquetas do hospedeiro vertebrado (Harvey, 2012) como inclusões basófilas redondas ou ovais isoladas, em pares ou em grupos formando as mórulas (Fig. 11. A e Fig. 11. B) (Dyachenko *et al.*, 2012; Harvey, 2012), com diâmetro de 0,35 a 1,35 μm (CVBD, 2010). As plaquetas infetadas podem conter um a três vacúolos com um a 15 agentes bacterianos por vacúolo (Harvey, 2012).

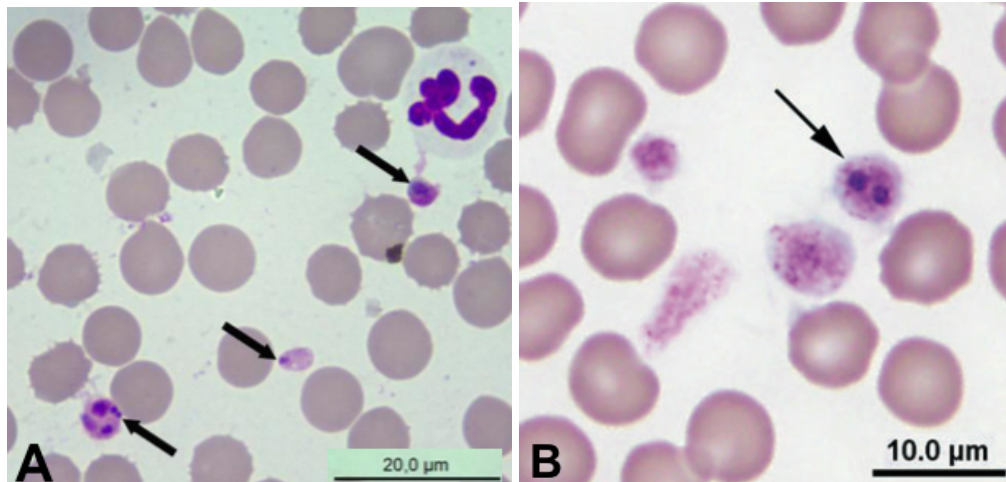


Figura 11 - Esfregaços sanguíneos de dois cães, com inclusões basófilas de *Anaplasma platys* dentro de plaquetas. A: mórulas no interior de três plaquetas (coradas por Giemsa) (adaptado de Dyachenko *et al.*, 2012); B: duas mórulas numa plaqueta (seta) (coloração Romanowsky) (adaptado de Alisson & Little, 2013).

I.2.1.1.A.5. Saúde pública

Embora o potencial zoonótico deste agente ainda não tenha sido comprovado (Cicuttin *et al.*, 2014), o ADN de *A. platys* foi detetado em amostras sanguíneas de uma médica veterinária nos USA (Maggi *et al.* 2013) e de duas mulheres na Venezuela (Arraga-Alvarado *et al.*, 2014).

I.2.1.1.B. Ehrlichia canis

I.2.1.1.B.1. Etiologia

A espécie *Ehrlichia canis* é o agente etiológico da erliquiose monocítica canina (Beugnet *et al.*, 2011; Sainz *et al.*, 2015). Este importante agente infeccioso canino tem uma distribuição mundial (Harrus *et al.*, 2012) e todos os países Europeus que circundam o mar Mediterrâneo são endémicos para esta espécie (Sainz *et al.*, 2015).

As espécies *E. chaffeensis* e *E. ewingii* também são responsáveis por causar erliquiose em cães nos EUA (Cardoso *et al.*, 2010; Romero *et al.*, 2011) embora ainda não tenham sido detetadas em cães na Europa (Sainz *et al.*, 2015).

I.2.1.1.B.2. Hospedeiro invertebrado

A distribuição da infeção por *E. canis* está relacionada com a distribuição geográfica do vetor, *R. sanguineus* s.l. (Breitschwerdt, 2009; Irwin, 2007). Em Portugal esta bactéria foi isolada de hemolinfa de espécimes do complexo *R. sanguineus* s.l. provenientes do distrito de Setúbal (Figueiredo, 2008). O ADN de *E. canis* também foi detetado em outras espécies de carraças, nomeadamente *R. turanicus* em Israel (Harrus *et al.*, 2011) e *Dermacentor* spp. na Hungria (Harrus *et al.*, 2011; Hornok *et al.*, 2013).

I.2.1.1.B.3. Hospedeiro vertebrado

Os hospedeiros vertebrados e reservatórios de *E. canis* incluem os canídeos domésticos e silvestres. *E. canis* foi o primeiro agente da EMC identificado em cães por Donatien e Lestosquard na Argélia em 1935 (Chomel, 2011). Na década de 1970, este agente bacteriano adquiriu importância após ter provocado a morte de centenas de cães militares americanos durante a Guerra do Vietname (Vieira *et al.*, 2011). Em Portugal a deteção de ADN de *E. canis* foi reportada em cães (Alexandre, 2009; Cardoso *et al.*, 2010a; Cardoso *et al.*, 2010b; Maia *et al.*, 2015; René- Martellet *et al.*, 2015), e em raposas de todo o país (Cardoso *et al.*, 2015).

Num estudo seroepidemiológico nacional, Cardoso *et al.* (2012) obtiveram uma prevalência de infeção por *E. canis*, de 4,1% (23/557) em animais saudáveis e 16,45% (103/628) em animais clinicamente suspeitos de estarem infetados com agentes transmitidas por artrópodes vetores.

No entanto, este agente bacteriano pode infetar ocasionalmente outros hospedeiros, tais como o gato e o homem (Ayllon *et al.*, 2009; Greene, 2006; Perez *et al.*, 2006;). O primeiro caso de erliquiose nos gatos foi reportado em França em 1986 e desde então têm sido descritos vários casos de infeção por *E. canis* em gatos em todo o mundo por intermédio de técnicas serológicas e moleculares (Ayllon *et al.*, 2009; Maia *et al.*, 2014a). A deteção de ADN de Anaplasmataceae também já foi documentada em gatos do norte, centro e sul de Portugal (Maia *et al.*, 2014a; Vilhena *et al.*, 2013).

I.2.1.1.B.4. Ciclo de vida

As carraças ao realizarem uma refeição sanguínea num hospedeiro infetado ingerem leucócitos contendo *E. canis*, que se multiplicam nos hemócitos, glândulas salivares e células intestinais do vetor. A transmissão do agente é realizada entre os estádios (transmissão transestadial) (Cohn, 2003; Dantas-torres, 2010; Harrus *et al.*, 2012). Uma vez infetada, a carraça é capaz de disseminar a infeção até 155 dias após a separação do seu

hospedeiro (Breitschwerdt, 2009; Moreira, 2009). A transmissão das bactérias a um hospedeiro susceptível ocorre durante as refeições sanguíneas subsequentes da carraça (Hagiwara, 2009; Dantas-Torres, 2010). Não se encontra descrita a transmissão transovárica de *E. canis* (Cohn, 2003; Dantas-torres, 2010; Harrus *et al.*, 2012). Por esta razão, este ixodídeo não funciona como um verdadeiro reservatório de *E. canis* (Cohn, 2003), sendo necessária a presença de canídeos infetados para manter a bactéria na população de ixodídeos (Aguiar *et al.*, 2007; Breitschwerdt, 2009; Figueiredo, 2008). As carraças necessitam de um período de 24 a 48 horas de fixação ao hospedeiro para a transmissão do agente infeccioso (Breitschwerdt, 2009). Contudo, um estudo recente em cães detetou por métodos moleculares a transmissão de *E. canis* por carraças do complexo *R. sanguineus* s.l. após 8 horas de fixação (Fourie *et al.*, 2013). A transmissão da infeção por *E. canis* pode ser também iatrogénica e por intermédio de transfusões sanguíneas de um dador infetado (Harrus *et al.*, 2012).

No hospedeiro vertebrado as espécies do género *Ehrlichia* infetam principalmente os leucócitos (monócitos, macrófagos e granulócitos) do sangue, fígado, baço, medula óssea, linfonodos, pulmão, rins e sistema nervoso central, onde se replicam dentro de vacúolos citoplasmáticos formando mórulas (Harrus *et al.*, 2012).

Em cães, *E. canis* infeta macrófagos (Fig. 12. A) e monócitos (Fig. 12. B) (Harrus *et al.*, 2012). Após multiplicação estes agentes bacterianos disseminam-se pelo sistema mononuclear fagocitário para o fígado, baço e linfonodos (ESCCAP, 2012), causando infeções persistentes que duram possivelmente toda a vida do animal (Aguiar *et al.*, 2007).

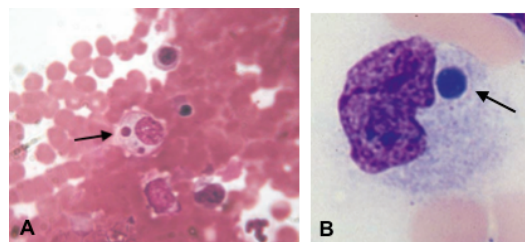


Figura 12 – A: Esfregaço de medula óssea de um cão onde se visualiza um macrófago contendo uma mórula (seta) de *E. canis* (adaptado de Dantas-Torres, 2008b); B: Esfregaço de sangue onde se observa uma mórula de *E. canis* (seta) no citoplasma de um monócito – 1000x (adaptado de Harrus *et al.*, 2012).

I.2.1.1.B.5. Saúde pública

Com base no isolamento em pacientes humanos, verificou-se que as bactérias *E. canis*, *E. chaffeensis* e *E. ewingii* podem causar erliquiose monocítica humana (Breitschwerdt, 2009; 2011; Ismail *et al.*, 2010), embora segundo o ESCCAP (2012) o potencial zoonótico de *E. canis* ainda não esteja comprovado. A EMH causada por *E. chaffeensis* é considerada uma zoonose emergente na América do Norte, Ásia, Europa, e

mais recentemente no Brasil (Breitschwerdt, 2009) enquanto os casos humanos causados por *E. ewingii* são maioritariamente reportados em indivíduos imunodeprimidos (Ismail *et al.*, 2010).

Em virtude da necessidade de existir um vetor, não há evidências de que qualquer uma destas infeções seja transmitida diretamente dos animais para as pessoas e vice-versa (Breitschwerdt, 2009; Cohn, 2003). Contudo, os animais domésticos podem servir de sentinelas ou reservatórios em áreas endémicas, uma vez que são susceptíveis aos mesmos organismos que afetam o homem (Cohn, 2003).

I.2.2. *Borrelia burgdorferi* s.l.

I.2.2.1. Etiologia

As bactérias do género *Borrelia* (família Spirochaetaceae) são bactérias gram negativas, microaerofílicas, extracelulares (Gonzalez, 2013; Tsao, 2009) e caracterizam-se por ser longas (4 a 18 µm de comprimento) e finas (0.2 µm a 0,5 de largura), de forma helicoidal e flexível (Greene *et al.*, 2012b; Karami, 2012).

As espiroquetas do complexo *Borrelia burgdorferi* s.l. (ESCCAP, 2012, Silva *et al.*, 2006; Rauter *et al.*, 2005) são os agentes etiológicos da Borreliose de Lyme (BL), uma infeção multisistémica que afeta humanos e animais domésticos. Na Europa, podem ser encontradas 11 genoespécies deste complexo., das quais nove são notoriamente endémicas: *Borrelia afzelii*, *Borrelia bavariensis*, *Borrelia bissettii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (s.s.), *Borrelia finlandensis*, *Borrelia garinii*, *Borrelia lusitaniae*, *Borrelia spielmanii* e *Borrelia valaisiana* (Couceiro *et al.*, 2003; de Carvalho *et al.*, 2012; Franke *et al.*, 2013; Gern, 2009).

I.2.2.2. Hospedeiro invertebrado

Apesar dos vetores de *Bo. burgdorferi* s.l. pertencerem ao género *Ixodes* (Norte *et al.*, 2013; Núncio & Carvalho, 2014), as espécies responsáveis pela transmissão destas espiroquetas diferem de região para região (Center for Food Security & Public Health [CFSPH], 2011): *Ixodes scapularis* e *Ixodes pacificus* na América do Norte, *I. persulcatus* na Ásia e no Leste da Europa, e *I. ricinus* (Fig. 8) na Europa, Norte de África e Ásia Ocidental (CFSPH, 2011; Franke *et al.*, 2013).

A espécie *I. ricinus* encontra-se presente em todos os distritos de Portugal (Santos-Silva *et al.*, 2011), embora exista uma distribuição desigual, predominando em zonas florestadas e onde os níveis de humidade relativa sejam elevados, podendo também ser encontrado em parques urbanos (Oteo *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2006).

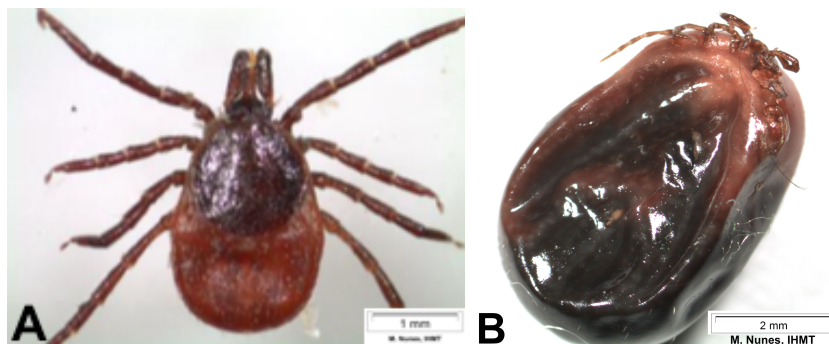


Figura 13 - Duas fêmeas de *Ixodes ricinus*, espécie vetor de *Borrelia burgdorferi* s.l. na Europa. A: fêmea não alimentada - vista dorsal; B: fêmea engorgitada - vista ventral (Foto de M. Nunes, UEI Microbiologia Médica, IHMT).

Em Portugal, o ADN de borrelíias do complexo *Bo. burgdorferi* s.l., foi detetado não só em *I. ricinus* (nomeadamente *Bo. afzelii*, *Bo. burgdorferi* s.s., *Bo. garinii*, *Bo. lusitaniae*, *Borrelia turdi*, e *Bo. valaisiana*) (Batista, 2006; de Carvalho *et al.*, 2008a; Milhano *et al.*, 2010; Norte *et al.*, 2013; Núncio *et al.*, 2022) mas também noutras espécies de carraças: *D. marginatus*, *Ha. punctata*, complexo *R. sanguineus* s.l. (Baptista, 2006) e *Hy. lusitanicum* (Milhano *et al.*, 2010).

I.2.2.3. Hospedeiro vertebrado

Embora o vetor *I. ricinus* se alimente numa grande variedade de vertebrados, cada espécie de *Borrelia* parece estar associada a determinados hospedeiros vertebrados. Na Europa, os hospedeiros reservatórios competentes das espiroquetas *Bo. garinii* e *Bo. valaisiana* são sobretudo as aves (de Carvalho *et al.*, 2010a), enquanto *Bo. afzelii* é perpetuada por pequenos roedores. A espiroqueta *Bo. burgdorferi* s.s. está associada a esquilos e ouriços, enquanto *Bo. lusitaniae* é mantida sobretudo nos lagartos, tendo as aves um papel *minor* na sua distribuição (de Carvalho *et al.*, 2010a; Radzijevskaia *et al.*, 2013).

Os humanos e os animais domésticos são considerados hospedeiros acidentais, podendo ser infetados com borrelíias do complexo *Bo. burgdorferi* s.l. quando são parasitados por carraças infetadas (CFSPH, 2011). Em Portugal, o agente *Bo. lusitaniae* foi isolado em humanos (Collares-Pereira *et al.*, 2004; de Carvalho *et al.*, 2008; de Carvalho *et al.*, 2010) e roedores (*Apodemus sylvaticus*) (de Carvalho *et al.*, 2010a) e os agentes *Bo. valaisiana* e *B. turdi* foram isolados em aves (Norte *et al.*, 2013). Recentemente detetou-se ADN de *Bo. burgdorferi* s.l. em javalis (Faria *et al.*, 2015), gatos (Maia *et al.*, 2014) e cães (Maia *et al.*, 2015a). No inquérito seroepidemiológico nacional realizado por Cardoso *et al.* (2012) a prevalência de anticorpos anti-*Borrelia* em cães portugueses foi de 0,2% (1/557).

I.2.2.4. Ciclo de vida

O ixodídeo *Ixodes ricinus* é uma espécie de evolução trifásica, exofílica e telotrófica. A atividade das carrças adultas inicia-se no outono (outubro) e termina a meio de março. As larvas e ninfas estão ativas em simultâneo tanto nos hospedeiros como na vegetação entre abril e julho (primavera e verão) (Biesiada *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2006; Tilly *et al.*, 2008;). A duração do ciclo de vida desta espécie é dependente de fatores importantes como o clima e a disponibilidade de hospedeiros (Estrada-Peña, 2004d; Silva *et al.*, 2006). São carrças de três hospedeiros e as formas adultas podem ser encontradas na vegetação até 1,5 metros enquanto os estádios imaturos mantêm-se sobretudo na vegetação rasteira (Lindgren & Jaenson, 2006). As larvas parasitam principalmente pequenos mamíferos (Fig. 14.1), enquanto as ninfas são encontradas em mamíferos de médio porte, aves e répteis (Fig. 14.2) (Estrada-Peña, 2004c; Greene *et al.*, 2012b; Núncio & Carvalho, 2014; Núncio *et al.*, 2022). Os ixodídeos adultos são encontrados mais frequentemente em animais de grande porte como os ungulados (Fig. 14.3). Apenas as fêmeas realizam grandes refeições sanguíneas, enquanto os machos fazem pequenas refeições, ingerindo pouco volume de sangue, e nunca engorgitam. Apenas uma única refeição sanguínea é efetuada em cada estágio evolutivo de *I. ricinus*. Depois de se alimentarem durante alguns dias (cerca de 3-5 dias para as larvas, 4-8 dias para as ninfas e 5-20 dias para as fêmeas adultas), as carrças soltam-se do hospedeiro para o solo e realizam a muda para o estágio seguinte. O ciclo de vida de *I. ricinus* termina com a cópula e a oviposição. Após o acasalamento a fêmea alimenta-se até à total repleção (aumentando o seu volume até 100 vezes) (Fig. 14.C), libertando-se de seguida para o solo onde faz uma postura de ovos (aproximadamente 2000), morrendo em seguida (Fig. 14.4) (Estrada-Peña, 2004c; Greene *et al.*, 2012b; Núncio & Carvalho, 2014; Núncio *et al.*, 2022).

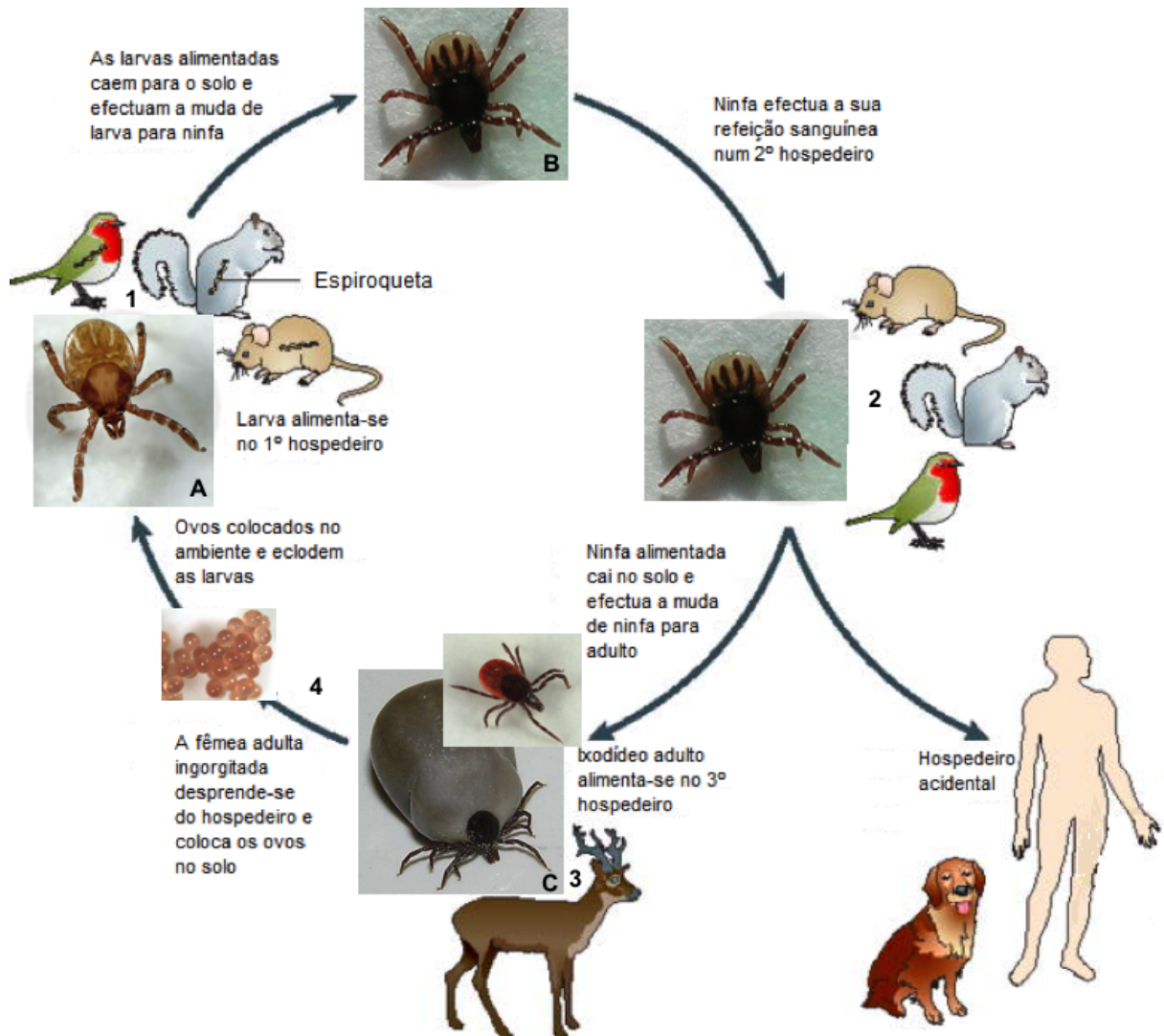


Figura 14 - Ciclo de vida de *Borrelia burgdorferi* s.l. através dos três estágios de desenvolvimento dos ixodídeos (larva, ninfa e adultos) (adaptado de Radolf *et al.*, 2012). Legenda: 1-larva; 2-ninfa; 3- fêmea ingurgitada; 4-ovos.

A transmissão das bactérias do complexo *Bo. burgdorferi* s.l. à carraça pode ocorrer por “cofeeding”, por via transtestadial e/ou transovárica, embora esta última seja mais rara e pouco eficiente (ESCCAP, 2012b, Geller *et al.*, 2013; Lindgren & Jaenson, 2006; Nuncio *et al.*, 2014; Silva, 2014; Voordouw, 2015). As espiroquetas multiplicam-se no intestino médio da carraça, migram para a hemolinfa e disseminam-se para as glândulas salivares (Greene *et al.*, 2012b). Estas bactérias extracelulares têm um único modo de mobilidade ativo por rotação-flexão (Gonzalez, 2013; Tsao, 2009) que lhes permite mover de forma eficiente em meios viscosos como nos tecidos do vetor e do hospedeiro (Greene *et al.*, 2012b; Tsao, 2009) (Fig. 15).

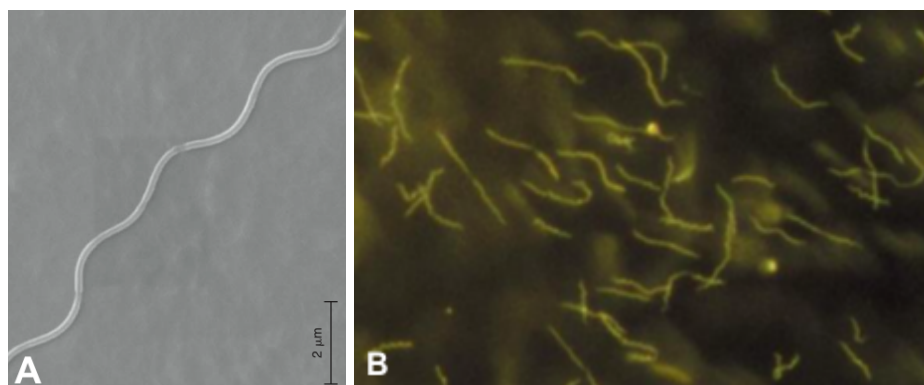


Figura 15 - Espiroquetas de *Borrelia burgdorferi* s.l. visualizadas por microscopia electrónica (A) (adaptado de Greene *et al.*, 2012b); por microscopia de fundo escuro (B) (adaptado de Carvalho, 2010).

A transmissão das espiroquetas ocorre pela inoculação da saliva da carraga durante a refeição sanguínea e é mais eficiente quanto maior for o tempo de fixação desta ao hospedeiro (ESCCAP, 2012b; Gern, 2009; Greene *et al.*, 2012b; Tilly *et al.*, 2008). Dependendo da espécie de *Borrelia* e da espécie de vetor, a transmissão pode ocorrer após as 24 horas de fixação (Carvalho, 2010; Radolf *et al.*, 2012). Sabe-se, por exemplo, que *Bo. burgdorferi* s.s. normalmente não é transmitida antes de 48 horas de fixação da carraga ao animal, enquanto *Bo. afzelii* pode ser transmitida em menos de 24 horas (CFSPH, 2011).

1.2.2.5. Saúde pública

A Borreliose de Lyme (BL) é considerada uma doença zoonótica emergente (de Carvalho *et al.*, 2010b; Cotté *et al.*, 2008) e a segunda doença associada a carragas com maior prevalência na população portuguesa (Núncio *et al.*, 2022). Embora a BL seja subnotificada, são reportados anualmente cerca de 85.000 casos clínicos na Europa (Lindgren & Jaenson, 2006), com uma incidência estimada de 0,04 por 100.000 habitantes (Milhano *et al.*, 2010). Em Portugal, os agentes espiroquetídeos *Bo. burgdorferi* s.s., *Bo. afzelii*, *Bo. garinii*, *Bo. lusitaniae* foram detectados em humanos (Pereira *et al.*, 2018). O primeiro caso clínico humano de BL em Portugal foi identificado em Évora e desde 1999, a BL é uma doença de notificação obrigatória em Portugal (Milhano *et al.*, 2010).

O cão e o gato não são considerados reservatórios das espiroquetas do complexo *Bo. burgdorferi* s.l. e como tal, não são uma fonte de risco para a saúde pública no que diz respeito à transmissão destas bactérias aos seres humanos. Contudo, os animais podem transportar carragas infetadas para a proximidade humana (ambientes peri-domésticos) (ESCCAP, 2012b).

I.2.3. *Rickettsia* spp.

I.2.3.1. Etiologia

As bactérias do género *Rickettsia* (família Rickettsiaceae) são gram negativas, pleomórficas e de vida intracelular obrigatória (Allison & Little, 2013; Galvão *et al.*, 2005; ; Rovey *et al.*, 2008; Radulovic *et al.*, 2011; Levin *et al.*, 2012), com dimensões de 0,8 a 2 µm de comprimento e 0,3 a 0,5 µm de diâmetro (Duarte, 2008).

O género *Rickettsia* divide-se taxonomicamente em dois grupos distintos: o grupo do tifo, que inclui três espécies: *Rickettsia prowazekii* (agente do tifo epidémico); *Rickettsia typhi* (agente etiológico do tifo murino) e *Rickettsia canadensis* (isolado de carraças e cujo significado quanto à patologia humana permanece desconhecido) (Galvão *et al.*, 2005), e o grupo exantemático ou grupo das febres exantemáticas (“Spotted fever group”-SFG), onde se inclui a espécie *Rickettsia conorii* (Sousa *et al.*, 2003; Radulovic *et al.*, 2011).

A infeção por bactérias do complexo *Ri. conorii* é responsável pela febre escarotodular (FEN), ou febre da carraça na linguagem popular, em humanos (Pereira *et al.*, 2018). Contudo a sua denominação internacional é de febre botonosa (FB), ou febre mediterrânica (“Mediterranean Spotted Fever” na denominação anglo-saxónica) (Abreu *et al.*, 2007; Gouveia *et al.*, 2013; Louro *et al.*, 2006; Marquez *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 1999; Socolovschi *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2003).

I.2.3.2. Hospedeiro invertebrado

Nos países da bacia do Mediterrâneo, o principal vetor e reservatório de *Ri. conorii* são as carraças do complexo *R. sanguineus* s.l. (Alexandre *et al.*, 2011; Claerebout *et al.*, 2013; Foley *et al.*, 2014; Harrus *et al.*, 2007; Levin *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 1999; Oteo *et al.*, 2012; Santos-Silva *et al.*, 2006; Segura *et al.*, 2014; Socolovschi *et al.*, 2009; 2012; Solano-Gallego *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2003, Sousa, 2008). Na região do Algarve, 22,2% (10/45) dos exemplares de complexo *R. sanguineus* s.l. colhidos estavam infetados com bactérias pertencentes ao género *Rickettsia* (Alexandre, 2005). Contudo, esta bactéria já foi detetada noutras espécies de ixodídeos. Num estudo de Figueiredo (2008), a sequenciação comprovou a presença de ADN de *Ri. conorii* em um exemplar pertencente ao complexo *R. sanguineus* s.l., *Ri. Slovaca*, num exemplar de *D. marginatus* e *Rickettsia massiliae* em três *R. sanguineus* (Figueiredo, 2008). Num estudo desenvolvido por Santos-Silva *et al.* (2006) foi detectado ADN de *Ri. conorii* em *R. turanicus* (16%; 25/152) colhidos de aves silváticas.

Em Portugal, foram identificadas em várias espécies de carraças outras espécies de *Rickettsia* patogénicas para o homem pertencentes ao grupo das febres exantemáticas, tais como *Rickettsia aeschlimanii*, *Rickettsia helvetica*, *Ri. massiliae*, *Rickettsia sibirica* e

Rickettsia Slovaca (Morais, 2009; Pereira *et al.*, 2011). No distrito de Bragança, o ADN de *Rickettsia* spp. foi detetado em 83,3% dos exemplares de *D. marginatus* (10/12) analisados assim como em 5,6% (2/36) e 3,6% (1/28) das carraças das espécies *D. reticulatus* e *R. sanguineus* testadas, respetivamente (Santos-Silva *et al.*, 2006). Na ilha da Madeira, de Carvalho *et al.* (2008b) detetaram ADN de *Rickettsia* spp. em 0,6% (2/300) dos *I. ricinus*.

I.2.3.3. Hospedeiro vertebrado

Nos países da bacia do Mediterrâneo, os principais hospedeiros vertebrados de *Ri. conorii* são os cães, raposas e os pequenos roedores (Gouveia *et al.*, 2013; Greene *et al.*, 2012a; Marques *et al.*, 2005; Radulovic *et al.*, 2011; Sociedade Portuguesa de Pediatria, 2005). Contudo, a infecção por *Ri. conorii* já foi reportada em gatos (Alves *et al.*, 2009; Segura *et al.*, 2014) e já se detetaram anticorpos contra este agente em lagomorfos (Morais, 2009). Embora os humanos sejam considerados hospedeiros acidentais deste agente patogénico (Galvão *et al.*, 2005; Marques *et al.*, 2005; Sousa *et al.*, 2003), em Portugal encontram-se reportados casos humanos de FEN causados pelas duas estirpes do complexo: *R. conorii* estirpe *israeli* e *R. conorii* estirpe *malish* (Gehrke *et al.*, 2013; Louro *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2003). A FEN foi considerada uma doença com predomínio estival (Oliveira *et al.*, 1999), no entanto, devido ao aquecimento global e à capacidade das espécies do complexo *R. sanguineus* s.l. estarem bem adaptadas ao ambiente familiar, são reportados casos humanos ao longo do ano (Duarte, 2008).

A deteção molecular de *Ri. conorii* no sangue de cães doentes juntamente com uma seroprevalência de 69% (35/51) na população canina considerada clinicamente saudável, foi reportada no sul de Portugal (Alexandre *et al.*, 2011) e em outras áreas endémicas de MSF (Levin *et al.*, 2012; Pennisi *et al.*, 2012; Trotta *et al.*, 2012), sugerindo que os cães são frequentemente expostos a esta bactéria.

I.2.3.4. Ciclo de vida

Com exceção das bactérias *Rickettsia akari* e *Rickettsia felis*, que são transmitidas por ácaros e pulgas, respetivamente, todas as restantes espécies de riquetsias do grupo das febres exantemáticas são transmitidas por ixodídeos (Louro *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2003).

O vetor infeta-se ao efetuar a sua refeição sanguínea no hospedeiro vertebrado infetado (Fig. 16.A) (Marques *et al.*, 2005; Rovey *et al.*, 2008). Esta ingestão de sangue desencadeia a replicação destas bactérias no trato digestivo do vetor as quais persistem nas glândulas salivares durante as mudas ocorrendo transmissão transestadial (Oliveira *et al.*, 1999). Por outro lado, este artrópode funciona também como reservatório deste agente porque tem a capacidade de o transmitir por via transovárica (Fig. 16.B) (Beninati *et al.*,

2005; Marie *et al.*, 2012; Marques *et al.*, 2005; Rovey *et al.*, 2008; Socolovschi *et al.*, 2009), não sendo necessário um hospedeiro vertebrado para a manutenção do ciclo de vida desta bactéria (Dantas-Torres, 2008a; Marquez *et al.*, 2008; Stuen *et al.*, 2013). Desta forma a infecção está presente na carraça ao longo do seu período de vida (Oliveira *et al.*, 1999) e na geração seguinte (Dantas-Torres, 2008a; Stuen *et al.*, 2013).

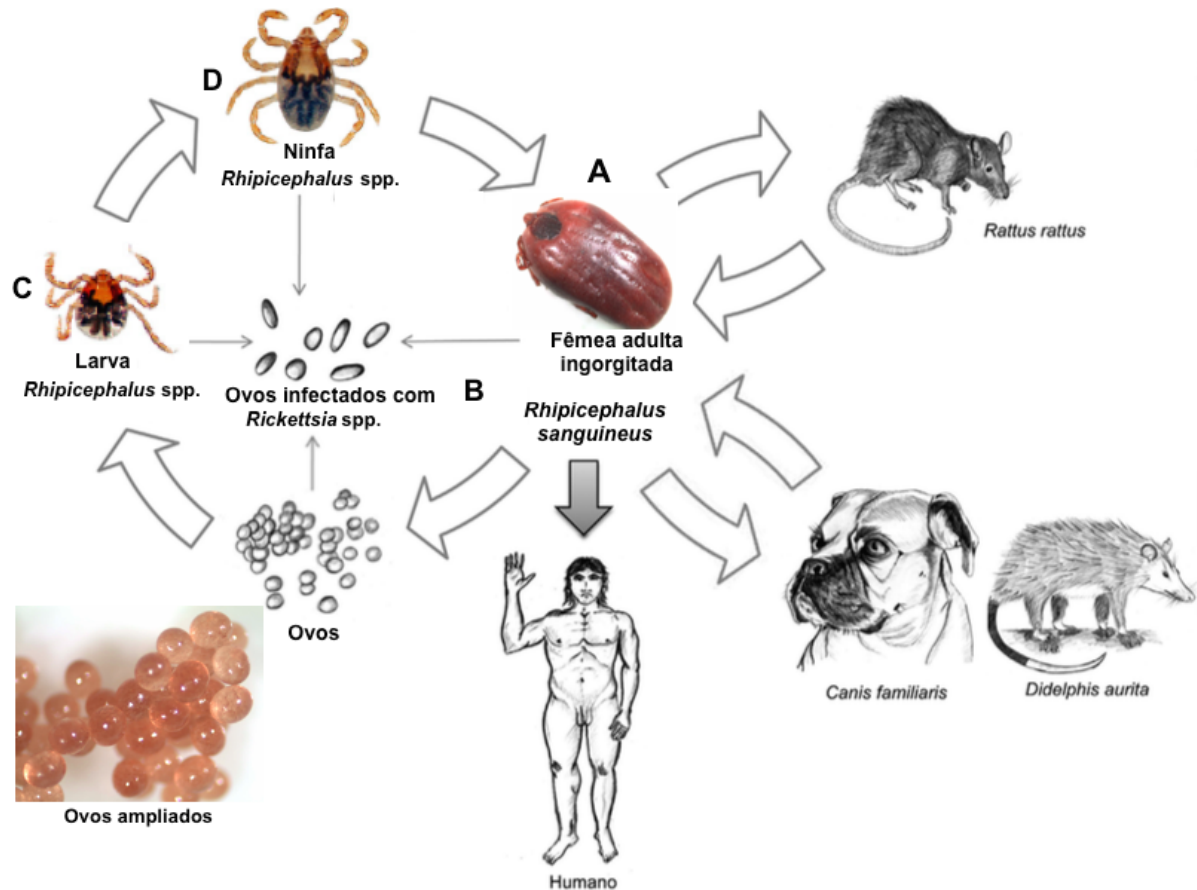


Figura 16 - Ciclo de vida para as riquetsias do grupo das febres exantemáticas (esquema com imagens originais, adaptado de Vélez *et al.*, 2012). Legenda: A-Fêmea adulta ingorgitada; B-ovos; C-larva; D-ninfa.

A transmissão de *Ri. conorii* ao hospedeiro vertebrado faz-se pela fixação de um ixodídeo infetado (enquanto este efetua a sua refeição sanguínea) e para que a transmissão do agente seja efetiva são necessárias entre 6 a 20 horas de parasitação (Sousa *et al.*, 2003). A transmissão do agente também pode ocorrer por via mecânica através da contaminação das mucosas com macerados de carracas infetadas (Oliveira *et al.*, 1999; Sousa *et al.*, 2003). Após a inoculação, a bactéria é disseminada pela corrente sanguínea, invade e replica-se nas células endoteliais existentes nas arteríolas e vénulas, provocando lesão nestes vasos (vasculite generalizada) (Estrada-Peña, 2004c; Greene *et al.*, 2012a; Louro *et al.*, 2006).

A infeção por *Ri. conorii* em cães é normalmente subclínica e quando se manifesta clinicamente, geralmente é aguda, causando sinais de febre, letargia, vômito, diarreia, linfadenopatia, mucosas pálidas, anorexia e petéquias (Alexandre *et al.*, 2011).

I.2.3.5. Saúde pública

A FEN é considerada uma doença endémica em Portugal e é considerada a principal doença associada a carrças (Núncio *et al.*, 2022). Em alguns países da bacia Mediterrânea, tais como Itália e Portugal, a incidência desta patologia aumentou substancialmente em anos recentes (Rovero *et al.*, 2008). Apesar de ser uma doença de notificação obrigatória (Milhano *et al.*, 2010, Pereira *et al.*, 2018), continua-se a subestimar a sua verdadeira incidência devido à sua elevada subnotificação (Marques *et al.*, 2005). Em Portugal, a taxa de incidência da FEN é de 8,4 por cem mil habitantes (1989-2005), uma das mais altas dos países da bacia Mediterrânica, sendo Bragança e Beja os distritos portugueses que apresentam as taxas mais elevadas (Núncio *et al.*, 2022; Sousa, 2008).

Segundo Sousa *et al.* (2003) o grupo etário mais afetado por esta patologia é de 1-4 anos de idade. As crianças são alvos muito vulneráveis porque mantêm uma relação mais próxima com os animais domésticos, como o cão (principal veículo dos vetores para o ambiente humano), e estão em contacto com o solo (gatinham ou brincam) onde pode haver carrças (Marques *et al.*, 2005). Com esta ideia em mente, o maior risco de infeção humana é provavelmente a proximidade a ixodídeos infetados (Harrus *et al.*, 2007).

I.3. Bactérias transmitidas por pulgas

I.3.1. *Bartonella* spp.

I.3.1.1. Etiologia

As bactérias do género *Bartonella* (família Bartonellaceae) são pequenos bacilos gram negativos, curvos, aeróbios e intracelulares facultativos que infetam mamíferos e artrópodes (Brunt *et al.*, 2006; Cotté *et al.*, 2008; Diniz *et al.*, 2007; Guptill, 2010).

I.3.1.2. Hospedeiro invertebrado

A transmissão de *Bartonella henselae* ao hospedeiro felino é realizada através das fezes da pulga *Ctenocephalides felis*, designada como a “pulga do gato” (Fig. 17) (Ebani *et al.*, 2012; Pennisi *et al.*, 2010).



Figura 17 – Pulga do gato, *Ctenocephalides felis*, principal vetor de *Bartonella henselae* (Foto de C. Maia, UEI de Parasitologia Médica, IHMT).

Contudo, o ADN de várias espécies de *Bartonella* já foi detetado em carraças de várias regiões do mundo, nomeadamente: *Ixodes pacificus* e *Ixodes scapularis* nos EUA (Adelson *et al.*, 2004, Halos *et al.*, 2005), *H. flava*, *Haemaphysalis longicornis*, *Ixodes flava*, *Ixodes nipponensis*, *Ixodes turdus*, *I. persulcatus* e *Ixodes* spp. na Coreia (Kim *et al.*, 2005) e em *Haemaphysalis leachi* e em ixodídeos do complexo *R. sanguineus* s.l. na Nigéria (Kamani *et al.*, 2013b). O ADN de *Ba. henselae* foi detetado em *I. ricinus* colhidos na Alemanha, França e Portugal (Dietrich *et al.*, 2010; Sanogo *et al.*, 2003). Embora tenha sido sugerido que as carraças possam transmitir *Bartonella* spp. a vários hospedeiros vertebrados (Ebani *et al.*, 2012; Sanogo *et al.*, 2003) e se tenha recentemente demonstrado a transmissão transestadial de *Ba. henselae*, a sua multiplicação nas glândulas salivares e capacidade infetante em *I. ricinus*, (Cotté *et al.*, 2008), a competência vetorial destes artrópodes ainda não foi comprovada (Reis *et al.*, 2011; Welc-Faleciak *et al.*, 2013).

I.3.1.3. Hospedeiro vertebrado

De um modo geral, *Ba. henselae* e *Bartonella clarridgeiae* são as espécies mais frequentemente detetadas em gatos em vários países da Europa, Ásia, Oceânia e América (Brunt *et al.*, 2010; Diniz *et al.*, 2009), sendo nos cães as espécies *Ba. henselae* e *Bartonella vinsonii* as mais frequentemente detetadas (Diniz *et al.*, 2009). O gato é o reservatório primário de *Ba. henselae* (Dias *et al.*, 2012; Dietrich *et al.*, 2010; Faria *et al.*, 2008), principalmente gatos com menos de um ano de idade (Dias *et al.*, 2011; Faria *et al.*, 2008) sendo o ser humano um hospedeiro acidental (Guptill, 2010).

A espécie *Ba. henselae* é considerada na atualidade como o agente etiológico da doença da arranhadela do gato, responsável pela zoonose bacteriana mais comum adquirida através de um animal de estimação (Diogo *et al.*, 2010; Faria *et al.*, 2008). A espécie *Ba. clarridgeiae* também tem sido associada a esta doença (Murinello *et al.*, 2010).

Em Portugal, Alves *et al.* (2009) obtiveram uma seroprevalência de 64,9% (24/37) para *Ba. henselae* em gatos domésticos, errantes e de abrigos residentes nas regiões de Lisboa e Évora. O ADN de *Ba. clarridgeiae* (Maia *et al.*, 2014a) e *Ba. henselae* foi detetado em gatos residentes no sul de Portugal (Alves *et al.*, 2009; Maia *et al.*, 2014a).

Os cães podem também ser infetados por *Ba. henselae* (Dietrich *et al.*, 2010), no entanto, ao contrário do que ocorre nos gatos, são considerados hospedeiro acidentais (Dietrich *et al.*, 2010; Guptill, 2010; Mogollon-Pasapera *et al.*, 2009). Num estudo serológico em Espanha em cães expostos a artrópodes, Solano-Gallego *et al.* (2006) obtiveram uma prevalência de 16,9% (59/350) para *Ba. henselae* e de 1,07% (5/466) para *Ba. vinsonii* subsp. *berkhoffii*.

I.3.1.4. Ciclo de vida

A pulga infeta-se ao alimentar-se de sangue de um gato portador de *Ba. henselae*. No intestino do vetor, a bactéria multiplica-se sendo excretada pelas fezes (Murinello *et al.*, 2010). No meio ambiente o agente pode sobreviver e permanecer nas fezes de pulgas até nove dias após defecação (Brunt *et al.*, 2006; ESCCAP, 2012b; Haubenstricker, 2010; Pennisi *et al.*, 2010). As fezes de pulgas estão presentes na pele do gato que ao coçar-se, devido ao prurido causado pela infestação de pulgas, contamina as suas unhas e/ou a cavidade oral (ESCCAP, 2012b; Stutzer *et al.*, 2012). Os gatos geralmente infetam-se ao ingerir as fezes de pulga infetadas, durante o “grooming” (ESCCAP, 2012b; Guptill, 2010). A transmissão aos humanos ocorre quando o agente presente nas fezes da pulga é inoculado através de um trauma cutâneo (arranhadelas e/ou mordeduras de gatos) (Dias *et al.*, 2012; Diogo *et al.*, 2010; ESCCAP, 2012b; Guptill-Yoran, 2012; Murinello *et al.*, 2010; Pennisi *et al.*, 2010; Stutzer *et al.*, 2012). Os bacilos de *Bartonella* spp. têm como célula hospedeira os glóbulos vermelhos e apresentam uma grande afinidade pelo endotélio vascular do hospedeiro vertebrado (Breitschwerdt, 2010; Brunt *et al.*, 2006; Diogo *et al.*, 2010; ESCCAP, 2012b) infetando vários tecidos (mucosa oral e respiratória, pele, nódulos linfáticos, tecidos oculares, mucosa gastrointestinal, tecidos esplénicos e hepáticos) (Breitschwerdt, 2010; Haubenstricker, 2010). Posteriormente, um novo vetor é infetado ao ingerir eritrócitos infetados com a bactéria (Chomel *et al.*, 2006; Rubinov *et al.*, 2014; Tuyá *et al.*, 2014).

I.3.1.5. Saúde pública

Este género inclui várias espécies isoladas em humanos, nomeadamente, *Bartonella alsatica*, *Bartonella bacilliformes*, *Ba. clarridgeiae*, *Bartonella elizabethae*, *Bartonella grahamii*, *Ba. henselae*, *Bartonella koehlerae*, *Bartonella quintana*, *Bartonella rochalimae*, *Bartonella tamiae* e *Ba. vinsonii* subsp. *berkhoffii* (Guptill, 2010; Murinello *et al.*, 2010)

responsáveis por causar um amplo espectro de manifestações clínicas (Faria *et al.*, 2008). A espécie *Ba. henselae* é considerada na atualidade como o agente etiológico da doença da arranhadela do gato, responsável pela zoonose bacteriana mais comum adquirida através de um animal de estimação (Diogo *et al.*, 2010; Faria *et al.*, 2008) embora a espécie *Ba. clarridgeiae* também tenha sido associada a esta doença (Murinello *et al.*, 2010).

A infecção de *Ba. henselae* pode ser potencialmente fatal em humanos, particularmente nos indivíduos imunocomprometidos (Presley *et al.*, 2005; Stutzer *et al.*, 2012). A incidência anual desta doença nos EUA varia entre os 6 a 7 casos por 100 000 habitantes, valores que provavelmente subestimam a real prevalência do agente, pelo fato de muitos doentes não procurarem aconselhamento médico (Lamps & Scott, 2004). Vários casos humanos da doença da arranhadela de gato foram recentemente documentados em Portugal (Dias *et al.*, 2012, Diogo *et al.*, 2010; Murinello *et al.*, 2010), inclusive um caso de infecção por *Bartonella quintana* num doente infetado com o vírus da imunodeficiência humana (VIH) (Carvalho, 2010).

Os proprietários dos animais devem ser informados pelo médico veterinário sobre o modo como os gatos adquirem a infecção por *Ba. henselae* e como esta pode ser transmitida aos humanos, incluindo a associação com a infestação por pulgas ou a potencial transmissão por carraças (Guptill, 2010). No caso de adoção de um gato, especialmente em indivíduos imunocomprometidos, deve ser dada preferência a animais com mais de um ano de idade e que se encontrem livres de pulgas (Brunt *et al.*, 2006; Guptill, 2010).

I.4. Filarídeos transmitidos por carraças

I.4.1. *Cercopithifilaria* spp.

I.4.1.1. Etiologia

O género *Cercopithifilaria* (família Onchocercidae) compreende atualmente 28 espécies de nematodes que são parasitas de uma ampla gama de animais domésticos e silváticos e são transmitidas por carraças (Cortes *et al.* 2014). Os nematodes *Cercopithifilaria* adultos localizam-se no tecido subcutâneo e as microfilárias localizam-se exclusivamente na derme (Cortes *et al.*, 2014; Otranto *et al.*, 2011; Solinas *et al.*, 2014);

I.4.1.2. Hospedeiro invertebrado

Os filarídeos pertencentes ao género *Cercopithifilaria* são transmitidos por carraças da família Ixodidae (Brianti *et al.*, 2012; Claerebout *et al.*, 2013; Otranto *et al.*, 2011; 2012; Ramos *et al.*, 2013a; Solinas *et al.*, 2014). As espécies do complexo *R. sanguineus* s.l. são vetores de *Cercopithifilaria baina* (Brianti *et al.*, 2012; Cortes *et al.*, 2014; Ramos *et al.*,

2014a; Solinas *et al.*, 2014) tendo-se detetado microfilárias ou o seu material genético em exemplares colhidos em Espanha, Grécia e Itália (Otranto *et al.*, 2012; Ramos *et al.*, 2014a).

I.4.1.3. Hospedeiro vertebrado

Estes nematodes parasitam uma vasta gama de hospedeiros: ruminantes, primatas, carnívoros, roedores, lagomorfos, marsupiais e monotremados (Otranto *et al.*, 2011; 2012). Na Europa encontram-se reportadas três espécies de *Cercopithifilaria* em cães: *Cercopithifilaria baina*, *Cercopithifilaria grassi* e *Cercopithifilaria* sp. II sensu Otranto *et al.*, 2013 (Cortes *et al.*, 2014; Ramos *et al.*, 2013b) enquanto *Cercopithifilaria rugosicauda* foi identificada em corços (*Capreolus capreolus*) (Ramos *et al.*, 2013b).

I.4.1.4. Ciclo de vida

Ao efetuar a sua refeição sanguínea num hospedeiro infetado por *Cercopithifilaria* spp., a carraça ingere as microfilárias dermais no primeiro estágio larvar (L1) (Brianti *et al.*, 2012; Ramos *et al.*, 2014a). No interior do vetor, as microfilárias desenvolvem-se até atingirem o terceiro estágio larvar, que é a fase infetante (L3) (Fig.18), em 30 dias aproximadamente (Ramos *et al.*, 2013a; 2014c).

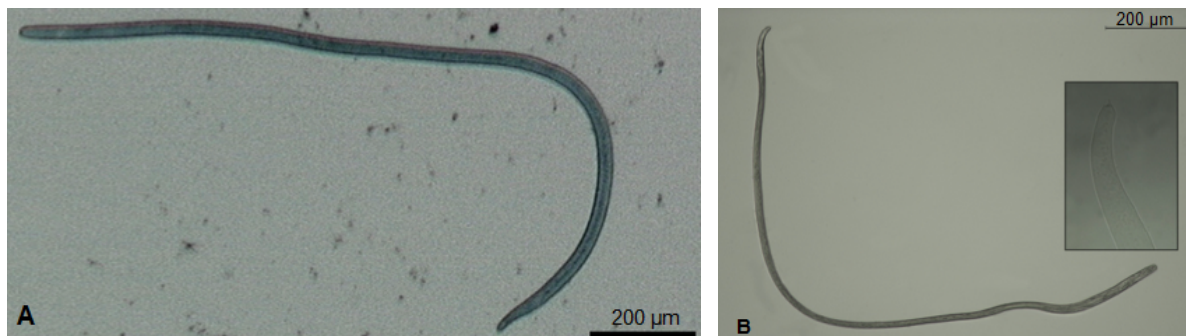


Figura 18 - A: Larva infetante (L3) de *Cercopithifilaria* sp. numa ninfa de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Brianti *et al.*, 2012); B: Terceiro estágio larval (L3) de *Cercopithifilaria baina*e detetado numa carraça adulta (adaptado de Ramos *et al.*, 2014a).

As larvas L3 são inoculadas aquando da refeição sanguínea do vetor no hospedeiro vertebrado. No hospedeiro vertebrado desenvolvem-se até á fase adulta, sucedendo posteriormente a cópula, a fecundação e consequente produção de microfilárias (Ramos *et al.*, 2014c).

I.4.1.5. Saúde pública

Até ao momento não existem dados que levantem a hipótese deste filarídeos terem potencial zoonótico.

I.5. Protozoários transmitidos por carrças

I.5.1. *Babesia* spp.

I.5.1.1. Etiologia

Os protozoários do gênero *Babesia* (família Babesiidae) são hemoparasitas com forma piriforme ou pleomórfica que infetam os eritrócitos do hospedeiro vertebrado (Baneth *et al.*, 2004; Birkenheuer, 2012; Hartmann *et al.*, 2013; Solano-Gallego *et al.*, 2011a), apresentando uma distribuição mundial (Baneth *et al.*, 2004; Hartmann *et al.*, 2013; Solano-Gallego & Baneth, 2011). A babesiose canina, também conhecida como piroplasmose, é causada por várias espécies e subespécies de *Babesia*, nomeadamente *Babesia canis*, *Babesia conradae*, *Babesia gibsoni*, *Babesia rossi*, *Babesia vogeli* (Simões *et al.*, 2011) e *Babesia vulpes* (Baneth *et al.*, 2019).

A morfologia e o tamanho das formas intraeritrocitárias têm sido tradicionalmente utilizadas para a identificação de espécies de *Babesia* que afetam os cães: as grandes babesias com 3-5 μm de comprimento (ex^o *B. canis*; Fig. 19.A) e as pequenas babesias com 0,5-2,5 μm de comprimento (ex^o *B. gibsoni*) (Irwin, 2009; Simões *et al.*, 2011).

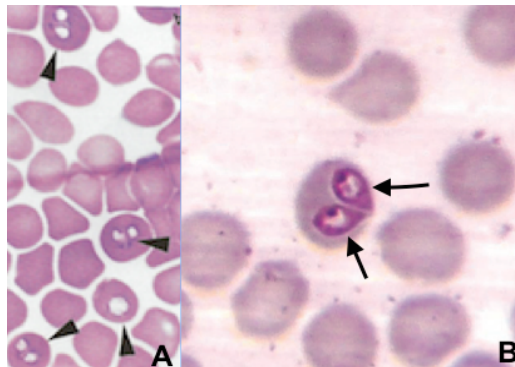


Figura 19 – Esfregaços sanguíneos de cães infetados por *Babesia* spp.. A: Eritrócitos parasitados por *B. canis* (setas); B: Eritrócito com dois trofozoítos de *B. vogeli* (setas) (adaptado de Dantas-Torres, 2008b).

I.5.1.2. Hospedeiro invertebrado

Na Europa, os vetores implicados na transmissão de *B. canis* e *B. vogeli* são os ixodídeos *Dermacentor reticulatus* (Fig. 20) e do complexo *R. sanguineus* s.l., respetivamente (Claerebout *et al.*, 2013).



Figura 20 – Fêmea (A) e macho (B) da espécie *Dermacentor reticulatus* (adaptado de <http://bristoltickid.blogs.ilt.ort.org/key-to-genera/dermacentor/dermacentor-reticulatus/>).

A infecção por *B. canis* ocorre nas regiões temperadas da Europa (Cardoso *et al.*, 2008; Simões *et al.*, 2011) enquanto *B. vogeli* encontra-se distribuída na bacia do Mediterrâneo (Cardoso *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2013; Solano-Gallego *et al.*, 2011a). A distribuição de *B. canis* em Portugal está estreitamente relacionado com o do seu principal vetor, geralmente encontrado no Norte e Centro de Portugal (Santos-Silva *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2013) enquanto *B. vogeli* encontra-se presente de norte a sul do país devido à ampla distribuição do complexo *R. sanguineus* s.l. (Cardoso *et al.*, 2008; Santos-Silva *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2013).

Em Israel detetou-se ADN de *B. vogeli* em *R. turanicus* (Harrus *et al.*, 2011) e em Itália amplificou-se material genético de *B. canis* em carraças da espécie *Dermacentor marginatus* (Trotta *et al.*, 2012).

I.5.1.3. Hospedeiro vertebrado

O protozoário *B. canis* parasita preferencialmente os canídeos domésticos e silváticos (cão, lobo e chacal), mas pode parasitar outros hospedeiros, tais como o gato (Penzhorn & Oosthuizen, 2020).

O ADN de *B. canis* foi detectado em cães (Cardoso *et al.*, 2008; 2010b) e gatos do norte e centro de Portugal (Vilhena *et al.*, 2013). Também por técnicas de biologia molecular foi possível detetar ADN de *Babesia microti*-like em cães (Simões *et al.*, 2011) e raposas (Cardoso *et al.*, 2013) assim como *B. vogeli* em gatos (Maia *et al.*, 2014a).

I.5.1.4. Ciclo de vida

As carraças ao alimentarem-se do sangue do hospedeiro infetado ingerem os merozoítos de *Babesia* presentes nos eritrócitos (Solano-Gallego *et al.*, 2011a). No interior do artrópode ocorre a reprodução sexuada (gametogenia) em que os parasitas atingem o intestino e diferenciam-se em macrogametócitos e microgametócitos. Estes produzem

gâmetas femininos e masculinos que se fundem no lúmen intestinal para darem origem ao zigoto (Fig. 21.F). O zigoto penetra no intestino, entra na hemolinfa e migra para o tecido das glândulas salivares do ixodídeo onde ocorre a esporogonia (reprodução assexuada) com formação de esporozoítos (Fig. 21.G) (Taboada & Lobetti, 2006). Antes da migração do parasita para as glândulas salivares, e dependendo da espécie de *Babesia*, os esporozoítos podem também migrar para o ovário da carraça (transmissão transovárica), garantindo a infecção de vários ovos (Fig. 21.I). A capacidade de transmissão transestadial e transovárica do agente permite a perpetuação dos protozoários, tornando o ixodídeo infetante entre gerações, sem necessidade das carraças se alimentarem num hospedeiro infetado (Esch & Peterson, 2013; Roura, 2006; Taboada & Lobetti, 2006).

Os hospedeiros vertebrados são infetados através da alimentação (refeição sanguínea) de um ixodídeo infetado com o agente. Os esporozoítos, forma infetante do parasita, são inoculados juntamente com a saliva do ixodídeo na corrente sanguínea, aderindo à membrana eritrocitária e penetrando o glóbulo vermelho por endocitose (Fig. 21.A) (Estrada-Peña, 2004b). Os parasitas replicam-se por divisão binária e formam merozoítos que são observados em pares ou de forma isolada dentro dos eritrócitos (Fig. 21.B). A reprodução assexuada (merogonia) leva à formação de oito ou mais merozoítos na mesma célula e a consequência final deste processo multiplicativo é a lise celular e a libertação dos parasitas para a corrente sanguínea, seguida de invasão de novos glóbulos vermelhos (Fig. 21.D) (Solano-Gallego *et al.*, 2011a).

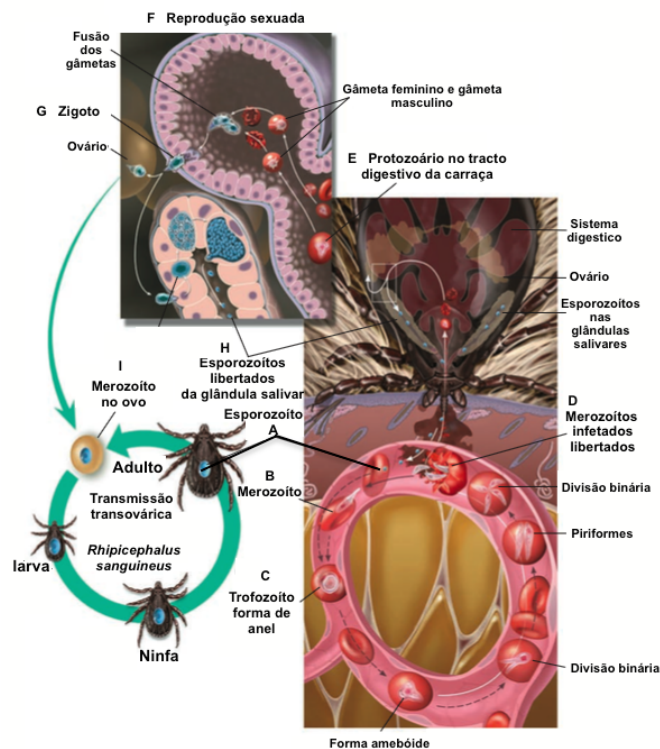


Figura 21 – Ciclo de vida de *Babesia canis* (adaptado de Taboada & Lobetti, 2006).

Algumas espécies de *Babesia*, incluindo *B. canis*, tornam-se infetantes para os animais dois a três dias depois da fixação do ixodídeo. Pensa-se que os factores responsáveis pelo estímulo para a maturação dos esporozoítos são a mudança de temperatura ou a presença de sangue no intestino do vetor (Solano-Gallego & Baneth, 2011a).

A transmissão do parasita através de transfusões de sangue, por via transplacentária e por mordeduras de cães também se encontra documentada (Hartmann *et al.*, 2013; Roura, 2006; Taboada & Lobetti, 2006; Solano-Gallego & Baneth, 2011a).

I.5.1.5. Saúde pública

A babesiose humana é uma infeção zoonótica emergente (Solano-Gallego *et al.*, 2011a), sendo a gravidade da infeção maior nos idosos, nos doentes imunodeprimidos, ou nos doentes submetidos a esplenectomia (Solano-Gallego & Baneth, 2011a; Birkenheuer, 2012).

Existem diversas espécies de *Babesia* implicadas na babesiose humana, das quais são exemplos as espécies *B. divergens* e *B. venatorum* presentes na Europa e as espécies *Babesia microti* e *B. duncani* na América do Norte (Birkenheuer, 2012; Centeno-Lima *et al.*, 2003; Gabrielli *et al.*, 2014; Schorn *et al.*, 2011; Solano-Gallego & Baneth, 2011a; Taboada & Lobetti, 2006). O primeiro caso fatal de babesiose humana em Portugal causado por *B. divergens* ocorreu num indivíduo esplenectomizado (Centeno-Lima *et al.*, 2003).

Embora os animais de companhia não pareçam atuar como reservatórios de espécies de *Babesia* com potencial zoonótico, podem servir como veículos de transporte de carraças infetadas, aumentando o risco de transmissão aos seres humanos (Birkenheuer, 2012; Gallego & Baneth, 2011).

I.5.2. *Hepatozoon* spp.

I.5.2.1. Etiologia

Os protozoários do género *Hepatozoon* (família Hepatozoidae) são transmitidos aos hospedeiros vertebrados, nomeadamente anfíbios, aves, mamíferos e répteis (Aktas *et al.*, 2013, Baneth *et al.*, 2011; 2013; Ivanov *et al.*, 2008), por diferentes artrópodes tais como carraças e pulgas. Na corrente sanguínea, *Hepatozoon* parasita os leucócitos (neutrófilos e monócitos) do hospedeiro vertebrado (Modrý *et al.*, 2017). O cão é afetado sobretudo pelas espécies *Hepatozoon canis* e *Hepatozoon americanum* (Baneth *et al.* 2013; Modrý *et al.*, 2017). No caso do gato, a espécie mais comum é *Hepatozoon felis*, podendo também ser

afetado por *H. canis* e pelo mais recentemente descrito *Hepatozoon silvestris* (Baneth *et al.* 2013; Hodžić & Alić, 2022; Modrý *et al.*, 2017).

I.5.2.2. Hospedeiro Invertebrado

Na Europa, o principal vetor e hospedeiro definitivo de *Hepatozoon canis* são os ixodídeos do complexo *R. sanguineus* s.l. (Aktas *et al.*, 2013; Baneth, 2012a; Ramos *et al.*, 2014a) enquanto nos EUA *H. americanum* tem como hospedeiro definitivo o ixodídeo *Amblyomma maculatum*. A ocorrência da hepatozoonose canina está intimamente relacionada com a distribuição geográfica do hospedeiro definitivo (Aktas *et al.*, 2013; Baneth, 2011; Macintire *et al.*, 2012).

Relativamente à espécie *H. felis*, e embora ainda não se tenha identificado o seu vector (Baneth *et al.*, 2013), Aktas *et al.* (2013) amplificaram o seu ADN em exemplares do complexo *R. sanguineus* s.l. na Turquia.

I.5.2.3. Hospedeiro vertebrado

A espécie *H. canis* é o agente etiológico da hepatozoonose canina presente no Velho e Novo Mundo (Baneth, 2011), sendo um dos agentes infecciosos mais comuns dos canídeos domésticos e silváticos (Baneth, 2012a; Baneth *et al.*, 2013; Ivanov *et al.*, 2008).

Em Portugal, este protozoário foi identificado por biologia molecular e/ou por citologia/histopatologia em cães (Maia *et al.*, 2015a; René-Martellet *et al.*, 2015; Yisaschar-Mekuzas *et al.*, 2013) e raposas (Cardoso *et al.*, 2014; Conceicao-Silva *et al.*, 1988).

A hepatozoonose em gatos domésticos causada por *H. canis* e *H. felis* tem sido documentada no Velho e Novo Mundo (Baneth, 2011). A espécie *H. silvestris* foi identificada em gatos silvestres (*Felis silvestris silvestris*) apenas em 2017 (Modrý *et al.*, 2017). Em Portugal, casos de infecção por *H. felis* encontram-se reportados em gatos residentes no território continental (Maia *et al.* 2014; Vilhena *et al.* 2013).

I.5.2.4. Ciclo de vida

O ciclo de vida de *Hepatozoon* é heteroxeno e apresenta duas fases de reprodução, assexuada e sexuada. A fase assexuada ocorre no hospedeiro vertebrado e inclui a merogonia e diferenciação em gamontes, enquanto a fase sexuada inclui a gametogonia seguida de esporogonia e ocorre nos hospedeiros invertebrados (Baneth, 2011; Ivanov *et al.*, 2008; Vilcins *et al.*, 2009).

No caso de *H. canis*, o ixodídeo infeta-se ao efetuar a sua refeição sanguínea no hospedeiro vertebrado infetado, ingerindo neutrófilos (Fig. 22.A) ou monócitos (Fig. 22.B)

contendo os gamontes (Fig. 22.H) (Aktas *et al.*, 2013; Baneth, 2012a; Ivanov *et al.*, 2008). No tubo digestivo do vetor, os gamontes libertam-se dos leucócitos e ocorre a gametogénese com a formação de gâmetas distintos com posterior fertilização e formação do zigoto móvel (Fig. 22.I). O zigoto atravessa a parede intestinal e chega ao hemocélio da carraça, onde se desenvolve e permanece em oocisto (Fig. 22.C) (Aktas *et al.*, 2013; Baneth, 2012a; Ivanov *et al.*, 2008). Não há migração dos esporozoítos para a glândula salivar do vetor (Baneth, 2011; 2012a, Farkas *et al.*, 2014).

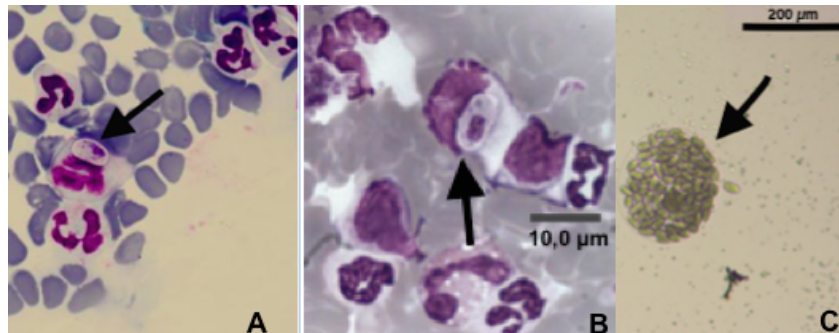


Figura 22 - Esfregaços de sangue periférico corados por Giemsa, infetados por *Hepatozoon canis*, onde se visualiza um gamonte no citoplasma de um neutrófilo (x1000) (seta) (A) (Amoli *et al.*, 2012) e de um monócito (seta) (B) (adaptado http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1984-29612011000300002&script=sci_arttext); C: Oocisto maduro (seta) de *H. canis* no hemocélio de *R. sanguineus* s.l. (adaptado de Ramos *et al.*, 2014).

O protozoário *H. canis* é transmitido transtadialmente quando é feita a muda para o estágio adulto (Aktas *et al.*, 2013; Farkas *et al.*, 2014; Ramos *et al.*, 2014). A transmissão transovárica não foi demonstrada (Baneth, 2012a; Farkas *et al.*, 2014; Ivanov *et al.*, 2008).

A infeção do hospedeiro vertebrado ocorre pela ingestão do artrópode infetado, ou seja, da ninfa ou da carraça adulta do complexo *Rhipicephalus sanguineus* s.l., contendo oocistos com esporozoítos maduros (Fig. 23.A) (Aktas *et al.*, 2013; Baneth, 2011; Baneth *et al.*, 2013; Dantas-Torres *et al.*, 2012b; Ivanov *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2014a; Vilcins *et al.*, 2009). No hospedeiro vertebrado, os esporozoítos (forma infetante) são libertados dos oocistos e penetram na parede intestinal (Fig. 23.B), sendo disseminados por via sanguínea e circulação linfática até ao baço, linfonodos, fígado, medula óssea e pulmões (Fig. 23.C) (Baneth *et al.*, 2012a). No caso de *H. americanum*, *H. felis* e *H. silvestris*, a multiplicação do parasita ocorre sobretudo ao nível dos tecidos muscular esquelético e cardíaco (Baneth *et al.*, 2013; Hodžić & Alić, 2022). Nestes tecidos ocorre o processo de merogonia, ou seja, os merozoítos dividem-se de forma assexuada, formando dois tipos de merontes: um contendo macromerozoítos (Fig. 23.E) que se libertam do meronte maduro e invadem novas células hospedeiras para formar novos merontes (início de uma segunda merogonia); e outro contendo micromerozoítos que após invadirem os neutrófilos e monócitos dão origem aos gamontes (Fig. 23.G) (Baneth, 2012a). O ciclo de vida fica completo quando um hospedeiro intermediário ingere sangue do hospedeiro vertebrado contendo leucócitos parasitados.

Embora a ingestão do vetor seja a mais comum nos canídeos, a transmissão transplacentária de *H. canis* também se encontra reportada (Baneth, 2012a; Baneth *et al.*, 2013).

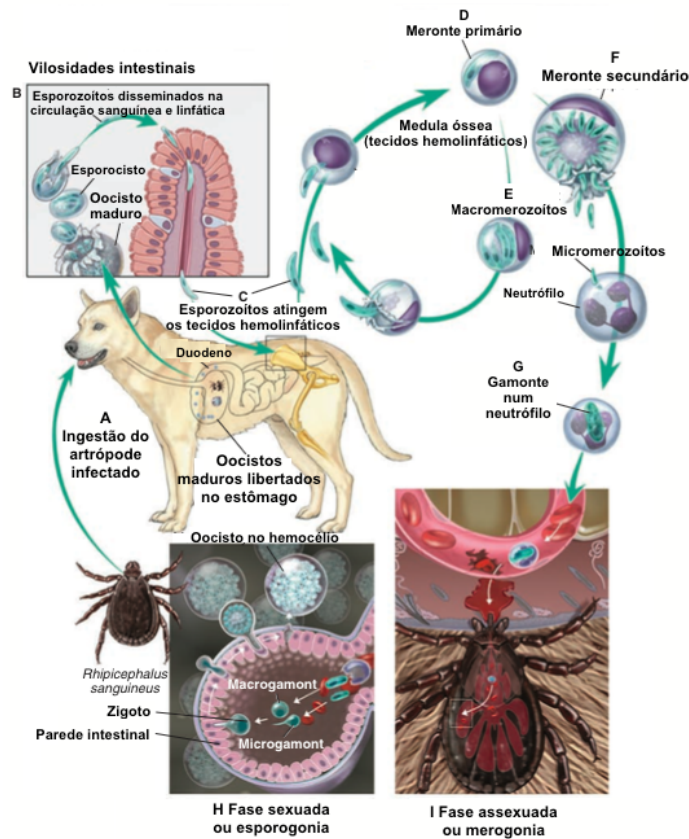


Figura 23 - Ciclo de vida de *Hepatozoon canis* (adaptado de Baneth, 2012a).

I.5.2.5. Saúde pública

Até ao momento, apenas um caso clínico humano por *Hepatozoon* spp. foi reportado nas Filipinas (Baneth, 2012a), não existindo mais dados relativamente à importância zoonótica deste protozoário. Contudo, uma vez que a infecção é transmitida pela ingestão da carraça infetada (Aktas *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2014c), o perigo da transmissão deste agente de cães para humanos parece ser muito baixo (Macintire *et al.*, 2012).

I.6. Protozoários transmitidos por flebótomos

I.6.1. *Leishmania infantum*

I.6.1.1. Etiologia

Os protozoários do género *Leishmania* (família Trypanosomatidae) apresentam durante o seu ciclo de vida duas formas principais, a forma promastigota, extracelular e flagelada, que se encontra no vetor, e a forma amastigota, aflagelada e intracelular, que

parasita o sistema mononuclear fagocitário do hospedeiro vertebrado (Bañuls *et al.*, 2007; Santos-Gomes *et al.*, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2011b; Pennisi *et al.*, 2013).

I.6.1.2. Hospedeiro invertebrado

Os vetores de *Leishmania* spp. são pequenos insectos (família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae), comumente designados de flebótomos (NCBI, 2009c). A transmissão do parasita aos hospedeiros vertebrados é realizada por fêmeas de flebotomíneos dos géneros *Lutzomyia* spp. no Novo Mundo e *Phlebotomus* spp. no Velho Mundo (Killick-Kendrick, 1999). Em Portugal, os vetores comprovados de *Leishmania infantum* são *Phlebotomus perniciosus* (Fig. 24) e *Phlebotomus ariasi* (Afonso & Alves-Pires, 2008, Maia & Campino, 2015).



Figura 24 – *Phlebotomus perniciosus*, fêmea engorgitada (adaptado de Charrel *et al.*, 2007).

Em climas temperados, como é o caso de Portugal, a época de atividade flebotomínica decorre de Maio a Outubro, com o pico entre Julho e Agosto, principalmente ao crepúsculo e durante a noite (Afonso & Alves-Pires, 2008).

I.6.1.3. Hospedeiro vertebrado

O cão é o principal reservatório doméstico e peridoméstico de *Leishmania infantum*, (sinónimo *L. chagasi*) em países da Bacia do Mediterrâneo, Médio Oriente, Ásia, América Central e do Sul (Campino *et al.*, 2013; Dantas-Torres, 2011; Grevot *et al.*, 2005; Maia *et al.*, 2011; Spada *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos em Portugal apontam para uma seroprevalência global de leishmaniose canina de 6%, sendo superior a 10% nos distritos de Castelo Branco (17,4%), Portalegre (12,5%) e Beja (12,1%) (Cortes *et al.*, 2012) enquanto a deteção do ADN do parasita no sangue periférico variou entre 1,1% e 34,9% em cães do sul do país (Maia *et al.*, 2010; 2015).

Esta infecção já foi documentada em gatos domésticos em muitos países onde esta zoonose é endêmica (Maia *et al.*, 2008; 2010; 2014b; Maia & Campino, 2015b; Ramos, 2012; Pinto, 2013). Em Portugal foram realizados vários estudos moleculares tendo-se obtido uma prevalência de 0,3% no norte e centro (Vilhena *et al.*, 2013), entre 20,3% e 30,4% na região de Lisboa (Maia *et al.*, 2008; 2010), e de 9,9% no sul do país (Maia *et al.*, 2014a).

I.6.1.4. Ciclo de vida

Os protozoários do género *Leishmania* possuem dois hospedeiros no seu ciclo: um invertebrado e um vertebrado (Killick-Kendrick, 1999; Afonso & Alves-Pires, 2008).

O vetor, um flebótomo fêmea infetado, usa as suas mandíbulas para rasgar a pele, ao realizar a sua refeição de sangue no hospedeiro vertebrado suscetível e inocula as formas promastigotas metacíclicas do parasita na camada interna da pele (Afonso & Alves-Pires, 2008; Baneth, 2012b; Killick-Kendrick, 1999; Santos-Gomes *et al.*, 2009). As formas promastigotas metacíclicas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos, no vacúolo parasitóforo, diferenciam-se em formas imóveis, os amastigotas (Fig. 25) e multiplicam-se provocando a destruição das células fagocíticas, ocorrendo a libertação destas formas e consequente invasão de novas células do sistema mononuclear fagocítico (Bañuls *et al.*, 2007; Pennisi *et al.*, 2013; Santos-Gomes *et al.*, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2011b).

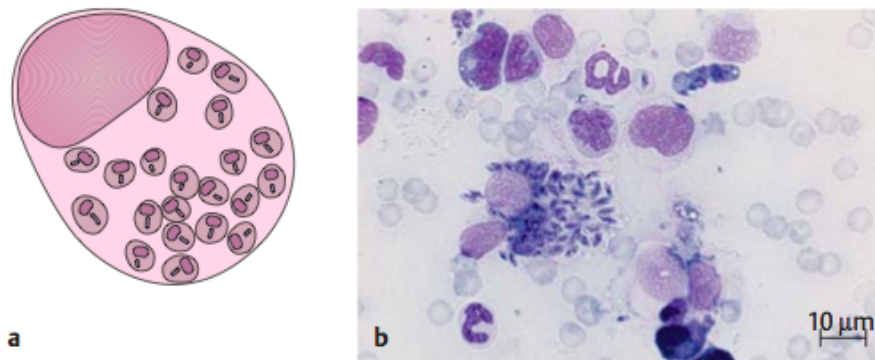


Figura 25 – Formas amastigotas de *Leishmania infantum*. (a) Representação esquemática de um macrófago com várias formas amastigotas; (b) Esfregaço de medula óssea corado por Giemsa, onde se visualizam várias formas amastigotas de *Leishmania infantum* dentro de um macrófago (adaptado de Kayser *et al.*, 2005).

A infecção vetorial inicia-se quando uma fêmea flebotomínica efetua a sua refeição sanguínea ingerindo os macrófagos infetados com formas amastigotas de *Leishmania* (Afonso & Alves-Pires, 2008; Baneth & Solano-Gallego, 2012b). No interior do vetor, as formas amastigotas transformam-se em promastigotas procíclicas (Afonso & Alves-Pires,

2008). Após várias transformações morfológicas, os promastigotas diferenciam-se nas formas promastigotas metacíclicas (Bates, 2007).

Além da transmissão através dos flebótomos, estão descritos alguns casos de transmissão congênita, transfusão sanguínea a partir de doadores infetados e transmissão venérea (Afonso & Alves-Pires, 2008; Campino & Maia, 2012; CFSPH, 2013; Dantas-Torres *et al.*, 2010; Killick-Kendrick, 1999; Pennisi *et al.*, 2013; Solano-Gallego *et al.*, 2011b). Outras formas secundárias de transmissão ainda não comprovadas são a transmissão direta entre cães (pela mordedura ou feridas abertas) e a transmissão por outros ectoparasitas hematófagos, como as pulgas *Ctenocephalides felis* e as carraças do complexo *R. sanguineus* s.l. (Baneth, 2012b; CFSPH, 2013; Dantas-Torres *et al.*, 2009; 2010; Pennisi *et al.*, 2013; Solano-Gallego *et al.*, 2009; 2011b).

A possibilidade da transmissão oral de *Leishmania infantum* por ingestão de ixodídeos do complexo *R. sanguineus* s.l. infetados foi verificada experimentalmente por Coutinho *et al.* (2005). Estes autores infetaram experimentalmente por via oral e peritoneal hamsters com macerados de *R. sanguineus* s.l. removidos de cães seropositivos para *Leishmania*, e após seis meses de infecção, amplificaram ADN do parasita em 40,9% (27/98) das amostras de baço e fígado dos hamsters. Apesar destes resultados sugerirem que estes artrópodes possam ser uma via alternativa de transmissão deste protozoário para os canídeos, são necessários mais estudos para compreender a sua competência vetorial e o seu papel na epidemiologia da leishmaniose canina (Dantas-Torres *et al.*, 2010; 2011; Trotta *et al.*, 2012).

I.6.1.5. Saúde pública

A leishmaniose canina é importante não só do ponto de vista veterinário, mas também em saúde pública humana, já que o cão é considerado o principal reservatório da leishmaniose visceral humana (Campino & Maia, 2010). A infecção por *L. infantum* em humanos é considerada acidental e a forma visceral é a manifestação clínica mais grave desta infecção, ocorrendo principalmente em crianças e adultos imunocomprometidos (Organização Mundial Da Saúde, 2010). No período de 1999 a 2014 foram diagnosticados laboratorialmente, na Unidade de Leishmanioses do IHMT (UNL), 199 novos casos de Leishmaniose visceral humana, 122 em indivíduos adultos imunodeprimidos, e 27 casos de leishmaniose cutânea (Maia & Campino, 2015). Embora a leishmaniose cutânea causada por *L. infantum* seja considerada rara em Portugal, são diagnosticados por ano cerca de 10 novos casos (Campino & Maia, 2010).

I.7. Controlo de ixodídeos

Mais de 10% das espécies de carraças são vetores de agentes patogénicos que afectam quer o homem quer outros animais (Silva, 2014). Uma vez que estes ectoparasitas passam 94-97% da vida no ambiente (Gray *et al.*, 2013), as estratégias de controlo devem envolver uma combinação de meios químicos e não-químicos abrangendo quer o hospedeiro quer o ambiente, numa tentativa de eliminar os seus biótopos (Cafarchia *et al.*, 2015; Dantas-Torres, 2008a; Small & Morton, 2010).

Os acaricidas sob a forma de coleiras impregnadas, pipetas “spot-on” ou “sprays” são as formas mais comuns e eficazes no controlo de infestações por carraças nos animais de companhia. Os piretróides sintéticos concentrados e especialmente as permetrinas, ou as amidinas (amitraz) são tóxicas para os felinos, sendo o fipronil o acaricida mais apropriado nestes animais (ESCCAP, 2012a; Hartmann *et al.*, 2013). Estes princípios ativos interferem com a função neurológica dos ixodídeos em 24 horas (permetrinas) ou entre as 24 e as 48 horas (amitraz, fipronil e piriprol), existindo a hipótese que nesse tempo haja transmissão de agentes patogénicos (Shaw, 2008). O piriproxifeno combinado com um acaricida impede as mudas e, no caso da carraça fêmea adulta sobreviver, inibe a postura dos ovos (Estrada-Peña, 2004a). A regularidade de aplicação destes ectoparasiticidas depende do grau de infestação e da duração do efeito do acaricida, devendo ser respeitadas todas as instruções referidas na bula do produto (Dantas-Torres, 2008a). Uma correta desparasitação dos animais domésticos pode ajudar a repelir e a diminuir o tempo de fixação das carraças. A densidade da população de carraças à volta das habitações também pode ser controlada, quer através do uso de acaricidas ambientais quer através da construção de cercas que mantenham os animais silváticos afastados das zonas de residência. Uma particularidade que torna o complexo *R. sanguineus* s.l. diferente de outras espécies de carraças é a capacidade de completar o seu ciclo de vida em ambientes fechados, ou seja, dentro de casa ou em canis (Dantas-Torres, 2008a). Neste sentido, as áreas de repouso do cão (as casotas/canis, as paredes, as frestas e as fendas das casas) devem ser pulverizadas (Small & Morton, 2010; World Health Organization [WHO], 2006) com acaricidas permitidos para uso doméstico, como as permetrinas (Shaw, 2008). Contudo, o propoxur (em pó ou em spray) pode também ser utilizado para polvilhar a cama e cobertores dos animais para impedir reinfestações (Bayer, 2009). A escovagem regular do animal pode prevenir a fixação e a ingestão de carraças (Shaw, 2008). O controlo mecânico através da remoção manual das carraças deve ser seguido da aplicação de acaricidas (Dantas-Torres, 2008a, ESCCAP, 2012a). Após a deteção dos artrópodes e tratamento da infestação, deverá ser iniciado um tratamento profiláctico (ESCCAP, 2012).

Em relação ao ser humano também existem medidas importantes que podem ajudar

a evitar o contacto e o risco de parasitação por carraças tais como caminhar pelo centro dos trilhos, evitar ambientes infestados por carraças, e quando tal for inevitável, usar roupas adequadas (com cores claras para fácil observação das carraças, com mangas compridas e calças por dentro das meias ou uso de botas altas). Além disso, o uso de repelentes, a observação corporal diária e a remoção imediata das carraças, podem ajudar a prevenir a transmissão de agentes patogénicos (Marques, 2010).

I.8. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo principal a deteção molecular de ADN de *Anaplasma* spp./*Ehrlichia* spp., *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Borrelia burgdorferi* s.l., *Cercopithifilaria* spp., *Hepatozoon* spp., *Leishmania infantum* e *Rickettsia* spp. em *Rhipicephalus sanguineus* s.l. capturados em animais (cães, gatos) e no ambiente (solo).

II. Materiais e Métodos

O presente estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, com o número 28-2013.

II.1. Áreas geográficas de estudo

Os ixodídeos estudados foram colhidos nos distritos da Guarda, Lisboa, Setúbal e Faro (Fig. 26).

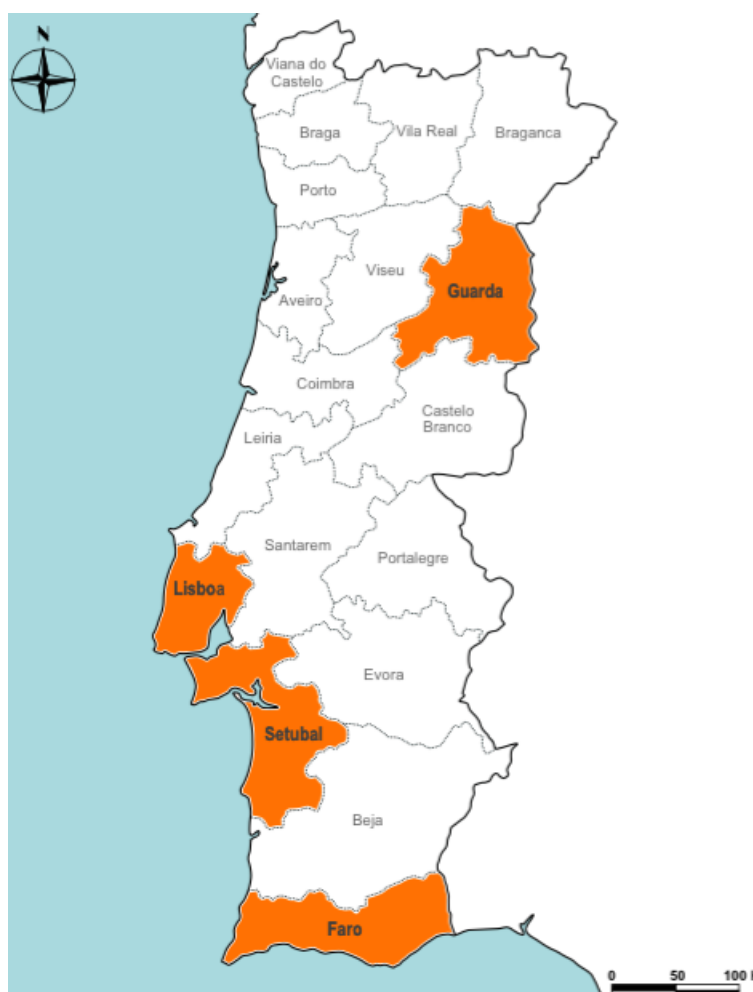


Figura 26 - Mapa representativo dos quatro distritos de Portugal onde foram capturados os ixodídeos.

II.1.1. Caracterização das áreas geográficas das amostras

O distrito da Guarda é limitado a norte pelo distrito de Bragança, a oeste por Coimbra e Viseu, a leste faz fronteira com Espanha e a sul pelo distrito de Castelo Branco (Câmara Municipal da Guarda [CMG], 2014; Câmara Municipal de Lisboa [CML], 2014; Instituto Geográfico do Exército [IGEOE], 2014). Apresenta uma população total de 168898 habitantes (Censos, 2011) numa área de 5518 km² divididos em 14 municípios (Instituto nacional de estatística [INE], 2014). O clima deste distrito é temperado, com influência mediterrânica, visto que no verão existe uma curta estação seca. Os meses mais quentes são Julho e Agosto, com temperatura média de 17 °C, sendo os meses mais frios Janeiro e Fevereiro, com média de 3 °C. É considerado um dos distritos mais frios de Portugal, experimentando em alguns dias do ano precipitações de neve e temperaturas negativas, sendo a pluviosidade média anual de 1713 mm (CMG, 2014).

O distrito de Lisboa é limitado a norte pelo distrito de Leiria, a leste pelo distrito de Santarém, a oeste pelo Oceano Atlântico e a sul pelo rio Tejo e distrito de Setúbal (CML, 2014; IGEOE, 2014). Este distrito apresenta uma população total de 2026481 habitantes (Censos, 2011) com uma área de 2,761 km² distribuída por 16 municípios (INE, 2014). O clima é temperado e mediterrâneo, geralmente com invernos amenos e chuvosos e verões quentes e sem chuva e com índice pluviométrico que se situa entre os 500-700 mm, verificando-se uma temperatura média entre 15 e 35°C no verão e entre 3 e 17 °C no inverno (CML, 2014).

O distrito de Setúbal está limitado a norte pelo distrito de Lisboa (CMS, 2014) e pelo distrito de Santarém, a leste pelo distrito de Évora e a sul pelo distrito de Beja (IGEOE, 2014). Apresenta uma população de 781064 habitantes (censos, 2011) com uma área total de 5 064 km² dividida por 13 municípios (INE, 2014; CMS, 2013). A região de Setúbal apresenta um clima misto, subtropical e mediterrânico, com fracas amplitudes térmicas, sendo a precipitação reduzida com índice pluviométrico que se situa entre os 500-700 mm e a temperatura média anual de 16° C (CMS, 2013).

O distrito de Faro está limitado a norte pelo distrito de Beja, a leste faz fronteira com Espanha e é ainda banhado a sul e a oeste pelo oceano Atlântico (Câmara Municipal de Lisboa [CML], 2014; IGEOE, 2014). O distrito compreende uma área total de 4960 km² distribuído por 16 municípios e uma população de 442358 habitantes (Censos, 2011; INE, 2014). O clima do distrito é quente, ameno e seco todo o ano com fracas amplitudes térmicas, verificando-se um índice pluviométrico entre 500 e 650mm que se concentra sobretudo nos meses de inverno; no verão a temperatura média situa-se entre os 25 e 30°C e no inverno entre os 15 e 20 °C (CMF, 2014).

II.2. Métodos de captura dos ixodídeos

As colheitas de ixodídeos do complexo *R. sanguineus* s.l. foram realizadas pela autora do presente trabalho e por médicos veterinários durante a fase parasitária (em hospedeiros animais) e durante a fase de vida livre (vegetação) no período de um ano, entre Maio de 2012 e de Maio de 2013. Todos os espécimens obtidos dos hospedeiros vertebrados foram retirados cuidadosamente com torções suaves utilizando uma pinça, para preservar o aparelho bucal, imprescindível para a identificação taxonómica. Posteriormente foram acondicionados em microtubos de plástico com tampa de rosca, de 1,5 ml contendo álcool a 70%, devidamente identificados (com inscrição da data da colheita, região geográfica e hospedeiro).

Na colheita dos ectoparasitas no meio ambiente (pelo grupo de Leptospirose e Borreliose de Lyme, unidade de Microbiologia Médica, IHMT) foi utilizado o método de arrastamento da bandeira, que consistiu na utilização de um pano de flanela, de cor branca, com dimensões de 1,50 metros de comprimento por 1,0 metro de largura, com duas hastes de madeira com o objectivo de manter a flanela aberta, permitindo que a face da flanela estivesse em maior contacto com a vegetação (Fig. 27). Os espécimens foram recolhidos da flanela com o auxílio de pinças e acondicionados em microtubos de modo idêntico ao descrito anteriormente para os exemplares colhidos dos animais domésticos.



Figura 27 - Técnica de arrasto com flanela branca para a colheita de ixodídeos no meio ambiente (adaptado de Lopes, 2013).

Todos os espécimes foram transportados para o laboratório do IHMT, onde foram processados.

II.3. Identificação de carrças do complexo *R. sanguineus* s.l.

A identificação taxonómica dos espécimes capturados foi realizada com recurso a um estereomicroscópio binocular (Motic SMZ-168), pela Mestre Mónica Nunes, do grupo das Leptospiras e Borreliose de Lyme (IHMT-UNL), utilizando a chave morfológica para a fauna ixodológica, segundo Travassos-Dias (1994).

Cada ixodídeo foi separado para um tubo safe-lock de 1,5 ml autoclavado, devidamente identificado com a numeração laboratorial, data da colheita, região geográfica, origem (hospedeiro/vegetação), espécie e estágio de desenvolvimento. De seguida, foram conservados a -20°C até à extração de ADN.

II.4. Pesquisa de ADN de *Anaplasma* spp./*Ehrlichia* spp., *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Borrelia burgdorferi* sensu lato., *Cercopithifilaria* spp., *Hepatozoon* spp., *Leishmania infantum* e *Rickettsia* spp. através da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Para a realização da técnica de PCR foi necessário executar várias etapas (Fig. 28), nomeadamente, a extração do ADN dos ixodídeos, o controlo de qualidade de extração através da quantificação do ADN por espectrofotometria e a amplificação parcial do gene constitutivo 16S rDNA da carrça.

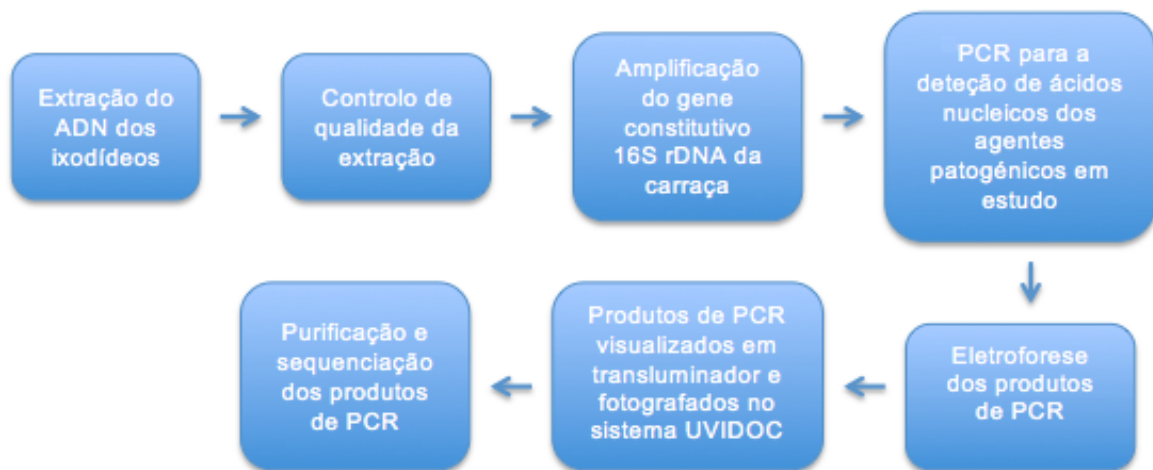


Figura 28 - Diagrama de execução.

Em todas as amplificações foram utilizados controlos positivos previamente sequenciados e específicos para cada agente que se pretendia detetar e controlos negativos. Para evitar contaminações cruzadas utilizaram-se materiais estéreis descartáveis e as etapas de extração de ADN, de preparação da mistura de reação, de aplicação das amostras de ADN, de amplificação e de eletroforese foram realizadas em áreas separadas.

Posteriormente à amplificação, todos os produtos de PCR, assim como um marcador de massa molecular de 100 pb de ADN (Bioline→), foram corridos por eletroforese em gel de agarose a 1,5% [1X tampão TAE (2,25g de agarose e 150 ml de tampão TAE 1X), corado com 0,2 µg/ml de brometo de etídio] a 120 volts e 400 mA, durante 60 minutos, com exceção para os agentes *Bartonella* e *Hepatozoon* nos quais se utilizou 130 V durante 80 minutos, sendo todos seguidamente submetidos a observação em transiluminador e fotografados no sistema UVIDOC.

Por último, os produtos de PCR obtidos foram purificados e enviados para sequenciação.

II.4.1. Extração de ADN de ixodídeos

A extração de ADN foi realizada pelo método de hidrólise alcalina, utilizando uma solução de amónia (De Michelis *et al.*, 2000, Couceiro *et al.*, 2003, Baptista, 2006, Wodecka *et al.*, 2010).

Cada carraça fêmea engorgitada foi dividida longitudinalmente com o auxílio de uma lâmina de bisturi esterilizada em duas metades (Fig. 29.A): uma foi utilizada para extração de ADN e a outra foi armazenada a -20° C. A cada tudo de 1,5 ml contendo um ixodídeo adulto (no caso de não se encontrar engorgitado, ou metade no caso de estar) foi adicionado 500 µl de amónia a 20% (1 ml de amónia com 19 ml de água destilada autoclavada). No caso das ninfas e pools de larvas (2-13 larvas por pool) adicionaram-se apenas 100 µl de amónia a 20%. Posteriormente procedeu-se à homogeneização e à maceração mecânica do ixodídeo com a ajuda de uma ponta de plástico autoclavada. Após este processo, as amostras foram incubadas em duas fases, sendo a primeira a 100°C durante um período de tempo de 20 minutos com os tubos fechados (Fig. 29.B), sucedida de uma segunda incubação com os tubos abertos até o volume atingir metade do volume inicial (250 µl para ixodídeos adultos, e 50 µl para larvas ou ninfas).



Figura 29 – Procedimento de extração de ADN de ixodídeos. A: uso de uma lâmina esterilizada para cortar metade do ixodídeo fêmea engorgitada; B: ebulição a 100° C durante 20 minutos. Fotografias originais da autora.

De forma a controlar a existência de contaminações durante o passo de extração, realizou-se paralelamente a cada série de extrações, três controlos negativos contendo cada

um 100 µl de amónia a 20% submetidos ao mesmo tratamento referido anteriormente (De Michelis *et al.*, 2000, Baptista, 2006). Por fim, os produtos de extração foram conservados a -20°C, até posterior utilização. Para quantificar o ADN obtido na extração, utilizou-se um espectrofotómetro Nanodrop® 1000 (Thermo Scientific, EUA), e todas as amostras quantificadas que excederam os 500 ng/µl de ADN foram diluídas em água destilada autoclavada.

II.4.2. Controlo de Extração de ADN – Amplificação parcial do gene 16S rDNA

Com o objetivo do controlo da eficácia de extração de ADN procedeu-se à amplificação parcial do gene 16S rDNA, com os “primers” 16Sa (5’CGCCTGTTTATCAAACAT3’) e 16Sb (5’CTCCGGTTTGAAGTCTCAGATC3’) (Rich *et al.*, 1995).

Para cada amostra (3 µl de ADN), preparou-se 22 µl de uma mistura de reação, constituída por 9,3 µl de água ultrapura (Labestal®), 5 µl de tampão de reação [tampão NH4 (5X): 160 mM (NH₄)₂SO₄; 670 mM Tris-HCl; pH 8,8 (25°C)] (Invitrogen®), 2 µl de uma solução de Mg²⁺ (25 mM MgCl₂, Promega®), 0,5 µl de dNTPs (10mM, Bionline®), 2,5 µl de “primers” 16Sa (10 pmol/µl), 2,5 µl de 16Sb (10 pmol/µl), 0,2 µl de Taq Polimerase (5 U/µl, Promega®). Como controlo positivo usou-se 1 µl ADN genómico de *R. sanguineus* s.l., e como controlo negativo 3 µl de água ultrapura em substituição do ADN (Labestal®).

As condições para a amplificação no termociclador (Thermo Electron Corporation® Px2 Thermal Cycler) foram as seguintes: 40 ciclos de desnaturação a 93°C durante 30 segundos; ligação dos “primers” a 45°C durante 60 segundos e extensão a 72°C durante 120 segundos; seguidos de elongação final a 72°C durante 6 minutos.

Os produtos de amplificação constituídos por 500 pares de bases (pb) foram visualizados num gel de agarose a 1,5%.

II.4.3. Pesquisa de ADN de *Anaplasma* spp./*Ehrlichia* spp.

Para deteção de ADN dos géneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*, realizou-se a amplificação parcial do gene 16S rDNA, com os “primers” EHR16SD (5’GGTACCYACAGAAGAAGTCC3’) e EHR16SR (5’TAGCACTCATCGTTTACAGC3’) (Harrus *et al.*, 2011).

Para cada amostra preparou-se 25 µl de uma mistura de reação constituída por 12,3 µl de água ultrapura, 5 µl de tampão de reação [tampão NH4 (5X): 160 mM (NH₄)₂SO₄; 670 mM Tris-HCl; pH 8,8 (25°C)], 2 µl de uma solução de Mg²⁺ (25 mM MgCl₂), 0,5 µl de dNTPs (10 mM), 1 µl de “primers” EHR16SD (5 pmol/µl), 1 µl de EHR16SR (5 pmol/µl), 0,2 µl de Taq Polimerase (5U/µl), e 3 µl de ADN. Em todas as amplificações foi utilizado um controlo

positivo contendo 1 µl ADN genómico de *E. canis*, e um controlo negativo sem ADN constituído por 3 µl de água ultrapura estéril.

As reações de amplificação foram efetuadas segundo as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C, a 5 min., seguida 35 ciclos com nova desnaturação a 94°C a 30 seg., ligação dos “primers” a 55°C durante 30 seg., e a extensão a 72°C a 90 seg., seguida de uma extensão final a 72°C durante 5 min. Os produtos de amplificação constituídos por 345 pb foram visualizados por eletroforese em 1,5% de gel de agarose.

II.4.4. Pesquisa de ADN de *Babesia* spp.

Para deteção de ADN do género *Babesia*, realizou-se a amplificação parcial do gene 18S *rDNA*, com os seguintes “primers”: PIRO-A (5’AATACCCAATCCTGACACAGGG3’) e PIRO-B (5’TTAAATACGAATGCCCCCAAC3’) (Harrus *et al.*, 2011).

Preparou-se, para cada amostra, 25 µl de uma mistura de reação constituída por 12,3 µl de água ultrapura (Labetal®), 5 µl de tampão de reação [tampão NH4 (5X): 160 mM (NH4)2SO4; 670 mM Tris-HCl; pH 8,8 (25°C)] (Invitrogen®), 2 µl de uma solução de Mg²⁺ (25 mM MgCl₂, Promega®), 0,5 µl de dNTPs (10 mM, Biotin®), 1 µl de “primers” Piro A (5 pmol/µl), 1 µl de Piro B (5 pmol/µl), 0,2 µl Taq Polimerase (5U/µl, Promega®) e 3 µl de ADN extraído. Em todas as amplificações foi utilizado um controlo positivo contendo 1 µl ADN genómico de *B. canis*, e um controlo negativo, contendo 3 µl de água ultrapura estéril.

As condições ótimas para a PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 3 min., seguida de 35 ciclos com nova desnaturação a 94°C por 30 seg., ligação dos “primers” a 64°C durante 45 seg., e a extensão a 72°C por 30 seg. e para finalizar uma extensão final a 72°C durante 7 min. Posteriormente, os produtos de amplificação constituídos por 400 pb foram visualizados por eletroforese em 1,5% de gel de agarose.

II.4.5. Pesquisa de ADN de *Bartonella* spp.

Para a deteção de ADN de *Bartonella* spp. foram utilizados os “primers” 325S (5’CTTCAGATGATGATCCCAAGCCTTCTGGCG3’) e 1100as (5’GAACCGACGACCCCCTGCTTGCAAAGCA3’) direcionados para o espaço intergénico (ITS do inglês *internal transcribed spacer*) 16S-23S *rRNA* da bactéria (Diniz *et al.*, 2007).

Preparou-se, para cada amostra, 25 µl de uma mistura de reação constituída por 13 µl de água ultrapura, 5 µl de tampão de reação [tampão NH4 (5X): 160 mM (NH4)2SO4; 670 mM Tris-HCl; pH 8,8 (25°C)], 2 µl de uma solução de Mg²⁺ (25 mM MgCl₂), 0,5 µl de dNTPs (10 mM), 0,6 µl de “primer” 32S (5 pmol/µl), 0,6 µl de “primer” 1100as (5 pmol/µl), 0,3 µl de

Taq Polimerase (5U/ μ l), e 3 μ l de ADN extraído. Em todas as amplificações foi utilizado um controlo positivo contendo 1 μ l de ADN genómico de *Ba. henselae*, e um controlo negativo, contendo 3 μ l água ultrapura estéril.

As reacções de amplificação foram efectuadas segundo as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 min., seguida 55 ciclos com nova desnaturação a 95°C por 15 seg., ligação dos “primers” a 66°C durante 15 seg., e a extensão a 72°C por 15 seg., seguida de uma extensão final a 72°C durante 1 min. Os produtos de amplificação constituídos por 600 pb foram visualizados por eletroforese em 1,5% de gel de agarose.

II.4.6 Pesquisa de ADN de *Borrelia burgdorferi sensu lato*

A detecção de ADN do complexo *Bo. burgdorferi* s.l. foi realizada através da técnica de “nested”-PCR (Schwartz *et al.*, 1992) em colaboração com o grupo das Leptospiras e Borreliose de Lyme (IHMT-UNL), envolvendo “primers” direccionados para o espaço intergénico 5S-23S *rRNA*.

Na primeira amplificação foram utilizados os seguintes “primers”: 23SN1 (5'-ACCATAGACTCTTATTACTTTGAC-3') e 23SC1 (5'-TAAGCTGACTAATACTAATTACCC-3').

Este procedimento deu origem a um fragmento com cerca de 380 pb, que submetido a um segundo PCR com os “primers” 23SN2 (5'-ACCATAGACTCTTATTACTTTGACCA-3') e 5SC (5'-GAGAGTAGGTTATTGCCAGGG-3'), dando origem a um fragmento final de 230 pb. Preparou-se, para cada amostra, 25 μ l de uma mistura de reacção constituída por 14,9 μ l de água ultrapura, 2,5 μ l de tampão de reacção [tampão NH4 (5X): 160 mM (NH4)2SO4; 670 mM Tris-HCl; pH 8,8 (25°C)], 1,25 μ l de uma solução de Mg²⁺ (25 mM MgCl₂), 0,2 μ l de dNTPs (10 mM), 0,5 μ l de “primers” RpC5.877p (5 pmol/ μ l) e 0,5 μ l de RpCS.1258n (5 pmol/ μ l), 0,125 μ l de Taq Polimerase (5U/ μ l) e 5 μ l de ADN extraído. Em todas as amplificações foi utilizado um controlo positivo contendo 1 μ l ADN genómico de *Bo. burgdorferi* s.l. e um controlo negativo sem ADN, contendo 5 μ l água ultrapura estéril.

As reacções de amplificação da primeira PCR foram efetuadas segundo as seguintes condições: desnaturação inicial a 94,5°C por 1 min., seguida 25 ciclos com nova desnaturação a 94°C por 30 seg., ligação dos “primers” a 52°C durante 30 seg., e a extensão a 72°C por 1 min., seguida de uma extensão final a 72°C durante 5 minutos. Na segunda PCR, as condições óptimas foram: desnaturação inicial a 94,5°C por 1 min., seguida 40 ciclos com nova desnaturação a 94°C por 30 seg., ligação dos “primers” a 55°C durante 30 seg., e a extensão a 72°C por 1 min., seguida de uma extensão final a 72°C durante 5 minutos.

II.4.7. Pesquisa de ADN de *Cercopithifilaria* spp.

Para amplificação de uma porção do gene *cox1* de *Cercopithifilaria* sp. utilizaram-se os “primers” Cbcox1F (5'-CGGGTCTTTGTTGTTTTTATTGC-3') e o NTR (5'-ATAAGTACGAGTATCAATATC-3') (Otranto *et al.*, 2012).

Preparou-se, para cada amostra, 25 µl de uma mistura de reação constituída por 12,8 µl de água ultrapura, 5 µl de tampão de reação [tampão NH₄ (5X): 160 mM (NH₄)₂SO₄; 670 mM Tris-HCl; pH 8,8 (25°C)], 3 µl de uma solução de Mg²⁺ (25 mM MgCl₂), 0,5 µl de dNTPs (10 mM), 0,25 µl de “primers” Cbcox1F (5 pmol/µl), 0,25 µl de NTR (5 pmol/µl), 0,2 µl de Taq Polimerase (5U/µl), e 3 µl de ADN extraído. Em todas as amplificações foi utilizado um controlo positivo contendo 1 µl ADN genómico de *Cercopithifilaria binae*, e um controlo negativo, contendo apenas 3 µl água ultrapura estéril.

As reações de amplificação foram efetuadas segundo as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 10 min., seguida 40 ciclos com nova desnaturação a 95°C por 60 seg., ligação dos “primers” a 58°C durante 60 seg., e a extensão a 72°C por 60 seg., seguida de uma extensão final a 72°C durante 7 minutos. Os produtos de amplificação constituídos por 304 pb foram visualizados por eletroforese em 1,5% de gel de agarose.

II.4.8. Pesquisa de ADN de *Hepatozoon* spp.

Para a deteção de ADN de *Hepatozoon* spp., realizou-se a amplificação de parte do gene *18S rDNA* de 626-666 pb, com os “primers” HEP-F (5'-ATACATGAGCAAAATCTCAAC-3') e HEP-R (5'-CTCCGGTTTGAAGTTCAGATC-3') (Harrus *et al.*, 2011).

Preparou-se, para cada amostra, 25 µl de uma mistura de reação constituída por 12,3 µl de água ultrapura, 5 µl de tampão de reação [tampão NH₄ (5X): 160 mM (NH₄)₂SO₄; 670 mM Tris-HCl; pH 8,8 (25°C)], 2 µl de uma solução de Mg²⁺ (25 mM MgCl₂), 0,5 µl de dNTPs (10 mM), 1 µl de “primers” Hep-F (5 pmol/µl) e 1 µl de Hep-R (5 pmol/µl), 0,2 µl Taq Polimerase (5U/µl) e 3 µl de ADN extraído. Em todas as amplificações foi utilizado um controlo positivo contendo 1 µl ADN genómico de *H. canis* e um controlo negativo com 3 µl de água ultrapura estéril.

As reações de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C, a 5 min., seguida 34 ciclos com nova desnaturação a 95°C a 20 seg., ligação dos “primers” a 56°C durante 30 seg., e a extensão a 72°C a 90 seg. Depois do último ciclo, foi a vez de uma extensão final a 72°C durante 5 min.

II.4.9. Pesquisa de ADN de *Leishmania infantum*

Para a detecção de ADN de *Leishmania infantum* utilizaram-se os “primers” MC1 (5'-GTTAGCCATGGTGGTCTTG-3') e o MC2 (5'-CACCCATTTTTCCGATTTTG-3') (Cortes *et al.*, 2004) desenhados a partir de uma sequência completa do ADN do cinetoplasto de *L. infantum* e são específicos para espécies do complexo *L. donovani*. Em teoria, amplificam uma sequência com 447 pares de base, dos quais 42 pb pertencem à região conservada do minicírculo e os restantes (405 pb) à região variável. A sequência MC1 encontra-se na região variável e a sequência MC2 encontra-se na região conservada (Cortes, 2008).

Preparou-se, para cada amostra, 25 µl de uma mistura de reação constituída por 7,3 µl de água ultrapura, 5 µl de tampão de reação [tampão NH₄ (5X): 160 mM (NH₄)₂SO₄; 670 mM Tris-HCl; pH 8,8 (25°C)], 3 µl de uma solução de Mg²⁺ (25 mM MgCl₂), 0,5 µl de dNTPs (10 mM), 3 µl de “primers” MC1 (5 pmol/µl) e 3 µl de MC2 (5 pmol/µl), 0,2 µl Taq Polimerase (5 U/µl) e 3 µl de ADN extraído. Em todas as amplificações foi utilizado um controlo positivo contendo 1 µl de ADN genómico de *L. infantum* e um controlo negativo sem ADN, contendo 3 µl de água ultrapura estéril.

As reações de amplificação foram efetuadas segundo as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 2 min., seguida de 30 ciclos a 94°C por 20 seg., ligação dos “primers” a 60°C durante 20 seg., e a extensão a 72°C por 30 seg. e para finalizar uma extensão final a 72°C durante 5 minutos.

II.4.10. Pesquisa de ADN de *Rickettsia* spp.

Para pesquisa do género *Rickettsia*, cada amostra de ADN foi submetida à PCR, utilizando os “primers” RpCS.877p (5'GGGGGCCTGCTCACGGCGG3') e RpCS.1258n (5'ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA3'), que amplificam parte do gene *gltA*, presente em todas as espécies de *Rickettsia* (Regnery *et al.*, 1991).

Preparou-se, para cada amostra, 25 µl de uma mistura de reação constituída por 12,3 µl de água ultrapura, 5 µl de tampão de reação [tampão NH₄ (5X): 160 mM (NH₄)₂SO₄; 670 mM Tris-HCl; pH 8,8 (25°C)], 2 µl de uma solução de Mg²⁺ (25 mM MgCl₂), 0,5 µl de dNTPs (10 mM), 1 µl de “primers” RpCS.877p (5 pmol/µl), 1 µl de RpCS.1258n (5 pmol/µl), 0,2 µl de Taq Polimerase (5U/µl), e 3 µl de ADN extraído. Em todas as amplificações foi utilizado um controlo positivo contendo 1 µl de ADN genómico de *Rickettsia* spp., e um controlo negativo contendo 3 µl água ultrapura estéril.

As reações de amplificação foram efetuadas segundo as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C, a 5 min., seguida 35 ciclos com nova desnaturação a 94°C a 30 seg., ligação dos “primers” a 55°C durante 30 seg., e a extensão a 72°C a 90 seg., seguida

de uma extensão final a 72°C durante 5 minutos. Posteriormente, os produtos de amplificação constituídos por 381 pb foram visualizados por eletroforese em 1,5% de gel de agarose.

II.5. Purificação de fragmentos de ADN a partir do gel de agarose

Após a visualização dos produtos de PCR no gel, as amostras positivas foram purificadas com o “Kit” comercial “High Pure PCR Product Purification Kit” (Roche® Mannheim, Alemanha). Este “Kit” tem como fundamento a ligação específica do ADN amplificado a uma fibra de vidro existente na membrana da coluna de purificação que na presença de tiocianato de guanidina e através de uma sequência de lavagens e centrifugações permite remover os “primers”, nucleótidos e outros sais resultantes da PCR. O ADN purificado é eluído da membrana da coluna usando uma solução de baixa concentração salina. Para aplicar o protocolo de purificação, correu-se os produtos amplificados de interesse, em gel de agarose (1,5%) e observou-se num transiluminador de luz ultravioleta a presença dos fragmentos de ADN. Foram cortadas as bandas específicas, com o auxílio de uma lâmina de bisturi esterilizada, e colocadas separadamente em tubos de 1,5 ml, devidamente identificados. Adicionou-se 300 µl de tampão de ligação a cada tubo, homogeneizou-se no vórtex durante 15 a 30 segundos, incubando em banho-maria a 56°C durante 10 minutos (com agitação da mistura em vórtex a cada 2 a 3 minutos). Após dissolução total do gel de agarose, adicionou-se 150 µl de isopropanol, seguido de homogeneização no vórtex. De seguida, pipetou-se 700 µl da mistura para a coluna de purificação combinada com o tubo de recolha. As amostras foram centrifugadas a 15294 g durante 1 minuto. Posteriormente, realizou-se uma dupla lavagem, durante 1 minuto a 15294 g, com 500 µl e 200 µl de tampão de lavagem respetivamente.

Para finalizar, o produto já purificado foi eluído da coluna de purificação para um novo tubo de 1,5 ml com 100 µl de tampão de eluição e centrifugado a 20817 g durante 1 min.

II.6. Sequenciação e análise dos segmentos de ADN purificados

O ADN purificado foi enviado para sequenciação para o serviço StabVida (Portugal), utilizando os mesmos “primers” utilizados na amplificação do agente patogénico em causa.

As sequências obtidas foram analisadas com o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), tendo como base de dados o GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Um nível de identidade maior ou igual a 94% foi aceite como indicativo de elevado grau de confiança. Todas as sequências obtidas no presente estudo foram depositadas no DNA Data Bank of Japan (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>).

III. Resultados

III.1. Caracterização da amostra

A amostra de trabalho consistiu em 919 espécimes do complexo *R. sanguineus* s.l.: 882 adultos (96,0%), 8 ninfas (1,0%) e 29 larvas (3,0%) (Fig. 30). Dos 882 ixodídeos adultos, 307 (34,8%) eram machos e 580 (65,8%) eram fêmeas (Fig. 31).

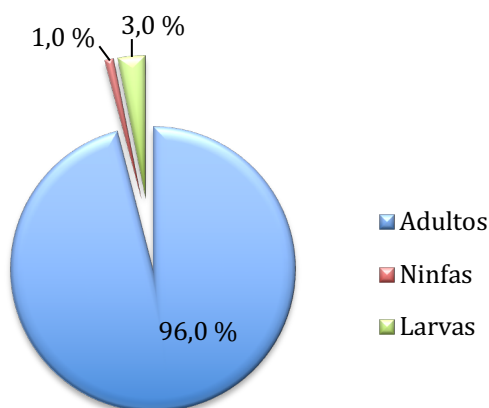


Figura 30 – Caracterização da amostra quanto à fase de desenvolvimento (n=919).

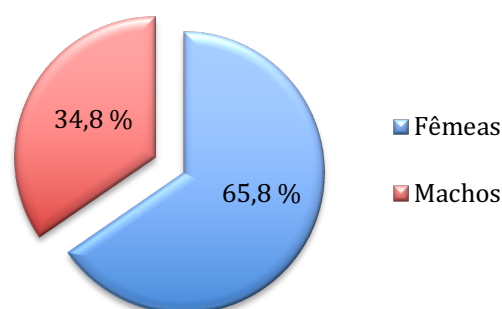


Figura 31 – Caracterização da amostra quanto ao sexo (n=882).

No presente estudo, foram coletadas 60 carraças (6,5%) no distrito da Guarda, 77 (8,4%) no distrito de Lisboa, 191 (20,6%) no distrito de Setúbal e 591 (64,3%) no distrito de Faro (Tabela 2). Seiscentos e vinte ixodídeos foram removidos de 116 cães, 36 de oito gatos e 263 da vegetação. Os ixodídeos colhidos da vegetação eram todos provenientes do distrito de Faro.

Tabela 2 – Número de ixodídeos colhidos nos distritos da Guarda, Lisboa, Setúbal e Faro.

Distrito	Complexo <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l.						<i>Rhipicephalus</i> spp.						Total n (%)
	Machos n (%)			Fêmeas n (%)			Ninfas n (%)			Larvas n (%)			
	Cão	Gato	Vegetação	Cão	Gato	Vegetação	Cão	Gato	Vegetação	Cão	Gato	Vegetação	
Guarda	17	7	na	25	11	na	0	0	na	0	0	na	60 (6,5)
Lisboa	29	6	na	33	8	na	1	0	na	0	0	na	77 (8,4)
Setúbal	74	0	na	117	0	na	0	0	na	0	0	na	191 (20,6)
Faro	64	0	111	257	4	119	2	0	5	1	0	28	591 (64,3)
Total	184 (1,9)	13 (1,4)	111 (12,0%)	432 (46,7)	23 (2,5)	119 (12,9)	3 (0,3)	0	5 (0,5)	1 (0,1)	0	28 (3,0)	919 (100)

III.2. Pesquisa de ADN dos agentes patogênicos em estudo através da técnica de PCR

Parte do gene *16S rDNA* mitocondrial dos ixodídeos foi amplificado a partir de todas as amostras de ADN (Fig. 32).

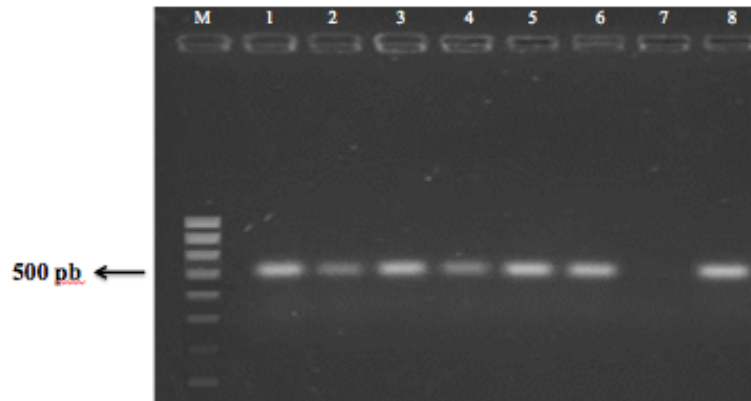


Figura 32 – Exemplo de eletroforese em gel de agarose com resultados da amplificação do gene *16S rDNA* mitocondrial da carraça de 6 amostras: M – marcador de 100 pb; colunas 1-6 (amostras positivas); coluna 7 - controle negativo; coluna 8 - controle positivo. Fotografia original da autora.

Através da técnica de PCR foi detetado ADN de pelo menos um dos agentes em estudo em 55 ixodídeos (6,0%), incluindo a presença simultânea de ADN de dois agentes, *H. felis* e *Ri. massiliae* em um exemplar (0,1%). Os produtos de PCR positivos correspondiam apenas a ixodídeos colhidos de cães (n=16) e gatos (n=3). Não foi detetado ADN de qualquer agente nos ixodídeos colhidos da vegetação. As sequências de ADN obtidas pertenciam aos gêneros: *Rickettsia* (n=41; 4,5%), *Hepatozoon* (n=6; 0,7%), *Anaplasma* (n=4; 0,4%), *Babesia* (n=2; 0,2%), *Cercopithifilaria* (n=1; 0,1%) e complexo *Bo. burgdorferi* s.l. (n=1; 0,1%). Não se amplificou ADN dos gêneros *Ehrlichia* e *Bartonella* ou ADN de *L. infantum* em nenhum dos ixodídeos em estudo.

III.2.1. *Anaplasma* spp.

O ADN de *Anaplasma* spp. foi detetado em 0,4% (4/919) dos ixodídeos analisados utilizando “primers” genéricos para a amplificação parcial do gene *16S rDNA* (Fig. 33).

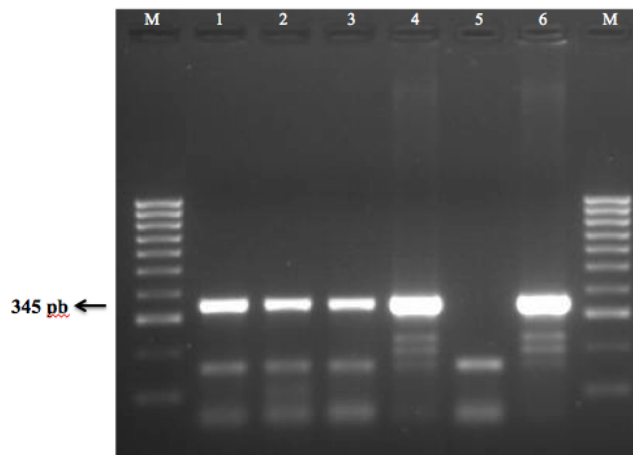


Figura 33 - Eletroforese em gel de agarose com os resultados da amplificação parcial do gene *16S rDNA* de *Anaplasma* spp.: M – marcador de 100 pb; colunas 1-4 (amostras positivas); coluna 5 - controlo negativo; coluna 6 - controlo positivo. Fotografia original da autora.

Das quatro sequências obtidas para *Anaplasma* spp., uma (0,1%) e três (0,3%) apresentavam 94-98% de identidade com sequências previamente amplificadas a partir das espécies *Anaplasma phagocytophilum* e *Anaplasma platys*, respetivamente. As sequências foram depositadas na Base de dados de ADN do Japão (“DNA Data Bank of Japan”-DDBJ) com os seguintes números de acesso: AB872954 (*A. phagocytophilum*) e AB872951-53 (*A. platys*).

III.2.2. *Babesia* spp.

O ADN de *Babesia* spp. foi detetado em 0,2% (2/919) dos ixodídeos analisados utilizando “primers” genéricos para a amplificação parcial do gene *18S rDNA* (Fig. 34).

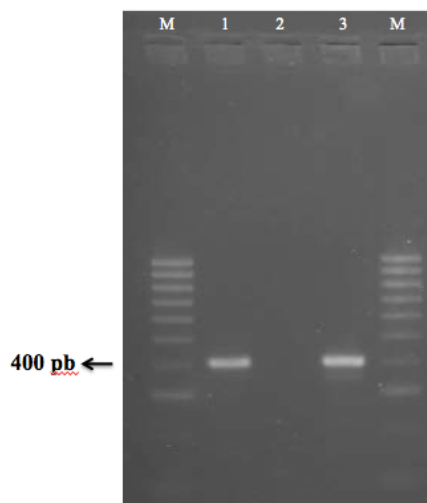


Figura 34 - Eletroforese em gel de agarose com os resultados da amplificação parcial do gene *18S rDNA* de *Babesia* spp.: M – marcador de 100 pb; coluna 1 (amostra positiva); coluna 2 - controlo negativo; coluna 3 - controlo positivo. Fotografia original da autora.

Dos dois ixodídeos adultos positivos, apenas numa das amostras foi possível caracterizar até ao nível da espécie por sequenciação, apresentando 98% de identidade com sequências amplificadas a partir de *Babesia vogeli* (número de acesso: AB872952),

III.2.3. *Borrelia burgdorferi* s.l.

O ADN de *Borrelia* spp. foi identificado num (0,1%) ixodídeo usando “primers” direcionados para o espaço intergénico 5S-23S *rRNA*. A amostra sequenciada apresentou 97% de identidade com as sequências de *Borrelia burgdorferi* s.l. depositadas no GenBank, tendo sido depositada no DDBJ com o número de acesso AB872956.

III.2.4. *Cercopithifilaria* spp.

Apenas em um (0,1%) dos 919 exemplares analisados se amplificou um fragmento de ADN específico da região parcial do gene *cox1* de *Cercopithifilaria* sp. (Fig. 35).

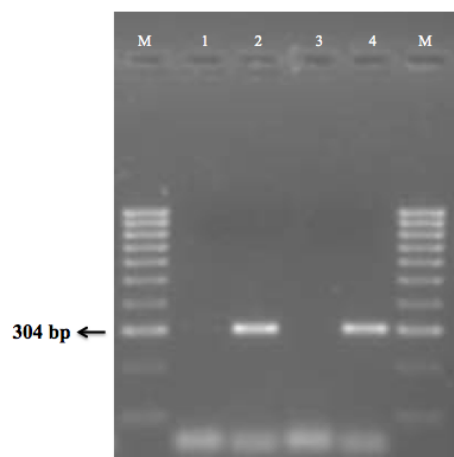


Figura 35 - Eletroforese em gel de agarose com os resultados da amplificação parcial do gene *cox1* de *Cercopithifilaria* spp.: M – marcador de 100 pb; coluna 2 (amostra positiva); coluna 3 - controlo negativo; coluna 4 - controlo positivo. Fotografia original da autora.

A comparação da sequência obtida (e depositada no DDBJ com o número de acesso AB872950) mostrou uma identidade de 98% com as sequências de *Cercopithifilaria* spp. depositadas no Genbank.

III.2.5. *Hepatozoon* spp.

O ADN de *Hepatozoon* spp. foi detetado em 0,7% (6/919) dos ixodídeos analisados utilizando “primers” genéricos para a amplificação parcial do gene *18S rDNA* (Fig. 36).

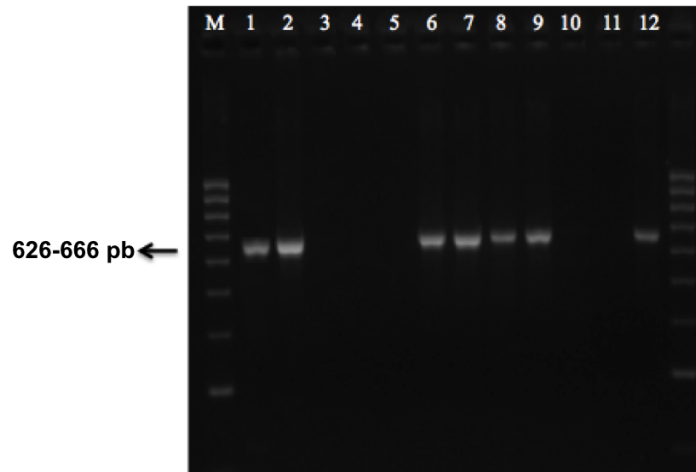


Figura 36 - Eletroforese em gel de agarose com os resultados da amplificação parcial do gene *18S rDNA* de *Hepatozoon* spp.: M – marcador de 100 pb; coluna 1-2 e 6-9 (amostras positivas); coluna 11 - controlo negativo; coluna 12 - controlo positivo. Fotografia original da autora.

Das seis sequências obtidas de ixodídeos adultos, duas (0,2%) apresentavam 95-99% de identidade com sequências previamente amplificadas a partir de *Hepatozoon canis* e quatro (0,4%) a partir de *Hepatozoon felis*. As seis sequências foram depositadas no DDBJ com os seguintes números de acesso (*H. canis*: AB872944, AB872949; *H. felis*: AB872945, AB872946, AB872947 e AB872794).

III.2.6. *Rickettsia* spp.

O ADN de *Rickettsia* spp. foi detetado em 4,5% (n=41) dos ixodídeos analisados, por amplificação parcial do gene *gltA* (Fig. 32).

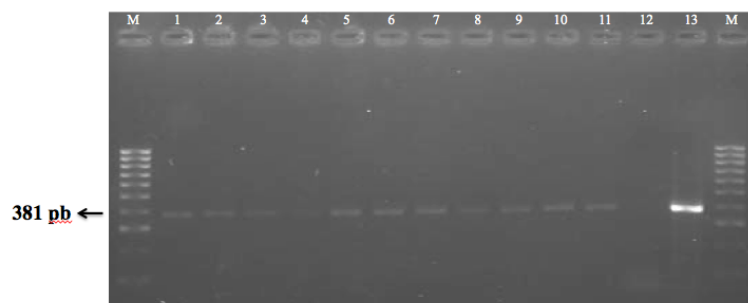


Figura 37 - Eletroforese em gel de agarose com os resultados da amplificação parcial do gene *gltA* de *Rickettsia* spp.: M – marcador de 100 pb; coluna 1-11 (amostras positivas); coluna 12 - controlo negativo; coluna 13 - controlo positivo. Fotografia original da autora.

Das 41 sequências obtidas para *Rickettsia* spp., três (0,3%) e 35 (4,0%) apresentaram 94-99% de identidade com sequências previamente amplificadas a partir das espécies *Rickettsia conorii* e *Rickettsia massiliae* respetivamente. Nos restantes três ixodídeos, devido à fraca qualidade das sequências obtidas, apenas foi possível identificar a presença de ADN do género *Rickettsia*. As sequências foram depositadas no DDBJ com os

seguintes números de acesso (*Ri. conorii*: AB872795, AB8729805 e AB872796; *Ri. massiliae*: AB872765, AB872786, AB872790, AB8727803, AB8727807, AB872784, AB872788, AB872797-98, AB872802, AB872463-64, AB872791, AB872793, AB872799, AB872801, AB872806, AB872785, AB872808, AB872939, AB872941, AB872462, AB872466, AB872787, AB872789, AB872792, AB872800, AB872804, AB872809-12, AB872940, AB872942 e AB872948).

O ADN de *Ri. massiliae* foi detetado em ixodídeos colhidos nos 4 distritos de Portugal anteriormente descritos (Tabela 3). No distrito de Lisboa foi também detetado ADN de *Ri. conorii* em ixodídeos colhidos de cães e de *H. felis* em ixodídeos retirados de cães e gatos dos distritos da Guarda e de Faro, enquanto *H. canis* foi detetado em ixodídeos colhidos de cães provenientes de Setúbal. O ADN de *A. platys*, *B. vogeli* e *Cercopithifilaria* spp. foram apenas detetados em espécimens colhidos de cães no distrito de Faro. Setúbal foi o único distrito onde se detetou um espécime, colhido de um cão, contendo ADN de espiroquetas do complexo *Bo. burgdorferi* s.l. A deteção de ADN de dois agentes diferentes, *H. felis* e *Ri. massiliae* verificou-se num ixodídeo colhido de um gato proveniente do distrito de Faro.

Tabela 3 – Agentes detetados por PCR e resultados da sequenciação em ixodídeos do complexo *R. sanguineus* s.l. de Portugal de acordo com a região geográfica, hospedeiro vertebrado, sexo e número de espécimes.

Agentes patogénicos	Região geográfica	Proveniência	Sexo do ixodídeo	Ixodídeos (n)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Guarda	Gato	Fêmea	1
<i>Anaplasma platys</i>	Setúbal	Cão	Macho	1
<i>Anaplasma platys</i>	Faro	Cão	Fêmea	1
<i>Anaplasma platys</i>	Faro	Cão	Macho	1
<i>Babesia vogeli</i>	Faro	Cão	Macho	1
<i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>	Setúbal	Cão	Macho	1
<i>Cercopithifilaria</i> spp.	Faro	Cão	Fêmea engorgitada	1
<i>Hepatozoon canis</i>	Setúbal	Cão	Fêmea	2
<i>Hepatozoon felis</i>	Guarda	Gato	Fêmea	2
<i>H. felis</i>	Faro	Cão	Fêmea	1
<i>Rickettsia conorii</i>	Lisboa	Cão	Fêmea	1
<i>Ri. conorii</i>	Lisboa	Cão	Macho	1
<i>Ri. conorii</i>	Faro	Cão	Fêmea engorgitada	1
<i>Rickettsia massiliae</i>	Guarda	Gato	Macho	4
<i>Ri. massiliae</i>	Guarda	Cão	Fêmea engorgitada	1
<i>Ri. massiliae</i>	Guarda	Cão	Fêmea	2
<i>Ri. massiliae</i>	Guarda	Cão	Macho	1
<i>Ri. massiliae</i>	Lisboa	Gato	Macho	1
<i>Ri. massiliae</i>	Lisboa	Cão	Fêmea engorgitada	3
<i>Ri. massiliae</i>	Lisboa	Cão	Fêmea	1
<i>Ri. massiliae</i>	Lisboa	Cão	Macho	3
<i>Ri. massiliae</i>	Setúbal	Cão	Fêmea engorgitada	1
<i>Ri. massiliae</i>	Setúbal	Cão	Fêmea	1
<i>Ri. massiliae</i>	Setúbal	Cão	Macho	2
<i>Ri. massiliae</i>	Faro	Cão	Fêmea engorgitada	4
<i>Ri. massiliae</i>	Faro	Cão	Fêmea	4
<i>Ri. massiliae</i>	Faro	Gato	Fêmea	1
<i>Ri. massiliae</i>	Faro	Cão	Macho	5
<i>H. felis</i> + <i>Ri. massiliae</i>	Faro	Gato	Fêmea	1

IV. Discussão

No presente estudo analisaram-se 919 ixodídeos pertencentes ao complexo *Rhipicephalus sanguineus* s.l. considerado o mais abundante em Portugal (Figueiredo, 2007; INSA, 2016; Núncio *et al.*, 2022; Santos-Silva *et al.*, 2011). Devido à fácil adaptação das espécies deste complexo a diferentes temperaturas e graus de humidade, consegue manter a sua atividade praticamente durante todo o ano (Dantas-Torres, 2008a) razão pela qual no presente estudo se realizaram colheitas ao longo de um ano.

A maioria dos ixodídeos recolhidos foram adultos, com maior prevalência de fêmeas, seguindo-se as ninfas e larvas corroborando os resultados obtidos por Santos-Silva *et al.*, (2011). O facto da maioria dos exemplares serem fêmeas esteve provavelmente relacionado com a maior facilidade destas, serem visualizadas quer pela autora do presente estudo quer pelos médicos veterinários que colaboraram no mesmo, do que os machos ou as formas imaturas.

No presente estudo, a amplificação por PCR e posterior análise de sequências de genes específicos de diferentes agentes patogénicos presentes nos ixodídeos colhidos de cães gatos e da vegetação, teve como objetivo conhecer a sua atual distribuição nos distritos da Guarda, Lisboa, Setúbal e Faro. A investigação desenvolvida, que está na origem da presente dissertação, revelou uma considerável diversidade de agentes patogénicos circulando em ixodídeos do complexo *R. sanguineus* s.l. colhidos de gatos e de cães provenientes de quatro distritos de Portugal.

A deteção de ADN de *Anaplasma* spp., *Babesia* spp, *Bo. burgdorferi* s.l., *Cercopithifilaria* spp., *Hepatozoon* spp. e *Rickettsia* spp. em 6,0% (55/919) dos ixodídeos analisados por PCR, vai de encontro ao valor anteriormente obtido em ixodídeos do complexo *R. sanguineus* s.l. (6,0%; 7/117), recolhidos no distrito de Bragança (Figueiredo, 2007). Recentemente, foi detetado nos mesmos espécimes de ixodídeos um valor inferior (4,5%; 10/221) em Santarém e Évora (Barradas *et al.*, 2020) e superior (28,0%; 63/224) em Beja e Faro (Pereira *et al.*, 2018).

IV.1. *Anaplasma phagocytophilum* e *Anaplasma platys*

O ixodídeo *I. ricinus* é considerado o principal vetor de *A. phagocytophilum* na Europa (Claerebout *et al.*, 2013; Dantas-Torres *et al.*, 2012a; Heikkila *et al.*, 2010; Ionita *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2004; Smith & Wall, 2013; Smrdel *et al.*, 2010). Contudo, a deteção deste agente num espécime do complexo *R. sanguineus* s.l. no presente estudo não é completamente surpreendente, uma vez que esta bactéria já foi anteriormente detetada por PCR em várias espécies de carraças, nomeadamente *Amblyomma cajennense* (Santos *et al.*, 2013), *I. ventralloii* (Santos *et al.*, 2004), *D. marginatus*, *Hy. lusitanicum*, *R. bursa* e *R.*

pusillus (Santos *et al.*, 2013; Satta *et al.*, 2011; Toledo *et al.*, 2009). A infecção por *A. phagocytophilum* tem sido reportada em cães (Figueredo, 2008; Santos *et al.*, 2009a), gatos (Alves *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2009a), equinos (Ribeiro *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2009a), roedores (*Mus spretus*) (Santos *et al.*, 2009a), veados (Pereira *et al.*, 2016) e em humanos (Santos *et al.*, 2006; 2009a; 2009c). No presente estudo, apenas se detetou ADN de *A. phagocytophilum* num exemplar (0,5%) colhido de um cão, valor inferior ao de 2,58% (5/194) obtido por Santos *et al.* (2013) em *R. sanguineus* s.l. colhidos de cães no Brasil.

A presença da *A. platys* em carraças tem sido escassamente reportada na literatura científica (Cicuttin *et al.*, 2014). As infecções com esta bactéria têm sido descritas em cães do norte (Cardoso *et al.*, 2010a; René-Martellet *et al.*, 2015), centro (René-Martellet *et al.*, 2015), sul do país (Maia *et al.*, 2015a; René-Martellet *et al.*, 2015), em raposas de Portugal continental (Cardoso *et al.*, 2015) e em javalis do sul do país (Pereira *et al.*, 2016). Neste estudo, o ADN deste agente foi detetado em 0,3% (3/919) dos espécimens testados, colhidos de cães dos distritos da Guarda e Faro, corroborando as deteções mencionadas anteriormente desta bactéria em cães e raposas das mesmas regiões. Este valor foi mais baixo que as frequências obtidas nos ixodídeos do complexo *R. sanguineus* s.l. testados em Itália [1,2% (1/81) e 48,3% (129/267)] (Latrofa *et al.*, 2014; Ramos *et al.*, 2014) e no Japão [9,4% (3/32)] (Inokuma *et al.*, 2000).

IV.2. *Babesia* spp.

A babesiose canina ou piroplasmose é causada por protozoários intraeritrocitários e tem atualmente uma distribuição mundial (M`ghirbi & Bouattour, 2008; Solano-Galego & Baneth, 2011a). As infecções por *B. canis* e *B. vogeli* têm sido descritas em cães do Norte (Cardoso *et al.*, 2008; 2010b) e em gatos do norte e centro (Vilhena *et al.*, 2013), enquanto do sul de Portugal apenas o ADN de *B. vogeli* tem sido detetado em gatos (Maia *et al.*, 2014a), pelo que a deteção no presente estudo deste agente num ixodídeo macho colhido de um cão proveniente de Faro, reforça a presença do parasita na região. A deteção molecular de *B. vogeli* em exemplares do complexo *R. sanguineus* s.l. já tinha anteriormente sido reportada em outros países do Mediterrâneo, nomeadamente Israel e Tunísia (Harrus *et al.* 2010; M`Ghibi & Bouattour, 2008). No presente estudo, a deteção de ADN de *B. vogeli* num espécime pode ser explicada com o facto da carraça do complexo *R. sanguineus* s.l. se encontrar presente de norte a sul do país, devido à ampla distribuição deste artrópode. Contudo, não se detetou ADN de *Babesia canis*, cujo vetor, *Dermacentor reticulatus*, é mais abundante no norte do país (Cardoso *et al.*, 2010b).

IV.3. *Borrelia burgdorferi* sensu lato

O ixodídeo *Ixodes ricinus* é o vetor comprovado das bactérias do complexo *Bo. burgdorferi* s.l. na Europa (Dantas-Torres *et al.*, 2012). Contudo, a deteção de agentes da borreliose de Lyme já foi documentada em outras espécies de carraças, nomeadamente em ixodídeos do género *Dermacentor* spp., *Haemaphysalis* spp., *Rhipicephalus* spp. (Batista, 2006) e da espécie *Hy. lusitanicum* (Milhano *et al.*, 2010), provenientes do sul de Portugal. A taxa de infeção vetorial encontrada em artrópodes do género *Rhipicephalus* foi de 4,3% (1/23) na região centro de Portugal (Batista, 2006), superior à obtida no presente estudo de 0,1% (1/919), provavelmente devido ao reduzido número de exemplares analisados no estudo de Batista (2006). As espiroquetas do complexo *Bo. burgdorferi* s.l. foram detetadas por PCR em amostras de sangue de javalis no norte (Faria *et al.*, 2014) e em cães e gatos no sul do país (Maia *et al.*, 2014; 2015). Estes dados juntamente com a deteção molecular destes agentes em ixodídeos provenientes do sul (presente estudo) e centro (Batista, 2006) do país, reforçam a ideia da circulação destas bactérias entre os animais domésticos e as carraças, aumentando o risco de exposição dos humanos às borrelíias.

IV.4. *Cercopithifilaria* spp.

O presente estudo permitiu detetar, pela primeira vez em Portugal, ADN de *Cercopithifilaria* spp. num exemplar colhido de um cão proveniente do sul do país. A circulação deste filaróide no Algarve foi posteriormente corroborada por Cortes *et al.* (2014) ao detetar microfilárias de *Cercopithifilaria bainaie*, *Cercopithifilaria grassii* e *Cercopithifilaria* sp. II *sensu* Otranto *et al.*, 2013, em 24 das 102 biopsias cutâneas em cães realizadas nessa região.

A frequência de deteção molecular destes nematodes no presente estudo (0,1%; 1/919) foi inferior às obtidas quer na Grécia (0,5%; 1/218) quer na Itália (3,1%; 19/606) (Otranto *et al.* 2012), que poderá estar relacionada com o facto de no estudo de Otranto *et al.* (2012) os ixodídeos terem sido colhidos de cães em cujas biópsias cutâneas foram visualizadas microscopicamente e detetadas por PCR microfilárias de *Cercopithifilaria* sp.

Apesar da baixa patogenicidade deste filarídeos alguns cães podem apresentar dermatites eritematosas (Ramos *et al.*, 2014a), pelo que será importante incluir esta parasitose no diagnóstico diferencial de patologias cutâneas em cães do sul de Portugal expostos a ixodídeos.

IV.5. *Hepatozoon* spp.

No presente estudo amplificou-se, pela primeira vez em Portugal, ADN de *H. canis* em dois ixodídeos colhidos de cães do sul do país e *H. felis* em quatro espécimes colhidos de gatos dos distritos da Guarda e de Faro. Estes dados, juntamente com a deteção de *H. canis* em cães (Cardoso *et al.*, 2010b; Maia *et al.*, 2015; Menn *et al.*, 2010; René-Martellet *et al.*, 2015) e raposas (Cardoso *et al.*, 2014; Conceição-Silva *et al.*, 1988) e de *H. felis* em gatos (Maia *et al.*, 2014; Vilhena *et al.*, 2013) de Portugal continental indicam que estas duas espécies estão disseminadas por todo o país.

Embora a maioria das infeções por *Hepatozoon* sejam subclínicas não devem ser negligenciadas, uma vez que pode evoluir para doença, principalmente na presença de condições imunossupressivas ou de outro(s) agente(s) infeccioso(s) e requerer tratamento específico (Baneth *et al.*, 2015).

IV.6. *Rickettsia* spp.

Muitas infeções rickettsiais afectam o homem bem como os animais de companhia (Otranto *et al.*, 2009; Vilhena *et al.*, 2013). No presente estudo, amplificou-se ADN de *Ri. conorii* (0,3%) em três ixodídeos removidos de cães dos distritos de Lisboa e Faro, similar à de 0,3% (2/666) reportada em 2022 pelo programa Revive em ixodídeos coletados em todo o território continental de Portugal (Núncio *et al.*, 2022) Este valor foi ligeiramente inferior ao obtido do programa REVIVE em 2020, que foi de 0,4% (2/558) (Santos *et al.*, 2020). A percentagem de *Rhipicephalus* spp. infetados com *Ri. conorii* na natureza é normalmente muito baixa (Oteo *et al.*, 2012). Um estudo de Sousa (citado por Duarte, 2008) constatou que esta percentagem baixa pode ser justificada pelo facto de algumas riquetsias, como a espécie *Ri. Conorii*, também serem patogénicas para os vectores, havendo uma elevada taxa de letalidade nos artrópodes infetados. A deteção molecular de *Ri. conorii* no sangue de cães doentes juntamente com uma seroprevalência de 69% (35/51) na população canina considerada clinicamente doente foi reportada no distrito de Faro (Alexandre *et al.*, 2011) e em outras áreas endémicas de FEN (Levin *et al.*, 2012; Pennisi *et al.*, 2012; Trotta *et al.*, 2012), sugerindo que os cães são frequentemente expostos a esta bactéria. Ainda, em Lisboa e Évora, foi reportado em gatos uma seroprevalência de 18,9% (7/37) com esta espécie bacteriana (Alves *et al.*, 2009). De referir que todo este leque de informação, juntamente com a deteção do agente etiológico da FEN em carraças removidas de cães, reforça a importância da monitorização das carraças nestes animais que, no ambiente doméstico, podem funcionar como reservatórios e/ou sentinelas para a infeção humana.

Rickettsia massiliae foi o patógeno mais detetado nos ixodídeos neste estudo, com uma frequência de 4% (35/919), similar à de 4% (20/569) reportada em 2020 pelo programa

Revive em ixodídeos coletados em todo o território continental de Portugal (Santos *et al.* 2020). Nos anos seguintes (2021 e 2022) a frequência de detecção molecular desta bactéria pelo programa foi de 9% (50/575) e de 7% (49/666), respetivamente (Núncio *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2021) e também foi o agente patogénico mais detetado nos ixodídeos em ambos os estudos, demonstrando a importância da monitorização periódica da presença e densidade de artrópodes vectores assim como da presença dos agentes por eles transmitidos.

Curiosamente, este é o primeiro estudo onde *Ri. massiliae* foi detetado em exemplares do complexo *R. sanguineus* s.l. retirados de gatos, embora pareça ser comum encontrar este agente em ixodídeos removidos de cães (Cicuttin *et al.*, 2014; Claerebout *et al.*, 2013; Marquez *et al.*, 2008; Trotta *et al.*, 2012). Recentemente, esta espécie bacteriana foi detetada em ixodídeos *R. sanguines* s.l. recolhidos em ovelhas com uma frequência superior (7%;15/224) e também num ouriço e num texugo (Pereira *et al.*, 2018). Embora não existam até ao momento evidências de que este agente possa causar infeção nestas espécies animais, nem que estas possuam um papel na transmissão desta bactéria ao homem, os cães, gatos, ovelhas, ouriços e texugos podem funcionar como sentinelas ou como veículo de transporte dos vectores para o ambiente doméstico.

IV.7. Co-infeção

Tem sido reportado que uma única carraça pode transmitir mais do que um agente patogénico aos animais e ao homem (Chen *et al.*, 2012; Cohn, 2003). No presente estudo, apenas se detetou uma co-infeção por *H. felis* e *Ri. massiliae* num exemplar removido de um gato proveniente do distrito de Faro. Este achado é importante na medida em que sugere a possibilidade de ocorrência da transmissão simultânea de dois agentes ou múltiplas infeções através de uma única carraça, aos animais ou humanos, potenciando a patogénese da doença, alterando as manifestações clínicas, dificultando o diagnóstico, o prognóstico e a resposta à terapêutica (Chen *et al.*, 2012; Cohn, 2003).

V. Conclusão

Este estudo teve como objetivo detetar por PCR quais as bactérias e parasitas presentes em exemplares do complexo *Rhipicephalus sanguineus* s.l. capturados em animais domésticos (cães, gatos) e no ambiente de quatro distritos de Portugal.

Embora a deteção molecular de um determinado agente num ixodídeo (especialmente em espécimens engorgitados) apenas indique que este se encontra infetado por ter ingerido durante a refeição sanguínea microrganismos de um hospedeiro infetado, e não implique que seja infeccioso ou seja, capaz de transmitir o agente a outro hospedeiro (Estrada-Peña *et al.*, 2013), o presente estudo demonstra a existência de um largo espectro de agentes patogénicos, alguns com potencial zoonótico, a circular na população de *R. sanguineus* s.l. de Portugal colhidos de cães e gatos. Como tal este estudo reforça a importância de se sensibilizar os profissionais de saúde, médicos veterinários e os tutores dos animais domésticos, para o controlo e prevenção de infestações por ectoparasitas e dos agentes por eles transmitidos.

Com o aumento da exposição dos animais domésticos aos vetores, quer devido às alterações climáticas quer às dificuldades económicas que o país atravessa (impossibilitando muitas vezes a aplicação de medidas profiláticas), torna-se indispensável a inclusão dos agentes transmitidos por ixodídeos nas listas de diagnósticos diferenciais, especialmente em áreas endémicas, assim como o rastreio anual da sua presença, mesmo em animais sem sinais clínicos.

VI. Referências bibliográficas

Abarca, K., Lopez, J., Perret, C., Guerrero, J., Godoy, P., Veloz, A.,... Azócar, T. (2007). *Anaplasma platys* in dogs, Chile. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 13, n.º 9, p. 1392-5.

Abreu, T., Sousa, R., Pinto, C. & Bacellar, F. (2007). Como diagnosticar a febre escarodular em doentes com febre e exantema: um estudo prospetivo. Vol. 14, n.º 1, p. 5-11. Consultado em 14 Janeiro 2015 em: www.spmi.pt/revista/vol14_n1_2007__05_11.pdf.

Adelson, M. E., Rao, R. V., Tilton, R. C., Cabets, K., Eskow, E., Fein, L.,... Mordechai, E. (2004). Prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Bartonella* spp., *Babesia microti*, and *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes scapularis* ticks collected in Northern New Jersey. *J Clin Microbiol*. Vol. 42, n.º 6, p. 2799-801.

Afonso, M.O. & Alves-Pires, C. (2008). Capítulo II: Biecológia dos vetores. In: G. Santos-Gomes & I. P. Fonseca, Portugal: Chaves Ferreira - Publicações, S.A., p. 27-40.

Aguiar, D. M., Cavalcante, G. T., Pinter, A., Gennari, S. M., Camargo, L. M. & Labruna, M. B. (2007). Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. *J Med Entomol*. Vol. 44, n.º 1, p. 126-32.

Aguirre, E., Tesouro, M. A., Ruiz, L., Amusatogui, I. & Sainz, A. (2006). Genetic characterization of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* in dogs in Spain. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. Vol. 53, n.º 4, p. 197-200.

Aktas, M., Ozubek, S. & Ipek, D. N. (2013). Molecular investigations of *Hepatozoon* species in dogs and developmental stages of *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasitology research*. Vol. 112, n.º 6, p. 2381-5.

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*. Vol. 2, n.º 2, p. 119-22.

Alleman, A. R. (2005). The diagnosis and treatment of tick borne diseases in dogs. In *IVIS Proceedings of the North American Veterinary Conference (NAVC)*. EUA: Orlando, Florida, p. 72-477.

Allison, R. W. & Little, S. E. (2013). Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. *Vet Clin Pathol*. Vol. 42, n.º 2, p. 127-44.

Alves, A., Milhano, N., Santos-Silva, M., Santos, A., Vilhena, M. & Sousa, R. (2009). Evidence of *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in domestic, shelter and stray cat blood and fleas, Portugal. *European Society of Clinical Microbiology and Infection Diseases*. Vol. 15, n.º 2, p. 1-3.

Amoli, A. R., Khoshnegah, J. & Razmi, G. (2012). A preliminary parasitological survey of *hepatozoon* spp. Infection in dogs in mashhad, iran. *Iranian journal of parasitology*. Vol. 7, n.º 4, p. 99-103.

Anatriello, E., Ribeiro, J. M., de Miranda-Santos, I. K., Brandao, L. G., Anderson, J. M., Valenzuela, J. G. *et al.* (2010). An insight into the sialotranscriptome of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *BMC Genomics*. Vol. 11, p. 450.

Andersson, M., Turcitu, M. A., Stefanache, M., Tamba, P., Barbuceanu, F. & Chitimia, L. (2013). First evidence of *Anaplasma platys* and *Hepatozoon canis* co-infection in a dog from Romania - a case report. *Ticks Tick Borne Dis*. Vol. 4, n.º 4, p. 317-9.

Arraga-Alvarado, C. M., Qurollo, B. A., Parra, O. C., Berrueta, M. A., Hegarty, B. C. & Breitschwerdt, E. B. (2014). Case report: Molecular evidence of *Anaplasma platys* infection in two women from Venezuela. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. Vol. 91, n.º 6, p. 1161-5.

Ayllon, T., Villaescusa, A., Tesouro, M. A. & Sainz, A. (2009). Serology, PCR and culture of *Ehrlichia/Anaplasma* species in asymptomatic and symptomatic cats from central Spain. *Clin Microbiol Infect*. Vol. 15 Suppl 2, p. 4-5.

Baneth, G. (2010). Ehrlichial and Anaplasma infections. In *IVIS Proceeding of the 35th World Small Animal Veterinary Congress*. Geneva, Suíça.

Baneth, G. (2011). Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. *Veterinary Parasitology*. Vol. 181, n.º 1, p. 3-11.

Baneth, G. (2012a). *Hepatozoon canis* infection. In: C.E. Greene (Ed.), Infection diseases of the dog and cat. (4th ed.). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier, p. (750-7756).

Baneth, G. & Solano-Gallego, L. (2012b). Canine Leishmaniosis. In: C. E. Greene (Ed.), Infectious Diseases of Dog and Cat (4th Ed.). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier, p. (736-746).

Baneth, G., Kenny, M. J., Tasker, S., Anug, Y., Shkap, V., Levy, A. & Shaw, E. (2004). Infection with a proposed new subspecies of *Babesia canis*, *Babesia canis* subsp. *presentii*, in domestic cats. *J Clin Microbiol*. Vol. 42, n.º 1, p. 99-105.

Baneth, G., Sheiner, A., Eyal, O., Hahn, S., Beaufils, J. P., Anug, Y. & Talmi-Frank, D. (2013). Redescription of *Hepatozoon felis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) based on phylogenetic analysis, tissue and blood form morphology, and possible transplacental transmission. *Parasit Vectors*. Vol. 6, n.º, p. 102.

Baneth, G., Cardoso, L., Brilhante-Simões, P. & Schnittger, L. (2019). Establishment of *Babesia vulpes* n. sp. (Apicomplexa: Babesiidae), a piroplasmid species pathogenic for domestic dogs. *Parasites Vectors* Vol. 12, n.º1, p. 129.

Bañuls, A., Hide, M. & Prugnolle, F. (2007). Leishmania and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. *Adv Parasitol*. Vol. 64, nº 1, p. 455-458.

Baptista, S. (2006). Lyme borreliosis in Portugal: study on vectors, agents and risk factors (PhD thesis). Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.

Barradas, P. F., Mesquita, J. R., Ferreira, P., Amorim, I., & Gärtner, F. (2020). Detection of tick-borne pathogens in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato and dogs from different districts of Portugal. *Ticks and tick-borne diseases*, 11(6), 101536.

Bates, P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*. Vol. 37, n.º 10, p. 1097-106.

Bayer (2009). Parasitas em animais de Companhia. Desparasitação - soluções Bayer. Vol. 1, n.º 1, Acedido em 22 Fevereiro 2015 em: http://www.veterinaria.com.pt/media/DIR_27001/VCP1-1-e32.pdf.

Beaufils, J.P., Inokuma, H., Martin-Granel, J., Jumelle, P. & Brouqui, P. (2002). *Anaplasma platy (Ehrlichia platy)* infection in a dog in France: description of the case, and characterization of the agent. *Revue de Médecine Vétérinaire*. n.º 153, p. 85-90.

Beninati, T., Genchi, C., Torina, A., Caracappa, S., Bandi, C. & Lo, N. (2005). Rickettsiae in Ixodid Ticks, Sicily. *Emerging infectious diseases*. Vol. 11, n.º 3, p. 509-511.

Berrada, Z. L. & Telford, S. R. (2009). Burden of tick-borne infections on American companion animals. *Top Companion Anim Med*. Vol. 24, n.º 4, p. 175-81.

Beugnet, F., Kolasinski, M., Michelangeli, P. A., Vienne, J. & Loukos, H. (2011). Mathematical modelling of the impact of climatic conditions in France on *Rhipicephalus sanguineus* tick activity and density since 1960. *Geospat Health*. Vol. 5, n.º 2, p. 255-63.

Beugnet, F. & Marie, J. L. (2009). Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Vet Parasitol*. Vol. 163, n.º 4, p. 298-305.

Biesiada, G., Czepiel, J., Lesniak, M. R., Garlicki, A. & Mach, T. (2012). Lyme disease: review. *Arch Med Sci*. Vol. 8, n.º 6, p. 978-82.

Birkenheuer, A. J. (2012). Babesiosis. In: In C. E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of dog and cat*. St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier, p. (784).

Breitschwerdt, E. (2009). Canine and Human Anaplasmosis and Ehrlichiosis. In *IVIS (Ed.) Proceeding of the LAVC Latin American Veterinary Conference, 16-19 Outubro 2009*. Lima, Peru.

Breitschwerdt, E. (2011). Canine Ehrlichiosis. In *IVIS Proceeding of the 36th World Small Animal Veterinary Congress, 14-17 Oct. 2011*. Jeju, Korea.

Breitschwerdt, E. B. & Kordick, D. L. (2000). Bartonella infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. *Clin Microbiol Rev.* Vol. 13, n.º 3, p. 428-38.

Breitschwerdt, E.B. (2010). Bartonelose: uma epidemiologia emergente e potencialmente escondida? *Veterinary Medicine.* Vol. 12, n.º 70, p. 15-22.

Breitschwerdt, E.B. & Chomel, B.B. (2012). Canine Bartonellosis. In C.E. Greene (Ed.), *Infection diseases of the dog and cat* (4th Ed.). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier, p. (552-562).

Brianti, E., Otranto, D., Dantas-Torres, F., Weigl, S., Latrofa, M. S., Gaglio, G.,... Bain, O. (2012). *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodida, Ixodidae) as intermediate host of a canine neglected filarial species with dermal microfilariae. *Vet Parasitol.* Vol. 183, n.º 3-4, p. 330-7.

Brunt, J., Guptill, L., Kordick, D. L., Kudrak, S. & Lappin, M. R. (2006). American Association of Feline Practitioners 2006 Panel report on diagnosis, treatment, and prevention of *Bartonella* spp. infections. *J Feline Med Surg.* Vol. 8, n.º 4, p. 213-26.

Cafarchia, C., Immediato, D., Iatta, R., Ramos, R., Lia, R., Porretta, D.,... Otranto, D. (2015). Native strains of *Beauveria bassiana* for the control of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. *Parasites & vectors.* Vol. 8, n.º 1, p. 80.

Câmara Municipal de Faro [CMF] (2014). Município de Faro. Acedido em 23 Julho 2014 em: <http://www.cm-faro.pt/menu/5/municipio.aspx>.

Câmara Municipal de Guarda [CMG] (2014). Município da Guarda. Acedido em 23 Julho 2014 em: <http://www.munguarda.pt/index.asp?ideducacao=51&idseccao=576&action=secca0>.

Câmara municipal de Lisboa [CML] (2014). Lisboa, Câmara municipal. Acedido em 23 Julho 2014 em: <http://www.cm-lisboa.pt/>.

Câmara Municipal de Setúbal [CMS] (2014). Setúbal, Município participado. Acedido em 23 Julho 2014 em: <http://www.mun-setubal.pt/pt/categoria/localizacao-e-caracteristicas/2>.

Campino, L. & Maia, C. (2013). The role of reservoirs: canine leishmaniasis. In: *Drug Resistance in Leishmania Parasites - Consequences, Molecular Mechanism and Possible Treatments*; A. Ponte-Sucre, M. Padron-Nieves; E. Diaz. Viena, Austria: Springer Verlag, p. (45-64).

Cardoso, L., Costa, A., Tuna, J., Vieira, L., Eyal, O., Yisaschar-Mekuzas, Y., *et al.* (2008). *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* infections in dogs from northern Portugal. *Vet Parasitol.* Vol. 156, n.º 3-4, p. 199-204.

Cardoso, L., Tuna, J., Vieira, L., Yisaschar-Mekuzas, Y. & Baneth, G. (2010a). Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal. *Vet J.* Vol. 183, n.º 2, p. 232-3.

Cardoso, L., Yisaschar-Mekuzas, Y., Rodrigues, F., Costa, A., Machado, J., Diz-Lopes, D. & Baneth, G. (2010b). Canine babesiosis in northern Portugal and molecular characterization of vector-borne co-infections. *Parasites & Vectors.* Vol. 3, n.º27, p.1-10.

Cardoso, L., Mendao, 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.* Vol. 5, n.º, p. 62.

Cardoso, L., Cortes, H. C., Reis, A., Rodrigues, P., Simoes, M., Lopes, A. P.,... Baneth, G. (2013). Prevalence of *Babesia microti*-like infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Portugal. *Veterinary Parasitology.* Vol. 196, n.º 1-2, p. 90-5.

Cardoso, L., Cortes, H. C., Eyal, O., Reis, A., Lopes, A. P., Vila-Vicosa, M. J.,... Baneth, G. (2014). Molecular and histopathological detection of *Hepatozoon canis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Portugal. *Parasites & vectors.* Vol. 7, n.º1, p. 113.

Cardoso, L., Gilad, M., Cortes, H. C., Nachum-Biala, Y., Lopes, A. P., Vila-Vicosa, M. J.,... Baneth, G. (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.* Vol. 8, p. 144.

Carvalho, I. L. (2010). *Borrelia lusitaniae* and Lyme borreliosis in Portugal: A contribution to the study of an emerging bacterial zoonosis with an impact on Public Health. Thesis. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Centeno-Lima, S., do Rosario, V., Parreira, R., Maia, A. J., Freudenthal, A. M., Nijhof, A. M.,... Jongejan, F. (2003). A fatal case of human babesiosis in Portugal: molecular and phylogenetic analysis. *Trop Med Int Health*. Vol. 8, n.º 8, p. 760-4.

Center for Food Security & Public Health [CFSPH] (2013). Ehrlichiosis and Anaplasmosis: Zoonotic Species, Institute for International Cooperation in Animal Biologics, Iowa State University, College of Veterinary Medicine. Acedido em 23 Julho 2013 em <http://www.cfsph.iastate.edu/factsheets/pdfs/ehrlichiosis.pdf>.

Center for Food Security & Public Health [CFSPH] (2011). Lyme disease. Zoonotic Species, Institute for International Cooperation in Animal Biologics, Iowa State University, College of Veterinary Medicine. Acedido em 20 Junho 2013 em http://www.cfsph.iastate.edu/factsheets/pdfs/lyme_disease.

Charrel, R. N., Izri, A., Temmam, S., Delaunay, P., Toga, I., Dumon, H.,... Parola, P. (2007). Cocirculation of 2 genotypes of Toscana virus, southeastern France. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 13, n.º 3, p. 465-8.

Chochlakis, D.; Ioannou, I.; Sandalakis, V., Dimitriou, T., Kassinis, N., Papadopoulos, B.,... Psaroulaki, A (2012). Spotted fever group Rickettsiae in ticks in Cyprus. *Microbial ecology*. Vol. 63, n.º 2, p. 314-23.

Chomel, B. (2011). Tick-borne infections in dogs-an emerging infectious threat. *Vet Parasitol*. Vol. 179, n.º 4, p. 294-301.

Cicuttin, G. L., Brambati, D. F., Rodriguez Eugui, J. I., Lebrero, C. G., de Salvo, M. N., Beltran, F. J.,... Anda, P. (2014). Molecular characterization of *Rickettsia massiliae* and *Anaplasma platys* infecting *Rhipicephalus sanguineus* ticks and domestic dogs, Buenos Aires (Argentina). *Ticks and tick-borne diseases*. Vol. 5, n.º 5, p. 484-8.

Claerebout, E., Losson, B., Cochez, C., Casaert, S., Dalemans, A. C., De Cat, A.,... Lempereur, L. (2013). Ticks and associated pathogens collected from dogs and cats in Belgium. *Parasit Vectors*. Vol. 6, n.º, p. 183.

Cohn, L. A. (2003). Ehrlichiosis and related infections. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. Vol. 33, n.º 4, p. 863-84.

Collares-Pereira, M., Couceiro, S., Franca, I., Kurtenbach, K., Schafer, S. M., Vitorino, L.,... Cunha, C. (2004). First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *Journal of clinical microbiology*. Vol. 42, n.º 3, p. 1316-8.

Conceicao-Silva, F. M., Abranches, P., Silva-Pereira, M. C. & Janz, J. G. (1988). Hepatozoonosis in foxes from Portugal. *Journal of Wildlife Diseases*. Vol. 24, n.º 2, p. 344-7.

Cortes, H. C., Cardoso, L., Giannelli, A., Latrofa, M. S., Dantas-Torres, F. & Otranto, D. (2014). Diversity of *Cercopithifilaria* species in dogs from Portugal. *Parasites & Vectors*. Vol. 7, n.º 1, p. 261.

Cortes, S., Rolao, 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*. Vol. 98, n.º 1, p. 12-17.

Cortes, S., Vaz, Y., Neves, R., Maia, C., Cardoso, L. & Campino, L. (2012). Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Vet Parasitol*. Vol. 189, n.º 2-4, p. 189-96.

Cotté, V., Bonnet, S., Le Rhun, D., Le Naour, E., Chauvin, A., Boulouis, H. J.,... Vayssier-Taussat, M. (2008). Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 14, n.º 7, p. 1074-80.

Couceiro, S., Batista, S., Franca, I., Vieira, L. & Colares-Pereira, M. (2003). Cultura versus PCR: que apoio ao diagnóstico de Borreliose de Lyme? *Acta Médica*. Vol. 28, n.º 2, p. 75-82.

Coutinho, M. T., Bueno, L. L., Sterzik, A., Fujiwara, R. T., Botelho, J. R., De Maria, M.,... Linardi, P. M. (2005). Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* Vol. 128, n.º 1-2, p. 149-55.

Couto, C. G. (2011). What's new in tick borne diseases? In IVIS Proceedings of the Southern European Veterinary Conference.

Dantas-Torres, F. (2010). Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit Vectors.* Vol. 3, n.º, p. 26.

Dantas-Torres, F. (2008a). The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Vet Parasitol.* Vol. 152, n.º 3-4, p. 173-85.

Dantas-Torres, F. (2008b). Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasit Vectors.* Vol. 1, n.º 1, p. 25.

Dantas-Torres, F. (2009). *Rhipicephalus sanguineus* e a epidemiologia da Leishmaniose visceral canina no Estado de Pernambuco. Tese de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Dantas-Torres, F. (2007). The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol.* Vol. 149, n.º 3-4, p. 139-46.

Dantas-Torres, F. (2011). Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. *Trends Parasitol.* Vol. 27, n.º 4, p. 155-9.

Dantas-Torres, F., Chomel, B. B. & Otranto, D. (2012a). Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends Parasitol.* Vol. 28, n.º 10, p. 437-46.

Dantas-Torres, F., Latrofa, M. S., 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.* Vol. 6, n.º, p. 213.

Dantas-Torres, F., Latrofa, M. S., Weigl, S., Tarallo, V. D., Lia, R. P. & Otranto, D. (2012b). *Hepatozoon canis* infection in ticks during spring and summer in Italy. *Parasitology research*. Vol. 110, n.º 2, p. 695-8.

Dantas-Torres, F., Lorusso, V., Testini, G., de Paiva-Cavalcanti, M., Figueredo, L. A., Stanneck, D.,... Otranto, D. (2010). Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. *Parasitol Res*. Vol. 106, n.º 4, p. 857-60.

de Almeida, R. F., Garcia, M. V., Cunha, R. C., Matias, J., e Silva, E. A., de Fatima Cepa Matos, M.,... Andreotti, R. (2013). Ixodid fauna and zoonotic agents in ticks from dogs: first report of *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus sanguineus* in the state of Mato Grosso do Sul, mid-western Brazil. *Experimental and Applied Acarology*. Vol. 60, n.º 1, p. 63-72.

de Carvalho, I. L., Fonseca, J. E., Marques, J. G., Ullmann, A., Hojgaard, A., Zeidner, N.,... Nuncio, M. S. (2008). Vasculitis-like syndrome associated with *Borrelia lusitaniae* infection. *Clin Rheumatol*. Vol. 27, n.º 12, p. 1587-91.

de Carvalho, I. L., Alves, A. S., Pardal, S., Lopes, R. J., Mendes, L., Nuncio, M. S. & Líbia, Z. (2012). *Borrelia garinii* and *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* detected in migratory shorebirds in Portugal. *European Journal of Wildlife Research*. Vol. 58, n.º 5, p. 857-861.

de Carvalho, I. L., Zeidner, N., Ullmann, A., Hojgaard, A., Amaro, F., Zé-Zé, L.,... Nuncio, M. S. (2010a). Molecular characterization of a new isolate of *Borrelia lusitaniae* derived from *Apodemus sylvaticus* in Portugal. *Vector Borne Zoonotic Dis*. Vol. 10, n.º 5, p. 531-4.

de Carvalho, I. & Nuncio, M. (2006). Laboratory diagnosis of Lyme Borreliosis at Portuguese National Institute of Health (1990-2004). *Euro Surveill*. Vol. 11, n.º 10, p. 257-260.

de Carvalho, L., Luz, T., Parreira, P., Palma, M., Roxo, F., Brito, M.,... Nuncio, M. (2010b). Clinical and laboratory data of Portuguese patients with a diagnosis of Lyme borreliosis. *Acta Médica*

de la Fuente, J., Torina, A., Naranjo, V., Nicosia, S., Alongi, A., La Mantia, F.,... Kocan, K. M. (2006). Molecular characterization of *Anaplasma platys* strains from dogs in Sicily, Italy. *BMC Vet Res*. Vol. 2, n.º, p. 24.

de Michelis, S., Sewell, H. S., Collares-Pereira, M., Santos-Reis, M., Schouls, L. M., Benes, V.,... Kurtenbach, K. (2000). Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from mainland Portugal. *Journal of clinical microbiology*. Vol. 38, n.º 6, p. 2128-33.

de Sousa, R., Barata, C., Vitorino, L., Santos-Silva, M., Carrapato, C., Torgal, J.,... Bacellar, F. (2006). *Rickettsia sibirica* isolation from a patient and detection in ticks, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 12, n.º 7, p. 1103-8.

de Sousa, R., Duque, L., Anes, M., Pocas, J., Torgal, J., Bacellar, F.,... Walker, D. H. (2008). Lymphangitis in a Portuguese patient infected with *Rickettsia sibirica*. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 14, n.º 3, p. 529-30.

Dias, A., Pinto, D., Borges, T., Guedes, M. (2011). Manifestação atípica de infeção por *Bartonella henselae*. *Acta Pediátrica Portuguesa*. Vol. 42, n.º 6, p. 277-9.

Dietrich, F., Schmidgen, T., Maggi, R. G., Richter, D., Matuschka, F. R., Vonthein, R.,... Kempf, V. A. (2010). Prevalence of *Bartonella henselae* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Appl Environ Microbiol*. Vol. 76, n.º 5, p. 1395-8.

Diniz, P. P., Maggi, R. G., Schwartz, D. S., Cadenas, M. B., Bradley, J. M., Hegarty, B.,... Breitschwerdt, E. B. (2007). Canine bartonellosis: serological and molecular prevalence in Brazil and evidence of co-infection with *Bartonella henselae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*. *Vet Res*. Vol. 38, n.º 5, p. 697-710.

Diogo, M., Fernandes, H., Pimentel, T., Ferreira, A. & Serra, E. (2010). Doença da arranhadela do gato - um diagnóstico a ter em conta. *Revista Portuguesa de Doenças infecciosas* Vol. 6, n.º 1, p. 38-41.

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

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

Anaplasma, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol*. Vol. 51, n.º Pt 6, p. 2145-65.

Dyachenko, V., Pantchev, N., Balzer, H. J., Meyersen, A. & Straubinger, R. K. (2012). First case of *Anaplasma platys* infection in a dog from Croatia. *Parasites & Vectors*. Vol. 5, p. 49.

Ebani, V. V., Bertelloni, F. & Fratini, F. (2012). Occurrence of *Bartonella henselae* types I and II in Central Italian domestic cats. *Res Vet Sci*. Vol. 93, n.º 1, p. 63-6.

European Cientific Counsel Companion Animal Parasites [ESCCAP] (2012a). Control of Ectoparasites in Dogs and Cats (Guia ESCCAP nº3). Acedido em 20 Fevereiro 2015 em: [http://www.waccp.org/uploads/file/esccap%20guidelines%20gl3%30final%2019june2012\(2\).pdf](http://www.waccp.org/uploads/file/esccap%20guidelines%20gl3%30final%2019june2012(2).pdf).

European Cientific Counsel Companion Animal Parasites [ESCCAP] (2012b). Control of Vector-Borne Diseases in Dogs and Cats (Guía ESCCAP nº5). Acedido em 20 Dezembro 2013 em: http://www.esccap.org/uploads/docks/ih38c2d6_escap_guidelines_guidelines_gl5_010ct2012.pdf.

Esch, K. J. & Petersen, C. A. (2013). Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clin Microbiol Rev*. Vol. 26, n.º 1, p. 58-85.

Estrada-Peña, A. (2004a). As carraças do cão e as doenças transmitidas na Península Ibérica: uma panorâmica com aspectos zoonóticos. In: Estrada-Peña, A. (Ed), *As carraças do cão na Península Ibérica: espécies, distribuição, ecologia e controlo* (p. 8-16). Estrada-Peña, A. Virbac Saúde Animal.

Estrada-Peña, A. (2004b). Babesiose canina. In: Estrada-Peña, A. (Ed), *As carraças do cão e as doenças transmitidas na Península Ibérica: uma panorâmica com aspectos zoonóticos* (p. 64-69). Virbac Saúde Animal.

Estrada-Peña, A. (2004c). Borreliose de Lyme no cão. In: Estrada-Peña, A. (Ed), *As carraças do cão na Península Ibérica: espécies, distribuição, ecologia e controlo* (p. 58-62). A. Virbac saúde animal.

Estrada-Peña, A. (2004d). Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region. A Guide to identification of Species. Univ. Zaragoza, Spain., n.º 1, p. 1-131.

Falcaro, C., Granato, A., Babiker, A. M., Cassini, R., Capeli, G., Montarsi, F. & Ravagnan, S. (2014). Prevalence of *Babesia* spp. potentially pathogenic for humans in *Ixodes ricinus* ticks of north-eastern Italy. *Società Italiana di Parasitologia*. Vol. XXVIII Congresso Nazionale, p. 190.

Faria, A. S. (2013). Detecção de DNA de *Borrelia burgdorferi* sensu lato em soro e ixodídeos parasitas de javali (*Sus scrofa*) no norte de Portugal por nested-PCR. Tese de Mestrado em Biotecnologia para as Ciências da Saúde, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Faria, A.S., Paiva-Cardoso, M., Nunes, M., Carreira, T., Vale-Gonçalves, H.M. & Veloso, O. (2015). First detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in Serum of the Wild Boar (*Sus scrofa*) in Northern Portugal by Nested-PCR. *EcoHealth*, (1989). Vol. 12, nº1, p. 183-7.

Faria, A.L., Carvalho, R., Lima, N., Castanheira, R. (2008). Angiomatose Bacilar em Doente Imunocompetente: A propósito de um caso clínico. Vol. 22, n.º 1, p. 17-19. Acedido em 05 Maio2016em:http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S087134132008000100002&lng=pt.

Farkas, R., Solymosi, N., Takacs, N., Hornyak, A., Hornok, S., Nachum-Biala, Y. & Baneth, G. (2014). First molecular evidence of *Hepatozoon canis* infection in red foxes and golden jackals from Hungary. *Parasites & vectors*. Vol. 7, n.º, p. 303.

Fernández-Soto, P., Encinas-Grandes, A. & Perez-Sanchez, R. (2003). *Rickettsia aeschlimannii* in Spain: molecular evidence in *Hyalomma marginatum* and five other tick species that feed on humans. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 9, n.º 7, p. 889-90.

Figueiredo, T. (2008). Estudo da prevalência de doenças associadas a vectores em canídeos domésticos do distrito de Bragança. Tese de Mestrado em Microbiologia Clínica, Universidade de Lisboa.

Foley, E. & Reeves, W. (2014). *Rickettsia massiliae* (Latreille) from the Azores. *Journal of Agricultural and Urban Entomology* Vol. 30, n.º 1, p. 25-27.

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. *Vet Parasitol.* Vol. 197, n.º 3-4, p. 595-603.

Franke, J., Hildebrandt, A. & Dorn, W. (2013). Exploring gaps in our knowledge on Lyme borreliosis spirochaetes - updates on complex heterogeneity, ecology, and pathogenicity. *Ticks and tick-borne diseases.* Vol. 4, n.º 1-2, p. 11-25.

Gabrielli, S., Macchioni, F., Totino, V., Suniga, F., Rojas, P., Lara, Y., *et al.* (2014). First detection of *Babesia microti* in people living in the plurinational state of Bolivia. *Società Italiana di Parasitologia.* Vol. XXVIII Congresso Nazionale, p. 114.

Galvão, M., Silva, L., Nascimento, E., Calic, S., Sousa, R. & Bacellar, F. (2005). Riquetsioses no Brasil e Portugal: ocorrência, distribuição e diagnóstico. *Rev Saúde Pública.* Vol. 39, n.º 5, p. 850-6.

Gehrke, F. S., Angerami, R. N., Marrelli, M. T., de Souza, E. R., do Nascimento, E. M., Colombo, S.,... Schumaker, T. (2013). Molecular characterization of mediterranean spotted fever rickettsia isolated from a European traveler in the state of Sao Paulo, Brazil. *Journal of travel medicine.* Vol. 20, n.º 1, p. 54-6.

Geller, J., Nazarova, L., Katargina, O. & Golovljova, I. (2013). *Borrelia burgdorferi* sensu lato prevalence in tick populations in Estonia. *Parasit Vectors.* Vol. 6, n.º, p. 202.

Gern, L. (2009). Life cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and transmission to humans. *Curr Probl Dermatol.* Vol. 37, n.º, p. 18-30.

Gonzalez, R. (2013). Actualización acerca de *Borrelia burgdorferi* sensu lato y enfermedad de Lyme. Vol. 65, n.º 2, p. 149-165. Acedido 15 Janeiro 2014 em: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S037507602013000200002&lng=es&nr_m=iso.

Gouveia, J., Serafim, A.S., Cardoso, A., Maltêz, C., Pinto, A., Pereira, A., *et al.* (2013). Febre Escaro-Nodular com falência multiorgânica - caso clínico. *Revista Portuguesa de Doenças infecciosas (RPDI).* Vol. 9, n.º 2, p. 93-97.

Gramiccia, M. (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet Parasitol.* Vol. 181, n.º 1, p. 23-30.

Gray, J., Dantas-Torres, F., Estrada-Pena, A. & Levin, M. (2013). Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Ticks Tick Borne Dis.* Vol. 4, n.º 3, p. 171-80.

Greene, C.E., Kidd, L. & Breitschwerdt, E. (2012a). Rocky Mountain and Mediterranean Spotted Fevers, Cat-Flea Typhuslike Illness, Rickettsialpox, and Typhus. In: C. E. Greene (Ed.), *Infection diseases of the dog and cat* (4th Ed., p. 259-268). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.

Greene, C.E., Straubinger, R.K. & Levy, S.A. (2012b). Borreliosis. In: C.E. Greene (Ed.), *Infection diseases of the dog and cat* (4th Ed., pp. 447-465). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.

Grevot, A., Jaussaud Hugues, P., Marty, P., Pratlong, F., Ozon, C., Haas, P.,... Bourdoiseau, G. (2005). Leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in a FIV and FeIV positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods. *Parasite.* Vol. 12, n.º 3, p. 271-5.

Guptill-Yoran (2012). Feline Bartonellosis. In: Greene (Ed.), *Infection diseases of the dog and cat* (4th Ed., pp. 545-552). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.

Guptill, L. (2010). Bartonellosis. *Veterinary Microbiology.* Vol. 140, n.º 3-4, p. 347-59.

Halos, L., Jamal, T., Maillard, R., Beugnet, F., Le Menach, A., Boulouis, H. J. & Vayssier-Taussat, M. (2005). Evidence of *Bartonella* sp. in questing adult and nymphal *Ixodes ricinus* ticks from France and co-infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia* sp. *Vet Res.* Vol. 36, n.º 1, p. 79-87.

Harrus, S., Waner, T. & Neer, T.M. (2012). *Ehrlichia Canis* Infection. In: C.E. Greene (Ed.), *Infections Diseases of dog and cat* (4th Ed., pp. 227-237). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.

Harrus, S., Lior, Y., Ephros, M., Grisaru-Soen, G., Keysary, A., Strenger, C. & Baneth, G. (2007). *Rickettsia conorii* in humans and dogs: a seroepidemiologic survey of two rural villages in Israel. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. Vol. 77, n.º 1, p. 133-5.

Harrus, S., Perlman-Avrahami, A., Mumcuoglu, K. Y., Morick, D., Eyal, O. & Baneth, G. (2011). Molecular detection of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma platys*, *Candidatus Midichloria mitochondrii* and *Babesia canis vogeli* in ticks from Israel. *Clin Microbiol Infect*. Vol. 17, n.º 3, p. 459-63.

Hartmann, K., Addie, D., Belák, S., Baralon-Boucraut, C. & Egberink, H. (2013). Babesiosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. Vol. 15, n.º, p. 643-646.

Harvey, J. W. (2012). *Anaplasma platys* infection (Thrombocytotropic Anaplasmosis). In: C.E. Greene (Ed.) *Infections diseases of dog and cat* (4th Ed., pp. 256-258). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.

Haubenstricker, S. (2010). *Bartonella* Infection: An Underrecognized Threat. Acedido em 25 Dezembro 2013 em: <https://www.vetlearn.com/veterinarytechnician/bartonellainfectionanunder-recognized-threat>>.

Heikkila, H. M., Bondarenko, A.; Mihalkov, A., Pfister, K.; Spillmann, T. (2010). *Anaplasma phagocytophilum* infection in a domestic cat in Finland: Case report. *Acta Vet Scand*. Vol. 52, n.º, p. 62.

Hodžić, A. & Alić, A. (2022). Hepatozoon silvestris: an emerging feline vector-borne pathogen in Europe? *Trends in Parasitology*. Vol. 39, nº 3, p. 163-166.

Hornok, S., Fuente, J., Horvath, G., Fernandez de Mera, I. G., Wijnveld, M., Tanczos, B., et al. (2013). Molecular evidence of *Ehrlichia canis* and *Rickettsia massiliae* in ixodid ticks of carnivores from South Hungary. *Acta Vet Hung*. Vol. 61, n.º 1, p. 42-50.

Inokuma, H., Beppu, T., Okuda, M., Shimada, Y. & Sakata, Y. (2003). Epidemiological survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* using ticks collected from dogs in Japan. *Vet Parasitol*. Vol. 115, n.º 4, p. 343-8.

Instituto Geográfico do Exército [IGEOE] (2014). Cartografia. Acedido em 24 Julho 2014 em: <http://www.igeoe.pt/igeoearcweb/igeoesig/execcmd.asp?selarea&distrito=guarda&concelho=&freguesia=>.

Instituto nacional de estatística [INE] (2014). População residente por local de residência, sexo e grupo etário. Acedido em 24 Julho 2014 em: http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000611&contexto=pi&selTab=tab0.

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, INSA (2016). REVIVE 2011-2015 - Culicídeos e Ixodídeos: Rede de Vigilância de Vetores. Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac. Lisboa: INSA, IP.

Ionita, M., Mitrea, I. L., Pfister, K., Hamel, D. & Silaghi, C. (2013). Molecular evidence for bacterial and protozoan pathogens in hard ticks from Romania. *Vet Parasitol.* Vol. 196, n.º 1-2, p. 71-6.

Irwin, P. (2007). Pups, PCRs and platelets: *Ehrlichia* and *Anaplasma* infections on gogs in Australia and overseas. IVIS Proceeding of the World Small Animal Veterinary Association. Sydney: Austrália.

Irwin, P. J. (2009). Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasites & vectors.* Vol. 2 Suppl 1, n.º, p. S4.

Ismail, N., Bloch, K. C. & McBride, J. W. (2010). Human ehrlichiosis and anaplasmosis. *Clin Lab Med.* Vol. 30, n.º 1, p. 261-92.

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

Javkhlan, G., Enkhtaivan, B., Baigal, B., Myagmarsuren, P., Battur, B. & Battsetseg, B. (2014). Natural *Anaplasma phagocytophilum* infection in ticks from a forest area of Selenge province, Mongolia. *Western Pacific surveillance and response journal : WPSAR.* Vol. 5, n.º 1, p. 21-4.

Kamani, J., Baneth, G., Mumcuoglu, K. Y., Waziri, N. E., Eyal, O., Guthmann, Y. & Harrus, S. (2013a). Molecular detection and characterization of tick-borne pathogens in dogs and ticks from Nigeria. *PLoS Negl Trop Dis*. Vol. 7, n.º 3, p. e2108.

Kamani, J., Morick, D., Mumcuoglu, K. Y. & Harrus, S. (2013b). Prevalence and diversity of *Bartonella* species in commensal rodents and ectoparasites from Nigeria, West Africa. *PLoS Negl Trop Dis*. Vol. 7, n.º 5, p. e2246.

Karami, A. (2012). Molecular Biology of *Borrelia burgdorferi*, Lyme Disease. p. 1-26. Acedido em 13 Abril 2015 em: <http://cdn.intechweb.org/pdfs/28824.pdf>.

Kayser, F. H., Bienz, K.A.; Eckert, J. & Zinkernagel, R.M. (2005). *Medical Microbiology*. 2º Ed. New York: Thieme.

Killick-Kendrick, R. (1999). Biology of sand fly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. In Canine Leishmaniasis: an Update, Proc Intern Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona., p. 26-31.

Kim, C. M., Kim, J. Y., Yi, Y. H., Lee, M. J., Cho, M. R., Shah, D. H.,... Chae, J. S. (2005). Detection of Bartonella species from ticks, mites and small mammals in Korea. *J Vet Sci*. Vol. 6, n.º 4, p. 327-34.

Lamps, L. W. & Scott, M. A. (2004). Cat-scratch disease: historic, clinical, and pathologic perspectives. *American journal of clinical pathology*. Vol. 121 Suppl, p. S71-80.

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*. Vol. 12, n.º 1, p. 28-33.

Lee, S., Hong, Y., Chung, D.I., Jang, H. K., Goo, Y. K. & Xuan, X. (2022). Evolutionary analysis of *Babesia vulpes* and *Babesia microti*-like parasites. *Parasites Vectors* 15, 404.

Lima, M. L., Soares, P. T., Ramos, C. A., Araujo, F. R., Ramos, R. A., Souza, I. & Alves, L.C. A. (2010). Molecular detection of *Anaplasma platys* in a naturally-infected cat in Brazil. *Braz J Microbiol*. Vol. 41, n.º 2, p. 381-5.

Lindgren, E. & Jaenson, T. G. (2006). Lyme borreliosis in Europe: influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures. Acedido em 23 Junho 2015 em: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0006/96819/E89522.pdf>.

Lopes, N. (2013). Identificação de genoespécies do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) circulantes na fauna ixodideológica em Portugal. Tese de Mestrado em Microbiologia Médica. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.

Louro, E., Campos, A. , A., Carvalho, A., Santos, R., Reis, C., Almiro, E. & Armando, P. (2006). Mediterranean spotted fever: a benign zoonosis? *Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna*. Vol. 13, n.º 1.

M'Ghirbi, Y. & Bouattour, A. (2008). Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* from naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Tunisia. *Veterinary Parasitology*. Vol. 152, nº 1-2, p. 1-7.

Macintire, D. K., Vincent-Johnson, N. & Potter, M. (2012). *Hepatozoon americanum* infection. In: C.E. Greene, Infection diseases of the dog and cat (4th Ed., pp. 757-763). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.

Maggi, R. G., Mascarelli, P. E., Havenga, L. N., Naidoo, V. & Breitschwerdt, E. B. (2013). Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian. *Parasites & vectors*. Vol. 6, n.º, p. 103.

Maia, C., Almeida, B., Coimbra, M., Fernandes, M.C., Cristóvão, J.M., Ramos, C. & Campino, L. (2015a). Bacterial and protozoal agents of canine vector-borne diseases in the blood of domestic and stray dogs from southern Portugal. *Parasites & vectors*. Vol. 8, n.º 1, p. 759.

Maia, C. & Campino, L. (2011). Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends in Parasitology*. Vol. 27, n.º 8, p. 341-344.

Maia, C. & Campino, L. (2015b). Leishmaniose em Portugal no início do século XXI. In: *Anais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical: saúde global e doenças tropicais*. p. (25-28).

- Maia, C., Gomes, J., Cristovao, J., Nunes, M., Martins, A., Rebelo, E. & Campino, L. (2010). Feline Leishmania infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Vet Parasitol.* Vol. 174, n.º 3-4, p. 336-40.
- Maia, C., Nunes, M. & Campino, L. (2008). Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector Borne Zoonotic Dis.* Vol. 8, n.º 4, p. 555-9.
- Maia, C., Ramos, C., Coimbra, M., Bastos, F., Martins, A., Pinto, P. & Campino, L. (2014a). Bacterial and protozoal agents of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from southern Portugal. *Parasites & Vectors.* Vol. 7, n.º 1, p. 115.
- Maia, C., Ramos, C., Coimbra, M., Bastos, F., Martins, A., Pinto, P. & Campino, L. (2014b). Bacterial and protozoal agents of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from southern Portugal. *Parasites & Vectors.* Vol. 7, n.º 1, p. 115.
- Marie, J. L., Davoust, B., Socolovschi, C., Mediannikov, O., Roqueplo, C., Beaucournu, J. C. & Parola, P. (2012). Rickettsiae in arthropods collected from red foxes (*Vulpes vulpes*) in France. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases.* Vol. 35, n.º 1, p. 59-62.
- Marques, A. R. (2010). Lyme disease: a review. *Current allergy and asthma reports.* Vol. 10, n.º 1, p. 13-20.
- Marques, L., Mesquita, S., Tavares, E. & Guedes, M. (2005). Febre Escaro-nodular. *Acta Pediatr Port.* Vol. 36, n.º 5, p. 257-263.
- Marquez, F. J., Rodriguez-Liebana, J. J., Soriguer, R. C., Muniain, M. A., Bernabeu-Wittel, M., Caruz, A. & Contreras-Chova, F. (2008). Spotted fever group Rickettsia in brown dog ticks *Rhipicephalus sanguineus* in southwestern Spain. *Parasitology research.* Vol. 103, n.º 1, p. 119-22.
- Marta, F. M. F. (2009). Borreliose de Lyme em Portugal: (novos) aspectos clínico-laboratoriais do diagnóstico da infecção humana. Tese, Universidade de Lisboa.
- Milhano, N., de Carvalho, I. L., Alves, A. S., Arrube, S., Soares, J., Rodriguez, P.,... de Sousa, R. (2010). Coinfections of *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia helvetica* with *Borrelia*

lusitaniae in ticks collected in a Safari Park, Portugal. *Ticks Tick Borne Dis.* Vol. 1, n.º 4, p. 172-7.

Modrý, D., Beck, R., Hrazdilová, K., & Baneth, G. (2017). A Review of Methods for Detection of *Hepatozoon* Infection in Carnivores and Arthropod Vectors. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, Vol. 17, n.º 1, p. 66–72.

Mogollon-Pasapera, E., Otvos, L., Jr., Giordano, A. & Cassone, M. (2009). Bartonella: emerging pathogen or emerging awareness? *International journal of infectious diseases (IJID): official publication of the International Society for Infectious Diseases*. Vol. 13, n.º 1, p. 3-8.

Mokhtar, A. S., Lim, S. F., & Tay, S. T. (2013). Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Babesia gibsoni* in dogs in Malaysia. *Trop Biomed.* Vol. 30, n.º 2, p. 345-8.

Moraes-Filho, J., Marcili, A., Nieri-Bastos, F. A., Richtzenhain, L. J., Labruna, M. B. (2011). Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. *Acta Trop.* Vol. 117, n.º 1, p. 51-5.

Morais, J.D. (2009). Zoonoses emergentes em Portugal. *Revista Portuguesa de Doenças infecciosas* Vol. 5, n.º 3, p. 95-114.

Mouffok, N., Parola, P., Lepidi, H. & Raoult, D. (2009). Mediterranean spotted fever in Algeria - new trends. *International journal of infectious diseases (IJID): official publication of the International Society for Infectious Diseases*. Vol. 13, n.º 2, p. 227-35.

Murinello, N., Murinello, A., Damásio, H., Carvalho, A. & de Sousa, R. (2010). Doença da arranhadela do Gato em mulher de 44 anos de idade. *Revista Portuguesa de Doenças infecciosas* Vol. 6, n.º 3, p. 112- 119.

Nava, S., Estrada-Pena, A., Petney, T., Beati, L., Labruna, M. B., Szabo, M. P.,... Mastropaolo, M. (2015). The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). *Veterinary Parasitology*. Vol. 208, n.º 1-2, p. 2-8.

National Center for Biotechnology Information [NCBI] (2009a). Taxonomy Browser. *Anaplasma* spp.. Acedido em 05 Agosto 2014 em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=768>>.

National Center for Biotechnology Information [NCBI], (2009b). Taxonomy Browser. Ixodidae. Acedido em 05 Agosto 2014 em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6939>>.

National Center for Biotechnology Information [NCBI] (2009c). Taxonomy Browser. *Leishmania infantum*. Acedido em 8 Agosto 2014 em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>>.

Norte, A. C., Ramos, J. A., Gern, L., Nuncio, M. S., & Lopes de Carvalho, I. (2013). Birds as reservoirs for *Borrelia burgdorferi* s.l. in Western Europe: circulation of *B. turdi* and other genospecies in bird-tick cycles in Portugal. *Environmental microbiology*. Vol. 15, n.º 2, p. 386-97.

Núncio, M. & Carvalho, I. (2014). Doenças associadas a carraças. In: Doenças associadas a artrópodes vectores e roedores. *Borrelia de Lyme*. Núncio, M. S., Alves, M. J. Guide - Artes gráficas, Lda, p. (87-97).

Nunes, M., Parreira, R., Lopes, N., Maia, C., Carreira, T., Sousa, C.,... Vieira, M. L. (2015). Molecular Identification of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes ricinus* from Portugal. *Vector borne and zoonotic diseases*. Vol. 15, n.º 8, p. 515-7.

Núncio, M., Santos, A., Luz, T., Parreira, P., Gomes, M., Zé-Zé, L.,... Carvalho, I. (2022). Relatório REVIVE 2021 - Ixodídeos: Rede de Vigilância de Vetores. Acedido em 13 de Janeiro de 2024 em: <http://hdl.handle.net/10400.18/8611>.

Oliveira, J. & Corte-Real, R. (1999). Rickettsia infections in Portugal. *Acta Médica Portuguesa*. Vol. 12, n.º 12, p. 313-21.

Organização Mundial da Saúde [OMS] (2010). Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. Switzerland: WHO technical report series., n.º 949.

Oteo, J. A. & Portillo, A. (2012). Tick-borne rickettsioses in Europe. *Ticks and tick-borne diseases*. Vol. 3, n.º 5-6, p. 271-8.

Oteo, J. a., Portillo, A., Ibarra, V. & Blanco, J.R. (2004). Doença de Lyme na espécie humana. In: A. Estrada-Peña, As carraças do cão na Península Ibérica: espécies, distribuição, ecologia e controlo. *Virbac Saúde Animal*, p. (48-55).

Otranto, D., Brianti, E., Dantas-Torres, F., Weigl, S., Latrofa, M. S., Gaglio, G.,... Bain, O. (2011). Morphological and molecular data on the dermal microfilariae of a species of *Cercopithifilaria* from a dog in Sicily. *Vet Parasitol*. Vol. 182, n.º 2-4, p. 221-9.

Otranto, D., Brianti, E., Latrofa, M. S., Annoscia, G., Weigl, S., Lia, R. P.,... Bain, O. (2012). On a *Cercopithifilaria* sp. transmitted by *Rhipicephalus sanguineus*: a neglected, but widespread filarioid of dogs. *Parasit Vectors*. Vol. 5, n.º 1, p. 1.

Otranto, D., Varcasia, A., Solinas, C., Scala, A., Brianti, E., Dantas-Torres, F.,... Bain, O. (2013). Redescription of *Cercopithifilaria baina* Almeida & Vicente, 1984 (Spirurida, Onchocercidae) from a dog in Sardinia, Italy. *Parasit Vectors*. Vol. 6, n.º 1, p. 132.

Parola, P., Cornet, J. P., Sanogo, Y. O., Miller, R. S., Thien, H. V., Gonzalez, J. P.,... Wongsrichanalai, C. (2003). Detection of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., and other eubacteria in ticks from the Thai-Myanmar border and Vietnam. *J Clin Microbiol*. Vol. 41, n.º 4, p. 1600-8.

Pennisi, M. G., Hartmann, K., Lloret, A., Addie, D., Belak, S., Boucraut-Baralon, C.,... Horzinek, M. C. (2013). Leishmaniosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg*. Vol. 15, n.º 7, p. 638-42.

Pennisi, M. G., La Camera, E., Giacobbe, L., Orlandella, B. M., Lentini, V., Zummo, S. & Fera, M. T. (2010). Molecular detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in clinical samples of pet cats from Southern Italy. *Res Vet Sci*. Vol. 88, n.º 3, p. 379-84.

Penzhorn, B.L. & Oosthuizen, M. C. (2020). *Babesia* Species of Domestic Cats: Molecular Characterization Has Opened Pandora's Box. *Front. Vet. Sci.* 7:134. doi: 10.3389/fvets.2020.00134.

Pereira, B.I., Seixas, D., Malcata, L., Serra, J.E., Oliveira, J., Cunha, S. & de Sousa, R. (2011). Infecção por *Rickettsia sibirica mongolitimonae* em Portugal. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas* Vol. 7, n.º 1, p. 35-38.

Pereira, A., Parreira, R., Nunes, M., Casadinho, A., Vieira, M. L., Campino, L. & Maia, C. (2016). Molecular detection of tick-borne bacteria and protozoa in cervids and wild boars from Portugal. *Parasites Vectors*. Vol. 9, n.º 251.

Pereira, A., Parreira, R., Cotão, A. J., Nunes, M., Vieira, M. L., Azevedo, F.,... Maia, C. (2018). Tick-borne bacteria and protozoa detected in ticks collected from domestic animals and wildlife in central and southern Portugal. *Ticks and Tick-borne Diseases*. Vol. 9, p. 225-234.

Perez, M., Bodor, M., Zhang, C., Xiong, Q. & Rikihisa, Y. (2006). Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Ann N Y Acad Sci*. Vol. 1078, n.º, p. 110-7.

Pinto, P. M. F. (2013). Prevalência da infecção por *Leishmania* spp. em gatos residentes no Concelho de Cascais. Tese de Mestrado integrado em Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Presley, R.H. & Macintire, D.K. (2005). Feline Bartonellosis. Vol. 7, n.º 2, p. 7-11. Acedido em 18 Janeiro 2014 em: <https://www.vetlearn.com/veterinarytechnician/bartonellainfectionanunderrecognized-threat>>.

Radolf, J. D., Caimano, M. J., Stevenson, B., & Hu, L. T. (2012). Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat Rev Microbiol*. Vol. 10, n.º 2, p. 87-99.

Radulovic, Z., Chochlakis, D., Tomanovic, S., Milutinovic, M., Tselentis, Y. & Psaroulaki, A. (2011). First detection of spotted fever group Rickettsiae in ticks in Serbia. *Vector borne and zoonotic diseases*. Vol. 11, n.º 2, p. 111-5.

Radzijeuskaja, J., Paulauskas, A., Rosef, O., Petkevicius, S., Mazeika, V. & Rekasius, T. (2013). The propensity of voles and mice to transmit *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection to feeding ticks. *Vet Parasitol*. Vol. 197, n.º 1-2, p. 318-25.

Ramos, C. P. G. (2012). A importância da infecção por *Leishmania* spp. e *Dirofilaria immitis* em gatos na região de Olhão. Dissertação de Mestrado integrado em Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária.

Ramos, R. A., Giannelli, A., Brianti, E., Annoscia, G., Cantacessi, C., Dantas-Torres, F. & Otranto, D. (2013a). Tick vectors of *Cercopithifilaria bainae* in dogs: *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato versus *Ixodes ricinus*. *Parasitol Res.* Vol. 112, n.º 8, p. 3013-7.

Ramos, R. A., Giannelli, A., Carbone, D., Baneth, G., Dantas-Torres, F. & Otranto, D. (2014a). Occurrence of *Hepatozoon canis* and *Cercopithifilaria bainae* in an off-host population of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks. *Ticks Tick Borne Dis.* Vol. 5, n.º 3, p. 311-4.

Ramos, R. A., Giannelli, A., Dantas-Torres, F., Mallia, E., Passantino, G., Lia, R. P.,... Otranto, D. (2013b). *Cercopithifilaria rugosicauda* (Spirurida, Onchocercidae) in a roe deer and ticks from southern Italy. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* Vol. 2, n.º, p. 292-6.

Ramos, R. A., Latrofa, M. S., Giannelli, A., Lacasella, V., Campbell, B. E., Dantas-Torres, F. & Otranto, D. (2014b). Detection of *Anaplasma platys* in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* group ticks by a quantitative real-time PCR. *Veterinary Parasitology.* Vol. 205, n.º 1-2, p. 285-8.

Ramos, R. A. N., Giannelli, A., Lia, R.P., Brianti, E., Tarallo, V., Breitshwerdt, E. B. & Otranto, D. (2014c). Incidence of *Cercopithifilaria bainae* in Dogs and Probability of Co-infection with Other Tick-Borne Pathogens. *PLoS ONE.* Vol. 9, n.º 2.

Rauter, C. & Hartung, T. (2005). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Appl Environ Microbiol.* Vol. 71, n.º 11, p. 7203-16.

Regnery, R. L., Spruill, C. L., Plikaytis, & B. D. (1991). Genotypic Identification of Rickettsiae and Estimation of Intraspecies Sequence Divergence for Portions of 2 Rickettsial Genes. *Journal of Bacteriology.* Vol. 173, n.º 5, p. 1576-1589.

- Reis, C., Cote, M., Le Rhun, D., Lecuelle, B., Levin, M. L., Vayssier-Taussat, M. & Bonnet, S. I. (2011). Vector competence of the tick *Ixodes ricinus* for transmission of *Bartonella birtlesii*. *PLoS Negl Trop Dis*. Vol. 5, n.º 5, p. e1186.
- René-Martellet, M., Lebert, I., Chene, J., Massot, R., Leon, M., Leal, A.,... Halos, L. (2015). Diagnosis and incidence risk of clinical canine monocytic ehrlichiosis under field conditions in Southern Europe. *Parasites & vectors*. Vol. 8, n.º 1, p. 3.
- Reye, A. L., Hubschen, J. M., Sausy, A., & Muller, C. P. (2010). Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. *Appl Environ Microbiol*. Vol. 76, n.º 9, p. 2923-31.
- Rich, S. M., Caporale, D. A., Telford, S. R., 3rd, Kocher, T. D., Hartl, D. L. & Spielman, A. (1995). Distribution of the *Ixodes ricinus*-like ticks of eastern North America. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol. 92, n.º 14, p. 6284-8.
- Romero, L. E., Meneses, A. I., Salazar, L., Jimenez, M., Romero, J. J., Aguiar, D. M.,... Dolz, G. (2011). First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Costa Rica, Central America. *Research in veterinary science*. Vol. 91, n.º 1, p. 95-7.
- Rosa, F., Crespo, M.V. & Almeida, J.P. (2010). Ixodídeos em cães do concelho de Óbidos. *XIV Congresso Ibérico de Entomologia*.
- Rosa, F., Crespo, M.V. & Nunes, M.C. (2012). Morfologia de *Rhipicephalus sanguineus* em cães de Óbitos e Santarém. *Congresso de Investigação e Desenvolvimento do Instituto Politécnico de Santarém (IPS), Unidade de Investigaçao do IPS (UIIPS)*. Vol. 54.
- Roura, X. (2006). Actualización de las enfermedades infecciosas caninas transmitidas por garrapatas. *Proceeding Simposio Bayer*.
- Rovero, C., Brouqui, P. & Raoult, D. (2008). Questions on Mediterranean spotted fever a century after its discovery. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 14, n.º 9, p. 1360-7.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L. & Jr, J. H. O. (2011). Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks Tick Borne Dis*. Vol. 2, n.º 3, p. 123-8.

Sainz, A., Roura, X., Miró, G., Estrada-Peña, A., Kohn, B., Harrus, S. & Solano-Gallego, L. (2015). Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasites & vectors*. Vol. 8, n.º, p. 75.

Sanogo, Y. O., Zeaiter, Z., Caruso, G., Merola, F., Shpynov, S., Brouqui, P. & Raoult, D. (2003). *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodida) removed from humans, Belluno province, Italy. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 9, n.º 3, p. 329-32.

Santos-Gomes, G. & Fonseca, I.P. (2009). Leishmaniose Canina. 2ª Edição. Lisboa: Chaves Ferreira - Publicações, S.A..

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

Santos-Silva, M. M., Santos, A. S., de Carvalho, I. L., de Sousa, R., Alves, M. J. & Nuncio, S. (2012). Relatório REVIVE 2012 - Ixodídeos: Rede de Vigilância de Vectores. Acedido em 20 Dezembro 2015 em: <http://hdl.handle.net/10400.18/2235>>.

Santos-Silva, M. M., Santos, A. S., de Carvalho, I. L., de Sousa, R., Milhano, N., Osório, H.,... Nuncio, M. S. (2013). Relatório REVIVE 2013 - Ixodídeos: Rede de Vigilância de Vectores. Acedido em 20 Dezembro 2015 em: <http://hdl.handle.net/10400.18/2233>>.

Santos-Silva, M. M., de Carvalho, I. L., Santos, A. S., de Sousa, R., Osório, H., Alves, M. J. & Nuncio, M. S. (2014). Relatório REVIVE 2014 - Ixodídeos: Rede de Vigilância de Vectores. Acedido em 20 Dezembro 2015 em: <http://hdl.handle.net/10400.18/3026>>.

Santos-Silva, M., Sousa, R., Santos, A. S., Lopes, D., Queijo, E., Doreta, A.,... Bacellar, F. (2006). Ticks and tick-borne *Rickettsiae* surveillance in Montesinho Natural Park, Portugal. *Ann N Y Acad Sci*. Vol. 1078, p. 137-42.

Santos, A. S., Santos-Silva, M. M., Almeida, V. C., Bacellar, F. & Dumler, J. S. (2004). Detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in *Ixodes* ticks (Acari: Ixodidae) from Madeira

Island and Setubal District, mainland Portugal. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 10, n.º 9, p. 1643-8.

Santos, A. S., Bacellar, F., & Dumler, J. S. (2006). Human exposure to *Anaplasma phagocytophilum* in Portugal. *Ann N Y Acad Sci*. Vol. 1078, nº 1, p. 100-5.

Santos, A. S., Bacellar, F. & Dumler, J. S. (2009a). A 4-year study of *Anaplasma phagocytophilum* in Portugal. *Clin Microbiol Infect*. Vol. 15 Suppl 2, p. 46-47.

Santos, A. S., Santos-Silva, M. M., Sousa, R., Bacellar, F. & Dumler, J. S. (2009b). PCR-based survey of *Anaplasma phagocytophilum* in Portuguese ticks (Acari: Ixodidae). *Vector Borne Zoonotic Dis*. Vol.9, nº1, p. 33-40.

Santos, A. S., Sousa, R., Alves, F., Proença, P., Nuncio, M. S., Dumler, J. S. & Bacellar, F. (2009c). Isolation of *Coxiella burnetii* from the blood of a patient with positive *Anaplasma phagocytophilum* serological results. *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 15, nº 2, p.192-193.

Santos, A. S., Alexandre, N., Sousa, R., Nuncio, M. S., Bacellar, F. & Dumler, J. S. (2009d). Serological and molecular survey of *Anaplasma* species infection in dogs with suspected tickborne disease in Portugal. *Vet Rec*. Vol. 164, nº 6, p. 168- 71.

Santos, A. S., Sousa, R., Carvalho, I., Osório, H., Alves, M. & Nuncio, S. (2020). Relatório REVIVE 2020 - Ixodídeos: Rede de Vigilância de Vetores. Acedido em 13 de Janeiro de 2024 em: <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/7711>.

Santos, H. A., Thomé, S. M., Baldani, C. D., Silva, C. B., Peixoto, M. P., Pires, M. S.,... Massard, C. (2013). Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. *Parasit Vectors*. Vol. 6, n.º 1, p. 348.

Santos, A. S., Santos-Silva, M. M. & Cunha, M. V. (2019). Carracas: riscos e medidas preventivas. Acedido em 30 de Junho de 2023 em: https://www.researchgate.net/publication/337919287_Carracas_riscos_e_medidas_preventivas.

Satta, G., Chisu, V., Cabras, P., Fois, F. & Masala, G. (2011). Pathogens and symbionts in ticks: a survey on tick species distribution and presence of tick-transmitted micro-organisms in Sardinia, Italy. *Journal of medical microbiology*. Vol. 60, n.º Pt 1, p. 63-8.

Schorn, S., Pfister, K., Reulen, H., Mahling, M. & Silaghi, C. (2011). Occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. *Parasit Vectors*. Vol. 4, n.º, p. 135.

Schwartz, I., Wormser, G. P., Schwartz, J. J., Cooper, D., Weissensee, P., Gazumyan, A.,... Pavia, C. S. (1992). Diagnosis of early Lyme disease by polymerase chain reaction amplification and culture of skin biopsies from erythema migrans lesions. *J Clin Microbiol*. Vol. 30, n.º 12, p. 3082-8.

Segura, F., Pons, I., Miret, J., Pla, J., Ortuno, A. & Nogueras, M. M. (2014). The role of cats in the eco-epidemiology of spotted fever group diseases. *Parasites & vectors*. Vol. 7, p. 353.

Shaw, S.E. (2008). Understanding transmission of infection by ticks and the new strategies for control. Proceedings of the 33rd WSAVA congress. Acedido em 21 Novembro 2015 em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2008/lecture21/174.pdf?ça=1>.

Silva, E. (2010). *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii* e *Anaplasma phagocytophilum*. Tese de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto.

Silva, M. M., Santos, A. S., Formisinhos, P. & Bacellar, F. (2006). Ticks associated to infectious pathologies in Portugal. *Acta Med Port*. Vol. 19, n.º 1, p. 39-48.

Silva, M. M. S. (2014). Artrópodes e roedores associados à transmissão de agentes infecciosos. Carraças. In: *Doenças associadas a artrópodes vectores e roedores*. Nuncio, M., Alves, M.Lisboa. Guide - Artes gráficas, Lda, p. (29-34).

Simões, P. B., Cardoso, L., Araujo, M., Yisaschar-Mekuzas, Y. & Baneth, G. (2011). Babesiosis due to the canine *Babesia microti*-like small piroplasm in dogs-first report from Portugal and possible vertical transmission. *Parasit Vectors*. Vol. 4, n.º, p. 50.

Small, L. & Morton, R. (2010). The Brown Dog Tick. Northern Territory Government. p. 1-5. [Consult. 10 de Fevereiro de 2015]. Disponível na internet: www.nt.gov.au/d/.

Smith, F. D. & Wall, L. E. (2013). Prevalence of *Babesia* and *Anaplasma* in ticks infesting dogs in Great Britain. *Vet Parasitol.* Vol. 198, n.º 1-2, p. 18-23.

Smrdel, K. S., Serdt, M., Duh, D., Knap, N. & Zupanc, T. A. (2010). *Anaplasma phagocytophilum* in ticks in Slovenia. *Parasit Vectors.* Vol. 3, n.º, p. 102.

Sociedade Portuguesa de Pediatria [SPP] (2005). Febre Escaro-Nodular. Vol. 36, n.º 5, p. 257-263.

Socolovschi, C., Bitam, I., Raoult, D. & Parola, P. (2009). Transmission of *Rickettsia conorii conorii* in naturally infected *Rhipicephalus sanguineus*. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* Vol. 15 Suppl 2, n.º, p. 319-21.

Socolovschi, C., Gaudart, J., Bitam, I., Huynh, T. P., Raoult, D. & Parola, P. (2012). Why are there so few *Rickettsia conorii conorii*-infected *Rhipicephalus sanguineus* ticks in the wild? *PLoS neglected tropical diseases.* Vol. 6, n.º 6, p. e1697.

Solano-Gallego, L. & Baneth, G. (2011a). Babesiosis in dogs and cats - expanding parasitological and clinical spectra. *Vet Parasitol.* Vol. 181, n.º 1, p. 48-60.

Solano-Gallego, L., Kidd, L., Trotta, M., Di Marco, M., Caldin, M., Furlanello, T. & Breitschwerdt, E. (2006). Febrile illness associated with *Rickettsia conorii* infection in dogs from Sicily. *Emerging Infectious Diseases.* Vol. 12, n.º 12, p. 1985-8.

Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L.,... Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* Vol. 165, n.º 1-2, p. 1-18.

Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L. & Baneth, G. (2011b). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors.* Vol. 4, p. 86.

Solinas, C., Varcasia, A., Brianti, E., Giannetto, S., Pipia, A. P., Columbano, N.,... Scala, A. (2014). *Cercopithifilaria* spp. in dogs in Sardinia Island (Italy). *Parasitol Res.* Vol. 113, n.º 2, p. 675-9.

de Sousa, R., Barata, C., Vitorino, L., Santos-Silva, M., Carrapato, C., Torgal, J.,... Bacellar, F. (2006). *Rickettsia sibirica* isolation from a patient and detection in ticks, Portugal. *Emerging Infectious Diseases.* Vol. 12, n.º 7, p. 1103-8.

Sousa, R., Carvalho, I., Pratas, E., Luz, T., Parreira, P., Gomes, M.,... Santos, A. (2021). Relatório REVIVE 2021 - Ixodídeos: Rede de Vigilância de Vetores. Acedido em 13 de Janeiro de 2024 em: <http://hdl.handle.net/10400.18/8004>.

Sousa, R. M. (2008). Mediterranean spotted fever and identification of new agents of rickettsioses in Portugal: epidemiological determinants, host and microbial features in portuguese patients. Tese de Doutoramento em Saúde Pública. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa.

Sousa, R., Nóbrega, S., Bacellar, F. & Torgal, J. (2003). Epidemiologic features of Mediterranean Spotted Fever in Portugal. *Acta Med Port.* Vol. 16, p. 429-436.

Spada, E., Proverbio, D., Migliazzo, A., APepa, A.D., Perego, R. & Giorgi, G.B. (2013). Serological and Molecular Evaluation of *Leishmania infantum* Infection in Stray Cats in a Nonendemic Area in Northern Italy. *International Scholarly Research Notices (ISRN) Parasitology*, p. 6.

Stuenkel, S., Granquist, E. G., & Silaghi, C. (2013). *Anaplasma phagocytophilum* - a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front Cell Infect Microbiol.* Vol. 3, n.º, p. 31.

Stutzer, B. & Hartmann, K. (2012). Chronic Bartonellosis in cats: what are the potential implications? *J Feline Med Surg.* Vol. 14, n.º 9, p. 612-21.

Taboada, J. & Lobetti, R. (2006). Babesiosis. In: C.E. Greene, Infectious diseases of dog and cat. St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier, p. (725-735).

- Tilly, K., Rosa, P. A., & Stewart, P. E. (2008). Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Dis Clin North Am*. Vol. 22, n.º 2, p. 217-34.
- Toledo, A., Olmeda, A. S., Escudero, R., Jado, I., Valcárcel, F., Casado-Nistal, M. A.,... Anda, P. (2009). Tick-borne zoonotic bacteria in ticks collected from central Spain. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. Vol. 81, n.º 1, p. 67-74.
- Trotta, M., Nicetto, M., Fogliazza, A., Montarsi, F., Caldin, M., Furlanello, T. & Solano-Gallego, L. (2012). Detection of *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, and rickettsiae in ticks removed from dogs living in Italy. *Ticks Tick Borne Dis*. Vol. 3, n.º 5-6, p. 294-7.
- Tsao, J. I. (2009). Reviewing molecular adaptations of Lyme borreliosis spirochetes in the context of reproductive fitness in natural transmission cycles. *Vet Res*. Vol. 40, n.º 2, p. 36.
- Ulutas, B., Bayramli, G., & Karagenc, T. (2007). First case of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* infections in a dog in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animals Sciences*. n.º 31, p. 279-282.
- Uni, S., Bain, O., Fujita, H., Matsubayashi, M., Fukuda, M. & Takaoka, H. (2013). Infective larvae of *Cercopithifilaria* spp. (Nematoda: Onchocercidae) from hard ticks (Ixodidae) recovered from the Japanese serow (Bovidae). *Parasite*. Vol. 20, n.º, p. 1.
- Vélez, J., Hidalgo, M., & González, J. (2012). Rickettsiosis: a deadly emerging and re-emerging disease in Colombia. *Universitas Scientiarum*. Vol. 17, n.º 1, p. 82-99.
- Venzal, J. M., Agustín, E. P., Castro, O., Souza, C. G., Portillo, A. & Oteo, J. A. (2007). Study on seasonal activity in dogs and ehrlichial infection in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) from Southern Uruguay. *Parasitologia Latinoamericana*. Vol. 62, n.º 1-2, p. 23-26.
- Vieira, R. F., Biondo, A. W., Guimaraes, A. M., dos Santos, A. P., dos Santos, R. P., Dutra, L. H.,... Vidotto, O. (2011). Ehrlichiosis in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*. Vol. 20, n.º 1, p. 1-12.

Vilcins, I. M., Ujvari, B., Old, J. M., & Deane, E. (2009). Molecular and morphological description of a *Hepatozoon* species in reptiles and their ticks in the Northern Territory, Australia. *The Journal of parasitology*. Vol. 95, n.º 2, p. 434-42.

Vilhena, H., Martinez-Diaz, V. L., Cardoso, L., Vieira, L., Altet, L., Francino, O.,... Silvestre-Ferreira, A. C. (2013). Feline vector-borne pathogens in the north and centre of Portugal. *Parasit Vectors*. Vol. 6, n.º, p. 99.

Vitale, G., Mansueto, S., Rolain, J. M. & Raoult, D. (2006). *Rickettsia massiliae* Human Isolation. Vol. 12, n.º 1, p. 174-175. Acedido em 4 Janeiro 2014 em: <http://dx.doi.org/10.3201/eis1201.050850>>.

Voordouw, M. J. (2015). Co-feeding transmission in Lyme disease pathogens. *Parasitology*. Vol. 142, n.º 2, p. 290-302.

Welc-Faleciak, R., Werszko, J., Cydzik, K., Bajer, A., Michalik, J. & Behnke, J. M. (2013). Co-infection and genetic diversity of tick-borne pathogens in roe deer from Poland. *Vector Borne Zoonotic Dis*. Vol. 13, n.º 5, p. 277-88.

Wodecka, B., Leonska, A. & Skotarczak, B. (2010). A comparative analysis of molecular markers for the detection and identification of *Borrelia* spirochaetes in *Ixodes ricinus*. *Journal of medical microbiology*. Vol. 59, n.º Pt 3, p. 309-14.

World Health Organization [WHO] (2006). Pesticides and their application for the control of vectors and pets of public health importance, sixth edition. Acedido em 25 Fevereiro 2015 em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/who_cds_ntd_whopes_gcdpp_2006.1_eng.pdf>.

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*. Vol. 191, n.º 3-4, p. 367-73.