

BRUNO FILIPE MARTINHO ALMEIDA

**DETEÇÃO MOLECULAR DE PROTOZOÁRIOS E
BACTÉRIAS TRANSMITIDOS POR ARTRÓPODES
VETORES EM CÃES DO SUL DE PORTUGAL**

Orientadora: Professora Doutora Carla Maia

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2015

BRUNO FILIPE MARTINHO ALMEIDA

**DETEÇÃO MOLECULAR DE PROTOZOÁRIOS E
BACTÉRIAS TRANSMITIDOS POR ARTRÓPODES
VETORES EM CÃES DO SUL DE PORTUGAL**

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

Membros do Júri

Presidente: Professora Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Professor Doutor Luís Cardoso

Orientadora: Professora Doutora Carla Maia

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2015

Agradecimentos

À Professora Doutora Carla Maia pela sua orientação, total apoio, disponibilidade, saber que transmitiu, opiniões, críticas e colaboração no solucionar de dúvidas que foram surgindo ao longo da elaboração deste trabalho.

À Professora Doutora Lenea Campino, diretora do grupo de leishmanioses do IHMT, e à restante equipa, destacando o Mestre José Cristóvão e a Mestre Cláudia Ramos pela ajuda em toda a parte prática deste estudo.

Ao grupo leptospirose e borreliose de Lyme do IHMT.

Aos médicos veterinários que participaram no projeto, pela disponibilidade para a recolha de amostras e preenchimento dos inquéritos.

Às equipas do Hospital Veterinário Montenegro e do laboratório INNO, pela transmissão de conhecimentos durante os estágios.

E a toda a minha família e amigos pelo apoio e palavras de incentivo durante os últimos seis anos.

Os resultados incluídos na presente Dissertação foram publicados na revista internacional com arbitragem científica *Parasites and Vectors*: Maia C., **Almeida B.**, Coimbra M., Fernandes MC., Cistovão JM., Ramos C., Martins Â., Martinho F., Silva P., Neves N., Nunes., Vieira ML., Cardoso L., Campino L. 2015. Bacterial and protozoal agents of canine vector-borne diseases in the blood of domestic and stray dogs from southern Portugal, e fazem parte do livro de resumos do X *International Symposium on Vector-Born Diseases*, que teve lugar em Barcelona, de 23 a 25 de Março de 2015.

Resumo

As doenças caninas transmitidas por artrópodes vetores são causadas por vários agentes como bactérias ou parasitas que podem ser transmitidas por carrças, pulgas, mosquitos ou flebótomos. A prevalência de muitas destas doenças, algumas com potencial zoonótico, está a aumentar na Europa.

O presente trabalho teve como objetivo geral determinar a prevalência das infeções por *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Ehrlichia* spp., *Hepatozoon* spp. e *Leishmania infantum* em amostras de sangue de cão através da técnica de reação em cadeia da polimerase. A área de estudo foi o sul de Portugal, com predominância para a região de Setúbal, Lisboa e Algarve. Como objetivos específicos pretendeu-se relacionar a presença dos agentes com vários fatores intrínsecos (idade, sexo e raça) e extrínsecos (modo de vida, desparasitação externa e viagens). Para tal, foi estudada uma amostra de 1.010 cães que se apresentaram em Centros de Atendimento Médico-Veterinários ou que viviam em abrigos.

Na amostra em estudo obteve-se uma prevalência de 6,7% para um ou mais agentes patogénicos, nomeadamente: 1,9% de infeção por *Anaplasma* spp./ *Ehrlichia* spp., 0,8% de infeção por *Borrelia burgdorferi* sensu lato, 3,1% de infeção por *Hepatozoon* spp. e 1,1% de infeção por *Leishmania infantum*. *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* s. l. e *H. canis* foram os agentes identificados após sequenciação, incluindo uma coinfeção por *A. platys* e *H. canis*. Não se detetou a presença de ADN de *Bartonella* spp. ou de *Babesia* spp. em nenhuma das amostras de sangue testadas.

Este estudo realça a importância de se adotarem medidas profiláticas contra ectoparasitas, de modo a prevenir infeções por agentes patogénicos transmitidos por artrópodes vetores e assim levar a uma diminuição do seu potencial de transmissão a outros animais e humanos. Neste estudo também se verificou que os animais residentes na região do Algarve se encontram mais predispostos a infeções transmitidas por vetores que os animais das demais regiões estudadas.

Palavras-chave: cães, doenças transmitidas por artrópodes vetores, PCR, prevalência, sul de Portugal

Abstract

Canine vector-borne diseases (CVBD) are caused by a range of pathogens such as bacteria or parasites transmitted by arthropods, including ticks, fleas, mosquitoes and phlebotomine sand flies. The prevalence of many of these diseases, some of them of zoonotic concern, is increasing throughout Europe.

This study aimed to determine the prevalence of *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Ehrlichia* spp., *Hepatozoon* spp., and *Leishmania infantum* by polymerase chain reaction in blood samples from dogs living in the south of Portugal, mostly in the Setubal, Lisbon and Algarve regions and to correlate the presence of the studied agents with intrinsic (age, gender and breed) and extrinsic (lifestyle and administration of ectoparasitocides) factors. To this purpose, 1010 dogs from veterinary medical centers and animal shelters were screened.

Sixty nine out of 1010 (6.7%) dogs were PCR-positive to at least one of the tested genera or complex of CVBD agents, 1.9% to *Anaplasma* spp./*Ehrlichia* spp., 0.8% to *Borrelia burgdorferi* sensu lato, 3.1% to *Hepatozoon* spp. and 1.1% to *Leishmania infantum*. *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* s. l. and *Hepatozoon canis* were identified by DNA sequencing, including one animal co-infected with both *A. platys* and *H. canis*. None of the tested dogs was positive by PCR for *Bartonella* spp. or *Babesia* spp.

This study highlights the importance of adopting prophylactic measures against ectoparasites in order to prevent infection of dogs with vector-borne pathogens, and therefore, leading to a decrease in its potential transmission to other animals and humans. This study also found out that the dogs from the Algarve region were more predisposed to vector-borne infections than animals from the other studied regions.

Keywords: dogs, PCR, prevalence, South of Portugal vector-borne diseases.

Abreviaturas, siglas e símbolos

Abreviaturas, Siglas e Símbolos

% – Percentagem

°C – Graus Celsius

® - Marca registada

β – Beta

μg – Micrograma

μl – Microlitro

μm – Micrómetro

A – Adenina

A. phagocytophilum – *Anaplasma phagocytophilum*

A. platys – *Anaplasma platys*

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AGC – Anaplasmosse Granulocítica Canina

ASP – Antígenos solúveis do parasita

ATC – Anaplasmosse Trombocítica Canina

B. burgdorferi s.l. – *Borrelia burgdorferi* sensu lato

B. canis – *Babesia canis*

B. clarridgeiae – *Bartonella clarridgeiae*

B. divergens – *Babesia divergens*

B. gibsoni – *Babesia gibsoni*

B. henselae – *Bartonella henselae*

B. microti – *Babesia microti*

B. rossi – *Babesia rossi*

BID – “Bis in die” (Duas vezes ao dia)

C – Citosina

CD – Células densas tubulares

CR – Células reticulares

DDBJ – Base de dados de ADN do Japão

DTAV – Doenças transmitidas por artrópodes vetores

E. canis – *Ehrlichia canis*

E.U.A – Estados Unidos da América

ELISA – “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”

EMH – Erliquiose Monocítica Humana

EV – Endovenosa

G – Guanina

H. americanum – *Hepatozoon americanum*

H. canis – *Hepatozoon canis*

I. ricinus – *Ixodes ricinus*

I. ventalloi – *Ixodes ventalloi*

IC – Intervalo de Confiança

IFI – Imunofluorescência indireta

IFN- γ - Interferão gama

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IL-2 – Interleucina 2

IM – Intramuscular

Kg - Kilograma

L. amazonensis – *Leishmania amazonensis*

L. braziliensis – *Leishmania braziliensis*

L. chagasi – *Leishmania chagasi*

L. donovani – *Leishmania donovani*

L. infantum – *Leishmania infantum*

L. tropica – *Leishmania tropica*

LC – Leishmaniose cutânea

LV – Leishmaniose visceral

MA - Miliampere

Mg – Miligrama

Min. – Minutos

ml – Mililitro

mm – Milímetro

MV – Médico Veterinário

NK – Células exterminadoras naturais

Osp A – Proteína de superfície A

Osp C – Proteína de superfície C

P. ariasi – *Phlebotomus ariasi*

P. perniciosus – *Phlebotomus perniciosus*

Pb – Par de Bases

PCR – “Polymerase Chain Reaction” (Reacção em cadeia da polimerase)

PO – “Per os” (Por via oral)

R. sanguineus s.l. – *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato

RML – Região metropolitana de Lisboa

SC – Subcutâneo

Seg. – Segundos

SID – “Semel in die” (Uma vez ao dia)

SNC – Sistema Nervoso Central

T – Taurina

Th – Linfócitos T auxiliares

TNF- α – Fator necrótico tumoral α

UI – Unidade internacionais

V - Voltes

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

VVN – Valor preditivo negativo

VVP – Valor preditivo positivo

Índice Geral

Agradecimentos	2
Abreviaturas, siglas e símbolos	6
Índice de Tabelas	12
Índice de Figuras	13
1. Introdução	15
1.1. Doenças causadas por bactérias	16
1.1.1. <i>Anaplasma</i> spp.	16
1.1.1.1. Ciclo de vida	17
1.1.1.2. Patogenia e sinais clínicos	19
1.1.1.3. Epidemiologia	20
1.1.1.4. Diagnóstico	21
1.1.1.5. Tratamento	22
1.1.1.6. Saúde Pública	23
1.1.2. <i>Bartonella</i> spp.	23
1.1.2.1. Ciclo de vida	23
1.1.2.2. Patogenia e sinais clínicos	25
1.1.2.3. Epidemiologia	26
1.1.2.4. Diagnóstico	27
1.1.2.5. Tratamento	29
1.1.2.6. Saúde Pública	30
1.1.3. <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	31
1.1.3.1. Ciclo de vida	31
1.1.3.2. Patogenia e sinais clínicos	33
1.1.3.3. Epidemiologia	34
1.1.3.4. Diagnóstico	35
1.1.3.5. Tratamento	36
1.1.3.6. Saúde Pública	36
1.1.4. <i>Ehrlichia</i> spp.	37
1.1.4.1. Ciclo de vida	37
1.1.4.2. Patogenia e sinais clínicos	38
1.1.4.3. Epidemiologia	40
1.1.4.4. Diagnóstico	41
1.1.4.5. Tratamento	42

1.1.4.6. Saúde Pública	43
1.2. Doenças transmitidas por protozoários.....	43
1.2.1. <i>Babesia</i> spp.	43
1.2.1.1. Ciclo de vida	44
1.2.1.2. Patogenia e sinais clínicos.....	45
1.2.1.3. Epidemiologia.....	46
1.2.1.4. Diagnóstico	47
1.2.1.5. Tratamento	49
1.2.1.6. Saúde Pública	49
1.2.2. <i>Hepatozoon</i> spp.....	50
1.2.2.1. Ciclo de vida	50
1.2.2.2. Patogenia e sinais clínicos.....	51
1.2.2.3. Epidemiologia.....	52
1.2.2.4. Diagnóstico	53
1.2.2.5. Tratamento	54
1.2.2.6. Saúde Pública	54
1.2.3. <i>Leishmania infantum</i>	54
1.2.3.1. Ciclo de vida	55
1.2.3.2. Patogenia e sinais clínicos.....	57
1.2.3.3. Epidemiologia.....	59
1.2.3.4. Diagnóstico	60
1.2.3.5. Tratamento	62
1.2.3.6. Saúde Pública	63
1.3. Medidas profiláticas.....	63
2. Objetivos	65
3. Material e Métodos.....	65
3.1. Área geográfica do estudo	66
3.2. Caracterização da amostra.....	66
3.3. Critérios de inclusão	67
4. Protocolo	67
4.1. Colheita e processamento de amostras de sangue periférico	67
4.2. Pesquisa de ADN de <i>Anaplasma</i> spp./ <i>Ehrlichia</i> spp., <i>Babesia</i> spp., <i>Bartonella</i> spp., <i>Borrelia burgdorferi</i> s. l., <i>Hepatozoon</i> spp. e <i>Leishmania infantum</i>	67
4.2.1. Extração de ADN a partir de papel de filtro impregnado com sangue periférico	68
4.2.2. Pesquisa de ADN de <i>Babesia</i> spp.....	69
4.2.3. Pesquisa de ADN de <i>Bartonella</i> spp.....	69

4.2.4. Pesquisa de ADN do complexo <i>Borrelia burgdorferi</i> s. l.	70
4.2.5. Pesquisa de ADN de <i>Ehrlichia</i> spp./ <i>Anaplasma</i> spp.....	71
4.2.6. Pesquisa de ADN de <i>Hepatozoon</i> spp.	71
4.2.7. Pesquisa de ADN de <i>Leishmania infantum</i>	72
4.3. Sequenciação e análise dos segmentos de ADN purificados	72
5. Análise estatística	73
6. Resultados	73
6.1. Resultados da pesquisa de ADN de <i>Babesia</i> spp., <i>Bartonella</i> spp., <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l., <i>Anaplasma</i> spp./ <i>Ehrlichia</i> spp., <i>Hepatozoon</i> spp. e <i>L. infantum</i> através da técnica de PCR ..	75
6.2. <i>Anaplasma</i> spp. e <i>Ehrlichia</i> spp.....	76
6.3. <i>Borrelia burgdorferi</i> s. l.	78
6.5. <i>Hepatozoon</i> spp.....	79
6.6. <i>Leishmania infantum</i>	80
6.8. Coinfeção.....	81
7. Discussão	81
7.1. <i>Anaplasma</i> spp.	82
7.2. <i>Bartonella</i> spp.	83
7.3. <i>Borrelia burgdorferi</i> s. l.	84
7.4. <i>Ehrlichia</i> spp.....	84
7.5. <i>Babesia</i> spp.....	85
7.6. <i>Hepatozoon</i> spp.....	85
7.7. <i>Leishmania infantum</i>	86
7.8. Coinfeção.....	86
8. Conclusão	87
9. Bibliografia	88

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Número de amostras positivas por PCR a pelo menos um agente em estudo por mês	76
Tabela 2 – Resultados estatísticos obtidos a partir do teste de Mann-Whitney e teste Exato de Fisher das variáveis intrínsecas e extrínsecas com a presença de infecção por <i>Anaplasma</i> spp., p = índice de significância ($p < 0,05$)	77
Tabela 3 – Resultados estatísticos obtidos a partir do teste de Mann-Whitney e teste Exato de Fisher das variáveis intrínsecas e extrínsecas com a presença de infecção por <i>Ehrlichia</i> spp., p = índice de significância ($p < 0,05$)	78
Tabela 4 – Resultados estatísticos obtidos a partir do teste de Mann-Whitney e teste Exato de Fisher das variáveis intrínsecas e extrínsecas com a presença de infecção por <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l., p = índice de significância ($p < 0,05$)	79
Tabela 5 – Resultados estatísticos obtidos a partir do teste de Mann-Whitney e teste Exato de Fisher das variáveis intrínsecas e extrínsecas com a presença de infecção por <i>Hepatozoon</i> spp., p = índice de significância ($p < 0,05$)	80
Tabela 6 – Resultados estatísticos obtidos a partir do teste de Mann-Whitney e teste Exato de Fisher das variáveis intrínsecas e extrínsecas com a presença de infecção por <i>Leishmania infantum</i> , p = índice de significância ($p < 0,05$)	80

Índice de Figuras

Figura 1 – Granulócito infetado com mórulas (seta) de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> num esfregaço sanguíneo periférico de cão corado com Diff-quick	16
Figura 2 – <i>Ixodes ricinus</i> , um dos principais vetores de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> na Europa	18
Figura 3 – Duas plaquetas infetadas (setas) com mórulas de <i>Anaplasma platys</i> num esfregaço sanguíneo de cão corado com Diff-quick	21
Figura 4 – Ciclo de vida de <i>Bartonella</i> spp.	25
Figura 5 – Eosinofilia (setas) visualizado num esfregaço sanguíneo de cão corado com Diff-quick	27
Figura 6 – Ciclo de vida de <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	32
Figura 7 – <i>Rhipicephalus sanguineus</i> macho à direita e fêmea à esquerda	37
Figura 8 – Cão com hifema	40
Figura 9 – Vários eritrócitos infetados com merozoitos (setas) de <i>Babesia canis</i> num esfregaço sanguíneo de cão corado com Diff-quick	45
Figura 10 – Dois pares de merozoitos (seta) de <i>Babesia canis</i> no citoplasma de um eritrócito num esfregaço sanguíneo de cão corado com Diff-quick	48
Figura 11 – Neutrófilo infetado por <i>Hepatozoon</i> spp. (seta) em forma de gamonte, num esfregaço sanguíneo de cão corado com Diff-quick	53
Figura 12 – Diferenciação entre macho à esquerda e fêmea à direita do género <i>Phlebotomus</i>	55
Figura 13 – Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> sp. (seta) num esfregaço sanguíneo de cão corado com Diff-quick	60
Figura 14 – Papel de filtro impregnado com sangue de cão	68
Figura 15 – Caracterização da amostra quanto à região (n=1010)	74
Figura 16 – Caracterização da amostra quanto ao estilo de vida (n= 852)	74

Figura 17 – Distribuição das recolhas de amostras por meses do ano (n= 1000)	74
Figura 18 – Caracterização da amostra quanto aos sinais clínicos mais frequentemente reportados (n= 206)	75
Figura 19 – Electroforese em gel de agarose com os resultados da amplificação de <i>Anaplasma</i> spp./ <i>Ehrlichia</i> spp.	77
Figura 20 – Electroforese em gel de agarose com os resultados da amplificação de <i>Hepatozoon</i> spp.	79

1. Introdução

As doenças transmitidas por artrópodes vetores (DTAV) (carraças, flebótomos, mosquitos ou pulgas) são causadas por parasitas, bactérias e vírus (Mencke, 2013; Maia *et al.*, 2014a; 2014b). Nos últimos anos tem-se verificado a emergência de muitos destes agentes patogénicos, alguns com potencial zoonótico, representando um problema não só a nível de saúde animal mas também de saúde pública (Dantas-Torres & Otranto, 2014).

Os principais fatores responsáveis pelo aumento das DTAV são: as alterações climáticas, as quais têm um impacto direto nas populações de artrópodes; o aumento da mobilidade do homem e dos animais domésticos para novos destinos, anteriormente mais isolados; a criação de parques e zonas de convívio dentro de centros urbanos e ainda o aumento da prática de atividades ao ar livre, promovendo o contacto com vetores (Beugnet & Marié, 2009; Harrus & Waner, 2011a; Vilhena *et al.*, 2013).

A complexidade de diagnóstico destas infeções torna a tarefa do médico veterinário muito difícil, porque para além dos sinais clínicos serem na maioria dos casos inespecíficos ou inexistentes, os resultados dos meios de diagnóstico têm de ser interpretados com precaução (Solano-Gallego *et al.*, 2009; de Caprariis *et al.*, 2011; Vilhena *et al.*, 2013; Maggi *et al.*, 2014), uma vez que, os agentes patogénicos com tropismo hemático persistem durante longos períodos de tempo no sangue, embora na sua maioria apareçam em número reduzido, dificultando a visualização em exames diretos. Por outro lado, a produção de anticorpos detetada através de técnicas serológicas, pode apenas indicar que o animal esteve exposto ao agente (de Caprariis *et al.*, 2011), pelo que, o desenvolvimento de técnicas moleculares nas últimas décadas permitiu aumentar a deteção e caracterização de agentes patogénicos emergentes transmitidos por vetores (Harrus *et al.*, 2011b).

De facto, a identificação dos agentes transmitidos por artrópodes é requerida para uma melhor abordagem e manejo clínico de canídeos com sinais clínicos e para avaliar o seu papel como portador e transmissor da infeção (Tabar *et al.*, 2009).

Para prevenir e controlar as DTAV são necessárias várias medidas, tais como vacinação, desparasitação externa regular, diminuição da exposição dos cães aos vetores e o tratamento dos animais infetados de forma a reduzir o risco de transmissão a novos vetores (Baum *et al.*, 2014; Bradley *et al.*, 2014; Foroughi-Parvar & Hatam, 2014). Contudo, a presença de animais domésticos em contacto com seres humanos só é um risco para a saúde pública se não forem

tomadas as precauções necessárias para evitar o contacto dos humanos com os vetores, pelo que, é fundamental informar os proprietários como prevenir as DTAV nos seus animais de companhia (Guptill, 2010; Dantas-Torres *et al.*, 2012; Lopez *et al.*, 2013; Mencke, 2013).

1.1. Doenças causadas por bactérias

1.1.1. *Anaplasma* spp.

As bactérias do género *Anaplasma*, pertencentes à ordem Rickettsiales e família Anaplasmataceae são bactérias gram-negativas, cocóides, não móveis, intracelulares obrigatórias, aeróbias e pleomórficas, diferenciando-se de outras bactérias gram-negativas pela ausência de parede celular (Carrade, *et al.*, 2009; Jahfari *et al.*, 2014; Ramos *et al.*, 2014). Estas bactérias têm entre 0,2 e 2 µm podendo apresentar-se de duas formas: células reticuladas (CR) com o nucléolo ligeiramente comprimido e disperso que se ligam à célula do hospedeiro; ou células densas tubulares (CD) com o protoplasma intracelular condensado e denso (Popov *et al.*, 2007; Alexandre *et al.*, 2009). As bactérias deste género podem ser encontradas em forma de mórulas dentro de vacúolos no citoplasma de células hematopoiéticas maduras e imaturas, de hospedeiros mamíferos (fig.1) (Ulutaş *et al.*, 2007; Carrade *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2013).

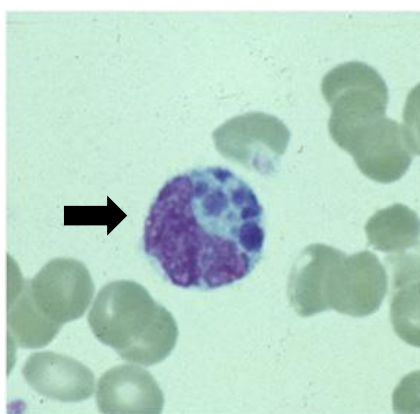


Figura 1 – Granulócito infetado com mórulas (seta) de *Anaplasma phagocytophilum* num esfregaço de sangue periférico de cão corado com Diff-quick (1000x , CDC, 2015, <http://www.cdc.gov/>)

A espécie *A. phagocytophilum* é responsável pela anaplasmoze granulocítica em seres humanos (AGH) (Santos *et al.*, 2006; Jahfari *et al.*, 2014) e animais domésticos (Eberts *et al.*, 2011; Brown, 2013). A anaplasmoze granulocítica canina (AGC) causada por *A. phagocytophilum* foi descrita pela primeira vez por Madewell e Gribble em 1982 nos EUA (Rejmanek *et al.*, 2012). Até ao ano de 2001 (Smith & Wall, 2013; Sainz *et al.*, 2015), esta

espécie era denominada *Ehrlichia phagocytophila* (em bovinos, cabras e ovelhas), *Ehrlichia equi* (em equinos) e agente da “Erlíquiose granulocítica humana” (Smith & Wall, 2013). Com a reclassificação taxonômica estes três agentes passaram a fazer parte de uma única espécie (Eberts *et al.*, 2011; Sainz *et al.*, 2015).

Das duas espécies mais conhecidas nos canídeos, *A. phagocytophilum* infeta granulócitos com maior tropismo para os neutrófilos (Santos *et al.*, 2013; Jahfari *et al.*, 2014), sendo rara em eosinófilos, enquanto a espécie *A. platys* infeta plaquetas (Ulutaş *et al.*, 2007; Cardoso *et al.*, 2010; Sainz *et al.*, 2015). A transmissão de ambas ocorre através da picada de ixodídeos (Eberts *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2013; Smith & Wall, 2013; Maia *et al.*, 2014b; Ostfeld *et al.*, 2014).

1.1.1.1. Ciclo de vida

O ciclo de vida do género *Anaplasma* inclui dois hospedeiros, um invertebrado (carraças da família Ixodidae) e um vertebrado (Dantas-Torres, 2010), sendo que, o ser humano e o cão são considerados hospedeiros acidentais (Smith & Wall, 2013; Berzina *et al.*, 2014; Sainz *et al.*, 2015).

Segundo Ostfeld *et al.* (2014), os roedores e os veados são considerados reservatórios naturais de *A. phagocytophilum*. Já Heikkilä *et al.* (2010) também consideram as aves migratórias como reservatórios, responsáveis pelo aumento da propagação e distribuição da infeção.

As carrças do género *Ixodes* (fig.2) alimentam-se de três hospedeiros (Welc-Falęciak *et al.*, 2014; Mierzejewska *et al.*, 2015), ou seja, em cada estágio de desenvolvimento alimentam-se de diferentes hospedeiros, transmitindo a bactéria transestadialmente (de um estágio para o outro) (Dantas-Torres, 2010; Ramos *et al.*, 2014). A transmissão transovárica (da fêmea infetada para os ovos) ainda não é consensual (Jahfari *et al.*, 2014). Na Europa, a espécie *I. ricinus* é considerada a principal vetor de *A. phagocytophilum* (Santos *et al.*, 2006; Dantas-Torres *et al.*, 2012).



Figura 2 – *Ixodes ricinus*, um dos principais vetores de *Anaplasma phagocytophilum* na Europa (ECDC, 2015, <http://ecdc.europa.eu/en/Pages/home.aspx>)

A multiplicação da bactéria ocorre nas glândulas salivares da carraça (Ramos *et al.*, 2014; Sainz *et al.*, 2015), sendo depois transmitida durante a refeição sanguínea para o vertebrado. Após a picada do vetor são necessárias entre 36 e 48 horas de ligação ao hospedeiro para que as bactérias penetrem na pele e se propaguem através do sangue e da linfa (Carrade *et al.*, 2009; Baneth, 2012; Bastos, 2013), sendo o período de incubação de uma a duas semanas (Carrade *et al.*, 2009; Sainz *et al.*, 2015). Posteriormente, ligam-se aos neutrófilos por uma molécula membranar de superfície, a P-selectina, que funciona como recetor da bactéria (Brown, 2013).

A sobrevivência e multiplicação do agente só são possíveis porque as espécies do género *Anaplasma* entram por endocitose para o interior dos fagossomas citoplasmáticos, onde impedem a fusão lisossoma-fagossoma evitando a apoptose celular (Carrade *et al.*, 2009; Otranto *et al.*, 2009; Brown, 2013).

No interior de vacúolos da célula do hospedeiro vertebrado, a bactéria multiplica-se por divisão binária (ESCCAP, 2012; Baneth, 2012), formando múltiplos organismos que podem ser classificados em dois tipos de células: células reticuladas e células densas tubulares, que em conjunto constituem mórulas (Baneth, 2012; Allison & Little, 2013). O aumento de tamanho e número destes organismos faz com que haja a rutura da célula, permitindo a disseminação das bactérias para novas células hospedeiras (Baneth, 2012).

As células infetadas no hospedeiro vertebrado podem ser encontradas no sangue periférico e em tecidos do sistema mononuclear fagocítico, tais como o baço, o fígado e a medula óssea (Carrade *et al.*, 2009; Baneth, 2012; Berzina *et al.*, 2014).

Um novo ciclo recomeça quando uma carraça saudável é infetada durante a sua alimentação sanguínea num hospedeiro vertebrado infetado (ESCCAP, 2012; Baneth, 2012).

O ciclo de vida de *A. platys* é muito semelhante ao da espécie *A. phagocytophilum*, diferindo apenas no vetor, que se suspeita ser *R. sanguineus* sensu lato (s.l.) (Ramos *et al.*, 2014) e nas células alvo, que neste caso são as plaquetas, não sendo conhecida a molécula que funciona como recetor da bactéria nas células (Andersson *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2014).

As duas espécies podem ser transmitidas entre vertebrados através de materiais contaminados com sangue (Annen *et al.*, 2012).

1.1.1.2. Patogenia e sinais clínicos

O género *Anaplasma* é responsável por duas doenças em canídeos, a AGC causada por *A. phagocytophilum* (Carrade *et al.*, 2009; Eberts *et al.*, 2011; Vieira *et al.*, 2013) e a anaplasmose trombocítica canina (ATC) causada por *A. platys* (Baneth, 2012; Beugnet & Chalvet-Monfray, 2013; Gaito *et al.*, 2014).

A AGC caracteriza-se pela supressão da produção de citocinas, formação de auto-anticorpos e invasão de células precursoras da hematopoiese. A imunossupressão causada por este tipo de infeção permite a entrada de agentes oportunistas, que vão definir qual a sintomatologia mais evidente (Carrade *et al.*, 2009; Baneth, 2012; Brown, 2013).

Os sinais clínicos começam após o período de incubação com letargia, anorexia, pirexia, esplenomegália, hepatomegália e linfadenopatia (Eberts *et al.*, 2011; Kelly *et al.*, 2013; Otranto *et al.*, 2013). Também se encontram descritas alterações do sistema musculo-esquelético, respiratório, gastrointestinal e nervoso (Eberts *et al.*, 2011; Sainz *et al.*, 2015), assim como lesões cutâneas (Berzina *et al.* 2014),

Suspeita-se que o mecanismo subjacente a estes distúrbios envolva processos de imunomodulação, associados à persistência do agente no hospedeiro, embora em cães a doença pareça exibir um carácter auto-limitante (Carrade *et al.*, 2009; Baneth, 2012). Na verdade, apesar do vasto número de cães expostos ao agente em regiões endémicas, não estão descritos casos fatais por AGC (Santos *et al.*, 2006; Carrade *et al.*, 2009; Baneth, 2012;).

As infeções por *A. platys* nos cães são normalmente assintomáticas (Andersson *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2014). Contudo, a trombocitopenia é o achado mais frequente e parece acompanhar a bacteriemia num padrão cíclico (Cardoso, *et al.*, 2010b; Andersson *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2014). Inicialmente, esta trombocitopenia surge como consequência direta das alterações nas plaquetas pela bactéria em multiplicação enquanto já numa fase posterior, há um período de silêncio clínico com alterações hematológicas leves ou ausentes, que é agravado por

novos episódios de trombocitopénia aparentemente imuno-mediada, por vezes tão severa quanto o episódio inicial. A nível sistémico, a infeção é acompanhada por sinais inespecíficos como anorexia, depressão, linfadenopatia, anemia, pirexia, uveíte e pancitopénia (Andersson *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2014; Sainz *et al.*, 2015).

1.1.1.3. Epidemiologia

Um pouco por toda a Europa tem crescido o número de estudos sobre este género com o objetivo de conhecer melhor a sua patogenia e epidemiologia. Na Sérvia, Savi *et al.* (2014) verificaram um aumento de 10% de canídeos positivos para anaplasmosse por serologia entre 2009 e 2013. Em Itália, Ramos *et al.* (2014) pesquisaram a presença de *A. platys* em 267 *R. sanguineus* s.l. e 34 canídeos, tendo detetado através da técnica de PCR em tempo real o ADN da bactéria em 48,3% (129/267) das carraças e em 52,9% (18/34) dos cães testados.

Noutros estudos realizados na Europa (Eslováquia, Espanha e Finlândia), a seroprevalência de *Anaplasma* spp. variou entre 5,3% (18/340) em cães errantes do norte da Finlândia (Vera *et al.*, 2014) e 3,75% (116/3094) em cães da Polónia (Krämer *et al.*, 2014). Por outro lado, a deteção de ADN de *A. platys* foi de 19,0% (25/120) em cães errantes de Espanha (Couto *et al.*, 2010).

Em Portugal, Santos *et al.* (2009) detetaram a presença de imunoglobulinas (IgG) específicas para *A. phagocytophilum* em 54,5% (30/55) dos cães com suspeita de doença transmitida por carraças. No mesmo estudo estes autores detetaram ADN deste agente em 4,8% (9/186) das carraças testadas e anticorpos anti-*Anaplasma* em 3,8% (7/194) dos ratos, em 3% (9/302) dos cavalos e em 3,9% (31/792) dos humanos testados. No estudo realizado no norte do país por Cardoso *et al.* (2010b), os autores verificaram que em quatro cães com suspeita de erliquiose, três foram positivos por PCR para *A. platys*. Na mesma região do país Ribeiro *et al.* (2013) detetaram 13,0% (21/167) de cavalos seropositivos para esta bactéria. Alves *et al.* (2009) realizaram um estudo em 51 gatos residentes na região de Lisboa e Évora onde se obteve uma seroprevalência para *A. phagocytophilum* de 13,5%. Mais recentemente, Vilhena *et al.* (2013) e Maia *et al.* (2014b) amplificaram ADN de *Anaplasma* spp./ *Ehrlichia* spp. em dois gatos domésticos provenientes do norte e centro de Portugal e em 35 gatos do sul do país, respetivamente.

A presença de ADN de *A. phagocytophilum* e *A. platys* em *R. sanguineus* s.l. foi também reportada em carraças capturadas nos distritos da Guarda e Faro (Maia *et al.*, 2014b).

1.1.1.4. Diagnóstico

O exame diagnóstico mais direto e acessível para identificar as inclusões basofílicas de pequenos organismos isolados ou em mórulas de maiores dimensões (Santos *et al.*, 2013) envoltos em vacúolos (fig. 3) é o esfregaço sanguíneo (Carrade *et al.*, 2009; Eberts *et al.*, 2011; Lasta *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2013). O número de microrganismos por vacúolo parece variar entre um e quinze consoante o estágio de desenvolvimento da bactéria (Carradge *et al.*, 2009). No caso de *A. phagocytophilum* é difícil a sua identificação fora do período agudo da doença, uma vez que só aparecem nos primeiros 28 dias, enquanto a espécie *A. platys* pode ser encontrada em esfregaços de rotina, devido à sua bacteriemia cíclica (Heikkilä *et al.*, 2010; Baneth, 2012; Berzina *et al.*, 2014). Embora a detecção destas inclusões seja um método de diagnóstico rápido, a sua sensibilidade é moderada sendo frequentemente necessário recorrer a outros métodos para confirmar a infeção (Baneth, 2012).

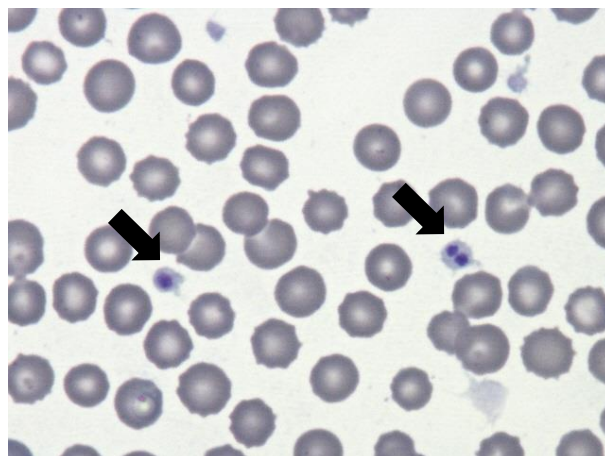


Figura 3 – Duas plaquetas infetadas (setas) com mórulas de *Anaplasma platys* num esfregaço sanguíneo de cão corado com Diff-quick (1000x, original)

Fazem parte dos achados hematológicos durante a fase aguda: trombocitopénia moderada e flutuante, anemia normocítica normocrómica de origem inflamatória e leucopénia com linfopénia e neutrofilia (de Caprariis *et al.*, 2011; Heikkilä *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2014). Nas análises bioquímicas poderá haver um aumento das enzimas hepáticas, hiperglobulinémia, hipoalbuminémia e hiperproteinémia (de Caprariis *et al.*, 2011; ESCCAP, 2012).

A presença de anticorpos anti-*Anaplasma* spp. pode ser detetada por imunofluorescência indireta (IFI), “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) e “Western blot” (WB) (Heikkilä *et al.*, 2010). Os métodos serológicos como a IFI e ELISA

carecem de especificidade por não permitirem a distinção entre *A. platys* e *A. phagocytophilum* (Scorza *et al.*, 2011; Baneth, 2012). No caso de *A. phagocytophilum*, a detecção de anticorpos é possível oito dias após a infecção, ou dois a cinco dias após o aparecimento de mórulas, o que evidência um intervalo de tempo na fase aguda durante o qual os testes serológicos não têm valor de diagnóstico (Heikkilä *et al.*, 2010; Baneth, 2012). Por outro lado os anticorpos podem persistir até um ano após a infecção (Carrade *et al.*, 2009).

Alguns animais podem apresentar sinais clínicos antes da formação de anticorpos específicos, resultando em falsos negativos, sendo necessário repetir os testes ao fim de duas a três semanas para avaliar se houve seroconversão (Baneth, 2012; Maggi *et al.*, 2014). Por outro lado, um número significativo de falsos positivos pode ocorrer devido à reação cruzada com outros organismos, como por exemplo *Ehrlichia canis*, sendo sempre recomendada a confirmação da infecção por métodos moleculares (Carrade *et al.*, 2009; Baneth, 2012).

Métodos imunocitoquímicos que envolvem a observação de esfregaços corados com soluções de anticorpos anti-*Anaplasma* contornam algumas das limitações da observação microscópica clássica, uma vez que permitem o diagnóstico de infecção aguda anterior à seroconversão. Contudo, são procedimentos mais dispendiosos que o esfregaço sanguíneo e, como tal, pouco disseminados (Baneth, 2012; Allison & Little, 2013).

A detecção molecular do ADN do agente por PCR ou *nested*-PCR (Alves *et al.*, 2009) seguida de sequenciação em amostras de sangue periférico, medula óssea, biópsias esplénicas ou de pele apresenta uma elevada sensibilidade e especificidade na fase aguda, permitindo a identificação da espécie (Ribeiro *et al.*, 2013; Berzina *et al.*, 2014).

1.1.1.5. Tratamento

Segundo o Concelho Europeu para o Controlo das Parasitoses dos Animais de Companhia (ESCCAP, 2012) a terapêutica recomendada para a anaplasmosse inclui a administração de tetraciclina, especialmente doxiciclina na dose de 10 mg/Kg/dia durante três a quatro semanas, suplementada com terapia de suporte (Carrade *et al.*, 2009; Kelly *et al.*, 2013). Na fase aguda, a resposta ao tratamento é rápida e podem ser observadas melhorias ao fim de 24 a 48 horas, embora a infecção possa persistir por alguns meses (Heikkilä *et al.*, 2010; ESCCAP, 2012).

1.1.1.6. Saúde Pública

A AGH é uma infecção emergente em que os seres humanos imunocompetentes apresentam pirexia e cefaleia, tendo a capacidade de combater a infecção sem tratamento, enquanto os casos severos aparecem, maioritariamente, em pessoas idosas ou imunocomprometidas (Annen *et al.*, 2012; Rizzoli *et al.*, 2014).

Apesar de pouco comuns, têm sido descritos alguns casos severos de anaplasmoze humana, como os referidos por Kaphle *et al.* (2015) e Hing *et al.* (2014), incluindo um caso raro de síndrome de stress respiratório agudo associado a *A. phagocytophilum*.

Como não há evidências da transmissão direta de anaplasmoze entre cães e humanos, a utilização de desparasitantes externos nos animais, diminui em muito o risco para o ser humano (Baneth, 2012).

1.1.2. *Bartonella* spp.

A bartonelose é uma infecção emergente em cães, causada por bactérias do género *Bartonella* da ordem Rhizobiales e família Bartonellaceae. Estas bactérias são gram-negativas, intracelulares facultativas que infetam mamíferos e artrópodes (Diniz *et al.*, 2007; Bradley *et al.*, 2014; Insa, 2014; Rossi *et al.*, 2015). O seu tamanho médio é de 2 µm de comprimento e 0,5 µm de largura, tendo como principal patogenicidade a secreção de endotoxinas, que afetam os eritrócitos e as células endoteliais (Baneth, 2012).

A espécie *Bartonella henselae*, anteriormente conhecida por *Rochalimaea henselae* (Bradley *et al.*, 2014), foi descrita pela primeira vez em 1983 nos EUA (Guptill, 2010; Insa, 2014), em pacientes imunocomprometidos, infetados com o vírus da imunodeficiência humana VIH, que desenvolveram lesões vasculares hepatoesplénicas e cutâneas (Guptill, 2010; Pennisi *et al.*, 2010; Stutzer & Hartmann, 2012).

Atualmente, já estão descritas mais de 22 espécies de *Bartonella* em mamíferos, estando filogeneticamente relacionadas com os géneros *Rickettsia*, *Brucella*, *Agrobacterium* e *Afipia* (Baneth, 2012; Nasereddin *et al.*, 2014). Mais de 14 destas espécies são consideradas zoonóticas ou potencialmente zoonóticas (Nasereddin *et al.*, 2014).

1.1.2.1. Ciclo de vida

O ciclo de vida de *Bartonella henselae* inclui dois hospedeiros, um invertebrado (pulgas da família Pulicidae) e um vertebrado (gato), tendo como possíveis hospedeiros acidentais, o

ser humano e o cão (Guptill, 2010). O gato é geralmente infectado através da ingestão de fezes de pulgas que contêm a bactéria (Guptill, 2010; Stutzer & Hartmann, 2012; André *et al.*, 2014).

Para a manutenção do ciclo de vida de *B. henselae* é necessária a presença de pulgas, principalmente no meio ambiente (Guptill, 2010; Pennisi *et al.*, 2010). Na sua ausência e mesmo na presença de gatos infectados, a transmissão de *B. henselae* não ocorre, pelo que se pode concluir que sem a presença de fezes de pulga contaminadas, não ocorre transmissão através de mordedura, arranhadura ou por fômites (areão, pratos de comida e bebedouros) (Chomel *et al.*, 2006; Guptaill, 2010). Contudo, Oskouizadeh *et al.* (2010) detetou por PCR a presença de *B. henselae* na saliva de gatos domésticos, alertando para a possível transmissão da bactéria por mordedura (Pennisi *et al.*, 2010).

As espécies mais encontradas em canídeos são: *Bartonella vinsonii*, subespécie *berkhoffi* e *B. henselae* (Diniz *et al.*, 2007; Chomel *et al.*, 2014; Mylonakis *et al.*, 2014). Ainda não é conhecida a capacidade de transmissão direta entre cães e humanos, embora os cães e os gatos possam ser sentinelas de várias espécies de *Bartonella* (Guptill, 2010). O facto de ainda não se saber qual a posição do cão no ciclo de vida destas bactérias não permite clarificar a capacidade de transmissão e o mecanismo de desenvolvimento do agente no organismo canino (Dietrich *et al.*, 2010). Assim, utilizando o gato como exemplo para o que pode acontecer no cão, as pulgas, vetores de *B. henselae*, são infectadas quando se alimentam de sangue de um animal infectado (Nasereddin *et al.*, 2014). No intestino do hospedeiro invertebrado, a bactéria multiplica-se e é excretada pelas fezes, podendo sobreviver no meio ambiente durante pelo menos nove dias (Baneth, 2012). O método utilizado para passar do intestino dos gatos após a ingestão das fezes de pulgas até à corrente sanguínea ainda não é conhecido.

Para a compreensão da evolução da infeção do hospedeiro vertebrado, sabe-se que, utilizando o ser humano como referência, e após trauma cutâneo, as bactérias colonizam inicialmente as células endoteliais (fig.4) e a cada cinco dias são libertadas para a corrente sanguínea, disseminando-se pelo sangue de forma a infectar mais células endoteliais ou eritrócitos (Tuya *et al.*, 2014). Posteriormente, um novo vetor é infectado durante a refeição de sangue ao ingerir eritrócitos infectados com a bactéria (Chomel *et al.*, 2006; Rubinov *et al.*, 2014; Tuya *et al.*, 2014).

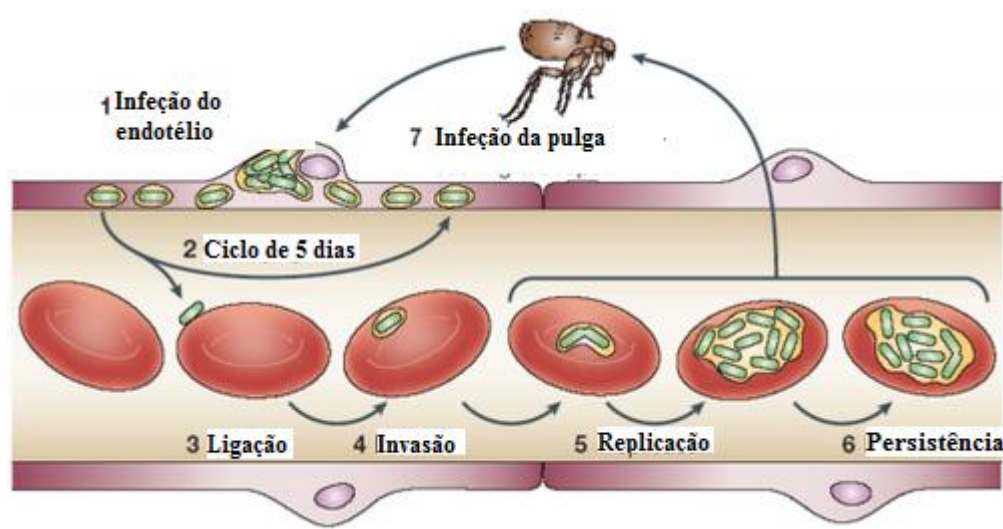


Figura 4 – Ciclo de vida de *Bartonella* spp. (1- infecção primária do endotélio; 2- ciclos consecutivos de 5 dias; 3- ligação ao eritrócito; 4- invasão do eritrócito; 5- replicação da bactéria; 6- infecção persistente; 7- ingestão de sangue infectado pela pulga) (adaptado: Quizlet, 2015)

No que concerne a outras formas de transmissão, alguns estudos experimentais em gatos demonstraram que a transmissão de *Bartonella* spp. pode ocorrer por transfusão de sangue contaminado ou por transmissão mecânica através da inoculação parenteral (intradérmica, subcutânea, intramuscular ou intravenosa) (Kordick *et al.*, 1999; Guptill, 2010; Stutzer & Hartmann, 2012; Hartmann *et al.*, 2013). Pelo contrário, a transmissão venérea, transplacentária e neonatal não se encontram documentadas para este agente (Guptill, 2010).

1.1.2.2. Patogenia e sinais clínicos

O facto do género *Bartonella* ter tropismo para os eritrócitos e células endoteliais permite-lhe a disseminação por muitos tecidos, como a mucosa oral, respiratória, pele, linfonodos, tecidos oculares, gastrointestinais, esplénicos e hepáticos (Guptill, 2010; Stutzer & Hartmann, 2012; Drut *et al.*, 2014).

A adesão através de estruturas de superfície e consequente penetração nas células alvo permite a proteção contra a ação antimicrobiana das células do sistema mononuclear fagocítico (Guptill, 2010; Nasereddin *et al.*, 2014; Tuya *et al.*, 2014; Rossi *et al.*, 2015), facilitando a persistência da infecção e a sua propagação (Guptill, 2010; Stutzer & Hartmann, 2012). A libertação cíclica das bactérias por parte dos tecidos faz com que a bacteriemia seja intermitente, já que as bactérias colonizam as células durante cerca de cinco dias até serem libertadas para a corrente sanguínea, invadindo novas células e causando novamente os sinais clínicos iniciais (Guptill, 2010; Pennisi *et al.*, 2010; Baneth, 2012).

O reduzido número de casos clínicos caninos e o facto de ainda não ser conhecido qual o papel dos cães no ciclo das várias espécies de *Bartonella*, torna importante a avaliação da sintomatologia felina (Dietrich *et al.*, 2010). Embora a maioria dos gatos infetados permaneça assintomática (Guptill, 2010; André *et al.*, 2014; Drut *et al.*, 2014), verificou-se que gatos experimentalmente infetados com *B. henselae* apresentavam ciclos de pirexia, anorexia, letargia, anemia moderada e transitória, linfadenopatia localizada ou generalizada, sinais neurológicos (nistagmos, alterações na resposta a estímulos, comportamentos agressivos, tremores e convulsões), falhas reprodutivas, sopro cardíaco, icterícia, efusão pleural e pericárdica. A severidade destes sinais clínicos varia consoante a bacteriémia e a estirpe inoculada (Guptill, 2010; Stutzer & Hartmann, 2012). De acordo com os mesmos estudos, a bacteriémia pode durar até 465 dias, dependendo da capacidade da bactéria em fazer rearranjos genéticos e alterar as proteínas da membrana externa (Chomel *et al.*, 2006; Pennisi *et al.*, 2010). Pelo mesmo método de rearranjos genéticos, Guptaill (2010) demonstrou que a imunidade protetora após a primeira infeção protege o animal contra estirpes homólogas de *Bartonella*, o que não se verifica para estirpes heterólogas. Assim, o nível de bacteriémia e o grau de suscetibilidade para a reinfeção variam consoante a estirpe e a espécie de *Bartonella* presente (Guptill, 2010; Hegarty *et al.*, 2014), o que dificulta o desenvolvimento de vacinas eficazes contra o agente (Hegarty *et al.*, 2014).

Relativamente à bartonelose canina verificou-se que os cães infetados com *B. vinsonii* subespécie *berkhofii* podem ser assintomáticos (Dietrich *et al.*, 2010; Oskouizadeh *et al.*, 2010; Pennisi *et al.*, 2010; Kamani *et al.*, 2013) ou apresentar endocardite ou doenças granulomatosas (Cotté *et al.*, 2008; Dietrich *et al.*, 2010; Guptaill, 2010; Drut *et al.*, 2014). Se a infeção for causada por *B. henselae* os sinais clínicos mais comuns incluem pirexia, endocardite, miocardite, linfadenite granulomatosa, arritmias cardíacas, rinite granulomatosa, epistáxis, prostatite e diarreia (Yancey *et al.*, 2014).

1.1.2.3. Epidemiologia

Devido às características zoonóticas do género *Bartonella*, têm sido realizados diversos estudos para compreender a epidemiologia deste agente. Este género apresenta uma distribuição mundial com elevada prevalência em países com clima quente e húmido, onde as condições são mais favoráveis para os vetores artrópodes, principalmente para as pulgas (Glaus *et al.*, 1997; Chomel *et al.*, 2006; Pennisi *et al.*, 2009; Guptaill, 2010; Hartmann *et al.*, 2013b). As infeções

em cães têm sido documentadas em vários países da Europa e América, sendo as espécies *B. henselae* e *B. vinsonii* as mais frequentemente detetadas (Zobba *et al.*, 2009; Diniz *et al.*, 2009).

Nos estudos realizados na Europa a prevalência de infeção por *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* em cães foi de 1,4% (1/73) através de técnicas serológicas e moleculares em Espanha (Yabsley *et al.*, 2008) e de 5,8% (11/190) em Itália (Zobba *et al.*, 2009). Num estudo realizado por Diniz *et al.* (2009) o ADN de *Bartonella* spp. foi detetado em 4% (2/50) e 12% (7/60) dos cães de abrigos testados na Grécia e em Itália, respetivamente.

Em Portugal, Alves *et al.* (2009) obtiveram uma seroprevalência de 64,9% (24/37) para *B. henselae* em gatos domésticos, errantes e de abrigos residentes nas regiões de Lisboa e Évora. Por sua vez Maia *et al.* (2014a), detetaram ADN de *Bartonella* em 2,9% (19/649) numa população de gatos domésticos e errantes residentes no sul de Portugal. Noutro estudo realizado por Maia *et al.* (2014b) com o objetivo de pesquisar agentes patogénicos em carraças, não foi amplificado ADN do género *Bartonella* em nenhum dos 945 ixodídeos testados.

1.1.2.4. Diagnóstico

O diagnóstico de *Bartonella* spp. pode basear-se em análises laboratoriais, cultura bacteriana, histologia, imunohistoquímica, serologia e métodos moleculares, sendo que a utilização de apenas um dos métodos pode ser insuficiente (Guptill, 2010; Stutzer & Hartmann, 2012; Drut *et al.*, 2014).

Relativamente às alterações hematológicas mais comuns podem destacar-se eosinofilia (fig. 5), monocitose e trombocitopénia, enquanto as alterações bioquímicas são variáveis e inespecíficas (Guptill, 2010; de Caprariis *et al.*, 2011).

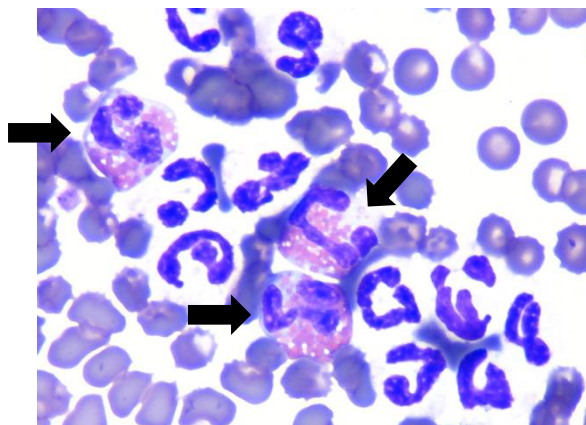


Figura 5 – Eosinofilia (setas) visualizado num esfregaço sanguíneo de cão corado com Diff-quick (500x, original)

As características histopatológicas da endocardite e miocardite granulomatosas causadas por *B. vinsonii* subespécie *berkhofii* são únicas, sendo possível observar agregados/colónias de bactérias entre as células com utilização da coloração de prata de Warthin-Starry (Baneth, 2012; Stutzer & Hartmann, 2012).

A cultura bacteriana com utilização de amostras de sangue ou biópsias de tecido, como linfonodos ou válvulas cardíacas, é a técnica de referência por ser a mais fiável para o diagnóstico definitivo de bartonelose. A maior limitação desta técnica é o longo período de incubação (6-8 semanas) devido ao crescimento lento da bactéria (Guptill, 2010; Oskouizadeh *et al.*, 2010; Hegarty *et al.*, 2014). Quando a cultura é positiva deve ser sempre comparada com os sinais clínicos manifestados pelo animal, uma vez que não é obrigatório que sendo positiva seja estritamente a única causa da doença. Podem também existir resultados falsos negativos devido à baixa bacteriémia, às fases cíclicas de libertação da bactéria para a corrente sanguínea e à morte bacteriana durante o transporte da amostra biológica para o laboratório (Oskouizadeh *et al.*, 2010; Hegarty *et al.*, 2014).

As técnicas serológicas utilizadas na deteção de anticorpos anti-*Bartonella* spp. são a IFI e ELISA (Guptill, 2010; Hegarty *et al.*, 2014; Yancey *et al.*, 2014) e servem principalmente para o diagnóstico de exclusão, uma vez que a presença de resultados falsos positivos é bastante comum e o valor preditivo positivo (VPP) da IFI é baixo (39% a 46%), enquanto a presença de falsos negativos já é raro, sendo o valor preditivo negativo (VPN) elevado (87% a 97%). No entanto, resultados negativos não excluem a presença de infeção (Brunt *et al.*, 2006; Gupta, 2010; Hegarty *et al.*, 2014). De facto, a pesquisa de anticorpos tem um valor limitado, em resultado das reações cruzadas entre espécies e estirpes, principalmente entre *B. henselae* e *B. clarridgeiae*. Além disso, apenas nos informa que o cão já esteve exposto ao agente, não detetando infeções ativas (Chomel *et al.*, 2006; Yancey *et al.*, 2014; Rossi *et al.*, 2015). A IgM aparece numa fase recente de exposição, embora não esteja relacionado com o nível de bacteriémia enquanto os valores de IgG permanecem elevados durante longos períodos de tempo (Diniz *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2009; Hegarty *et al.*, 2014).

A amplificação de ADN de *Bartonella* spp. por PCR é um método de diagnóstico específico e sensível. Esta tem como vantagens em relação aos restantes métodos de diagnóstico a identificação da espécie e/ou da estirpe de *Bartonella* presente por sequenciação do produto de reação e os resultados estarem disponíveis mais rapidamente que os obtidos por cultura (Dietrich *et al.*, 2010; Gupta, 2010; Ebani, *et al.*, 2012). No entanto, resultados falsos negativos

podem ocorrer devido à bacteriemia intermitente, à administração prévia de antibióticos, ausência de ADN na amostra e inibição ou interferência de substâncias presentes na mesma. Por outro lado, os resultados positivos indicam a presença de ADN da bactéria, mas não provam que o microrganismo esteja vivo (Brunt *et al.*, 2006; Guptill, 2010; Ebani *et al.*, 2012).

Embora existam várias técnicas utilizadas no diagnóstico da bartonelose, não existe nenhuma 100% precisa para o diagnóstico de infecção ativa (Guptill, 2010; Hegarty *et al.*, 2014; Yancey *et al.*, 2014). A presença de sinais clínicos compatíveis com a infecção, a exclusão de outras causas com sintomatologia semelhante, o isolamento da bactéria através de cultura, a amplificação do seu material genético por métodos moleculares, a detecção de anticorpos específicos e a resposta ao tratamento são critérios que podem ajudar no diagnóstico (Brunt *et al.*, 2006; Pennisi *et al.*, 2010). No entanto, a resposta ao tratamento não pode fazer parte do diagnóstico definitivo, visto que os fármacos de largo espectro combatem mais do que uma doença com sintomatologia semelhante (Guptill, 2010).

1.1.2.5. Tratamento

A terapia da bartonelose com fármacos disponíveis apenas reduz o nível de bacteriemia, não ocorrendo eliminação total do agente (Guptill, 2010; Bradley *et al.*, 2014; Yancey *et al.*, 2014). O tratamento apenas deve ser realizado em animais sintomáticos ou que estejam em contacto com humanos imunocomprometidos, isto porque, como o tratamento não elimina o agente a 100%, tem grande probabilidade de causar resistências devido às recidivas (Brunt *et al.*, 2006; Stutzer & Hartmann, 2012).

Para o tratamento de bartonelose pode ser administrada amoxicilina-ácido clavulânico (22 mg/Kg) BID durante sete dias (Brunt *et al.*, 2006; Guptill, 2010; Drut *et al.*, 2014; Rossi *et al.*, 2015). Outros antibióticos utilizados são a doxiciclina (10 mg/Kg) BID durante duas a quatro semanas (Stutzer & Hartmann, 2012; Bradley *et al.*, 2014; Rossi *et al.*, 2015;), ou a enrofloxacin (5 mg/Kg) SID durante duas a quatro semanas (Guptill, 2010; Stutzer & Hartmann, 2012).

Ao fim de uma semana o animal deve ser reavaliado, e caso haja diminuição dos sinais clínicos deve-se continuar o tratamento até duas semanas após a remissão completa da sintomatologia (Guptill, 2010; Rossi *et al.*, 2015). Se os sinais piorarem ou continuarem, pode-se associar azitromicina (10 mg/Kg) SID, durante 10 dias (Stutzer & Hartmann, 2012; Rubinov *et al.*, 2014).

A utilização de terapia de suporte é essencial para ajudar o sistema imunitário a combater as bactérias não eliminadas pelos antibióticos (Brunt *et al.*, 2006; Guptill, 2010; Drut *et al.*, 2014; Rossi *et al.*, 2015).

1.1.2.6. Saúde Pública

Muitas infeções por *Bartonella* spp. são zoonóticas e as mais reportadas incluem a doença da arranhadura do gato, angiomatose bacilar, endocardites e neuroretinites causadas por *B. clarridgeiae*, *B. henselae*, *B. koehlerae* e *B. quitana* (Brunt *et al.*, 2006; Guptill, 2010). A transmissão pode ocorrer por mordedura ou arranhadura de gatos, ou por vetores, como pulgas, piolhos e, potencialmente, carraças (Cotté *et al.*, 2008; Pennisi *et al.*, 2010; Stutzer & Hartmann, 2012).

A espécie com maior risco para o ser humano é *B. henselae*, agente causador da doença da arranhadura do gato e potencialmente fatal em humanos imunocomprometidos (Pennisi *et al.*, 2010; Cicuttin *et al.*, 2014). A espécie *B. clarridgeiae* também pode ser responsável por esta doença (Chomel *et al.*, 2006; André *et al.*, 2014). A transmissão ao ser humano pode ocorrer diretamente através de trauma cutâneo causado por arranhadura ou mordedura do gato, ou indiretamente pelo contacto de feridas abertas com saliva de gatos infetados ou fezes de pulgas contaminadas (Tuya *et al.*, 2014; Yancey *et al.*, 2014). Em seres humanos imunocompetentes, a infeção por *Bartonella* spp. pode ser assintomática, ou apresentar lesões cutâneas e linfadenopatia local (Rossi *et al.*, 2015; Tuya *et al.*, 2014; Yancey *et al.*, 2014).

De acordo com os estudos realizados por Dietrich *et al.* (2010) e Guptill (2010) a probabilidade de um ser humano ser infetado por *B. henselae* aumenta com o contacto com gatos com menos de dois anos, com acesso ao exterior, errantes e animais de abrigos (Dietrich *et al.*, 2010; Guptill, 2010). Como tal, na presença de humanos imunocomprometidos e crianças deve ser evitada a adoção de animais jovens, e principalmente de animais com acesso ao exterior. Sempre que haja feridas de pele e mordeduras, estas devem ser bem lavadas e desinfetadas. Apesar de não ser consensual, o corte de unhas em gatos pode ser uma ajuda para evitar a infeção (Brunt *et al.*, 2006; Guptill, 2010). Relativamente aos cães, ainda não é conhecido o seu papel na transmissão destes agentes ao ser humano, embora possam servir de sentinelas (Guptill, 2010).

Nos estudos realizados até ao momento, a seroprevalência de *B. henselae* em pessoas saudáveis variou entre 3,6% e 6% nos EUA, podendo ser mais elevada em alguns grupos de população específicos, tais como veterinários ou crianças (Stutzer & Hartmann, 2012).

Recentemente Varanat *et al.* (2013) detetaram ADN de *Bartonella* spp. em tecido cerebral humano, com ausência de isolamento da bactéria no sangue. Estes autores concluíram então, que a localização deste agente nas células do SNC do hospedeiro poderá contribuir para o desenvolvimento de uma infeção latente, facilitando a sobrevivência do agente por períodos prolongados.

1.1.3. *Borrelia burgdorferi* sensu lato

As bactérias do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) são espiroquetas altamente especializadas em forma de hélice, anaeróbias, gram-negativas, móveis, extracelulares, com 0,2 a 0,3 µm de largura e 15 a 20 µm de comprimento (Baptista, 2006; Baneth, 2012). Fazem parte da ordem Spirochaetales, família Spirochaetaceae (Schulze *et al.*, 2013; Insa, 2014; Prusinski *et al.*, 2014) e pertencem ao género *Borrelia*, sendo responsáveis pela Borreliose de Lyme (Tilly *et al.*, 2008; Littman, 2013; Skotarczak, 2014). Esta doença é a zoonose transmitida por vetores mais reportada na Europa, sendo que a sua prevalência está dependente da distribuição geográfica dos vetores, as carraças do género *Ixodes* (Tilly *et al.*, 2008; Prusinski *et al.*, 2014).

A primeira descrição da Doença de Lyme causada por *B. burgdorferi* s.l., em animais domésticos, foi feita em 1984, com o relato de um cão da raça Doberman que apresentava poliartrite (Gustafson, 1994). Desde então foram relatados muitos casos, sempre com história de exposição a carraças e sinais de claudicação (Littman *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2012; Vera *et al.*, 2014).

1.1.3.1. Ciclo de vida

O complexo *B. burgdorferi* s.l. é transmitido por carraças do género *Ixodes* (Claerebout *et al.*, 2013; Skotarczak, 2014), infetando uma grande variedade de animais, onde se incluem os pequenos mamíferos, lagartos e aves (Skotarczak, 2014; Norte *et al.*, 2015). Os estádios imaturos do vetor, larvas e ninfas, mantêm-se sobretudo na vegetação rasteira, com a diferença de as primeiras infetarem principalmente pequenos mamíferos, enquanto as segundas infetam mamíferos de médio porte, aves e répteis. Por sua vez, as carraças adultas são encontradas mais frequentemente em animais de grande porte como os ungulados (Schwarz *et al.*, 2012).

A forma larvar da carraça é infectada durante a primeira alimentação num hospedeiro vertebrado, normalmente, um roedor (fig. 6). A bactéria é mantida no epitélio intestinal da larva até migrar para as glândulas salivares (Baptista, 2006; Littman, 2013; Lopez *et al.*, 2013). Fenómeno esse que está dependente da expressão da proteína de superfície A (OspA) (Littman *et al.*, 2006; Tilly *et al.*, 2008; Wagner *et al.*, 2013) que processa um recetor para o plasminogénio (Tilly *et al.*, 2008). Ou seja, após o início da refeição, o plasminogénio altera-se para plasmina (Baptista, 2006), que em conjunto com a repressão da OspA e indução da síntese de proteína de superfície C (OspC) facilitam a migração das bactérias do intestino para as glândulas salivares. Com a conclusão deste processo, a bactéria está livre e preparada para infectar o hospedeiro vertebrado na próxima refeição sanguínea da carraça, no estágio de ninfa (Baptista, 2006; Tilly *et al.*, 2008; Wagner & Erb, 2012; Littman, 2013; Baum *et al.*, 2014; Hodzig *et al.*, 2014; Orkun *et al.*, 2014). Para isso, o vetor infectado apenas precisa de se fixar ao hospedeiro vertebrado durante 36-48 horas de forma a transmitir a bactéria (Smith *et al.*, 2012; Littman, 2013; Montandon *et al.*, 2014).

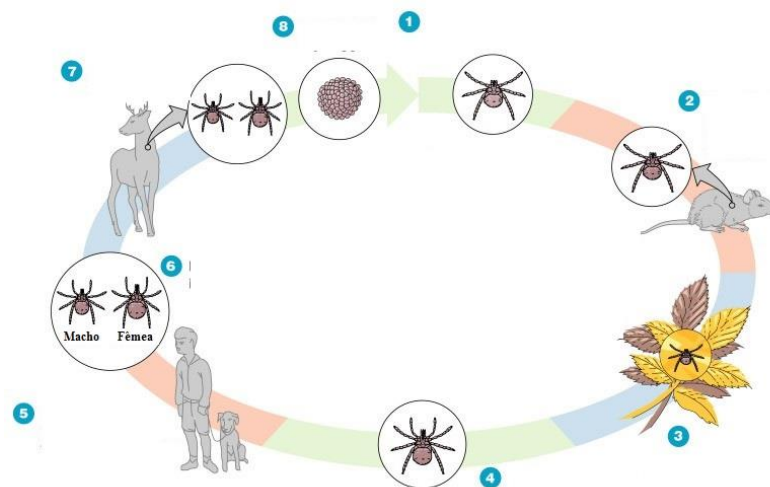


Figura 6 – Ciclo de vida de *Borrelia burgdorferi* s.l. (1- larva não infectada; 2- alimentação da larva num roedor infectado; 3- hibernação larvar; 4- evolução para ninfa; 5- alimentação da ninfa num mamífero, infectando-o; 6- passagem para carraça adulta; 7- alimentação da carraça adulta noutro mamífero, infectando-se; 8- postura de ovos saudáveis pela fêmea) (adaptado: Cummings, 2004)

Após a picada da carraça, os inibidores da protease presentes na sua saliva não permitem que ocorra no hospedeiro vertebrado a quimiotaxia e a expressão de integrina dos neutrófilos (Tilly *et al.*, 2008; Baneth, 2012) impedindo também a ação dos macrófagos, o que permite que as espiroquetas se mantenham no local de inoculação durante pelo menos dois dias. Alguns

autores tentam explicar este tempo, referindo a necessidade de as bactérias fazerem uma recombinação genética e de expressarem novas glicoproteínas de superfície que lhes permitam a disseminação (Tilly *et al.*, 2008; Wagner *et al.*, 2013; Zimmerman *et al.*, 2013). Esta disseminação será definida pelo tropismo da genoespécie em causa, permitindo-lhe alcançar vários tecidos, tais como as articulações, coração e tecido nervoso (Smith *et al.*, 2012; Lopez *et al.*, 2013; Hodzig *et al.*, 2014).

A transmissão entre hospedeiros vertebrados pode ocorrer ocasionalmente, via transplacentária, pelo sangue, urina ou leite (Smith *et al.*, 2012; Schurer *et al.*, 2014). Por sua vez, a transmissão das bactérias do complexo *B. burgdorferi* s.l. para uma nova carraça saudável pode ocorrer de três formas: i) através da refeição sanguínea em hospedeiro infetado; ii) por transmissão transovárica e/ou iii) por transmissão transestadial. A percentagem de bactérias transmitidas por via transovárica da fêmea aos ovos é muito baixa, podendo o número de bactérias diminuir ou mesmo desaparecer quando os ovos se desenvolvem em larvas (ESCCAP, 2012; Claerebout *et al.*, 2013).

Apesar da vasta gama de vertebrados parasitados por *I. ricinus*, poucos são os hospedeiros que conseguem efetivamente perpetuar as espiroquetas, atuando como seus sentinelas. Os humanos e os cães, considerados hospedeiros acidentais, não fazem parte do ciclo natural da bactéria, representando o fim do ciclo, ou seja, são infetados, mas não têm capacidade para transmitir a bactéria (Tilly *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2012; Richter *et al.*, 2013).

1.1.3.2. Patogenia e sinais clínicos

No caso específico de *B. burgdorferi* s.l., as espiroquetas expressam proteínas de superfície que interagem seletivamente com células endoteliais, plaquetas, condrócitos e matriz extracelular, através de interações específicas com integrinas, glicosaminoglicanos, fibronectina e colagénio (Littman, 2013; Zimmerman *et al.*, 2013). Uma vez que estas borrelias não produzem toxinas nem proteases, os sinais clínicos devem-se a uma resposta imunitária exacerbada do hospedeiro com acumulação de imunocomplexos em diferentes tecidos (Lopez *et al.*, 2013; Rolla *et al.*, 2014), estando estes não só associados ao estado do paciente mas também ao nível de bacteriémia e à espécie de *Borrelia* (Littman, 2013).

Um sinal comum a todas as borrelias acontece no local da picada da carraça no hospedeiro vertebrado, visto que há uma estimulação das células inflamatórias de fase aguda,

causando eritema (Franca *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2012; Hodzig *et al.*, 2014; Rolla *et al.*, 2014).

Em animais domésticos imunocompetentes, a infecção por *B. burgdorferi* s.l. pode não resultar em doença (Littman, 2013; Skotarczak, 2014), contudo quando a desenvolvem, o primeiro sinal de borreliose é a artrite (Smith *et al.*, 2012; Lopez *et al.*, 2013; Hodzic *et al.*, 2014; Mylonakis *et al.*, 2014). Em casos de cães imunocomprometidos o sinal mais comum é uma endocardite severa (Tilly *et al.*, 2008; Littman, 2013; Mayne, 2015).

Em jovens é possível distinguir duas síndromes: (i) a síndrome “artropatia de Lyme”, onde estão descritas claudicações devido à inflamação das articulações, caracterizadas por aparecimento agudo, com uma duração de três a quatro dias que recorrem após uma semana, no mesmo membro ou noutro (Littman *et al.*, 2006; ESCCAP, 2012; Lopez *et al.* 2013; Baum *et al.*, 2014; Hodzic *et al.*, 2014); e (ii) a síndrome, “nefropatia de Lyme”, associado a insuficiência renal, que quando não é tratada evolui para glomerulonefrite. Há outros sinais que podem estar também presentes, nomeadamente, vômitos, diarreia, anorexia, perda de peso, poliúria e acumulação de líquido no abdómen e nas extremidades, associados a uremia, hiperfosfatémia, e nefropatia com perda de proteínas (Littman *et al.*, 2006; Littman, 2013; Ebani *et al.*, 2014; Skotarczak, 2014).

Em alguns casos podem estar presentes sinais mais inespecíficos da borreliose canina como dispneia, pirexia, letargia, linfadenopatia perto do local de inoculação e complicações do sistema nervoso (ESCCAP, 2012; Hodzic *et al.*, 2014; Orkun *et al.*, 2014).

1.1.3.3. Epidemiologia

Nos últimos anos têm sido realizados vários estudos epidemiológicos em regiões endémicas Europeias. No Reino Unido Smith *et al.* (2012) pesquisaram ADN do género *Borrelia* em carraças do género *Ixodes* retiradas de cães, tendo encontrado 2,1% (17/810) de amostras positivas. Num estudo realizado na Finlândia, Vera *et al.* (2014) obtiveram uma prevalência de 2,9% (10/340) em cães que estiveram em contacto com o vetor. Nos estudos realizados em cães saudáveis de Itália (Ebani *et al.*, 2014) e Polónia (Krämer *et al.*, 2014) a seroprevalência variou entre 1,47% (29/1965) e 12,31% (381/3094), respetivamente.

Em Portugal a Doença de Lyme é de declaração obrigatória em humanos e para aumentar a sua deteção têm sido realizados vários estudos epidemiológicos. No estudo realizado por Franca *et al.*, (2005), para além da descrição e caracterização das lesões cutâneas

causadas pelo complexo *B. burgdorferi* s.l., os autores isolaram pela primeira vez em todo o Mundo a genoespécie *B. lusitaniae*. Mais recentemente, Norte *et al.* (2015) demonstraram a existência de mais reservatórios para a infeção causada por esta espécie de *Borrelia*, onde se incluem os lagartos, aves e pequenos mamíferos.

Em Portugal, no inquérito seroepidemiológico nacional realizado por Cardoso *et al.* (2012) a prevalência de anticorpos anti-*Borrelia* em cães foi de 0,2% (1/557). Por sua vez, Maia *et al.* (2014b) testaram 925 carraças, das quais apenas seis eram do género *Ixodes*, tendo encontrado uma amostra positiva por PCR para *B. burgdorferi* s.l. No mesmo ano Faria *et al.* (2014) e Maia *et al.* (2014) identificaram por técnicas moleculares e pela primeira vez em Portugal *B. burgdorferi* s.l. em javalis do norte e em gatos no sul do país, respetivamente.

1.1.3.4. Diagnóstico

O diagnóstico da borreliose é baseado na história clínica, sinais clínicos e achados laboratoriais. Nas análises laboratoriais podem não existir alterações, ou então haver leucocitose e azotémia (Zimmerman *et al.*, 2013). Dependendo da fase da doença pode ser difícil detetar alterações (ESCCAP, 2012), pelo que neste contexto assume especial importância o diagnóstico baseado na exclusão dos outros diagnósticos diferenciais e resposta à terapia (Littman, 2013).

Vários métodos permitem a deteção direta de *B. burgdorferi* s.l., tais como a microscopia e a cultura, contudo os resultados destas técnicas dependem da distribuição do agente na circulação sanguínea, o que é dificultado pela bacteriémia transitória (Hodzic *et al.*, 2014; Skotarczak, 2014).

A pesquisa de anticorpos específicos para *B. burgdorferi* s.l. é mais um exame auxiliar para o diagnóstico, sendo ELISA e Western blot (WB) as técnicas serológicas mais utilizadas (Hodzic *et al.*, 2014; Rolla *et al.*, 2014). Os testes serológicos apresentam como vantagens o facto de usarem amostras de fácil obtenção (soro ou plasma) e a sua implementação em laboratório é bastante acessível. Apesar da baixa especificidade, a serologia é utilizada em duas etapas, primeiro realiza-se ELISA e as amostras consideradas positivas, são confirmadas por WB (Rolla *et al.*, 2014). Porém, os testes que envolvem a pesquisa de anticorpos apresentam algumas limitações, nomeadamente: i) a resposta por anticorpos na fase precoce da doença pode ser diminuta ou estar mesmo ausente; ii) pode não existir seroconversão nas fases iniciais da

infecção; iii) uma resposta positiva por anticorpos específicos pode persistir por meses ou mesmo anos depois do tratamento (Smith *et al.*, 2012).

As técnicas moleculares para amplificação de ADN borreliano são mais rápidas e sensíveis do que os métodos bacteriológicos e imunológicos convencionais, podendo ser aplicadas a vários tecidos, tais como pele, sangue, líquido cefalorraquidiano e líquido sinovial (Marques, 2010; Hodzic *et al.*, 2014; Skotarczak, 2014).

1.1.3.5. Tratamento

Atualmente, o fármaco recomendado para o tratamento de borreliose é a doxiciclina (10 mg/Kg), BID no mínimo durante um mês (ESCCAP, 2012; Smith *et al.*, 2012; Littman, 2013). Os resultados do tratamento podem começar a ser visíveis a partir dos dois primeiros dias, principalmente no caso de o animal apresentar poliartrite (ESCCAP, 2012).

Para além da doxiciclina também pode ser utilizada a penicilina, na dose de 20 mg/Kg TID, apesar de a resposta ser mais lenta e a eficácia mais reduzida (Littman *et al.*, 2006; ESCCAP, 2012). O tratamento sintomático também é recomendado, principalmente para os casos em que há insuficiência renal (Smith *et al.*, 2012; Littman, 2013).

1.1.3.6. Saúde Pública

A Doença de Lyme no ser humano apresenta quatro fases no decurso da sua evolução as quais se traduzem por manifestações clínicas na pele (eritema migratório, linfocitoma borreliano, acrodermatite crónica atrófica), coração (cardite de Lyme), sistema nervoso central (neuroborreliose) e articulações (artrite de Lyme) (Shamasna *et al.*, 2012). Cada espécie patogénica está associada a diferentes manifestações clínicas, assim na Europa surge principalmente a neuroborreliose, enquanto na América a artrite de Lyme é a manifestação clínica mais frequente (Schwarz *et al.*, 2012).

Apesar de os cães e os gatos não poderem transmitir diretamente as espiroquetas aos humanos, não representando um risco direto para a saúde pública, eles são considerados sentinelas da doença, uma vez que mantêm a bactéria a circular próxima dos humanos (Littman, 2013; Lopez *et al.*, 2013; Baum *et al.*, 2014).

1.1.4. *Ehrlichia* spp.

As bactérias do género *Ehrlichia*, pertencentes à ordem Rickettsiales e família Anaplasmataceae, são bactérias gram-negativas, pleomórficas e intracelulares obrigatórias (Baneth, 2012; Ebani *et al.*, 2014).

De todas as espécies deste género, *E. canis* é o agente etiológico da erliquiose monocítica canina, tendo sido descoberta pela primeira vez em cães em 1935 por Donatien e Lestoquard no Instituto Pasteur na Argélia (Harrus & Waner, 2011a; Ebani, *et al.*, 2014; Sainz *et al.*, 2015). Na Europa esta bactéria é principalmente transmitida por *R. sanguineus* s.l., embora também estejam descritas infeções por *Ixodes* spp. e *Dermacentor* spp. (Beugnet & Marié, 2009; Latrofa *et al.*, 2014; Rizzoli *et al.*, 2014). Esta bactéria apresenta três estádios dentro das células eucarióticas: o corpo elementar, os corpos iniciais e a mórula (Popov *et al.*, 2007). O primeiro estágio é uma unidade singular, de forma circular com 0,5 µm de diâmetro; o segundo é um conjunto de corpos elementares que se multiplicaram por divisão binária, com 1,0 a 2,5 µm de diâmetro (Baneth, 2012); e o terceiro é uma “microcolónia” de bactérias, envolvidas por um vacúolo membranar (Popov *et al.*, 2007).

1.1.4.1. Ciclo de vida

As carrças, normalmente *R. sanguineus* s.l. (Fig. 7), ao realizarem uma refeição sanguínea num hospedeiro vertebrado infetado ingerem leucócitos contendo *E. canis*, que se multiplicam nos hemócitos e nas glândulas salivares dos vetores. A manutenção do agente durante todas as fases de evolução da carrça acontece através da transmissão entre os vários estádios (transmissão transestadial) (Popov *et al.*, 2007; Stich *et al.*, 2008; Allison & Little, 2013), tendo a carrça a capacidade de disseminar a infeção até 155 dias após a separação do hospedeiro (Popov *et al.*, 2007; Stich *et al.*, 2008; Rizzoli *et al.*, 2014).



Figura 7 – *Rhipicephalus sanguineus* macho à direita e fêmea à esquerda (IHMT, 2015)

Posteriormente a carraça infetada pode inocular a bactéria num hospedeiro vertebrado saudável, o que permite que os corpos elementares sejam fagocitados pelos monócitos ou macrófagos (Allison & Little, 2013; Baneth *et al.*, 2015). Dentro destas células as bactérias vão inibir a fusão dos vacúolos com os fagolisossomas, permitindo o crescimento e multiplicação das mesmas por divisão binária (Popov *et al.*, 2007). Este fenómeno acontece graças à desregulação do sistema imunitário resultante da inibição da libertação de citocinas estimuladoras das células exterminadoras naturais (NK) e células T auxiliares (Th), e mecanismos de inibição do metabolismo das mitocôndrias celulares (Popov *et al.*, 2007, Baneth, 2012; Baneth *et al.*, 2015).

Após três a cinco dias da inoculação, juntam-se vários corpos elementares para formarem corpos iniciais, os quais por sua vez, crescem e desenvolvem-se durante sete a doze dias para darem origem ao estágio de mórula (Popov *et al.*, 2007; Harrus & Waner, 2011a; Allison & Little, 2013). Com as sucessivas multiplicações e consequente aumento do número de microrganismos ocorre a lise da célula infetada, a mórula fragmenta-se e liberta corpos elementares para darem início a um novo ciclo de infeção (Popov *et al.*, 2007).

Os corpos elementares disseminam-se via sistema mononuclear fagocítico no hospedeiro vertebrado para o fígado, baço, medula óssea, linfonodos, pulmões, rins e sistema nervoso central (Popov *et al.*, 2007; Harrus & Waner, 2011a; Andrade *et al.*, 2014; Sainz *et al.*, 2015).

A distribuição da infeção está dependente tanto da presença e densidade do vetor como da presença de cães que funcionam como reservatórios de *E. canis* (Stanneck & Fourie, 2013; Maia *et al.*, 2014b). Para além do cão doméstico, o coiote, a raposa, o chacal e o lobo quando infetados cronicamente também são importantes reservatórios para a manutenção da infeção numa determinada população (Harrus & Waner, 2011a; Loftis *et al.*, 2013).

1.1.4.2. Patogenia e sinais clínicos

A patogenicidade da espécie *E. canis* está dependente da desregulação do sistema imunitário e da consequente produção exagerada e inefetiva de anticorpos. Isto é, a resposta humoral é exagerada e não protetora, uma vez que os anticorpos não têm ação contra *Ehrlichia* spp., causando apenas alterações imunomediadas (Harrus & Waner, 2011a; Sainz *et al.*, 2015).

Durante o período de incubação de 28 dias as bactérias multiplicam-se e disseminam-se pelo organismo do hospedeiro vertebrado, inibindo a formação de plaquetas e promovendo a sua destruição (Harrus & Waner, 2011a; René-Martellet *et al.*, 2015; Sainz *et al.*, 2015).

Após este período, seguem-se as três fases características da doença, começando com a fase aguda, que dura entre uma e três semanas após o período de incubação (Harrus & Waner, 2011a; Cardoso *et al.*, 2012). É nesta fase que, tanto os canídeos imunocompetentes como os imunocomprometidos podem recuperar sem tratamento, contudo, também podem entrar na fase subclínica, passando a ser portadores da infecção durante meses a anos (Cardoso *et al.*, 2013; Sainz *et al.*, 2015). Nesta fase subclínica o baço tem um papel fundamental, uma vez que é responsável pelo sequestro da bactéria (Allison & Little, 2013), diminuindo a disseminação. Já as infecções persistentes ocorrem através de repetidas recombinações das proteínas antigénicas presentes na membrana externa, responsáveis por variações imunogénicas, que permitem ultrapassar os mecanismos de defesa do hospedeiro (Harrus & Waner, 2011a). Posteriormente, alguns animais podem recuperar totalmente sem sinais clínicos, ou podem progredir para a fase crónica (Harrus & Waner, 2011a; René-Martellet *et al.*, 2015).

Os sinais clínicos durante as várias fases são muito inespecíficos, sendo os mais comuns prostração, letargia, perda de peso, pirexia, corrimento ocular, alterações gastrointestinais, linfadenopatia e esplenomegália (Harrus & Waner, 2011a; René-Martellet *et al.*, 2015; Sainz *et al.*, 2015). Em casos mais graves, normalmente relacionados com casos crónicos, há hemorragias (principalmente petéquias, equimoses e epistáxis) associadas a trombocitopenia, manifestações oculares (uveíte anterior, queratoconjuntivite, hifema (fig. 8), glaucoma, coriorretinite e deslocamento de retina), neuromusculares e neurológicas, tais como, poliartrite e polimiosite neutrofílica, vasculite, meningoencefalites e défices dos nervos cranianos (René-Martellet *et al.*, 2015; Sainz *et al.*, 2015).



Figura 8 – Cão com hifema (Animal eye center of New Jersey, in: <http://animaleysofnj.com/client-info/common-eye-diseases/>)

1.1.4.3. Epidemiologia

A distribuição geográfica de *E. canis* está dependente da presença do seu vetor na região, ocorrendo a maioria dos casos de erliquiose monocítica canina durante as estações mais quentes do ano, altura em que o vetor é mais abundante, embora possam ser relatadas ocorrências durante todo o ano, devido à existência de infeções persistentes (Stich *et al.*, 2008; René-Martellet *et al.*, 2015).

Na Europa já foram identificadas infeções por este agente em cães residentes em Espanha, Turquia, França, Itália, Grécia e Portugal (Stich *et al.*, 2008; Cardoso, *et al.*, 2010b; Baneth *et al.*, 2015).

Em Espanha, a seroprevalência deste agente variou entre 1,98% nas Ilhas Canárias a 19,2% em Castilla-León (Aguirre, *et al.*, 2004). Em Itália e França a seroprevalência em cães variou entre 7,07% (139/1965) em cães saudáveis e 0,33% (10/919) em cães domésticos, respetivamente (Pantchev *et al.*, 2009; Ebani *et al.*, 2014).

Em Portugal a infeção por *Ehrlichia* encontra-se descrita no norte, onde Cardoso *et al.* (2010b) detetaram a presença de ADN de Anaplasmataceae em quatro cães com suspeita de DTAV. Num estudo seroepidemiológico realizado em todo o território nacional, Cardoso *et al.* (2012) obtiveram uma prevalência de 4,1% (23/557) em animais saudáveis e 16,45% (103/628) em animais suspeitos de DTAV.

A deteção de ADN de Anaplasmataceae também já foi documentada em gatos residentes, tanto no norte e centro (Vilhena *et al.*, 2013), como no sul do país (Maia *et al.*, 2014a), e em raposas de todo o país (Cardoso *et al.*, 2015).

1.1.4.4. Diagnóstico

O diagnóstico de erliquiose é realizado com base na história clínica, sinais clínicos, alterações hematológicas e testes serológicos e moleculares (Harrus & Waner, 2011a; ESCCAP, 2012; René-Martellet *et al.*, 2015; Sainz *et al.*, 2015).

As alterações hematológicas mais comuns incluem trombocitopénia, geralmente severa devido à produção de anticorpos anti plaquetas, anemia não regenerativa, leucopénia com neutropénia, linfocitose e monocitose (Cardoso *et al.*, 2012; Loftis *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2014). Após a fase aguda, numa fase subclínica pode haver ainda trombocitopénia esporádica. Na fase crónica, geralmente, é visível uma pancitopénia causada por hipocelularidade da medula óssea (Andrade *et al.*, 2014; Stich *et al.*, 2008; Waner *et al.*, 2014). Relativamente às alterações bioquímicas, as mais frequentes em todas as fases são hiperproteinémia, hiperglobulinémia, hipoalbuminémia e aumento das enzimas hepáticas. A acrescentar, pode-se encontrar proteinúria, hematúria e aumento dos tempos de coagulação (ESCCAP, 2012).

Devido à baixa bacteriémia, o diagnóstico microscópico é desaconselhado (Harrus & Waner, 2011a; Sainz *et al.*, 2015; Teshale *et al.*, 2015). Quando é possível a visualização de *E. canis* num esfregaço, na fase aguda, as inclusões aparecem na forma de mórulas basofílicas, mais ou menos densas, de aparência granulada, contendo 30-60 microorganismos, podendo não alterar a estrutura do leucócito (Harrus & Waner, 2011a; Kumar *et al.*, 2014; Sainz *et al.*, 2015). De modo a aumentar a probabilidade de detetar mórulas desta bactéria em esfregaços de sangue periférico deve-se procurar no esfregaço realizado a partir do “buffy coat” (Alexandre *et al.*, 2009; Allison & Little, 2013; Sainz *et al.*, 2015).

Apesar do isolamento de bactérias ser fundamental para a completa descrição e caracterização das espécies presentes nas amostras (Popov *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2014), não é comum na prática clínica, devido à morosidade no crescimento (pode demorar cerca de oito semanas) (Popov *et al.*, 2007; Maggi *et al.*, 2014).

Os métodos serológicos são frequentemente utilizados, embora possa haver um número significativo de falsos positivos devido à reação cruzada com organismos do género *Anaplasma* e *Neorickettsia* (Harrus & Waner, 2011a; Allison & Little, 2013; Kamani *et al.*, 2013; Vieira *et al.*, 2013; Maggi *et al.*, 2014). A seroconversão ou títulos altos de anticorpos apenas confirmam a presença de exposição ao agente (Harrus & Waner, 2011; Maggi *et al.*, 2014), pelo que pode

ser necessário recorrer a técnicas moleculares para confirmar uma infecção ativa por *Ehrlichia* spp. (Maggi *et al.*, 2014).

Um resultado negativo por PCR não significa ausência de infecção, uma vez que a baixa bacteriemia é uma limitação para a detecção de material genético do agente, sendo também importante realizar a recolha de sangue antes da administração de antibióticos (Harrus & Waner, 2011a). Para qualquer tipo de resultado, a sua interpretação deve ser feita em conjunto com os testes serológicos e sinais clínicos (Harrus & Waner, 2011a; Maggi *et al.*, 2014; Sainz *et al.*, 2015).

Para aumentar a probabilidade de detecção da bactéria, o ideal seria utilizar vários métodos de diagnóstico em simultâneo, tais como esfregaço sanguíneo, citologia de medula óssea ou linfonodos, testes serológicos, moleculares e cultura (Allison & Little, 2013; De Tommasi *et al.*, 2013).

1.1.4.5. Tratamento

A terapêutica recomendada para a erliquiose inclui a administração de doxiciclina na dose de 10mg/kg BID durante quatro semanas, conjugada com terapia de suporte baseada em glucocorticóides no início, quando existe trombocitopenia severa (ESCCAP, 2012; Kelly *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2014). A eficácia desta abordagem é, no entanto, variável consoante o caso, sendo que em algumas situações é possível que o período de administração se prolongue por mais de seis semanas. Outros fármacos como a oxitetraciclina ou a minociclina estão descritos como apresentando semelhante eficácia (Harrus & Waner, 2011a; Baneth, 2012; Sainz *et al.*, 2015).

Quando o tratamento com doxiciclina não resulta, pode ser feito como segunda abordagem a utilização de dipropionato de imidocarb na dose de 5mg/Kg quinzenalmente até três administrações (Harrus & Waner, 2011a; Stanneck & Fourie, 2013; Sainz *et al.*, 2015).

Na fase crónica, a antibioterapia pode ser insuficiente, porque demora muito tempo até à eliminação da bactéria, sendo necessário tratamento de suporte como transfusões sanguíneas, suplementação nutricional, fluidoterapia ou outros antibióticos para controlar as infeções secundárias (ESCCAP, 2012; Sainz *et al.*, 2015).

O prognóstico quando o animal entra na fase crónica é sempre reservado, podendo ser pior se houver sinais neurológicos e oculares, visto que a recuperação é mais lenta e por vezes incompleta devido à presença de danos irreversíveis (Harrus & Waner, 2011a).

1.1.4.6. Saúde Pública

A erliquiose é uma infecção com potencial zoonótico, tendo sido considerada potencialmente fatal em humanos no final de 1980 (Kumar *et al.*, 2014). A partir dos primeiros casos de erliquiose mononúclear humana (EMH), causada por *E. chaffeensis*, houve necessidade de uma maior pesquisa sobre o agente causador da doença (Cohn, 2003). A EMH tem sido reportada principalmente nos EUA, embora haja casos humanos descritos em África, na América do Norte e Sul, Ásia, México e na Europa (WHHO, 2009).

Apesar de não existir evidência de transmissão direta de *Ehrlichia* spp. entre animais infectados e o homem e vice-versa, os animais domésticos são suscetíveis aos mesmos organismos que afetam o homem pelo que podem servir como sentinelas ou reservatórios em áreas endêmicas (Neer *et al.*, 2002; Chohn, 2003).

1.2. Doenças transmitidas por protozoários

1.2.1. *Babesia* spp.

Nos finais do século XIX, Victor Babes identificou um agente patogénico nas células sanguíneas de um bovino, denominado mais tarde de *Babesia bovis* (Solano-Gallego & Baneth, 2011).

A babesiose, anteriormente conhecida como piroplasmose, é causada por protozoários intra-eritrocitários do género *Babesia*, da ordem Piroplasmida e família Babesiidae (Silva, 2011; Esch & Petersen, 2013; Dantas-Torres & Otranto, 2014; Moraes *et al.*, 2014). Atualmente, é reconhecida a sua distribuição a nível Mundial, onde o parasita infeta animais domésticos, silvestres e seres humanos (Cardoso *et al.*, 2010a). As espécies deste género que afetam o cão foram classificadas consoante a sua aparência morfológica dentro dos eritrócitos, sendo possível distinguir a forma pequena, *Babesia gibsoni*, de 1,0 a 2,5 µm de comprimento, e a forma grande, *Babesia canis*, com 2,5 a 5,0 µm de comprimento (Cardoso, *et al.*, 2010a; René *et al.*, 2012).

A espécie *B. canis* ainda se pode dividir em três subespécies (Cardoso *et al.*, 2008), nomeadamente, *Babesia canis canis*, transmitida por *Dermacentor reticulatus*, mais comum nas regiões temperadas da Europa e que pode causar anemia hemolítica e aumentos dos tempos de coagulação com vários graus de severidade (Daste, *et al.*, 2013; Moraes *et al.*, 2014); *B. canis vogeli* transmitida por *Rhipicephalus sanguineus* s.l., normalmente assintomática, mais

comum em zonas tropicais e subtropicais de África, Europa, Ásia, Austrália central, América do Norte e do Sul (Solano-Gallego & Baneth, 2011; Moraes *et al.*, 2014); e *B. canis rossi* transmitida por *Haemaphysalis leachi*, encontrada na região sul e este de África, que causa a síndrome hemolítico fatal, sendo reconhecida como a mais virulenta das três subespécies (Cardoso, *et al.*, 2010a; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Moraes *et al.*, 2014).

1.2.1.1. Ciclo de vida

O ciclo de vida deste parasita necessita de um hospedeiro vertebrado e um invertebrado (Solano-Gallego & Baneth, 2011) da família Ixodidae (Schulze *et al.*, 2013). No interior da carraça dá-se a gametogonia e a fusão entre micro e macro gametócitos para formar um zigoto alongado. Este penetra no epitélio intestinal da carraça, migrando de seguida para as glândulas salivares, onde ocorre a esporogonia (Solano-Gallego & Baneth, 2011; Hartmann *et al.*, 2013b). Esta fase desenvolve-se em todos os estádios do ciclo de vida da carraça (larva, ninfa e adulta), garantindo a transmissão transestadial (Solano-Gallego & Baneth, 2011; Smith *et al.*, 2012). Ao mesmo tempo o parasita migra para os órgãos reprodutores da carraça permitindo a transmissão transovárica (Solano-Gallego & Baneth, 2011; Domingos *et al.*, 2013; Scoles & Ueti, 2015).

No hospedeiro vertebrado a infeção desenvolve-se a partir da inoculação de saliva da carraça, contendo esporozoítos. No entanto a penetração das formas infetantes só acontece após 48 horas de fixação da carraça ao hospedeiro vertebrado, uma vez que é necessário haver uma mudança de temperatura no intestino do vetor para que se dê a maturação dos esporozoítos (Solano-Gallego & Baneth, 2011; Hartmann, *et al.*, 2013a; Schaarschmidt *et al.*, 2013). Após este processo, o parasita já na fase de trofozoíto, com forma anelar, invade os eritrócitos, onde ocorre a merogonia para formar merozoítos, caracterizados pela forma de lágrima, que podem aparecer aos pares ou individualmente (fig.9) (Hartmann *et al.*, 2013a; Moraes *et al.*, 2014). As consecutivas subdivisões dos merozoítos até oito pares levam à destruição do eritrócito e à sua libertação, podendo infetar novas células ou serem ingeridos por um novo vetor para continuar o ciclo (Solano-Gallego & Baneth, 2011; Hartmann *et al.*, 2013a; Moraes *et al.*, 2014).

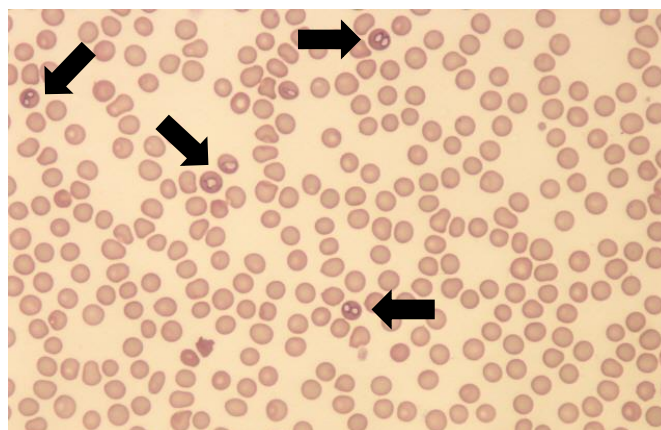


Figura 9 – Vários eritrócitos infectados com merozoítos (setas) de *Babesia canis* num esfregaço sanguíneo de cão corado com Diff-quick (400X, original)

Também se encontra reportada a transmissão de *Babesia* spp. por via iatrogénica, transplacentária e através de transfusões sanguíneas (Solano-Gallego & Baneth, 2011; ESCCAP, 2012; González *et al.*, 2015).

1.2.1.2. Patogenia e sinais clínicos

A babesiose canina não afeta todos os animais da mesma forma, variando de acordo com o sistema imunitário, idade e presença de coinfeções. Estes fatores também alteram o início dos sinais clínicos, podendo começar num intervalo entre os 10 e os 28 dias após a infeção (Solano-Gallego & Baneth, 2011; Mørch *et al.*, 2015).

O principal sinal clínico desta infeção advém da destruição dos eritrócitos resultante das consecutivas subdivisões do parasita dentro da célula, causando anemia hemolítica ou inflamação sistémica com consequente disfunção multiorgânica (Otranto *et al.*, 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Daste *et al.*, 2013). Esta disfunção resulta da hipoxia tecidular causada pela anemia, choque hipotensivo, estase vascular e produção excessiva de monóxido de carbono, afetando inicialmente os sistemas nervoso central, urinário e musculo-esquelético (Solano-Gallego & Baneth, 2011; Daste *et al.*, 2013).

Na babesiose anémica, para além da lise eritrocitária causada pelas consecutivas divisões do parasita, outros mecanismos podem ser responsáveis pela destruição dos eritrócitos e posterior anemia (Hartmann, *et al.*, 2013b), nomeadamente: (i) ligação de anticorpos de superfície das células parasitadas, ativação do complemento; (ii) produção de fatores hemolíticos no soro; (iii) dano oxidativo dos eritrócitos; (iv) aumento do número de eritrócitos fagocitados; e (v) aparecimento de esferócitos. Todas estas alterações resultam em

hemoglobulinemia, hemoglobinúria, bilirrubinemia e bilirrubinúria (Solano-Gallego & Baneth, 2011).

Em certos casos desenvolve-se a babesiose não anêmica ou inflamatória sistêmica que está associada a uma excessiva resposta inflamatória mediada por citocinas, óxido nítrico e fatores de ativação de plaquetas, causando pirexia, letargia e prostração (Cardoso *et al.*, 2010a; Solano-Gallego & Baneth, 2011; René *et al.*, 2012; Daste *et al.*, 2013).

As complicações mais frequentes destes dois tipos de babesiose passam por hepatopatias, pancreatite, insuficiência renal aguda, coagulação intravascular disseminada, dispneia, lesões do miocárdio e alterações do sistema nervoso central (Daste *et al.*, 2013).

Segundo Daste *et al.* (2013), a babesiose pode ser classificada em casos não complicados e casos complicados ou em fase hiperaguda, aguda, subclínica e crônica. A fase hiperaguda é caracterizada por choque hipotensivo, hipóxia, lesão tecidual extensa e estase vascular, apesar de pouco comum, pode ser fatal para o animal (Daste *et al.*, 2013; Moraes *et al.*, 2014). Por sua vez, a fase aguda da doença é a mais comum e os primeiros sinais clínicos são pirexia e letargia, podendo também apresentar anorexia, vômito, hematúria e icterícia (Solano-Gallego & Baneth, 2011; ESCCAP, 2012; Daste *et al.*, 2013; Moraes *et al.*, 2014). Já as fases subclínica e crônica são difíceis de caracterizar, porque os animais podem ser apenas portadores assintomáticos, ou apresentar sinais intermitentes e inespecíficos, como pirexia, prostração e linfadenopatia (Solano-Gallego & Baneth, 2011; Daste *et al.*, 2013).

Segundo Solano-Gallego & Baneth (2011), os cães que sofreram esplenectomia desenvolvem uma forma clínica mais grave e apresentam níveis mais elevados de parasitemia. Isto porque o baço tem uma função importante no controle da babesiose, uma vez que é responsável pelo sequestro do parasita.

1.2.1.3. Epidemiologia

A babesiose é uma infecção endêmica na região do Mediterrâneo e na Europa Ocidental (René *et al.*, 2012), sendo considerada uma doença sazonal (Leschnik *et al.*, 2008).

Na Europa têm sido realizados vários estudos para avaliar a prevalência e dispersão da parasitose, tendo sido detetado ADN de *B. canis* em 74,6% (94/123) das amostras de sangue de cães suspeitos de babesiose na Lituânia (Paulauskas, *et al.* 2014). Em Espanha, França, Alemanha e Áustria, Halos *et al.* (2014) realizaram um questionário epidemiológico sobre a babesiose canina tendo obtido uma incidência anual total de 0,70%. No mesmo estudo, os

autores identificaram a região da Galiza (5,5%) como o maior foco em Espanha, uma distribuição homogênea da doença em França (0,9-2,4%) e os restantes países com uma incidência muito baixa (0,3-0,9%). A infecção por este protozoário também se encontra reportada em raposas na Hungria (Farkas *et al.*, 2015) e na Alemanha (Najm *et al.*, 2014).

Em Portugal Cardoso *et al.* detetaram ADN de *B. canis* em cães suspeitos de babesiose provenientes do norte do país (Cardoso *et al.*, 2008; 2010a) e ADN de *B. microti* em raposas de todo o território nacional (Cardoso *et al.*, 2013). A presença de *B. caballi* foi reportada em equinos (Ribeiro *et al.*, 2013) e *B. canis* e *B. vogeli* foram detetados em gatos (Vilhena *et al.*, 2013; Maia, *et al.*, 2014a).

1.2.1.4. Diagnóstico

Durante as fases aguda ou subclínica é possível fazer o diagnóstico através de um esfregaço sanguíneo corado com Giemsa ou Diff-Quick (Moraes *et al.*, 2014; Mørch *et al.*, 2015), onde é possível distinguir formas grandes simples ou em pares, pertencentes à espécie *Babesia canis* (fig. 10); ou formas pequenas, geralmente redondas, simples, ou, por vezes, em grupos de quatro, os chamados “Maltese cross” pertencentes à espécie *B. gibsoni* (Cardoso, *et al.*, 2010a; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Schaarschmidt *et al.*, 2013).

Muitos autores referem a importância do sangue ser recolhido de capilares periféricos como do pavilhão auricular ou da ponta da cauda para a visualização de um maior número de parasitas, enquanto outros dão maior importância ao nível de parasitémia. Contudo, o grau de parasitémia não está relacionado com a gravidade da doença (Cardoso, *et al.*, 2010a; Daste *et al.*, 2013; Hartmann, *et al.*, 2013a).



Figura 10 – Dois pares de merozoitos (seta) de *Babesia canis* no citoplasma de um eritrócito num esfregaço sanguíneo de cão corado com Diff-quick (500X, original)

Nos exames laboratoriais é possível detetar anemia hemolítica regenerativa, hipocrômica e macrocítica, com presença de policromasia, corpos de “Howell-Jolly”, eritrócitos nucleados, anisocitose e esferócitos. Também pode ser evidenciada a presença de leucocitose com neutrofilia, trombocitopénia, bilirrubinúria, hemoglobínúria, alteração do painel de coagulação (Solano-Gallego & Baneth, 2011; Loftis *et al.*, 2013; Moraes *et al.*, 2014) e teste de Coombs positivo (Hartmann, *et al.*, 2013b).

O diagnóstico de infeção crónica ou subclínica com baixa parasitémia pode ser mais difícil, sendo necessário recorrer a técnicas mais específicas, nomeadamente pesquisa de anticorpos que só podem ser detetados após duas semanas da primeira infeção (ESCCAP, 2012; Maggi *et al.*, 2014). O método mais utilizado para a identificação destes anticorpos é a IFI. Em zonas endémicas a seropositividade pode não significar a existência da doença, apenas indicando que o animal esteve em contacto com o agente (Solano-Gallego & Baneth, 2011; Hartmann, *et al.*, 2013a).

As técnicas moleculares são cada vez mais utilizadas, uma vez que a PCR tem não só uma sensibilidade superior ao esfregaço sanguíneo e às técnicas serológicas para a deteção da infeção crónica, mas também porque permite a distinção de espécies e subespécies através de sequenciação (Tabar *et al.*, 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Maggi *et al.*, 2014).

1.2.1.5. Tratamento

O fármaco mais utilizado para eliminar as diferentes formas de *Babesia* spp. é o dipropionato de imidocarb na dose 6,6mg/kg, com quinze dias de intervalo (Cardoso, *et al.*, 2010a; Solano-Gallego & Baneth, 2011; ESCCAP, 2012; Daste *et al.*, 2013; Kelly *et al.*, 2013).

O tratamento de suporte, tal como administração de fluidos endovenosos, transfusões de sangue e o uso de anti-inflamatórios deve ser associado ao tratamento etiológico (Solano-Gallego & Baneth, 2011; ESCCAP, 2012).

A imunidade adquirida, após a primeira infecção por *B. canis*, pode ser eficaz contra uma reinfeção homóloga por um período de cinco meses a um ano, não tendo qualquer influência contra outras espécies (Leschnik *et al.*, 2008; Solano-Gallego & Baneth, 2011; ESCCAP, 2012).

Quando o dipropionato de imidocarb não é eficaz recomenda-se o diagnóstico definitivo da subespécie em causa, uma vez que as formas pequenas de *Babesia* demonstram maior resistência à terapêutica (Solano-Gallego & Baneth, 2011). Nestas situações é necessário utilizar a combinação de atavaquona e azitromicina, contudo, a eficácia deste protocolo é questionada pela expectável persistência da parasitemia e pelo risco de desenvolvimento de resistências (González *et al.*, 2015). Como alternativa a algumas destas limitações, foi proposto um protocolo baseado na combinação de clindamicina, metronidazol e doxiciclina (Tabar *et al.*, 2009; González *et al.*, 2015; Mørch *et al.*, 2015), que supõe ser menos predisposto a recidivas e ao desenvolvimento de resistências, porém com resultados terapêuticos mais lentos (Kelly *et al.*, 2013).

1.2.1.6. Saúde Pública

A babesiose humana causada por várias espécies do género *Babesia* é uma doença zoonótica emergente. Os quadros clínicos mais graves estão associados a indivíduos com o sistema imunitário comprometido e idosos (Solano-Gallego & Baneth, 2011; Esch & Petersen, 2013; González *et al.*, 2015; Mørch *et al.*, 2015).

Na Europa, há casos reportados de humanos esplenectomizados infetados por *B. divergens* (presente em ruminantes), tendo sido fatal na maioria dos casos. A babesiose humana causada por *B. microti* (agente da babesiose nos roedores) também já foi reportada (Solano-Gallego & Baneth, 2011; Mørch *et al.*, 2015). Em Portugal, está descrito um caso fatal de infecção por *B. divergens* num adulto esplenectomizado (Centeno-Lima *et al.*, 2003). Mais

recentemente, Mørch, *et al.* (2015) e González *et al.* (2015) relataram a infecção por *B. divergens* num adulto imunocompetente residente na Noruega e num adulto infetado com VIH em Espanha, respectivamente, enquanto em 2014 foi reportado nos EUA por Jared *et al.* a infecção de uma criança com babesiose causada por *B. microti*. Num estudo retrospectivo, Lempereur *et al.* (2015) demonstraram que a prevalência de babesiose humana na Europa é maioritariamente causada por *B. divergens*, ao contrário do que acontece nos EUA, onde a maioria dos casos é causada por *B. microti*.

Apesar de não estar provado que os animais (cão, gato e bovinos) possam atuar como reservatórios, estes podem servir como veículo de transporte de carraças infetadas (Solano-Gallego & Baneth, 2011).

1.2.2. *Hepatozoon* spp.

A hepatozoonose é causada por protozoários do género *Hepatozoon* pertencentes à subordem Adeleorina e família Hepatozoidae (Dantas-Torres, 2010; Pawar *et al.*, 2012; Aktas *et al.*, 2013; Vilhena *et al.*, 2013). A espécie *H. canis* foi descrita pela primeira vez num cão em 1905, sendo denominada *Leukocytozoon canis* (O'Dwyer, 2011; Amoli *et al.*, 2012).

Este género compreende centenas de espécies que infetam aves, répteis, anfíbios e mamíferos, em todos os continentes, principalmente de clima tropical e subtropical (O'Dwyer, 2011; Pawar *et al.*, 2012; Mencke, 2013). Em canídeos estão descritas infeções por duas espécies, *H. canis* e *H. americanum*; a primeira presente no Velho e Novo Mundo, e a segunda, diagnosticada, até ao momento, somente nos EUA (Baneth, 2011; O'Dwyer, 2011; Giannitti *et al.*, 2012).

O meronte de *H. canis* pode ser visualizado com cerca de 30,6 µm por 28,9 µm e os merozoitos dentro destes aparecem dispostos em círculos em torno do núcleo central. Por sua vez, os gamontes são alongados com 5 µm de largura e 10 µm de comprimento (Giannitti *et al.*, 2012).

1.2.2.1. Ciclo de vida

O ciclo de vida do parasita *Hepatozoon* apresenta duas fases de reprodução, ou seja, no hospedeiro vertebrado (anfíbios, mamíferos, pássaros e répteis) ocorre a merogonia seguida de gametogonia, enquanto no hospedeiro invertebrado (carraças e insetos) ocorre a esporogonia (Urguhart *et al.*, 1996; Baneth, 2011; O'Dwyer, 2011; Giannitti *et al.*, 2012).

Relativamente à transmissão de *H. canis*, esta pode ocorrer por ingestão da carraça *R. sanguineus* s.l. (Baneth, 2011; Aktas *et al.*, 2013; Hornok *et al.*, 2013) ou por transmissão transplacentária, embora a primeira seja mais comum (Baneth, 2011). É no estágio de ninfa que o vetor adquire os gamontes circulantes no sangue do hospedeiro vertebrado, os quais são transmitidos transtetadialmente quando é feita a muda para o estágio adulto (Aktas *et al.*, 2013; Dantas-Torres & Otranto, 2014). No intestino do vetor, os gamontes libertam-se dos leucócitos e ocorre a gametogénese com a formação de gâmetas distintos, para posteriormente haver fertilização e formação do zigoto (O'Dwyer, 2011). A partir deste ocorre a formação de oócitos contendo milhares de esporocistos, através do processo de esporogonia.

O ciclo continua com a ingestão do vetor infetado por um hospedeiro vertebrado (O'Dwyer, 2011; Hornok *et al.*, 2013; Baneth *et al.*, 2015). Quando chegam ao intestino do hospedeiro vertebrado os esporozoítos libertam-se dos esporocistos invadindo a parede intestinal. Em seguida, os esporozoítos invadem as células mononucleares e disseminam-se por via sanguínea ou linfática para os órgãos alvo (Hornok *et al.*, 2013; Baneth *et al.*, 2015). Dependendo da espécie infetante, a distribuição pode ser preferencialmente para os órgãos hematopoiéticos, tecidos musculares ou cardíaco (Jittapalapong, *et al.*, 2006).

Durante a disseminação há a formação de dois tipos de merontes que se diferenciam pelo número e tamanho de merozoítos que contêm (O'Dwyer, 2011; Giannitti *et al.*, 2012): um tem entre 20 e 30 micromerozoítos e o outro tem quatro macromerozoítos; em ambos os merozoítos multiplicam-se por divisão binária (O'Dwyer, 2011; Giannitti *et al.*, 2012).

Enquanto os macromerozoítos se libertam do meronte maturo e invadem novas células para formar novos merontes, os micromerozoítos libertam-se dos merontes maduros para colonizarem neutrófilos e monócitos (O'Dwyer, 2011), onde se diferenciam em gamontes, para mais tarde serem ingeridos pela carraça quando esta efetuar a refeição sanguínea no hospedeiro vertebrado (O'Dwyer, 2011; Giannitti *et al.*, 2012).

1.2.2.2. Patogenia e sinais clínicos

O desenvolvimento da infeção por *Hepatozoon* está dependente de vários fatores, como alterações genéticas dos neutrófilos, imaturidade do sistema imunitário, condições ou tratamentos imunossupressivos, assim como pela presença de coinfeções, tais como, anaplasmose, babesiose, erliquiose, leishmaniose, parvovirose e toxoplasmose (O'Dwyer, 2011; Baneth *et al.*, 2015).

De acordo com o grau de parasitémia, as infecções por *H. canis* podem apresentar-se sob a forma: subclínica, a mais comum; aguda, muitas vezes fatal; e crónica, com fases de expressão clínica e remissão (O'Dwyer, 2011; Giannitti *et al.*, 2012; Pawar *et al.*, 2012). Assim, os sinais clínicos são variados e inespecíficos, sendo os mais comuns, anemia, anorexia, caquexia, letargia, linfadenopatia e pirexia (Hornok *et al.*, 2013; Kamani *et al.*, 2013).

A migração do agente para diferentes localizações, como por exemplo fígado, rins, ou pulmões vai definir os sinais clínicos, tais como, hepatite, glomerulonefrite ou pneumonia, respetivamente. Estas lesões são resultantes da inflamação crónica causada pela presença do parasita e pela acumulação de complexos autoimunes nos órgãos afetados (O'Dwyer, 2011; Giannitti *et al.*, 2012).

1.2.2.3. Epidemiologia

A distribuição geográfica de hepatozoonose canina causada por *H. canis* na Europa é mais evidente nos países do sul e nos Balcãs, onde o vetor, *Rhipicephalus sanguineus* s.l., é endémico (Dantas-Torres & Otranto, 2015).

Hornok *et al.* (2013) reportaram o primeiro caso fora das áreas descritas anteriormente, mais precisamente na Hungria, onde se obteve uma prevalência da infeção por *Hepatozoon* spp. de 26% (33/126) em cães pastores. No mesmo país, Farkas *et al.* (2014) detetaram ADN de *H. canis* em 8% (26/334) das raposas e em 60% (9/15) dos chacais testados. Contudo, a prevalência de infeção por este protozoário foi mais elevada (45,2%) no estudo realizado por Najm *et al.* (2014) em raposas capturadas em várias regiões da Alemanha.

A presença de material genético de *H. canis* foi reportada em 13,47% (141/1091) e em 0,2% (2/925) das carraças testadas em Itália (Ramos *et al.* 2014) e Portugal (Maia *et al.*, 2014b), respetivamente.

Em Portugal, Cardoso, *et al.* (2010b) identificaram por biologia molecular uma coinfeção por *B. canis* e *H. canis* num cão do norte. Este protozoário foi também detetado por biologia molecular e histopatologia em 75% (68/90) das raposas analisadas por Cardoso *et al.* (2014); a prevalência obtida por estes autores foi superior à encontrada por Conceição-Silva *et al.* (1988) de 48% (143/301) em raposas de Lisboa e Alcácer do Sal. Ainda em Portugal, Maia *et al.* (2014) obtiveram uma prevalência de 8,6% (56/649) em gatos para *H. felis*, inferior à anteriormente reportada por Vilhena *et al.* (2013) de 13,8% (44/320).

1.2.2.4. Diagnóstico

Dependendo do grau de parasitemia o diagnóstico pode ser feito através de esfregaços sanguíneos, onde se podem observar gamontes no citoplasma dos monócitos ou dos neutrófilos (fig. 11) (Baneth, 2011; Amoli *et al.*, 2012; Hornok *et al.*, 2013). A visualização de quistos com esquizontes pode ser obtida por histopatologia de biópsias de tecidos musculares ou outros órgãos infectados (Metzger *et al.*, 2008; Giannitti *et al.*, 2012; Hornok *et al.*, 2013).

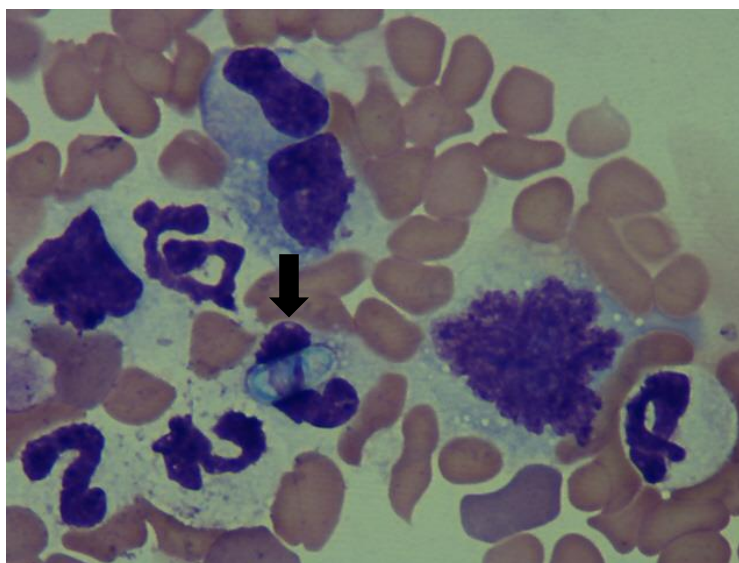


Figura 11 – Neutrófilo infectado por *Hepatozoon* spp. (seta) em forma de gamonte, num esfregaço sanguíneo de cão corado com Diff-quick (1000X, original)

Ao nível laboratorial, o cão pode apresentar anemia normocítica e normocrômica, leucocitose com neutrofilia e trombocitopenia, associado a hipoglicemia, aumento da fosfatase alcalina e hiperproteinemia com hipoalbuminemia (O'Dwyer, 2011; ESCCAP, 2012).

As técnicas serológicas, como imunofluorescência ou ELISA, estão descritas como apresentando resultados idênticos, ambas com maior sensibilidade que o exame direto. Resultados falsos negativos podem aparecer quando a infecção é muito recente e ainda não houve tempo de produção de anticorpos específicos, em casos crônicos, ou em animais que não têm capacidade de formar uma resposta humoral competente. Os resultados falsos positivos surgem quando a infecção já foi tratada mas ainda há anticorpos em circulação ou em casos de exposição sem infecção (O'Dwyer, 2011).

A combinação de métodos parasitológicos, pouco invasivos e não dispendiosos (esfregaço sanguíneo), com métodos moleculares (amplificação e sequenciação) aumenta a sensibilidade de diagnóstico de *Hepatozoon* spp. (Ortuño *et al.*, 2008; Pawar *et al.*, 2012; Aktas *et al.*, 2013).

1.2.2.5. Tratamento

O tratamento recomendado para a hepatozoonose baseia-se na administração de 5-6mg/Kg de dipropionato de imidocarb, quinzenalmente, até não serem visíveis gamontes no esfregaço sanguíneo (Baneth, 2011; ESCCAP, 2012). O prognóstico é favorável quando a parasitemia é baixa, sendo reservado quando o número de parasitas em circulação é elevado, o que geralmente acontece na presença de infeções concomitantes (ESCCAP, 2012; Giannitti *et al.*, 2012; Vilhena *et al.*, 2013).

Quando há coinfeções ou hepatozoonoses refratárias ao tratamento, é aconselhável a associação de doxiciclina ao dipropionato de imidocarb. Nos casos subclínicos e crónicos a utilização dos tratamentos descritos pode não ser eficaz, conseguindo-se apenas controlar os sinais clínicos nas fases de agudização (ESCCAP, 2012; Andersson *et al.*, 2013; Baneth *et al.*, 2015).

1.2.2.6. Saúde Pública

A única infeção conhecida por *Hepatozoon* spp. num ser humano foi reportada num paciente proveniente das Filipinas que apresentava icterícia e anemia (Baneth, 2012). O parasita foi observado num esfregaço sanguíneo, mas não foi detetado nos outros órgãos analisados, nomeadamente fígado e medula óssea.

O facto de apenas ter sido reportado um caso de infeção em seres humanos significa que ainda se desconhece a importância zoonótica deste protozoário (Baneth, 2012; 2015).

1.2.3. *Leishmania infantum*

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários intra-celulares do género *Leishmania*, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (Esch & Petersen, 2013; Dantas-Torres & Otranto, 2014; Dincer, *et al.*, 2015). O parasita causador desta doença infeta o ser humano, animais domésticos e silvestres em quase todo o mundo, sendo transmitido por fêmeas de flebotomíneos da ordem Diptera (família Psychodidae, subfamília Phlebotominae) (Fig. 12) (Esch & Petersen, 2013; Fankhauser *et al.*, 2015; Pennisi, 2015).



Figura 12 – Diferenciação entre macho à direita e fêmea à esquerda do gênero *Phlebotomus* (IHMT, 2015)

A primeira descrição de uma espécie do gênero *Leishmania* foi feita em 1903 por Ronald Ross (Insa, 2014), dando-lhe o nome de *Leishmania* para homenagear o patologista escocês William Boog Leishman (Armés, 2010).

As várias espécies do gênero *Leishmania* apresentam duas formas distintas: a forma amastigota (Esch & Petersen, 2013; Foroughi-Parvar & Hatam, 2014; Pennisi, 2015), no hospedeiro vertebrado, e a forma promastigota (Campino & Maia, 2013; Maia *et al.*, 2013), no hospedeiro invertebrado. A forma amastigota é intracelular e apresenta um corpo oval ou redondo de 2,5 a 6,8 μm de diâmetro com um cinetoplasto em forma de bastão associado a um flagelo rudimentar, encontrando-se dentro dos fagolisossomas das células mononucleares fagocíticas dos hospedeiros vertebrados (Gramiccia, 2011). Pelo contrário, a forma promastigota é extracelular, apresenta um corpo fusiforme (15-30 μm) com um flagelo longo e livre na extremidade anterior, sendo encontrada no intestino dos vetores artrópodes (Bates, 2007; Gramiccia, 2011).

1.2.3.1. Ciclo de vida

Os parasitas do gênero *Leishmania* completam o seu ciclo de vida em dois hospedeiros: um vertebrado e um invertebrado (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

A sua transmissão aos hospedeiros vertebrados é feita por flebótomos fêmeas do género *Lutzomyia* no Novo Mundo, e do género *Phlebotomus* no Velho Mundo, sendo as espécies *P. perniciosus* e *P. ariasi* comprovadamente vetores de *L. infantum* em Portugal (Campino & Maia, 2013; Maia *et al.*, 2013). No sul da Europa, os flebótomos são principalmente ativos entre os meses de maio e outubro, com um pico de atividade entre julho e agosto (Gramiccia, 2011; Maia *et al.*, 2013).

Quando um flebotomíneo fêmea efetua uma refeição hematófaga num hospedeiro vertebrado infetado por *Leishmania*, adquire os protozoários na forma amastigota (Bates, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Após ingestão, e já na porção posterior do intestino do vetor, as formas amastigotas são libertadas dos macrófagos infetados (Foroughi-Parvar & Hatam, 2014; Cantacessi *et al.*, 2015) e diferenciam-se em promastigotas (Bates, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2009; Roberts *et al.*, 2015). Nesta forma o parasita sofre várias alterações morfológicas e funcionais ao longo do intestino do vetor, diferenciando-se nas formas infetantes para o hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas metacíclicas, as quais se alojam no segmento anterior do estômago do vetor (Bates, 2007; Roberts *et al.*, 2015). Ao alimentar-se num novo hospedeiro vertebrado o vetor inocula os promastigotas metacíclicos na camada interna da pele do hospedeiro, provocando uma resposta inflamatória local, tendo um período de incubação que pode variar entre três meses a vários anos (Bates, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Inicialmente, aparecem no local de inoculação os neutrófilos e eosinófilos e posteriormente os macrófagos que fagocitam o parasita. Após fagocitose, o parasita diferencia-se na forma amastigota, não móvel, e multiplica-se por divisão binária dentro do fagolisossoma (Bates, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2009; Cantacessi *et al.*, 2015). A contínua multiplicação dos amastigotas leva à rutura dos macrófagos e invasão dos órgãos do sistema reticuloendotelial (Bates, 2007; Hernández *et al.*, 2015). A infeção dissemina-se rapidamente, iniciando-se na pele e estendendo-se para os linfonodos, baço e medula óssea (Bates, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2009; da Silva *et al.*, 2014). O ciclo completa-se quando um novo vetor realizar uma refeição sanguínea num hospedeiro vertebrado infetado.

A sobrevivência do género *Leishmania* durante os meses frios só é possível graças ao hospedeiro vertebrado, uma vez que não há transmissão transovárica de *Leishmania* spp. e os flebótomos adultos apresentam um curto período de vida (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Para além da forma de transmissão apresentada, através dos flebótomos, estão descritas outras vias de infeção, nomeadamente, a transmissão através de transfusões sanguíneas a partir

de dadores de sangue infetados, transmissão vertical e transmissão venérea, contudo ainda se desconhece o seu papel na epidemiologia da doença (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Dincer *et al.*, 2015; Pennisi, 2015).

A transmissão através de outros vetores artrópodes, como as carraças (*R. sanguineus* s.l. e *Dermacentor variabilis*) e as pulgas (*Ctenocephalides felis*) continuam por comprovar. No entanto, a forma de transmissão horizontal através de contacto direto, como feridas abertas, mordeduras e lambeduras, poderá explicar a presença de casos clínicos em áreas não endémicas e onde não existam vetores (Otranto *et al.*, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2009; Mattin, *et al.*, 2014; Maia & Cardoso, 2015).

1.2.3.2. Patogenia e sinais clínicos

Em áreas endémicas, um grande número de cães infetados pode ser assintomático e quando apresentam sinais clínicos estes são muito variáveis (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Mattin *et al.*, 2014; Dincer *et al.*, 2015). A existência ou não de sinais, assim como a sua intensidade, dependem de vários fatores tais como da resposta imunitária e história clínica (Bates, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2009; Foroughi-Parvar & Hatam, 2014; Pennisi, 2015).

Relativamente à multiplicação e disseminação do agente, estes estão dependentes do balanço entre uma resposta imune protetora mediada por células e uma resposta humoral não protetora (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Pennisi, 2015). Isto é, os linfócitos T CD4⁺ vão definir se o sistema imunitário avança para uma resposta Th1 (mediada por células) ou para uma resposta Th2 (humoral) (Solano-Gallego *et al.*, 2009; da Silva *et al.*, 2014; Foroughi-Parvar & Hatam, 2014). A ativação de células T leva à secreção de citocinas, interferão gama (IFN- γ), interleucina dois (IL-2) e fatores de necrose tumoral alfa (TNF- α), que vão estimular a morte intracelular dos amastigotas através da produção de radicais oxidativos tóxicos (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Foroughi-Parvar & Hatam, 2014).

O aumento da suscetibilidade do animal à doença está associado a uma forte resposta humoral e uma reduzida resposta celular. Isto porque há uma depleção dos linfócitos T nos órgãos linfóides e uma proliferação de linfócitos B, resultando numa produção excessiva de anticorpos ineficaz no combate ao parasita conduzindo ao aparecimento de sinais clínicos (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Foroughi-Parvar & Hatam, 2014). Existe também uma proliferação de células plasmáticas, macrófagos e histiócitos, causando uma linfadenomegália

generalizada, hepatoesplenomegália e hiperglobulinemia (Sollano-Gallego *et al.*, 2009; Campino & Maia, 2013; Andrade *et al.*, 2014; Foroughi-Parvar & Hatam, 2014).

A exuberante atividade das células B, com a libertação massiva de imunoglobulinas (Da Franca *et al.*, 2005; Dincer *et al.*, 2015), leva a formação de grandes quantidades de imunocomplexos (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Dincer *et al.*, 2015) que se depositam nas paredes dos vasos sanguíneos e rins podendo causar vasculites, poliartrites, uveítes e glomerulonefrites (Solano-Gallego *et al.*, 2009; ESCCAP, 2012; Pennisi, 2015).

Nos cães considerados resistentes, os parasitas permanecem localizados na pele ou atingem apenas o linfonodo regional. Estes animais permanecem assintomáticos devido a uma fraca resposta humoral (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Pennisi, 2015).

O primeiro sinal clínico de leishmaniose é a lesão cutânea focal, causada pela picada do flebótomo fêmea, sendo os locais mais comuns, as orelhas, o nariz e as zonas glabras (ESCCAP, 2012; Campino & Maia, 2013; Roberts *et al.*, 2015). Esta lesão pode ser em forma de pápula simples ou ulcerada, podendo demorar semanas a sarar, mas, normalmente, são auto-limitantes, e muitas vezes passam despercebidas (da Silva *et al.*, 2014; Roberts *et al.*, 2015). O passo seguinte da infecção é o aparecimento de linfadenopatia local ou generalizada, acompanhada com perda de peso, anorexia e astenia (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Cortes *et al.*, 2012; Campino & Maia, 2013; da Silva *et al.*, 2014; Foroughi-Parvar & Hatam, 2014). Nos casos mais graves aparecem sinais cutâneos, normalmente não pruríticos e simétricos, como alopecia, nódulos, úlceras, hiperqueratose, dermatite esfoliativa, lesões mucocutâneas e onicogribose (Solano-Gallego *et al.*, 2009; ESCCAP, 2012; Foroughi-Parvar & Hatam, 2014; Hernández *et al.*, 2015). Outros sinais também descritos são: atrofia muscular, esplenomegália, epistáxis, hematúria, vômitos, diarreia, colites crônicas, poliartrite, glomerulonefrite com poliúria e polidipsia, blefarites, conjuntivites, uveíte, queratoconjuntivite e desordens neurológicas (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Cortes *et al.*, 2012; Campino & Maia, 2013; da Silva *et al.*, 2014; Foroughi-Parvar & Hatam, 2014; Roberts *et al.*, 2015).

O quadro clínico pode ser agravado com outras doenças, como demodicose, piodermite, pneumonia, erliquiose, hepatozoonose, babesiose ou dirofilariose (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Dincer *et al.*, 2015; Hernández *et al.*, 2015). Em casos mais graves e que não seja controlada a evolução da doença, o animal pode mesmo morrer (ESCCAP, 2012; Hernández *et al.*, 2015).

1.2.3.3. Epidemiologia

A leishmaniose é uma doença endêmica em 98 países, com mais de 310 milhões de pessoas em risco de contrair a infecção (WHO, 2012). Em seres humanos, a leishmaniose pode ser classificada em três formas, de acordo com as manifestações clínicas e as espécies envolvidas (WHO, 2012): leishmaniose cutânea (LC); leishmaniose mucocutânea; e leishmaniose visceral (LV). Esta última é a mais severa, sendo causada pelas espécies *L. donovani* e *L. infantum* (sinónimo de *L. chagasi* no Novo Mundo) (WHO, 2012).

Relativamente à leishmaniose canina (LCan), causada por *L. infantum* sabe-se que é endêmica em 50 países, repartidos pela Ásia, Norte de África, Europa, Centro e Sul da América (Campino & Maia, 2013).

Os canídeos para além de serem hospedeiros de *L. infantum* são reservatórios da leishmaniose visceral humana, com um papel importante na manutenção do parasita no ciclo doméstico (Gramiccia, 2011; Cortes *et al.*, 2012; Campino & Maia, 2013; Foroughi-Parvar & Hatam, 2014). Os cães são muito suscetíveis a este parasita, no entanto, em áreas endêmicas, um largo número de animais infetados e seropositivos não desenvolvem sinais clínicos, embora continuem a ter a capacidade de transmitir o parasita ao vetor (Campino & Maia, 2013; Foroughi-Parvar & Hatam, 2014; Cantacessi *et al.*, 2015; Dincer *et al.*, 2015).

De acordo com Franco *et al.* (2011) e com base em dados obtidos a partir de 947 inquéritos (504 369 cães testados entre 1971 e 2006), a seroprevalência média de LCan nos países do Sul da Europa (Portugal, Espanha, França e Itália) é de 10%, sendo mais elevada em Itália (17,7%), seguida pela França (8%), Portugal (7,3%) e Espanha (5,9%). Em 2009 foi realizado o primeiro inquérito seroepidemiológico nacional de LCan tendo-se obtido uma prevalência de 6,31% (Cortes *et al.*, 2012), corroborando o estudo de Franco *et al.* (2011). Castelo Branco, Portalegre e Beja foram os distritos mais afetados com uma prevalência superior a 10%, enquanto Aveiro, Braga e Viana do Castelo foram os distritos que apresentaram o menor número de cães seropositivos (inferior a 1%) (Cortes *et al.*, 2012). Devido à pouca informação epidemiológica relativa à infecção por *Leishmania* spp. nos gatos nos últimos anos realizaram-se em Portugal vários estudos epidemiológicos tendo-se obtido por biologia molecular uma prevalência entre 20,3% e 30,4% na região de Lisboa (Maia *et al.*, 2008; 2010), de 0,3% no norte e centro (Vilhena *et al.*, 2013) e 9,9% no sul do país (Maia *et al.*, 2014a).

Durante o mesmo período realizaram-se vários inquéritos flebotomínios nas regiões centro e sul, tendo-se encontrado *P. ariasi* e *P. perniciosus* infetados com *L. infantum* (Cortes *et al.*, 2007; Maia, *et al.*, 2009; 2013; 2015; Branco *et al.*, 2013).

1.2.3.4. Diagnóstico

O diagnóstico direto (Fig. 13) é possível através da identificação de amastigotas livres ou dentro de monócitos, macrófagos e neutrófilos, em exames citológicos de linfonodos superficiais, de medula óssea ou pele, com coloração Giemsa ou Diff-Quick (Maia & Campino, 2008; ESCCAP, 2012; Hernández *et al.*, 2015).

Nas análises laboratoriais é possível encontrar anemia normocítica normocrômica, não regenerativa, trombocitopénia, leucopénia, alterações dos níveis de proteína plasmática, hiperglobulinémia e hipoalbuminémia, proteinúria, azotemia e aumento do rácio proteína/creatinina (Solano-Gallego *et al.*, 2009; ESCCAP, 2012).

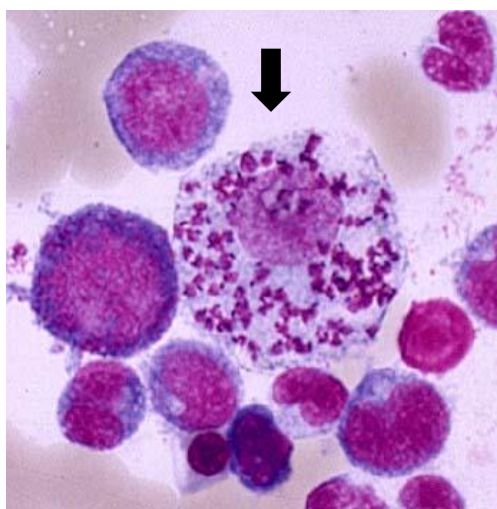


Figura 13 – Formas amastigotas de *Leishmania* sp. (seta) num esfregaço sanguíneo de cão corado com Diff-quick (500x, www.vetnexus.com, 2015)

A análise histopatológica de órgãos infetados corados com hematoxilina e eosina também tem permitido identificar formas amastigotas (Da Franca *et al.*, 2005; Maia & Campino, 2008; Andrade *et al.*, 2014; Hernández *et al.*, 2015).

A cultura de diferentes tecidos aumenta a sensibilidade da deteção do parasita, com uma especificidade de 100%, sendo a única técnica que permite isolar os parasitas e observar promastigotas (Bates, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2009; Gramiccia, 2011; Roberts *et al.*,

2015). No entanto, é uma técnica pouco utilizada devido ao tempo que demora para se obter os resultados (entre uma a cinco semanas), à suscetibilidade de contaminação microbiológica, ao facto de estar dependente da carga parasitária e de não existir um meio cultura “universal” em que todas as espécies de *Leishmania* cresçam com facilidade (Maia & Campino, 2008; Gramiccia, 2011).

O método mais rápido e por isso mais utilizado no diagnóstico é a serologia para pesquisa de anticorpos circulantes anti-*Leishmania*. Os testes serológicos apresentam elevada sensibilidade e especificidade, no entanto têm a limitação de não diagnosticar a doença numa fase em que ainda não se produziram anticorpos, ou seja, não tenha ocorrido seroconversão (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Foroughi-Parvar & Hatam, 2014; Hernández *et al.*, 2015; Pennisi, 2015). Resultados positivos através das técnicas serológicas podem significar apenas o contacto do animal com o parasita, sem que ocorra doença. A diminuição dos níveis de anticorpos pode indicar a diminuição da carga parasitária, não significando necessariamente a eliminação total do parasita (Baneth, 2012).

As técnicas mais utilizadas no diagnóstico da leishmaniose canina são a IFI, aglutinação direta (DAT) e ELISA (Maia & Campino, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009; Foroughi-Parvar & Hatam, 2014; Dincer *et al.*, 2015; Toledo-Machado *et al.*, 2015).

Atualmente, existem testes rápidos baseados na imunocromatografia e kits comerciais para serem realizados nas clínicas ou em estudos epidemiológicos. Contudo, a sensibilidade não é suficiente para se definir o diagnóstico com base apenas nestes testes (Cristovão, 2014).

Os métodos moleculares são usados para o diagnóstico e/ou identificação das espécies de *Leishmania* não só em casos ativos de infeção, como também na monitorização após o tratamento (Maia & Campino, 2008; L. Solano-Gallego *et al.*, 2009; Foroughi-Parvar & Hatam, 2014). O diagnóstico por PCR pode ser realizado a partir de ADN extraído de diferentes tipos de amostra, como sangue total, “buffy coat”, punção de baço, conjuntiva, linfonodos, medula óssea e pele (Maia & Campino, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2015; Pennisi, 2015). Contudo, os resultados obtidos por PCR a partir de diferentes amostras de cães infetados são por vezes conflituosos (Maia *et al.*, 2009). Este acontecimento pode ser explicado pela distribuição heterogénea do parasita em cada tecido e pela carga parasitária (Campino & Maia, 2013). Por outro lado, resultados falsos positivos também podem ocorrer se se utilizar como amostra biológica o sangue periférico, principalmente se a recolha for realizada em épocas de transmissão (durante a época de atividade flebotomínica), devido à contaminação

natural ou infecção transitória (Maia *et al.*, 2009; Campino & Maia, 2013). No entanto, os resultados de PCR positivos, utilizando amostras de sangue periférico obtidas fora da época de transmissão, indicam uma infecção “verdadeira” (Maia *et al.*, 2009; Campino & Maia, 2013; Cristovão, 2014).

A utilização simultânea de duas técnicas com fundamentos diferentes permite uma maior eficácia no diagnóstico da infecção (Maia & Campino, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2015; Pennisi, 2015).

1.2.3.5. Tratamento

A terapêutica da leishmaniose canina é geralmente onerosa, de longa duração e em muitos casos com resultados pouco satisfatórios (Foroughi-Parvar & Hatam, 2014). Muitos animais após o tratamento permanecem portadores do parasita, com capacidade de transmitir o protozoário ao vetor e as recidivas são frequentes (Hernández *et al.*, 2015). Por isso, estão disponíveis várias abordagens, com diferentes fármacos, posologias e duração de tratamento (ESCCAP, 2012).

Os fármacos mais utilizados incluem o antimoniato de meglumina (1ª linha) ou a miltefosina (2ª linha), associados ao alopurinol (ESCCAP, 2012; Hernández *et al.*, 2015; Pennisi, 2015). Outra opção é a utilização de domperidona (Gómez-Ochoa *et al.*, 2009).

A administração de antimoniato de meglumina pode ser feita uma vez por dia durante quatro a oito semanas, na dose de 75-100 mg/Kg (Solano-Gallego *et al.*, 2009; ESCCAP, 2012; Pennisi, 2015).

A administração de alopurinol deve ser BID ou TID na dose de 10-20 mg/Kg por via oral durante seis a dezoito meses, apresentando resultados satisfatórios, observando-se a eliminação de sinais clínicos após alguns meses. O aparecimento de cristais de xantina é muito comum nos tratamentos com este fármaco, pelo que, devem ser realizadas urianálises e ecografias abdominais regulares (Solano-Gallego *et al.*, 2009; ESCCAP, 2012; Mattin *et al.*, 2014; Pennisi, 2015).

A miltefosina deve ser administrada por via oral na dose 2 mg/Kg SID durante quatro semanas (Solano-Gallego *et al.*, 2009; ESCCAP, 2012; Roberts *et al.*, 2015)

A domperidona é um antagonista dos receptores dopaminérgicos D2 cuja administração repetida em cães saudáveis induz um aumento progressivo da atividade fagocitária das

populações de neutrófilos e monócitos na circulação periférica, o qual resulta numa maior resistência destas células frente à infecção. Deve ser administrada por via oral na dose 1mg/Kg BID durante, pelo menos, um mês (Gómez-Ochoa *et al.*, 2009).

A maioria dos animais demonstra melhorias no primeiro mês após a instituição da terapêutica, sendo que a existência de insuficiência renal piora o prognóstico (Solano-Gallego *et al.*, 2009). A utilização de terapia sintomática e dieta apropriada para os sinais clínicos pode ajudar no tratamento. Um exemplo é a utilização de imunomoduladores (prednisona ou prednisolona) eficazes no tratamento de lesões causadas por imunocomplexos (ESCCAP, 2012).

1.2.3.6. Saúde Pública

No sul da Europa, a LV causada por *L. infantum* é uma zoonose que afeta principalmente crianças e adultos imunocomprometidos, nomeadamente em indivíduos infetados pelo VIH (WHO, 2012).

Embora os cães sejam considerados os principais reservatórios de *L. infantum*, a principal via de infecção nos humanos é através do vetor (Baneth, 2006b). Por outro lado, a posse de cães com leishmaniose não parece constituir um risco acrescido de infecção para os donos, embora o risco seja inferior se os cães infetados forem tratados (ESCCAP, 2012; ONLeish, 2013; Pennisi, 2015).

1.3. Medidas profiláticas

Os artrópodes fazem parte do grupo dos ectoparasitas que incluem a classe Arachnida (carraças e ácaros) e a classe Insecta (pulgas, mosquitos e flebótomos). As infestações por estes ectoparasitas podem resultar em lesões cutâneas, induzir respostas imunopatológicas e levar à transmissão de agentes patogénicos (tais como, bactérias e parasitas) (ESCCAP, 2012).

O controlo dos agentes transmitidos por artrópodes vetores passa principalmente pela prevenção, evitando infestações de ectoparasitas (Domingos *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2013). O desenvolvimento de resistências por parte dos vetores aos desparasitantes tem conduzido à reformulação dos planos de prevenção, com a utilização mais regular e rotacional dos ectoparasiticidas.

A prevenção de infestações de carraças nos animais de companhia pode ser realizada com colares, comprimidos orais, “spot-on” e “sprays”, estando disponíveis no mercado vários

produtos, que incluem permetrinas, amitraz, fipronil ou imidaclopride (Solano-Gallego & Baneth, 2011). Para além disso, é importante evitar ou limitar o acesso a zonas com alta densidade de carraças, principalmente nas épocas do ano com pico de atividade, e aplicar acaricidas de ação residual e resistentes à água (ESCAAP, 2010).

Os inseticidas tópicos utilizados contra as infestações por pulgas nos animais domésticos incluem imidaclopride, selamectina e fipronil sob a forma de coleiras, “spot-on” e comprimidos orais (Schnieder *et al.*, 2008; Beugnet & Franc, 2012). As pulgas adultas representam apenas uma proporção muito pequena da população total de pulgas, pelo que o controlo dos estádios imaturos (fases de desenvolvimento fora do hospedeiro) deve ser sempre tido em consideração, especialmente em casos de infestações graves (ESCAAP, 2010). Como tal, além de tratar o animal, é importante a implementação de medidas de controlo do ambiente para uma eliminação eficaz de pulgas através da aplicação de produtos inseticidas e da aspiração e limpeza dos locais frequentados pelos animais de casa (ESCCAP, 2010; Rhodes, 2011). As medidas para o controlo de infestações de pulgas no exterior envolvem a remoção de detritos orgânicos, a rega regular do relvado e o corte da vegetação para permitir a penetração da luz solar.

As medidas de prevenção contra as picadas de flebótomos recomendadas nos canídeos incluem a redução de exposição a estes e a aplicação de inseticidas com ação repelente (ESCAAP, 2010; ONLeish, 2013). Os piretróides sintéticos aplicados sob a forma de colar ou formulações “spot-on” são os produtos mais amplamente usados nos canídeos (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Gramiccia, 2011; Pennisi, 2015; Talbi *et al.*, 2015). Vários estudos têm demonstrado que o uso regular destes compostos durante a época de atividade flebotomínica reduz significativamente o risco dos cães serem infetados por *L. infantum* (ESCAAP, 2010; Maia & Campino, 2011). A pulverização e higienização dos locais onde os animais descansam, permite diminuir o risco de transmissão, tal como, a colocação de redes impregnadas com piretróides nas janelas, de modo a não permitir a entrada do vetor para o interior das habitações (Cortes *et al.*, 2012; Maia *et al.*, 2013; Talbi *et al.*, 2015). Outra medida de diminuir a interação vetor-cão, é evitar os passeios no exterior depois de escurecer até ao amanhecer, durante a época de transmissão vetorial (Solano-Gallego *et al.*, 2009; ESCCAP, 2012; Foroughi-Parvar & Hatam, 2014).

A utilização da vacinação contra as DTAV ainda não reuniu consenso, visto a variação genética entre as espécies dos agentes patogénicos impedir a proteção cruzada, ou originar

pouca imunidade e causar demasiadas reações adversas. Para tal, estão-se a desenvolver vacinas que induzam a imunidade a partir de polipéptidos específicos do agente para impedir a infeção e/ou desenvolvimento de doença (Hartmann, *et al.*, 2013a).

Atualmente, em Portugal, existem vacinas para borreliose, babesiose e leishmaniose caninas. Para o complexo *Borrelia burgdorferi* s.l. existem duas vacinas (Nobivac[®] Lyme, Nobivac e Merilym3[®], Merial), ambas baseadas na criação de anticorpos contra a OspA, podendo ser utilizadas em animais seronegativos ou que tenham sinais ligeiros de artrite. No caso da babesiose existe uma vacina contra *B. canis* (Pirodog[®], Merial) e outra contra *B. canis* e *B. rossi* (Nobivac Piro[®], Nobivac); ambas as vacinas são baseadas em antigénios solúveis do parasita (Caeiros, 2012; Hartmann, *et al.*, 2013b) podendo ser administradas em animais seronegativos. Para a prevenção de LCan em cães sem anticorpos anti-*Leishmania* encontra-se disponível uma vacina (Canileish[®], Virbac), baseada em proteínas secretadas-excretadas dos promastigotas de *L. infantum*. Esta vacina reduz o risco de infeção ativa e de doença clínica (Oliva *et al.*, 2014).

2. Objetivos

Este estudo teve como objetivo geral determinar a prevalência de infeções causadas por protozoários e bactérias transmitidas por artrópodes vetores, tendo por base uma amostra de canídeos residentes no Sul de Portugal. O objetivo específico consistiu em determinar a relação das características intrínsecas e extrínsecas (idade, sexo, raça, modo de vida, desparasitações, viagens e infeções concomitantes) dos animais da amostra com a presença dos diferentes agentes patogénicos identificados.

3. Material e Métodos

O presente estudo foi aprovado pelas comissões de Ética do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa e da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Todos os proprietários dos cães foram informados do estudo, tendo sido a participação dos canídeos, nomeadamente a colheita de sangue e utilização dos dados relativos ao paciente, autorizada pelos mesmos. A participação dos canídeos errantes foi autorizada pelos respetivos responsáveis dos abrigos.

3.1. Área geográfica do estudo

Este estudo foi realizado em 11 CAMV e 6 abrigos dos distritos de Lisboa, Setúbal e Faro. Lisboa é um distrito com uma área de 2.761 Km² dividido em 16 municípios, com uma população a rondar os dois milhões de habitantes. Os invernos curtos e verões longos e quentes dão ao distrito um clima temperado. Mesmo nos meses mais frios, de Dezembro a Março as temperaturas não descem a pontos extremos, apenas aparentam ser mais frias devido à proximidade com o rio (Instituto Nacional de Estatística, 2008; DMPU, 2009).

O distrito de Setúbal fica a 32 km de Lisboa, na margem norte da foz do rio Sado ladeada pela Serra da Arrábida. Tem uma área de 5.064 Km² dividido em 13 municípios com 800 mil habitantes residentes. Toda a região de Setúbal apresenta um clima misto, subtropical e mediterrânico, com fracas amplitudes térmicas devido à sua proximidade com o mar e a presença dos rios Tejo e Sado. O período de insolação é bastante elevado ao longo de todo o ano e a precipitação é reduzida (INE, 2008; CMS, 2013).

O distrito de Faro representa a região do Algarve, apresentando uma área de 4.960 km² dividida em 16 municípios e uma população residente de 434.023 habitantes. O clima é oceânico, com temperatura amena durante todo o ano e com apenas dois meses mais chuvosos, Novembro e Dezembro (INE, 2008; Costa, 2012).

3.2. Caracterização da amostra

A população em estudo foi constituída por 1.010 cães. A recolha de amostras foi realizada entre Dezembro de 2011 e Abril de 2014, por motivos médicos ou consultas de rotina. Durante a recolha da amostra foi preenchido um questionário pelos proprietários e médicos veterinários, de modo a obterem-se informações sobre idade, sexo, raça, região, estilo de vida e exposição a artrópodes, desparasitação e sinais clínicos compatíveis com doenças transmitidas por vetores (Apêndice I).

Para as amostras de animais errantes foram preenchidos os mesmos inquéritos descritos anteriormente, mas certas informações, como a idade, foram estimadas, e outras mantiveram-se desconhecidas, como as medidas profiláticas.

3.3. Critérios de inclusão

Para efeitos do estudo, visando o objetivo geral, utilizou-se apenas como critério de inclusão, cães provenientes do Sul de Portugal, que se apresentaram nos CAMV ou que habitavam em abrigos.

4. Protocolo

4.1. Colheita e processamento de amostras de sangue periférico

Após tricotomia e assepsia com álcool etílico a 70% obtiveram-se, por venopunção de veias periféricas (veia cefálica, femoral ou jugular), amostras de sangue periférico. Para a recolha das amostras foram utilizadas seringas e agulhas de acordo com o tamanho dos animais, colhendo-se cerca de 1-2 ml de sangue por cão, no qual uma pequena quantidade de amostra foi utilizada para impregnar uma área correspondente a uma moeda de 2 euros em papel de filtro (Whatman® número 3). As amostras foram secas à temperatura ambiente e previamente, cada papel de filtro foi identificado com o número da amostra e com a data da recolha, tendo sido armazenados a 4°C até serem analisados.

4.2. Pesquisa de ADN de *Anaplasma* spp./ *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Borrelia burgdorferi* s.l., *Hepatozoon* spp. e *Leishmania infantum*

Para realização da PCR foram executados vários passos. Como primeiro passo, foi feita a extração do ADN diretamente do papel de filtro, seguida de um controlo de qualidade de extração através da quantificação do ADN por espectrofotometria (Nanodrop 1000, Thermo Scientific).

Após a confirmação da extração de ADN de cada amostra, foi realizada a amplificação do segmento do agente patogénico em estudo. Em todas as amplificações foram utilizados controlos positivos (previamente sequenciados e específicos para cada agente que se pretendia detetar) e controlos negativos. As técnicas de extração de ADN e a PCR foram realizadas em áreas separadas, previamente desinfetadas com lixívia de forma a prevenir possíveis contaminações.

Todos os produtos de PCR, assim como um marcador de massa molecular de 100 pb de ADN, foram corridos por eletroforese em gel de agarose a 1,5% a 120 V e 400 mA, durante 60 minutos (exceto para *Bartonella* spp. e *Hepatozoon* spp. em que se usou 130 V durante 80 min), observados no transiluminador e fotografados no sistema UVIDOC.

Após a visualização dos produtos de PCR, os que apresentavam uma quantidade suficiente de ADN foram enviados para sequenciação.

4.2.1. Extração de ADN a partir de papel de filtro impregnado com sangue periférico

Para a extracção do ADN a partir de sangue impregnado em papel de filtro (fig. 14) utilizou-se um método rápido comercial (Kit Citogene®, Citomed, Portugal), de acordo com as instruções do fabricante.



Figura 14 – Papel de filtro impregnado com sangue de cão (Original)

Deste modo, utilizaram-se 4 discos do papel de filtro, de 4 mm de diâmetro cada, os quais foram a incubar num tubo de 1,5 ml em 150 µl de tampão de lise e 1,5 µl de Proteinase K (20 mg/ml), durante 15 min a 65°C em placa térmica, seguida de uma incubação a 55°C durante 2 horas, em banho-maria, invertendo os tubos a cada 30 minutos. Terminada a incubação, retiraram-se as amostras do banho-maria, deixando o lisado arrefecer à temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado a cada amostra 100 µl de solução de precipitadora de proteínas e, de modo a obter uma mistura uniforme, usou-se o vórtex a velocidade elevada durante vinte segundos, seguindo-se uma centrifugação a 20817g, durante 15 min, a 4°C, para haver a formação de um “pellet” compacto de proteína.

Após a centrifugação, transferiu-se 200 µl de sobrenadante (ADN) para novos tubos contendo 300 µl de Isopropanol a 100% e a mistura, depois de invertida 50 vezes, foi centrifugada a 20817g, 5 min, a 4°C. Após rejeição do sobrenadante, adicionaram-se 300 µl de

etanol a 70% e, para garantir a lavagem do “pellet”, inverteu-se suavemente o tubo várias vezes. Procedeu-se a nova centrifugação a 20817g, durante 1 min, a 4°C, seguido da rejeição do sobrenadante e colocação dos tubos com a tampa aberta numa posição invertida, sobre papel absorvente, na estufa a 52°C até que o ADN estivesse completamente seco, tendo sido posteriormente adicionado 30 µl de tampão de hidratação de ADN a cada amostra e incubado à temperatura ambiente durante a noite. No dia seguinte, as amostras foram armazenadas a -20°C até à realização das PCR.

4.2.2. Pesquisa de ADN de *Babesia* spp.

Os “primers” escolhidos para a pesquisa de babesiose Piro A: 5’ AATACCCAATCCTGACACAGGG 3’ e Piro B: 5’ TTAAATACGAATGCCCCCAAC 3’ tiveram como referência o protocolo utilizado por Harrus *et al.* (2011b).

De acordo com o protocolo, para cada amostra (5 µl de ADN), preparou-se 20 µl de mistura de reação constituída por 10,3 µl de água bidestilada, 5 µl tampão de reação [tampão NH₄ (5X): 160mM (NH₄)₂SO₄; 670mM Tris-HCl; pH 8,8 (25°C)], 2 µl de solução de Mg²⁺ (25mM MgCl₂), 0,5 µl de dNTPs (10 mM), 1 µl de cada “primer” Piro A e Piro B (10pmol/µl cada) e 0,2 µl de enzima Taq polimerase (5U/µl). Utilizou-se 1 µl de ADN genómico de *Babesia canis* como controlo positivo e 5 µl de água bidestilada como controlo negativo.

As condições ótimas para a amplificação por PCR foram as seguintes: uma desnaturação inicial a 94°C durante 3 min, seguido de 35 ciclos constituídos por uma desnaturação a 94°C durante 30 seg., ligação dos “primers” a 64°C durante 45 seg. e uma extensão a 72°C durante 30 seg. Para finalizar este ultimo ciclo, realizou-se uma extensão final a 72°C durante 7 min. Os produtos de PCR, constituídos por 408 pb, foram visualizados por electroforese em 1,5% de gel de agarose.

4.2.3. Pesquisa de ADN de *Bartonella* spp.

Para a detecção de ADN de *Bartonella* spp. foram utilizados os “primers” Bart F: 5’ CTTGAGATGATGATCCCAAGCCTTCTGGCG 3’ e Bart R: 5’ GAACCGACGACCCCCTGCTTGCAAAGCA 3’ (Diniz *et al.*, 2007).

Para cada amostra (5 µl de ADN) adicionou-se uma mistura de reação de 20 µl constituída por 11 µl de água bidestilada, 5 µl de tampão de reação [tampão NH₄ (5X): 160mM (NH₄)₂SO₄; 670mM Tris-HCl; pH 8,8 (25°C)], 2 µl de solução de Mg²⁺ (25mM MgCl₂), 0,5

μl de dNTPs (10 mM), 0,6 μl de cada “primer” Bart F e Bart R (10pmol/μl cada), e 0,3 μl de enzima Taq polimerase (5U/μl). No controlo positivo adicionou-se 1 μl de ADN genómico de *Bartonella* spp e no controlo negativo adicionou-se 5 μl de água bidestilada.

As condições ótimas para as amplificações por PCR foram: desnaturação inicial a 95°C durante 5 min, seguida de 55 ciclos com uma desnaturação a 95°C durante 15 seg., ligação dos “primers” a 66°C durante 15 seg. e extensão a 72°C durante 15 seg. A amplificação foi completada com uma extensão final a 72°C durante 1 min, obtendo-se assim produtos de amplificação de 500-800 pb com posterior visualização por electroforese em 1,5% de gel de agarose.

4.2.4. Pesquisa de ADN do complexo *Borrelia burgdorferi* s. l.

Para a detecção de ADN do complexo *Borrelia burgdorferi* s.l. por *nested* PCR foram utilizados para a primeira PCR os “primers” 132f: 5'-TGGTATGGGAGTTTCTGG-3' e 905r: 5'-TCTGTCATTGTAGCATCTTT-3'; e para a segunda PCR os “primers” 220f: 5'-CAGACAACAGAGGGGAAAT-3' e 823r: 5'-TCAAGTCTATTTTGGAAAGCACC-3' (Wodecka *et al.*, 2010).

Tanto na primeira como na segunda reação é utilizado um volume de 25 μl, onde 5 μl de ADN ou produto da primeira reação foram adicionados a uma mistura de 20 μl constituída por 10,3 μl água bidestilada, 5 μl tampão de reação [tampão NH₄ (1X): 160mM (NH₄)₂SO₄; 670mM Tris-HCl; pH 8,8 (25°C)], 2 μl solução de Mg²⁺ (25mM MgCl₂), 0,5 μl dNTPs (10 mM), 1 μl de cada “primer” (10pmol/μl cada), e 0,2 μl enzima Taq polimerase (5U/μl). No controlo positivo adicionou-se 1 μl de ADN genómico de *Borrelia burgdorferi* s.l. e no controlo negativo adicionou-se 5 μl de água bidestilada.

As condições ótimas para a primeira amplificação por PCR foram: desnaturação inicial a 94,5°C durante 1 min, seguida de 25 ciclos com uma desnaturação a 94°C durante 30 seg., ligação dos “primers” a 52°C durante 30 seg. e extensão a 72°C durante 1 min. A amplificação foi completada com uma extensão final a 72°C durante 5 min, obtendo-se assim produtos de amplificação de 380 pb com posterior visualização por electroforese em 1,5% de gel de agarose.

Na segunda amplificação as condições ótimas foram: desnaturação inicial a 94,5°C durante 1 min, seguida de 40 ciclos com uma desnaturação a 94°C durante 30 seg., ligação dos “primers” a 55°C durante 30 seg. e extensão a 72°C durante 1 min. A amplificação foi

completada com uma extensão final a 72°C durante 5 min, obtendo-se assim produtos de amplificação de 230 pb com posterior visualização por electroforese em 1,5% de gel de agarose.

4.2.5. Pesquisa de ADN de *Ehrlichia* spp./ *Anaplasma* spp.

Para a detecção de ADN de *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp. foram utilizados os “primers” EHR 16SF: 5’ GGTACCYACAGAAGAAGTCC 3’ e EHR 16SR: 5’ TAGCACTCATCGTTTACAGC 3’ (Harrus *et al.* 2011b).

Para cada amostra (5 µl ADN), preparou-se 20 µl de mistura de reação constituída por 10,3 µl de água bidestilada, 5 µl tampão de reação [tampão NH₄ (5X): 160mM (NH₄)₂SO₄; 670mM Tris-HCl; pH 8,8 (25°C)], 2 µl de solução de Mg²⁺ (25mM MgCl₂), 0,5 µl de dNTPs (10 mM), 1 µl de cada “primer” EHR 16SF e EHR 16SR (10pmol/µl cada) e 0,2 µl de enzima Taq polimerase (5U/µl). Como controlo positivo utilizou-se 1 µl de ADN genómico de *E. canis* ou *A. phagocytophilum* e como controlo negativo 5 µl de água bidestilada.

Para amplificação das amostras foram usadas como condições ótimas: uma desnaturação inicial de 95°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos, que incluem uma desnaturação a 94°C durante 30 seg., ligação dos “primers” a 55°C durante 30 seg. e uma extensão a 72°C durante 90 seg., e uma extensão final a 72°C durante 5 min. Os produtos de amplificação constituídos por 345 pb foram visualizados por electroforese em 1,5% de gel de agarose.

4.2.6. Pesquisa de ADN de *Hepatozoon* spp.

Os “primers” utilizados para amplificação de ADN de *Hepatozoon* spp. foram: Hep F: 5’ ATACATGAGCAAAATCTCAAC 3’ e Hep R: 5’ CTTATTCCATGCTGCAG 3’ (Harrus *et al.*, 2011b).

Para a sua realização preparou-se, para cada amostra (5 µl de ADN), 20 µl de mistura de reação constituída por 10,3 µl de água bidestilada, 5 µl tampão de reação [tampão NH₄ (5X): 160mM (NH₄)₂SO₄; 670mM Tris-HCl; pH 8,8 (25°C)], 2 µl de solução de Mg²⁺ (25mM MgCl₂), 0,5 µl de dNTPs (10 mM), 1 µl de cada “primer” Hep F e Hep R (10pmol/µl cada) e 0,2 µl de enzima Taq polimerase (5U/µl). Para o controlo positivo utilizou-se 1 µl de ADN genómico de *H. canis* e para o controlo negativo 5 µl de água bidestilada.

No termociclador, para a amplificação do ADN de *Hepatozoon* spp. presente nas amostras, foram utilizadas as seguintes condições: uma desnaturação inicial a 95°C durante 5

min, seguido de 34 ciclos que incluía uma desnaturação a 95°C durante 20 seg., ligação de “primers” a 56°C durante 30 seg. e uma extensão a 72°C durante 90 seg. A amplificação terminou com uma extensão final a 72°C durante 5 min. Os produtos de amplificação constituídos por 626-666 pb foram visualizados num gel de agarose a 1,5 %.

4.2.7. Pesquisa de ADN de *Leishmania infantum*

Na pesquisa de ADN de *Leishmania infantum* utilizaram-se os “primers” MC1: 5’ GTTAGCCGATGGTGGTCTTG 3’ e MC2: 5’ CACCCATTTTCCGATTTTG 3’ (Cortes *et al.*, 2004).

Para a amplificação preparou-se para cada amostra uma reação com 25 µl de volume que continha 5 µl de ADN da amostra e 20 µl de mistura de reação. Esta era constituída por 5,3 µl de água bidestilada, 5 µl de tampão de reação [tampão NH₄ (10X): 160mM (NH₄)₂SO₄; 670mM Tris-HCl; pH 8,8 (25°C)], 3 µl de solução Mg²⁺ (25mM MgCl₂), 0,5 µl dNTPs (10mM), 3 µl de cada “primer” MC1 e MC2 (5 pmol/µl) e 0,2 µl da enzima Taq Polimerase (5U/µl). Como controlo negativo, foram utilizados 5 µl de água bidestilada em vez de ADN e, como controlo positivo, 2 µl de ADN extraído de uma cultura de massa de promastigotas de *L. infantum*.

As condições ótimas para a PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 2 min, seguido de 30 ciclos que consistia na desnaturação a 94°C durante 20 seg., ligação de “primers” a 60°C durante 20 seg. e extensão a 72°C durante 30 seg., e para finalizar uma extensão final a 72°C durante 5 min. Posteriormente, os produtos de amplificação constituídos por 447 pb foram visualizados por electroforese em 1,5% de gel de agarose.

4.3. Sequenciação e análise dos segmentos de ADN

O ADN amplificado foi enviado para sequenciação (empresa GATC-Biotech, Alemanha), utilizando como iniciadores de sequenciação (uma direção) os mesmos “primers” utilizados na amplificação do agente patogénico em causa.

A análise das sequências nucleotídicas obtidas foi realizada por correspondência no BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) com as sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Um nível de homologia maior ou igual a 99% foi aceite como indicativo de elevado grau de confiança. As sequências obtidas foram depositadas na Base de Dados de ADN do Japão (DDBJ) (<http://www.DDBJ.nig.ac.jp>).

5. Análise estatística

Todos os dados obtidos dos 1.010 cães estudados foram armazenados no software Microsoft Excel 2013®. Para a análise estatística utilizou-se o programa informático SPSS. Statistics 21.0 (IBM SPSS Modeler). Para análise dos dados recorreu-se aos seguintes testes estatísticos: o teste de Mann-Whitney para relacionar os resultados moleculares com a variável idade; e o teste Qui-quadrado para relacionar os resultados moleculares com as variáveis vacinação, estilo de vida, região, raça, desparasitação e viagens. O teste exato de Fisher foi utilizado quando não estavam reunidas as condições para a realização do teste Qui-quadrado, usando um nível de significância de 95% ($p < 0,05$). O teste exato binominal foi usado para calcular os intervalos de confiança, com um nível de confiança de 95%.

6. Resultados

A amostra em estudo foi constituída por 1010 cães, dos quais 521 (51,6%) eram domésticos e 489 (48,4%) errantes. Dentro dos 1004 em que o sexo foi identificado 504 (50,2%) eram fêmeas e 500 (49,8%) machos.

Dos 938 cães em que foi possível saber a idade, 73 (7,8%) tinham menos de um ano (jovem), 576 (61,4%) tinham entre um e oito anos (adulto), e 289 tinham mais de oito anos (sénior). A idade mínima neste grupo foi de um mês e a idade máxima de 19 anos, sendo a média de cinco anos e um mês com um IC 95% [57,74; 63,48].

Dos 1010 animais em estudo 305 (30,2%) eram da região de Lisboa, 453 (44,9%) da região de Setúbal e 252 (25,0%) da região do Algarve (fig. 15). Relativamente ao estilo de vida, 63 (7,4%) eram de interior, 182 (21,4%) tinham acesso ao interior e exterior das habitações, e 607 (71,2%) residiam exclusivamente de exterior das habitações (fig. 16). Cento e sete (10,6%) cães já tinham feito viagens para outras regiões, 12 para França, 5 para a Suíça, 4 para Espanha, mas na sua maioria dentro do país. Em relação às raças, 344 (43,4%) eram de raça definida e 449 (56,6%) eram de raça indeterminada.

REGIÃO

■ Algarve ■ Lisboa ■ Setúbal

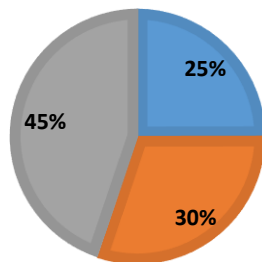


Figura 15 – Caracterização da amostra quanto à região (n=1010)

ESTILO DE VIDA

■ Interior ■ Misto ■ Exterior

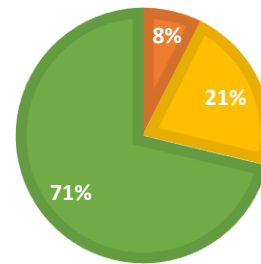


Figura 16 – Caracterização da amostra quanto ao estilo de vida (n=852)

As amostras foram recolhidas na sua maioria no mês de Maio com 36% (n=363) do total, seguido do mês de Abril e Dezembro (Fig. 17)

DATA DE RECOLHA

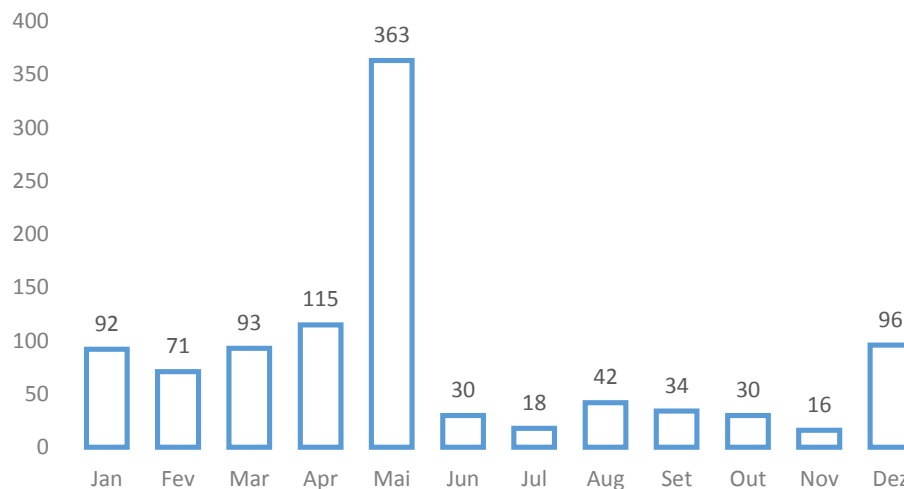


Figura 17 – Distribuição das recolhas de amostras por meses do ano (n=1000)

Relativamente às desparasitações externas, 448 (46,5%) animais eram desparasitados enquanto, 515 (53,5%) não recebiam profilaxia contra ectoparasitas. Os produtos mais utilizados na desparasitação externa foram imidaclopride e permetrinas (Advantix[®], Bayer) e deltametrina (Scalibor[®], MSD). Em termos clínicos, 700 (77,3%) cães foram considerados saudáveis, enquanto 206 (22,7%) apresentavam sinais compatíveis com DTAV nomeadamente manifestações cutâneas (n=84), perda de peso (n=57), anorexia (n=38) e atrofia muscular

(n=28) (fig. 18). Os outros sinais encontrados em menor frequência foram: palidez das mucosas, linfadenopatia, febre, letargia, intolerância ao exercício, lesões oculares, epistáxis, onicogribose, poliúria e polidipsia, claudicação, vômitos e diarreia.

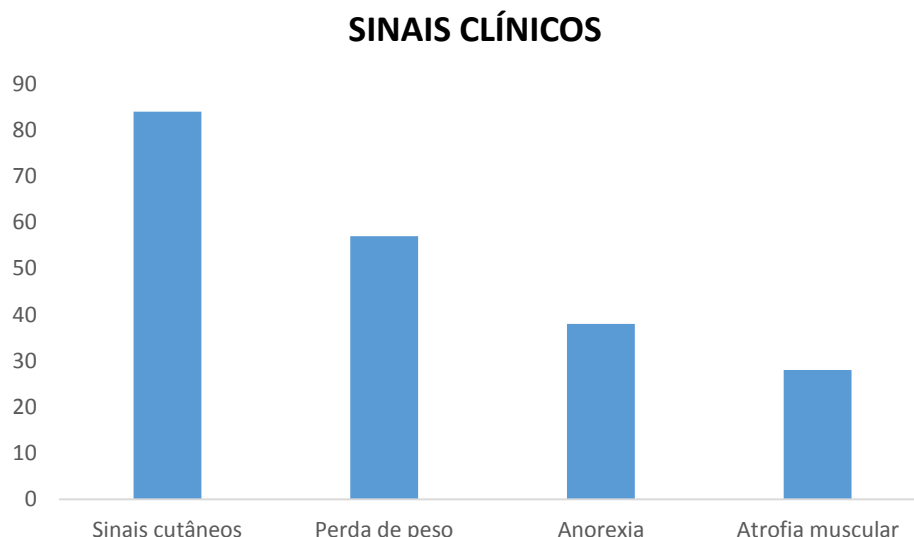


Figura 18 – Caracterização da amostra quanto aos sinais clínicos mais frequentemente reportados (n=206)

6.1. Resultados da pesquisa de ADN de *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Borrelia burgdorferi* s.l., *Anaplasma* spp./ *Ehrlichia* spp., *Hepatozoon* spp. e *L. infantum* através da técnica de PCR

Sessenta e oito (6,7%; IC: 5,3-8,5%) cães foram positivos por PCR pelo menos para um dos agentes em estudo. Sendo que destes, 19 (1,9%; IC: 1,1-2,9%) foram positivos para *Anaplasma* spp./ *Ehrlichia* spp., 8 (0,8%, IC: 0,5-1,5%) foram positivos para *B. burgdorferi* s.l., 31 (3,1%; IC: 2,1-4,3%) para *Hepatozoon* spp. e 11 (1,1%; IC: 0,5-1,9%) para *L. infantum*. Os géneros *Bartonella* e *Babesia* não foram detetados na amostra em estudo.

Dos 68 animais positivos por PCR para pelo menos um agente, 47% eram fêmeas e 53% machos, na sua maioria domésticos (65%) exclusivamente de exterior (56%), sendo que apenas 37% eram desparasitados externamente com regularidade, em maior número com Advantix®. Dos animais com PCR positiva, 10% já tinham viajado para fora das regiões em estudo.

Após sequenciação dos produtos de PCR foram confirmados 5 cães infetados com *A. platys*, 5 com *E. canis*, 6 com *B. burgdorferi* s.l. e 18 com *H. canis*, incluindo 1 animal coinfetado por *A. platys* e *H. canis*.

As datas de recolha revelaram uma percentagem mais elevada de amostras positivas no mês de fevereiro (20%) e julho (22%), ao contrário do mês de novembro em que não se amplificou ADN dos agentes em estudo (Tabela 1).

Tabela 1 – Número de amostras positivas por PCR a pelo menos um dos agentes em estudo por mês

DATA DE RECOLHA (MÊS)	NÚMERO DE AMOSTRAS NEGATIVAS	NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS (%)	TOTAL
Janeiro	89	3 (3%)	92
Fevereiro	57	14 (20%)	71
Março	89	4 (4%)	93
Abril	111	4 (3%)	115
Maio	354	9 (2%)	363
Junho	25	5 (17%)	30
Julho	14	4 (22%)	18
Agosto	36	6 (14%)	42
Setembro	30	4 (12%)	34
Outubro	28	2 (7%)	30
Novembro	16	0 (0%)	16
Dezembro	89	7 (7%)	96

6.2. *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp.

Dos 18 cães positivos para *Anaplasma* spp./ *Ehrlichia* spp. (fig. 19) foi possível identificar por sequenciação que cinco (quatro fêmeas e um macho) se encontravam infetados por *A. platys* e cinco (três fêmeas e dois machos) por *E. canis*. Dezasseis cães eram da região do Algarve, 11 eram exclusivamente de exterior e 12 sem raça definida.

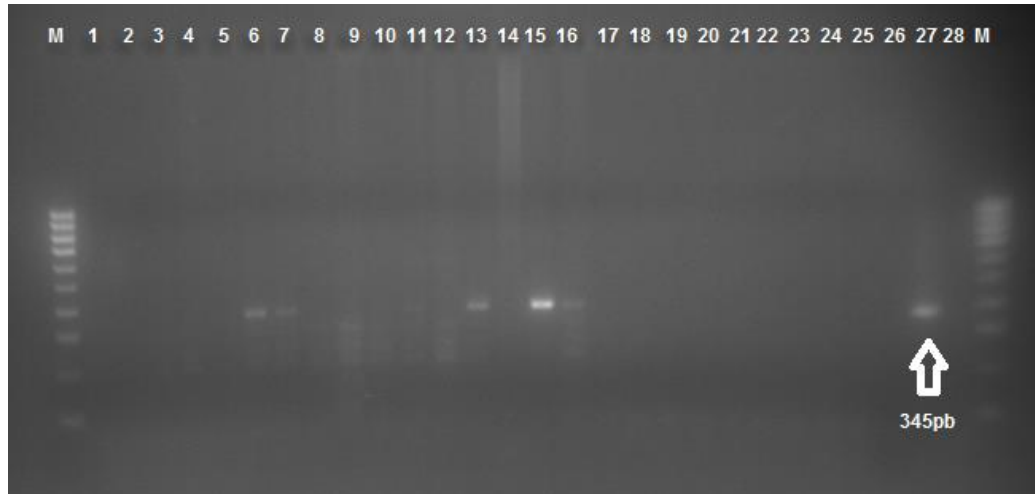


Figura 19 – Electroforese em gel de agarose com os resultados da amplificação de *Anaplasma* spp./ *Ehrlichia* spp.: M – marcador de 100pb; colunas 1-5, 8-12, 14, 17-26 - amostras negativas; colunas 6, 7, 13 e 15-16 – amostras positivas; coluna 27 – controlo positivo (345pb); coluna 28 – controlo negativo (Original)

As amostras de sangue destes cães foram recolhidas entre julho e dezembro nos diversos anos, não havendo dois cães positivos num único mês. Dois dos animais apresentavam sinais clínicos, nomeadamente anorexia, perda de peso, atrofia muscular, intolerância ao exercício, tosse, polidipsia, sinais cutâneos e oculares e apenas um era desparasitado externamente.

Não se verificaram associações estatisticamente significativas entre a infeção por *Anaplasma* spp. e os fatores intrínsecos ($p>0,05$) (Tabela 2). Contudo, os animais da região do Algarve ($p=0,015$), não desparasitados externamente ($p=0,025$) e domésticos ($p=0,025$) apresentaram uma suscetibilidade à infeção significativamente superior.

Tabela 2 – Resultados estatísticos obtidos a partir do teste de Mann-Whitney e teste Exato de Fisher das variáveis intrínsecas e extrínsecas com a presença de infeção por *Anaplasma* spp., p = índice de significância ($p < 0,05$)

FATORES INTRÍNSECOS	ÍNDICE DE SIGNIFICÂNCIA (P)	FATORES EXTRÍNSECOS	ÍNDICE DE SIGNIFICÂNCIA (P)
Idade	0,265	Região (Algarve)	0,015
Raça	0,227	Habitação	0,016
Sexo	0,986	Desparasitação	0,025
		Estilo de vida	0,794
		Viajar	0,581

Das cinco amostras de sangue positivas para *E. canis* duas foram recolhidas no mês de agosto, uma em fevereiro, uma em abril e outra em novembro. A desparasitação externa era efetuada em dois dos cinco animais.

Embora não se tenham verificado associações estatísticas significativas entre a infeção por *Ehrlichia* spp. e os fatores intrínsecos ($p>0,05$) (Tabela 3), os cães oriundos da região do Algarve ($p=0,001$) apresentam uma suscetibilidade superior à infeção por este agente do que os cães das outras regiões estudadas.

Tabela 3 – Resultados estatísticos obtidos a partir do teste de Mann-Whitney e teste Exato de Fisher das variáveis intrínsecas e extrínsecas com a presença de infeção por *Ehrlichia* spp., p = índice de significância ($p < 0,05$)

FATORES INTRÍNSECOS	ÍNDICE DE SIGNIFICÂNCIA (P)	FATORES EXTRÍNSECOS	ÍNDICE DE SIGNIFICÂNCIA (P)
Sexo	0,504	Região (Algarve)	0,001
Idade	0,390	Habitação	0,207
Raça	0,446	Desparasitação	0,550
		Estilo de vida	0,680
		Viajar	0,290

6.3. *Borrelia burgdorferi* s.l.

O ADN de *B. burgdorferi* s.l. foi amplificado em oito amostras e sequenciado em seis cães (quatro fêmeas e quatro machos). Quatro animais eram de raça definida e quatro de raça indeterminada. A maioria dos animais positivos ($n=4$) provinham da região do Algarve, seguida da região de Setúbal ($n=3$). Quatro cães eram desparasitados externamente e apenas um apresentava sinais clínicos, nomeadamente lesões cutâneas e linfadenopatia.

Das oito amostras positivas duas foram recolhidas em fevereiro e duas em junho, estando as restantes distribuídas pelo resto do ano, nomeadamente em janeiro, maio, setembro e novembro.

Não se verificou nenhuma relação entre os vários fatores intrínsecos e extrínsecos com a infeção por *B. burgdorferi* s.l. (tabela 4).

Tabela 4 – Resultados estatísticos obtidos a partir do teste de Mann-Whitney e teste Exato de Fisher das variáveis intrínsecas e extrínsecas com a presença de infecção por *Borrelia burgdorferi* s.l., p = índice de significância ($p < 0,05$)

FATORES INTRÍNSECOS	ÍNDICE DE SIGNIFICÂNCIA (P)	FATORES EXTRÍNSECOS	ÍNDICE DE SIGNIFICÂNCIA (P)
Idade	0,520	Algarve	0,069
Raça	0,446	Habitação	0,453
Sexo	0,504	Desparasitação	0,226
		Estilo de vida	0,583
		Viajar	0,514

6.5. *Hepatozoon* spp.

De 31 cães positivos para *Hepatozoon* spp. por PCR (Fig. 20) confirmou-se por sequenciação que 17 (5 fêmeas e 12 machos) se encontravam infetados por *H. canis*. A maioria dos cães positivos eram animais domésticos de exterior ($n=11$) sem raça definida ($n=12$) e pertencentes à região do Algarve ($n=13$). Dez dos animais não eram desparasitados externamente e apenas dois apresentavam sinais clínicos: lesões cutâneas, linfadenopatia, polidipsia e anorexia.

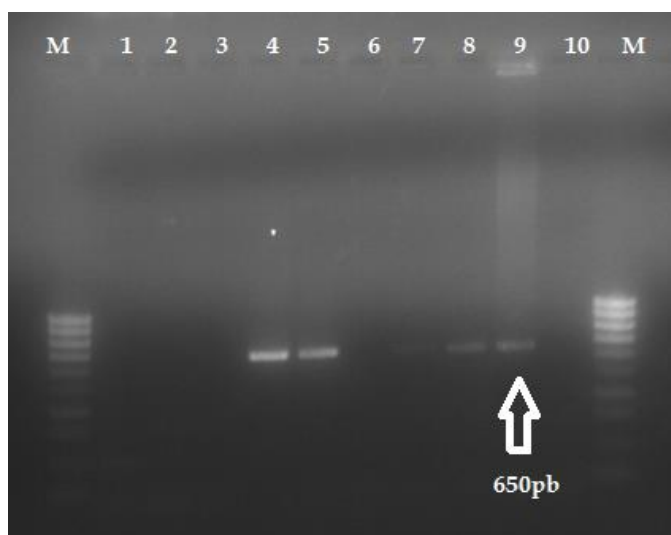


Figura 20 – Eletroforese em gel de agarose com os resultados da amplificação de *Hepatozoon* spp.: M – marcador de 100pb; colunas 1-3, 6 e 7 - amostras negativas; colunas 4,5 e 8 - amostras positivas; coluna 9 – controlo positivo (650pb); coluna 10 – controlo negativo (Original)

Das 31 amostras positivas cinco foram recolhidas no mês de Fevereiro e seis em Maio, estando as restantes distribuídas pelo resto do ano.

Os animais que residiam no Algarve ($p=0,001$) e que não recebiam profilaxia ectoparasiticida ($p=0,034$) apresentaram uma associação estatisticamente significativa com a presença de infecção por *Hepatozoon* spp. (tabela 5).

Tabela 5 – Resultados estatísticos obtidos a partir do teste de Mann-Whitney e teste Exato de Fisher das variáveis intrínsecas e extrínsecas com a presença de infecção por *Hepatozoon* spp., p = índice de significância ($p < 0,05$)

FATORES INTRÍNSECOS	ÍNDICE DE SIGNIFICÂNCIA (P)	FATORES EXTRÍNSECOS	ÍNDICE DE SIGNIFICÂNCIA (P)
Sexo	0,509	Região (Algarve)	0,001
Idade	0,425	Habitação	0,180
Raça	0,216	Desparasitação	0,034
		Estilo de vida	0,160
		Viajar	0,410

6.6. *Leishmania infantum*

Dos 1010 cães em estudo, 11 (quatro fêmeas e sete machos) foram positivos por PCR para *L. infantum*. Dos animais positivos, seis eram cães de raça, seis eram domésticos, cinco residiam exclusivamente no exterior e sete eram da região de Lisboa. Apenas cinco dos animais não eram desparasitados regularmente e três apresentavam sinais clínicos, nomeadamente lesões cutâneas, perda de peso e anorexia.

Das 11 amostras positivas oito foram recolhidas nos meses de Inverno ($p=0,001$), dezembro, janeiro, fevereiro e março. A infecção por *L. infantum* foi estatisticamente superior em animais residentes na região de Lisboa ($p=0,022$) (tabela 6). Não se verificou nenhuma associação entre os restantes determinantes extrínsecos ou intrínsecos e a presença de ADN deste protozoário.

Tabela 6 – Resultados estatísticos obtidos a partir do teste de Mann-Whitney e teste Exato de Fisher das variáveis intrínsecas e extrínsecas com a presença de infecção por *Leishmania infantum*, p = índice de significância ($p < 0,05$).

FATORES INTRÍNSECOS	ÍNDICE DE SIGNIFICÂNCIA (P)	FATORES EXTRÍNSECOS	ÍNDICE DE SIGNIFICÂNCIA (P)
Sexo	0,356	Habitação	0,843
Idade	0,851	Região (Lisboa)	0,022

Raça	0,132	Desparasitação	0,446
		Estilo de vida	0,680
		Viajar	0,180
		Inverno	0,001

6.8. Coinfeção

Apenas um cão doméstico aparentemente saudável encontrava-se coinfetado por *A. platys* e por *H. canis*. Este animal não recebia qualquer tipo de desparasitação externa e habitava na região de Lisboa.

7. Discussão

Este estudo teve como objetivo determinar a prevalência de bactérias e protozoários transmitidos por artrópodes vetores no sangue de cães residentes no Sul de Portugal. Para tal, foi analisada uma amostra de 1010 animais, das regiões de Lisboa, Setúbal e Faro, tendo-se obtido uma prevalência de infeção de 6,7% (n=68). Destes, 67 animais estavam infetados por um único agente e apenas um animal se encontrava coinfetado por *A. platys* e *H. canis*., não tendo sido detetado ADN de *Babesia* spp., ou de *Bartonella* spp. em nenhum dos animais do estudo.

A baixa prevalência de infeção obtida neste estudo poderá estar relacionada com o facto da amostragem ter sido aleatória, ao contrário de outros trabalhos em que a pesquisa dos agentes se baseou em animais suspeitos de estarem infetados por agentes transmitidos por artrópodes vetores (Cardoso *et al.*, 2012; Loftis *et al.*, 2013; Maggi *et al.*, 2014). É também importante realçar que a prevalência obtida no presente estudo foi significativamente menor ($p<0,001$) do que a encontrada em gatos errantes e domésticos (29,9%) provenientes da mesma região (Maia *et al.*, 2014a). Neste caso, as desigualdades nas prevalências podem ser explicadas pela diferença nas espécies estudadas, tanto a nível imunitário como pelo papel dos cães e dos gatos nos ciclos de vida dos agentes em estudo.

A maioria dos cães infetados pertencia à região do Algarve, havendo o mesmo número de machos e fêmeas infetados, com uma ligeira predominância para os animais sem raça definida (n=39), apesar destes também estarem em maior número (n=449) na população total em estudo. Ao contrário dos resultados obtidos por Jittapalapong *et al.* (2006), no presente

estudo os cães errantes não apresentaram uma prevalência de DTAV superior aos domésticos, o que poderá estar relacionado com o facto de serem animais de abrigos e não vadios e, como tal, terão provavelmente uma melhor alimentação assim como acesso a medidas profiláticas e cuidados médicos. Por outro lado, a razão para a maioria dos animais infetados serem domésticos poderá estar relacionada com o facto de, apesar de terem proprietário, viviam ou tinham acesso ao exterior e, como tal, estavam mais expostos aos vetores. É também importante realçar que apenas um terço dos animais infetados era desparasitado externamente. Embora não tenha sido possível aferir a eficácia dos princípios ativos contra os diversos agentes, uma vez que não foi incluído no inquérito inicial a pergunta sobre a regularidade e modo de aplicação dos desparasitantes externos, é de realçar que ainda existem muitos proprietários que não realizam profilaxia contra ectoparasitas nos seus animais (Domingos *et al.*, 2013).

Já pelas datas de recolha foi possível detetar um número mais elevado de amostras positivas no mês de fevereiro, principalmente para *L. infantum* e *Hepatozoon* spp., uma das épocas do ano, que segundo Fankhauser *et al.* (2015) e Leschnik *et al.* (2008) os vetores têm menor atividade, já que tanto os flebótomos como as carraças estão, supostamente, mais ativos a partir do mês de Maio (Dantas-Torres, 2010; Maia *et al.*, 2013). Tendo por base a informação dos artigos atrás citados, pode-se concluir que as amostras positivas nesta época do ano são verdadeiras infeções, uma vez que não há infeções transitórias ou contaminações por causa da menor atividade do vetor (Maia & Cardoso, 2015).

A baixa prevalência para cada um dos agentes encontrada neste estudo relativamente ao trabalho realizado por Cardoso *et al.* (2012), pode ser explicada pelas técnicas de deteção utilizadas. Enquanto a técnica de PCR, utilizado neste estudo, é mais sensível que as técnicas serológicas, utilizadas por Cardoso *et al.* (2012), na deteção de uma infeção ativa, a diferença entre os dois estudos poderá ser explicada pelo facto de nem todos os animais expostos à bactéria ficarem infetados, pelo que o número de animais expostos aos agentes será superior ao número de infetados.

7.1. *Anaplasma* spp.

A presença neste estudo de *A. platys* na região sul do país veio corroborar os resultados previamente obtidos tanto em cães (Alexandre *et al.*, 2009; René-Martellet *et al.*, 2015) como em *R. sanguineus* s.l. (Maia, *et al.*, 2014b). Os resultados do presente trabalho reforçam uma maior suscetibilidade dos cães que habitam na região do Algarve a este agente, seguindo a

tendência observada por Cardoso *et al.* (2012) em que a prevalência de *Anaplasma* spp./ *Ehrlichia* spp. era superior na região sul do país em relação ao norte. Contudo a prevalência de Anaplasmataceae obtida neste estudo (1,9%) foi inferior à encontrada em Espanha (4,0%) (Tabar *et al.*, 2009) e em Itália (3,7-6,0%) (Trotta *et al.*, 2009), podendo a diferença entre estudos estar relacionada com a população-alvo. Isto porque, nos estudos desenvolvidos por estes autores, todos os cães positivos por PCR eram animais que apresentavam sinais clínicos compatíveis com DTAV e internados para tratamento médico, enquanto neste trabalho a maioria dos animais eram aparentemente saudáveis.

A deteção de *Anaplasma* spp. foi significativamente superior em cães que não recebiam tratamento profilático contra ectoparasitas, reforçando a importância da desparasitação externa para diminuir a probabilidade de contrair a infeção. De acordo com Domingos *et al.* (2013) e Leschnik *et al.* (2008), o uso de desparasitantes externos é essencial para o controlo de DTAV, e a sua utilização (princípio ativo e regularidade de aplicação) deverá ser adequada à região e ao contacto do cão com o vetor.

Embora os sinais clínicos apresentados por dois dos cães positivos, nomeadamente perda de peso e anorexia, sejam compatíveis com a infeção de *A. platys*, a presença de lesões cutâneas observada num dos animais infetados apenas se encontra descrita por Berzina *et al.* (2014) em cães infetados por *A. phagocytophilum*. Apesar da infeção por *A. platys* ser normalmente assintomática, a presença de infeções concomitantes e/ou processos imuno-mediados poderão ter sido as responsáveis pela presença de sinais clínicos nos animais.

7.2. *Bartonella* spp.

Apesar do papel dos cães na epidemiologia de *Bartonella* spp. ainda ser desconhecido (Chomel *et al.*, 2006), a infeção por várias espécies de *Bartonella* já foi reportada em cães quer por PCR, quer por serologia na Europa, nomeadamente em Espanha, Itália e Grécia (Yabsley *et al.*, 2008; Zobba *et al.*, 2009; Diniz *et al.* 2009). Em Portugal já se detetou a presença de *Bartonella* spp. em gatos, tanto por biologia molecular (Maia *et al.*, 2014a) como por serologia (Alves, *et al.*, 2009) pelo que a não deteção de cães positivos para o género *Bartonella* no presente estudo poderá estar relacionado uma vez mais com a população em estudo ou com a diferença na resposta imunitária canina e felina à bactéria ou na preferência do vetor por gatos. Por outro lado, e tendo em conta que a bacteriémia pode ser baixa e heterogénea, uma forma de aumentar a sensibilidade da deteção da infeção seria iniciar o diagnóstico por uma cultura de

enriquecimento, de modo a aumentar o número de bactérias, antes de tentar amplificar o material genético de *Bartonella* (Pérez, *et al.*, 2011).

Para se definir com maior rigor a epidemiologia desta infeção nos cães é necessário realizar mais estudos e tentar perceber quais os vetores responsáveis pela transmissão, de preferência recolhidos diretamente dos animais. Só assim será possível perceber se os resultados do presente estudo se devem à baixa prevalência da infeção em cães ou pela ausência de vetores que transmitam o agente aos cães na região sul de Portugal.

7.3. *Borrelia burgdorferi* s.l.

Neste estudo foi possível amplificar pela primeira vez ADN de *B. burgdorferi* s.l. em amostras de sangue de cães de Portugal, embora já tivessem sido detetados animais seropositivos nas regiões do Algarve, Alentejo e Lisboa (Cardoso *et al.*, 2012). A prevalência obtida por PCR neste estudo (0,8%) foi ligeiramente superior à encontrada por técnicas serológicas (0,2% em animais saudáveis e 0,5% em animais suspeitos de DTAV) por Cardoso *et al.* (2012). Contudo, serão necessários mais estudos de modo a determinar se esta é uma DTAV emergente no nosso país, até porque têm aumentado o número de espécies animais diagnosticadas com esta infeção, expondo cada vez mais os seres humanos ao agente (Smith *et al.*, 2012; Ebani *et al.*, 2014; Kramer *et al.*, 2014; Maia *et al.*, 2014; Vera *et al.*, 2014).

7.4. *Ehrlichia* spp.

A prevalência de infeção por *E. canis* (0,5%) no presente estudo foi bastante inferior à encontrada por Cardoso *et al.* (2012) por técnicas serológicas (4,1% em animais saudáveis e 16,4% em animais suspeitos de DTAV) em cães de todo o país, tal como aconteceu nos restantes estudos realizados pela Europa (Aguirre, *et al.*, 2004; Pantchev *et al.*, 2009; Ebani *et al.*, 2014). Isto porque para o presente estudo utilizou-se a técnica de PCR, onde se amplificou ADN do agente, enquanto pelas técnicas serológicas utilizadas nos restantes trabalhos foram detetados anticorpos produzidos não só pela presença de infeções verdadeiras mas também por contacto com esta bactéria.

No presente estudo a prevalência de infeção por *E. canis* foi significativamente superior ($p=0,001$) nos cães residentes no Algarve, corroborando os resultados obtidos através de técnicas serológicas realizadas em cães (Cardoso *et al.*, 2012) e através de técnicas

moleculares em gatos (Maia *et al.*, 2014a), o que poderá estar associado com as condições ambientais favoráveis ao vetor *R. sanguineus* s.l. no sul do país.

7.5. *Babesia* spp.

Embora já tenha sido detetado *B. canis* e *B. vogeli* em cães (Cardoso *et al.*, 2010a; 2012) e *B. microti* e *B. vogeli* em gatos do norte de Portugal (Vilhena *et al.*, 2013), assim como *B. vogeli* em gatos e carraças no sul do país (Maia *et al.*, 2014a; 2014b), no presente estudo não se detetou ADN de *Babesia* em nenhuma das amostras analisadas. A não deteção de *B. canis* poderá estar relacionada com o facto do seu vetor, *D. reticulatus*, ser mais abundante no norte (Cardoso *et al.*, 2010a), enquanto a ausência de amostras positivas para *B. vogeli* é mais difícil de explicar, uma vez que, como referido anteriormente, *R. sanguineus* s.l. se encontrar amplamente distribuído no sul do país. Contudo, no inquérito realizado por Halos *et al.*, (2014) com o intuito de pesquisar babesiose canina na Europa Ocidental, a prevalência da parasitose no sul de Espanha, região contígua ao Algarve, foi de 0,0-0,7%, demonstrando que no sul da península ibérica a infeção por este protozoário não parece ser muito comum em cães.

7.6. *Hepatozoon* spp.

A deteção de ADN de *Hepatozoon* spp. foi significativamente superior ($p= 0,001$) nos animais da região do Algarve, um fator extrínseco que se provou influenciar a presença deste agente. De facto, *H. canis* foi recentemente identificado por PCR em cães (24/317) (René-Martellet *et al.*, 2015), em raposas (68/90) (Cardoso *et al.*, 2014) e em carraças *R. sanguineus* s.l. (2/925) removidas de cães residentes nesta região (Maia, *et al.*, 2014b), evidenciando que esta espécie de protozoário se encontra largamente presente no sul do país.

Dos 31 cães infetados por *H. canis* apenas três apresentavam sinais clínicos, demonstrando que, apesar da maioria dos animais serem aparentemente saudáveis, as infeções subclínicas não devem ser negligenciadas, uma vez que pode evoluir para doença e requerer tratamento específico.

A prevalência de infeção foi estatisticamente superior nos cães que não receberam tratamento profilático contra parasitas externos ($p= 0,034$), reforçando a necessidade de alertar os proprietários sobre a importância de realizarem uma desparasitação adequada no animal de modo a evitar a transmissão de agentes patogénicos (Solano-Gallego & Baneth, 2011; Stanneck & Fourie, 2013).

7.7. *Leishmania infantum*

A prevalência de *L. infantum* (1,1%) obtida neste estudo foi inferior à obtida em cães de Lisboa (34,9%) (Maia *et al.*, 2010), utilizando a mesma técnica molecular (PCR convencional) e o mesmo tipo de amostra (sangue periférico impregnado em papel de filtro). A detecção de ADN de *Leishmania* num menor número de cães pode ser explicada pela dinâmica da infeção ao longo do tempo, sendo esta dependente da abundância, distribuição e taxa de infeção do vetor. Em contrapartida, o sangue periférico não é o tecido de primeira escolha para o diagnóstico de leishmaniose como já demonstrado em canídeos, uma vez que a presença dos parasitas na circulação sanguínea parece ser intermitente (Maia & Campino, 2008). De facto, e tendo em conta a seroprevalência de 18,22% recentemente obtida em 170 cães da região do Algarve (Maia *et al.*, 2015), a PCR do sangue periférico deve ser utilizada em conjugação com as técnicas serológicas de modo a evitar resultados falsos negativos, especialmente em cães infetados subcl clinicamente (Maia & Campino, 2008).

Contudo, a predominância de cães infetados durante o inverno demonstra que são infeções ativas, descartando contaminações e infeções transitórias, uma vez que esta não é a época de maior atividade flebotomínica (Maia *et al.*, 2013).

Apesar da baixa prevalência obtida neste estudo a infeção por *L. infantum* foi significativamente superior nos cães de Lisboa ($p= 0,022$), tal como aconteceu no estudo realizado por Cortes *et al.* (2012).

A diminuição de animais infetados por *Leishmania infantum* pode significar que nos últimos anos tem aumentado o conhecimento sobre a infeção, o que leva os médicos veterinários a esclarecerem melhor os proprietários e a que estes optem pela prevenção.

7.8. Coinfeção

Embora a presença de coinfeções por mais de um agente patogénico transmitido por artrópodes vetores sejam frequentemente reportadas em zonas endémicas (Andersson *et al.* 2013; Baneth *et al.*, 2015), no presente estudo apenas se detetou um animal coinfetado por *H. canis* e *A. platys*. Embora este cão fosse clinicamente saudável, as coinfeções podem potenciar a patogénese da doença, alterando as manifestações clínicas associadas às infeções simples, dificultando o diagnóstico e tratamento (Otranto *et al.*, 2010; Andersson *et al.*, 2013).

8. Conclusão

Este estudo teve como objetivo detetar doenças transmitidas por artrópodes vetores em cães residentes no sul de Portugal, para melhor se compreender a sua disseminação e consequentemente alertar os médicos veterinários e os proprietários para a necessidade de prevenir estas infeções, algumas causadas por agentes patogénicos com potencial zoonótico.

A prevalência obtida neste estudo foi inferior à encontrada num estudo recente realizado na mesma região mas em gatos (Maia *et al.*, 2014a), o que pode ser justificado pela menor suscetibilidade dos cães a alguns agentes (como por exemplo *Bartonella* spp.). A baixa prevalência também poderá ser justificada por uma maior consciencialização dos médicos-veterinários e dos donos para a importância de proteger os canídeos domésticos dos artrópodes e dos agentes por eles transmitidos.

Com o aumento da exposição dos cães aos vetores, devido às alterações climáticas e reaproximação das áreas verdes, torna-se indispensável a inclusão dos agentes transmitidos por artrópodes nas listas de diagnósticos diferenciais, especialmente em áreas endémicas. Mesmo em animais sem sinais clínicos devem ser realizados rastreios serológicos para descartar estas doenças, nem que seja com a observação cuidada de esfregaços sanguíneos. A escolha dos planos de desparasitação e vacinação a utilizar também devem ser avaliados cuidadosamente, embora a realidade económica que se vive de momento em Portugal nem sempre permita a aplicação de todas as medidas profiláticas existentes.

A população alvo deste trabalho permitiu alcançar uma amostragem mais próxima da realidade obtendo uma prevalência mais precisa, uma vez que foram analisados animais domésticos e errantes de modo aleatório, isto é, sem a identificação prévia de animais clinicamente suspeitos de estarem infetados por DTAV. Contudo, mais estudos com critérios de inclusão ainda mais restritos e adaptados aos diferentes agentes patogénicos, tais como a divisão do estudo por épocas do ano, avaliação serológica e/ou molecular do mesmo animal em diferentes momentos da infeção e análise de um maior número de amostras de diferentes tecidos e não apenas de sangue periférico, pode reduzir as dificuldades de diagnóstico e facilitar o tratamento precoce dos animais infetados/doentes.

9. Bibliografia

- Aguirre, E., Sainz, A., Dunner, S., Amusatogui, I., López, L., Rodríguez-Franco, F., Luaces, I., Cortés, O. & Tesouro, M.A. (2004). First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. *Vet Parasitol.* ISSN 0304-4017. 125: 365-372.
- Aktas, M., Özübek, S., & Ipek, D. N. S. (2013). Molecular investigations of *Hepatozoon* species in dogs and developmental stages of *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasitol Res*, 112, 2381–2385. doi:10.1007/s00436-013-3403-6
- Alexandre, N., Santos, A. S., Nuncio, M. S., Sousa, R. De, Boinas, F., & Bacellar, F. (2009). Detection of *Ehrlichia canis* by polymerase chain reaction in dogs from Portugal. *Vet J*, 181, 343–344. doi:10.1016/j.tvjl.2008.03.025
- 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 Tick Borne Dis*, 2(2), 119–122. doi:10.1016/j.ttbdis.2011.03.001
- Allison, R. W., & Little, S. E. (2013). Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. *Vet Clin Pathol*, 42(2), 127–144. doi:10.1111/vcp.12040
- Alves, S., Milhano, N., Santos-Silva, M., Santos, a. S., Vilhena, M., & De Sousa, R. (2009). Evidence of *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in domestic, shelter and stray cat blood and fleas, Portugal. *Clin Microbiol Infect*, 15, 1–3. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02636.x
- Amoli, a. a R., Khoshnegah, J., & Razmi, G. R. (2012). A preliminary parasitological survey of *hepatozoon* spp. Infection in dogs in mashhad, Iran. *Iran J Parasitol*, 7(4), 99–103.
- 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*, 4, 317–319. doi:10.1016/j.ttbdis.2012.12.006
- Andrade, G., Barreto, W., Santos, L., Ribeiro, L., Macedo, G., Sousa, C., Herrera, H., *et al.*, (2014). Pathology of dogs in Campo Grande , MS , Brazil naturally co-infected with *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*, 2961, 509–515. *Rev Bras Parasitol Vet.* doi: 10.1590/S1984-29612014081
- André, M. R., Baccarim Denardi, N. C., Marques de Sousa, K. C., Gonçalves, L. R., Henrique, P. C., Grosse Rossi Ontivero, C. R., Machado, R. Z. (2014). Arthropod-borne pathogens circulating in free-roaming domestic cats in a zoo environment in Brazil. *Ticks Tick Borne Dis*, 5(5), 545–551. doi:10.1016/j.ttbdis.2014.03.011

Annen, K., Friedman, K., Eshoa, C., Horowitz, M., Gottschall, J., & Straus, T. (2012). Two cases of transfusion-transmitted *Anaplasma phagocytophilum*. *Am J Clin Pathol*, 137(4), 562–565. doi:10.1309/AJCP4E4VQQQOZIAQ

Armés, S. (2010). Rastreio de *Leishmania infantum* em cães assintomáticos na região de Mafra. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

Aydin, M. F., Sevinc, F., & Sevinc, M. (2015). Molecular detection and characterization of *Hepatozoon* spp. in dogs from the Central part of Turkey. *Ticks Tick Borne Dis*, 6(3), 388–392. doi:10.1016/j.ttbdis.2015.03.004

Baneth, G. (2011). Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. *Vet Parasitol*, 181(1), 3–11. doi:10.1016/j.vetpar.2011.04.015

Baneth, G. (2012). Infectious Disease of the Dog and cat. (C. Greene, Ed.) (4th ed.). Missouri: Elsevier Saunders.

Baneth, G., Harrus, S., Gal, A., & Aroch, I. (2015). Canine vector-borne co-infections: *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* in the same host monocytes. *Vet Parasitol*, 208(1-2), 30–34. doi:10.1016/j.vetpar.2014.12.013

Baptista, S. (2006). Lyme Borreliosis in Portugal: Study on Vector(s), Agent(s) and Risk Factors. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa.

Bastos, F. (2013). Infecções Causadas Por Protozoários E Bactérias Transmitidas Por Vectores Em Gatos Residentes Na Região Da Arrábida. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Bates, P. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J for Parasitol*, 37(10), 1097–1106. doi:10.1016/j.ijpara.2007.04.003

Baum, E., Grosenbaugh, D., & Barbour, A. G. (2014). Diversity of antibody responses to *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected beagle dogs. *Clin Vaccine Immun*, 21(6), 838–846. doi:10.1128/CVI.00018-14

Berzina, I., Krudewig, C., Silaghi, C., Matise, I., Ranka, R., Müller, N., & Welle, M. (2014). Ticks and Tick-borne Diseases *Anaplasma phagocytophilum* DNA amplified from lesional skin of seropositive dogs. *Ticks Tick Borne Dis*, 5(3), 329–335. doi:10.1016/j.ttbdis.2013.12.010

Beugnet, F., & Marié, J. L. (2009). Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Vet Parasitol*, 163, 298–305. doi:10.1016/j.vetpar.2009.03.028

Beugnet, F., & Franc, M. (2012). Insecticide and acaricide molecules and/or combinations to prevent pet infestation by ectoparasite. *Trends Parasitol*. doi: 10.1016/j.pt.2012.04.004.

Beugnet, F., & Chalvet-Monfray, K. (2013). Impact of climate change in the epidemiology of vector-borne diseases in domestic carnivores. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 36(6), 559–566. doi:10.1016/j.cimid.2013.07.003

Bradley, J. M., Mascarelli, P. E., Trull, C. L., Maggi, R. G., & Breitschwerdt, E. B. (2014). *Bartonella henselae* Infections In An Owner and Two Papillon Dogs Exposed to Tropical Rat Mites (*Ornithonyssus bacoti*). *Vector Borne Zoonot Dis*, 14(10), 703–709. doi:10.1089/vbz.2013.1492

Branco S., Alves-Pires C., Maia C., Cortes S., Cristovão J.M., Gonçalves L., Campino L., Afonso M.O. (2013). Entomological and ecological studies in a new potential zoonotic leishmaniasis focus in Torres Novas municipality, Central Region, Portugal. *Acta Trop* 125: 339-348

Brown, W. C. (2013). Adaptative immunity to *Anaplasma* pathogens and immune dysregulation : implications for bacterial persistence. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 1–21. doi:10.1016/j.cimid.2011.12.002.

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 Surgery*, 8(4), 213–226. doi:10.1016/j.jfms.2006.05.006

Caeiros, A. P. D. S. (2012). Detecção De Babesia Spp. E De Outros Hemoparasitas Em Cães, Por Técnicas Morfológicas, Serológicas E Moleculares, No Distrito De Lisboa, Portugal, 130. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.

Campino, L., & Maia, C. (2013). The role of reservoirs: Canine leishmaniasis. *Drug Resistance in Leishmania Parasites*, 45–64. doi:10.1007/978-3-7091-1125-3

Cantacessi, C., Dantas-Torres, F., Nolan, M. J., & Otranto, D. (2015). The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. *Trends Parasitol*, 31(3), 100–108. doi:10.1016/j.pt.2014.12.012

Cardoso, L., Costa, Á., Tuna, J., Vieira, L., Eyal, O., Yisaschar-Mekuzas, Y., & Baneth, G. (2008). *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* infections in dogs from northern Portugal. *Vet Parasitol*, 156, 199–204. doi:10.1016/j.vetpar.2008.05.027

Cardoso, L., Yisaschar-Mekuzas, Y., Rodrigues, F. T., Costa, A., Machado, J., Diz-Lopes, D., & Baneth, G. (2010a). Canine babesiosis in northern Portugal and molecular characterization of vector-borne co-infections. *Parasit Vectors*, 3, 27. doi:10.1186/1756-3305-3-27

Cardoso, L., Tuna, J., Vieira, L., Yisaschar-Mekuzas, Y., & Baneth, G. (2010b). Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal. *Vet J*, 183(2), 232–233. doi:10.1016/j.tvjl.2008.10.009

Cardoso, L., Mendão, C., & Madeira de Carvalho, L. (2012). Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal - a national serological study. *Parasit Vectors*, 5, 62. doi:10.1186/1756-3305-5-62

Cardoso, L., Cortes, H. C. E., Reis, a., Rodrigues, P., Simões, M., Lopes, a. P., Baneth, G. (2013). Prevalence of *Babesia microti*-like infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Portugal. *Vet Parasitol*, 196 (2010), 90–95. doi:10.1016/j.vetpar.2012.12.060

Cardoso, L., Cortes, H. C. E., Eyal, O., Reis, A., Lopes, A. P., Vila-Viçosa, M. J., Baneth, G. (2014). Molecular and histopathological detection of *Hepatozoon canis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Portugal. *Parasit Vectors*, 7(1), 113. doi:10.1186/1756-3305-7-113

Cardoso, S., Costa, I. M. H., Figueiredo, C., Castro, a, & Conceição, M. a P. (2014). The occurrence of zoonotic parasites in rural dog populations from northern Portugal. *J Helminthol*, 88, 203–9. doi:10.1017/S0022149X13000047

Cardoso, L., Gilad, M., Cortes, H., Nachum-Biala, Y., Lopes, A., Vila-Viçosa, M., Simões, M., Rodrigues, P., Baneth, G. First report of *Anaplasma platys* infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) and molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* in foxes from Portugal. *Parasit Vectors*, 2015. doi: 10.1186/s13071-015-0756-y.

Carrade, D. D., Foley, J. E., Borjesson, D. L., & Sykes, J. E. (2009). Canine granulocytic anaplasmosis: A review. *J Vet Int Med*, 23, 1129–1141. doi:10.1111/j.1939-1676.2009.0384.x

Centeno-Lima, S., do Rosário, V., Parreira, R., Maia, a J., Freudenthal, M., Nijhof, M., & Jongejan, F. (2003). A fatal case of human babesiosis in Portugal: molecular and phylogenetic analysis. *Trop Med Int Health : TM & IH*, 8(8), 760–764.

Chomel, B. B., Boulouis, H. J., Maruyama, S., & Breitschwerdt, E. B. (2006). *Bartonella* spp. in pets and effect on human health. *Emerg Infect Dis*, 12(3), 389–394. doi:10.3201/eid1205.050931

Chomel, B. B., Ermel, R. W., Kasten, R. W., Henn, J. B., Fleischman, D., & Chang, C. C. (2014). Experimental infection of dogs with various *Bartonella* species or subspecies isolated from their natural reservoir. *Vet Microbiol* 168(1), 169–176. doi:10.1016/j.vetmic.2013.11.009

Cicuttin, G. L., Brambati, D. F., De Gennaro, M. F., Carmona, F., Isturiz, M. L., Pujol, L. E., Gil, H. (2014). *Bartonella* spp. in cats from Buenos Aires, Argentina. *Vet Microbiol*, 168(1), 225–228. doi:10.1016/j.vetmic.2013.10.016

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*, 6(1), 183. doi:10.1186/1756-3305-6-183

Conceição-Silva, F. M., Abranches, P., Silva-Pereira, M. C., & Janz, J. G. (1988). Hepatozoonosis in foxes from Portugal. *J Wildlife Dis*, 24(2), 344–347.

Cortes, S., Rolão, N., Ramada, J., & Campino, L. (2004). PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l. - Specific kinetoplastid primers. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 98(1), 12–17. doi:10.1016/S0035-9203(03)00002-6

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*, 189, 189–196. doi:10.1016/j.vetpar.2012.04.028

Costa, H. (2012). Influências das Variáveis Meteorológicas nos Consumos de Água. Tese de Mestrado. Universidade do Minho.

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*. *Emerg Infect Dis*, 14(7), 1074–1080. doi:10.3201/eid1407.071110

Couto, C. G., Lorentzen, L., Beall, M. J., Shields, J., Bertolone, N., Couto, J. I., Ruano, R. (2010). Serological study of selected vector-borne diseases in shelter dogs in central Spain using point-of-care assays. *Vect Borne Zoonot Dis (Larchmont, N.Y.)*, 10(9), 885–888. doi:10.1089/vbz.2009.0063

Cristovão, J. (2014). Monitorização do risco de exposição à leishmaniose zoonótica. Tese de Mestrado. Universidade Nova de Lisboa - Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

Da Franca, I., Santos, L., Mesquita, T., Collares-Pereira, M., Baptista, S., Vieira, L., Prates, C. (2005). Lyme borreliosis in Portugal caused by *Borrelia lusitaniae*? Clinical report on the first patient with a positive skin isolate. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 117(11-12), 429–432. doi:10.1007/s00508-005-0386-z

Da Silva, G. A. R., Sugui, D., Nunes, R. F., de Azevedo, K., de Azevedo, M., Marques, A., Ferry, F. R. D. A. (2014). Mucocutaneous Leishmaniasis/HIV Coinfection Presented as a Diffuse Desquamative Rash. *Case Rep Infect Dis*, 2014, 1–5. doi:10.1155/2014/293761

Dantas-Torres, F. (2010). Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*, 3, 26. *Parasit Vectors*. doi:10.1186/1756-3305-3-26

Dantas-Torres, F., Chomel, B. B., & Otranto, D. (2012). Ticks and tick-borne diseases: A One Health perspective. *Trends Parasitol*, 28(10), 437–446. doi:10.1016/j.pt.2012.07.003

Dantas-Torres, F., & Otranto, D. (2014). Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. *Parasit Vectors*, 7, 22. doi:10.1186/1756-3305-7-22

Dantas-Torres, F., & Otranto, D. (2015). Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. *Vet Parasitol*, 208(1-2), 9–13. doi:10.1016/j.vetpar.2014.12.014

Darvishi, M., Yaghoobi-Ershadi, M. R., Shahbazi, F., Akhavan, A. A., Jafari, R., Soleimani, H., Arandian, M. H. (2015). Epidemiological Study on Sand Flies in an Endemic Focus of Cutaneous Leishmaniasis, Bushehr City, Southwestern Iran. *Front Public Health*, 3(February), 1–6. doi:10.3389/fpubh.2015.00014

Daste, T., Lucas, M. N., & Aumann, M. (2013). Cerebral babesiosis and acute respiratory distress syndrome in a dog. *J Vet Emerg Crit Care*, 23(6), 615–623. doi:10.1111/vec.12114

De Caprariis, D., Dantas-Torres, F., Capelli, G., Mencke, N., Stanneck, D., Breitschwerdt, E. B., & Otranto, D. (2011). Evolution of clinical, haematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-borne pathogens. *Vet Microbiol*, 149(1-2), 206–212. doi:10.1016/j.vetmic.2010.10.006

De Tommasi, A. S., Otranto, D., Dantas-Torres, F., Capelli, G., Breitschwerdt, E. B., & de Caprariis, D. (2013). Are vector-borne pathogen co-infections complicating the clinical presentation in dogs? *Parasit Vectors*, 6, 97. doi:10.1186/1756-3305-6-97

Dietrich, F., Schmidgen, T., Maggi, R. G., Richter, D., Matuschka, F. R., Vonthein, R., Kempf, V. a J. (2010). Prevalence of *Bartonella henselae* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *A Environ Microbiol*, 76(5), 1395–1398. doi:10.1128/AEM.02788-09

Dincer, E., Gargari, S., Ozkul, a., & Ergunay, K. (2015). Potential Animal Reservoirs of Toscana Virus and Coinfections with *Leishmania infantum* in Turkey. *Am J Trop Med Hyg*. doi:10.4269/ajtmh.14-0322

Diniz, P. P. V. D. 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*, 38, 697–710. doi:10.1051/vetres:2007023

Diniz, P. P. V. P., Billeter, S. a., Otranto, D., De Caprariis, D., Petanides, T., Mylonakis, M. E., Breitschwerdt, E. B. (2009). Molecular documentation of *Bartonella* infection in dogs in Greece and Italy. *J Clin Microbiol*, 47(5), 1565–1567. doi:10.1128/JCM.00082-09

DMPU. (2009). Relatório do Estado do Ornamento do Território. Câmara Municipal de Lisboa, Lisboa.

Domingos, A., Antunes, S., Borges, L., Estólio, V., & Rosário, V. E. Do. (2013). Review Case Report Article Approaches towards tick and tick-borne diseases control. *Rev Soc Bras Med Trop*, 46(3), 265–269. doi:10.1590/0037-8682-0014-2012

Drut, A., Bublot, I., Breitschwerdt, E. B., Chabanne, L., Vayssier-Taussat, M., & Cadoré, J. L. (2014). Comparative microbiological features of *Bartonella henselae* infection in a dog with fever of unknown origin and granulomatous lymphadenitis. *Med Microbiol Immun*, 203(2), 85–91. doi:10.1007/s00430-013-0318-x

Ebani, V. V., Bertelloni, F., & Fratini, F. (2012). Occurrence of *Bartonella henselae* types I and II in Central Italian domestic cats. *Res Vet Scien*, 93(1), 63–66. doi:10.1016/j.rvsc.2011.07.013

Ebani, V. V., Bertelloni, F., Torracca, B., & Cerri, D. (2014). Serological survey of *Borrelia burgdorferi* sensu canis infections in rural and urban dogs in Central Italy, 21(4), 671–675. *Ann Agric Environ Med* doi:10.5604/12321966.1129912

Eberts, M. D., Vissotto de Paiva Diniz, P. P., Beall, M. J., Stillman, B. a., Chandrashekar, R., & Breitschwerdt, E. B. (2011). Typical and Atypical Manifestations of Anaplasma phagocytophilum Infection in Dogs. *J Am Anim Hosp Ass*, 47, e86–e94. doi:10.5326/JAAHA-MS-5578

European Scientific Counsel Companion Animal Parasites. (2012). Control of Vector-Borne Diseases in dogs and cats. Guideline, October 2012.

Esch, K. J., & Petersen, C. a. (2013). Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clin Microbiol Rev*, 26(1), 58–85. doi:10.1128/CMR.00067-12

Farkas, R., Gyurkovszky, M., Lukács, Z., Aladics, B., & Solymosi, N. (2014). Seroprevalence of Some Vector-Borne Infections of Dogs in Hungary. *Vector Borne Zoon Dis (Larchmont, N.Y.)*, 14(4), 256–260. doi:10.1089/vbz.2013.1469

Fankhauser, B., Dumont, P., Halos, L., Hunter, J. S., Kunkle, B., Everett, W. R., Soll, M. D. (2015). Efficacy of a new combination of fipronil and permethrin against *Ctenocephalides felis* flea infestation in dogs. *Parasit Vectors*, 8(1), 4–9. doi:10.1186/s13071-015-0687-7

Faria, A. S., Paiva-Cardoso, M. D. N., Nunes, M., Carreira, T., Vale-Gonçalves, H. M., Veloso, O., Vieira, M. L. (2014). First Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in Serum of the Wild Boar (*Sus scrofa*) in Northern Portugal by Nested-PCR. *EcoHealth*, (1989). doi:10.1007/s10393-014-0973-4

Foroughi-Parvar, F., & Hatam, G. (2014). Vaccines for Canine Leishmaniasis. *Adv Prev Med*, 2014, 1–9. doi:10.1155/2014/569193

Franco, A.O., Davies, C.R., Mylne, A., Dedet, J.-P., Gállego, M., Ballart, C., Gramiccia, M., Gradoni, L., Molina, R., Gálvez, R., Morillas-Márquez, F., Barón-López, S., Pires, C.A., Afonso, M.O., Ready, P.D., Cox, J., (2011). Predicting the distribution of canine leishmaniasis in western Europe based on environmental variables. *Parasitol*, 1878–1891.

Gaito, A., Gjivoje, V., Lutz, S., & Baxter, B. (2014). Comparative analysis of the infectivity rate of both *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in humans and dogs in a New Jersey community. *Infect Drug Resist*, 7, 199–201. doi:10.2147/IDR.S68742

Giannitti, F., Diab, S. S., Uzal, F. a., Fresneda, K., Rossi, D., Talmi-Frank, D., & Baneth, G. (2012). Infection with a *Hepatozoon* sp. closely related to *Hepatozoon felis* in a wild Pampas gray fox (*Lycalopex* - *Pseudalopex* - *gymnocercus*) co-infected with canine distemper virus. *Vet Parasitol*, 186(3-4), 497–502. doi:10.1016/j.vetpar.2011.11.006

Gómez-Ochoa, P., Castillo, J. a, Gascón, M., Zarate, J. J., Alvarez, F., & Couto, C. G. (2009). Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. *Vet J (London, England : 1997)*, 179(2), 259–263. doi:10.1016/j.tvjl.2007.09.014

González, L. M., Castro, E., Lobo, C. a., Richart, A., Ramiro, R., González-Camacho, F., Montero, E. (2015). First report of *Babesia divergens* infection in an HIV patient. *Int J Infect Dis*, 4–6. doi:10.1016/j.ijid.2015.02.005

Gramiccia, M. (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet Parasitol*, 181(1), 23–30. doi:10.1016/j.vetpar.2011.04.019

Guptill, L. (2010). Bartonellosis. *Vet Microbiol*, 140(3-4), 347–359. doi:10.1016/j.vetmic.2009.11.011

Gustafson, R. Epidemiological studies on Lyme Borreliosis and tick-borne encephalitis. *Scand J Infect Dis Suppl* 92: 1-63.

Halos, L., Lebert, I., Abrial, D., Danlois, F., Garzik, K., Rodes, D., Guillot, J. (2014). Questionnaire-based survey on the distribution and incidence of canine babesiosis in countries of Western Europe. *Parasit (Paris, France)*, 21, 13. doi:10.1051/parasite/2014015

Harrus, S., & Waner, T. (2011a). Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. *Vet J*, 187(3), 292–296. doi:10.1016/j.tvjl.2010.02.001

Harrus, S., Perlman-Avrahami, a., Mumcuoglu, K. Y., Morick, D., Eyal, O., & Baneth, G. (2011b). Molecular detection of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma platys*,

Candidatus Midichloria mitochondrii and *Babesia canis vogeli* in ticks from Israel. *Clin Microbiol Infect*, 17(3), 459–463. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03316.x

Hartmann, KatrinFrymus, T., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Gruffydd-Jones, T., Horzinek, M. C. (2013a). Feline rabies ABCD guidelines on prevention and management. *J Fel Med Surg*, 11(7), 585–593. doi:10.1016/j.jfms.2009.05.007

Hartmann, K., Egberink, H., Pennisi, M. G., Lloret, A., Addie, D., Belák, S., Horzinek, M. C. (2013b). *Leptospira* species infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J Fel Med Surg*, 15(7), 576–81. doi:10.1177/1098612X13489217

Hegarty, B. C., Bradley, J. M., Lappin, M. R., Balakrishnan, N., Mascarelli, P. E., & Breitschwerdt, E. B. (2014). Analysis of seroreactivity against cell culture-derived *bartonella* spp. antigens in dogs. *J Vet Int Med*, 28(1), 38–41. doi:10.1111/jvim.12263

Heikkilä, 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*, 52(1), 62. doi:10.1186/1751-0147-52-62

Hernández, L., Montoya, A., Checa, R., Dado, D., Gálvez, R., Otranto, D., Miró, G. (2015). Course of experimental infection of canine leishmaniosis: Follow-up and utility of noninvasive diagnostic techniques. *Vet Parasitol*, 207(1-2), 149–155. doi:10.1016/j.vetpar.2014.10.035

Hodzic, E., Imai, D., Feng, S., & Barthold, S. W. (2014). Resurgence of persisting non-cultivable *Borrelia burgdorferi* following antibiotic treatment in mice. *PLoS ONE*, 9(1). doi:10.1371/journal.pone.0086907

Horney, B. S., & Stojanovic, V. (2013). Protein-losing nephropathy associated with *Borrelia burgdorferi* seropositivity in a soft-coated wheaten terrier: Response to therapy. *Canad Vet J*, 54(4), 392–396.

Hornok, S., Tánczos, B., Fernández de Mera, I. G., de la Fuente, J., Hofmann-Lehmann, R., & Farkas, R. (2013). High prevalence of *Hepatozoon*-infection among shepherd dogs in a region considered to be free of *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet Parasit*, 196, 189–193. doi:10.1016/j.vetpar.2013.02.009

Insa. (2014). Doenças Associadas a Artrópodes Vetores E Roedores. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa.

Jahfari, S., Coipan, E. C., Fonville, M., van Leeuwen, A. D., Hengeveld, P., Heylen, D., Sprong, H. (2014). Circulation of four *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in Europe. *Parasit Vectors*, 7(1), 365. doi:10.1186/1756-3305-7-365

Jared, M., Bullard, F., Ahsanuddin, A. N., Perry, A. M., Lindsay, L. R., Iranpour, M., Perry, A. M. (2014). The first case of locally acquired tick-borne *Babesia microti* infection in Canada, 25(6), 87–89. *Can J Infect Dis Med Microbiol*.

Jittapalapong, S., Rungphisutthipongse, O., Maruyama, S., Schaefer, J. J., & Stich, R. W. (2006). Detection of *Hepatozoon canis* in stray dogs and cats in Bangkok, Thailand. *Ann N Y Acad Sci*, 1081, 479–488. doi:10.1196/annals.1373.071

Kamani, J., Baneth, G., Mumcuoglu, K. Y., Waziri, N. E., Eyal, O., Guthmann, Y., & Harrus, S. (2013). Molecular Detection and Characterization of Tick-borne Pathogens in Dogs and Ticks from Nigeria. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(3), 1–7. doi:10.1371/journal.pntd.0002108

Kaphle, U., Kheir, F., & Thammasitboon, S. (2015). A Rare Case of ARDS From Human Anaplasmosis. *Respir Care*, (C), 2–4. doi:10.4187/respcare.03714

Kelly, P. J., Xu, C., Lucas, H., Loftis, A., Abete, J., Zeoli, F., Wang, C. (2013). Ehrlichiosis, Babesiosis, Anaplasmosis and Hepatozoonosis in Dogs from St. Kitts, West Indies. *PLoS ONE*, 8(1). doi:10.1371/journal.pone.0053450

Kordick, D. L., Brown, T. T., Shin, K., & Breitschwerdt, E. B. (1999). Clinical and pathologic evaluation of chronic *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cats. *J Clin Microbiol*, 37(5), 1536–1547.

Krämer, F., Schaper, R., Schunack, B., Połozowski, A., Piekarska, J., Szwedko, A., Pantchev, N. (2014). Serological detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia canis* antibodies and *Dirofilaria immitis* antigen in a countrywide survey in dogs in Poland. *Parasitol Res*, 3229–3239. doi:10.1007/s00436-014-3985-7

Kumar, N., Goyal, J., Goel, A., Shakoory, B., & Chatham, W. (2014). Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clini Infect Dis : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 45 Suppl 1, S45–S51. doi:10.1086/518146

Lasta, C. S., Pires, A., Messick, J. B., Oliveira, S. T., Biondo, A. W., Felipe, R., González, D. (2013). Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs in Southern Brazil, 2961, 360–366. *Rev Bras Parasitol Vet*. doi: 10.1590/S1984-29612013000300007.

Latrofa, M. S., Dantas-Torres, F., Giannelli, A., & Otranto, D. (2014). Molecular detection of tick-borne pathogens in Rhipicephalus sanguineus group ticks. *Ticks Tick Borne Dis*, 5(6), 943–946. doi:10.1016/j.ttbdis.2014.07.014

Lempereur, L., Shiels, B., Heyman, P., Moreau, E., Saegerman, C., Losson, B., & Malandrin, L. (2015). A retrospective serological survey on human babesiosis in Belgium. *Clin Microbiol Infect*, 21(1), 96.e1–96.e7. doi:10.1016/j.cmi.2014.07.004

Leschnik, M., Kirtz, G., Tichy, A., & Leidinger, E. (2008). Seasonal occurrence of canine babesiosis is influenced by local climate conditions. *Int J Med Microbiol* 298, 243–248. doi:10.1016/j.ijmm.2008.03.008

Littman, M. P., Goldstein, R. E., Labato, M. a, Lappin, M. R., & Moore, G. E. (2006). ACVIM small animal consensus statement on Lyme disease in dogs: diagnosis, treatment, and prevention. *J Vet Int Med*, 20, 422–434. doi:10.1111/j.1939-1676.2006.tb02880.

Littman, M. P. (2013). Lyme nephritis. *J Vet Emerg Crit Car*, 23(2), 163–173. doi:10.1111/vec.12026

Lledó, L., Gegúndez, M. I., Giménez-Pardo, C., Álamo, R., Fernández-Soto, P., Sofia Nuncio, M., & Saz, J. V. (2014). A seventeen-year epidemiological surveillance study of *Borrelia burgdorferi* infections in two provinces of northern Spain. *Int J Environ Res Publ Health*, 11(2), 1661–1672. doi:10.3390/ijerph110201661

Loftis, A. D., Kelly, P. J., Freeman, M. D., Fitzharris, S., Beeler-Marfisi, J., & Wang, C. (2013). Tick-borne pathogens and disease in dogs on St. Kitts, West Indies. *Vet Parasitol*, 196(1-2), 44–49. doi:10.1016/j.vetpar.2013.01.024

Lopez, J. E., Wilder, H. K., Boyle, W., Drumheller, L. B., Thornton, J. a., Willeford, B., Varela-Stokes, A. (2013). Sequence Analysis and Serological Responses against *Borrelia turicatae* BipA, a Putative Species-Specific Antigen. *PLoS Neglec Trop Dis*, 7(9), e2454. doi:10.1371/journal.pntd.0002454

Maggi, R. G., Birkenheuer, A. J., Hegarty, B. C., Bradley, J. M., Levy, M. G., & Breitschwerdt, E. B. (2014). Comparison of serological and molecular panels for diagnosis of vector-borne diseases in dogs. *Parasit Vectors*, 7, 127. doi:10.1186/1756-3305-7-127

Maia, C., & Campino, L. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol*, 158(4), 274–287. doi:10.1016/j.vetpar.2008.07.028

Maia, C., Afonso, M. O., Neto, L., Dionísio, L., & Campino, L. (2009). Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected phlebotomus perniciosus from Algarve Region, Portugal. *J Vect Borne Dis*, 46(4), 268–272.

Maia, C., Gomes, J., Cristóvão, J., Nunes, M., Martins, A., Rebêlo, E., & Campino, L. (2010). Feline Leishmania infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Vet Parasitol*, 174(3-4), 336–340. doi:10.1016/j.vetpar.2010.08.030

- Maia, C., Dionísio, L., Afonso, M. O., Neto, L., Cristóvão, J. M., & Campino, L. (2013). *Leishmania* infection and host-blood feeding preferences of phlebotomine sandflies and canine leishmaniasis in an endemic European area, the Algarve Region in Portugal. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(June), 481–487. doi:10.1590/0074-0276108042013014
- 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. *Parasit Vectors*, 7(1), 115. doi:10.1186/1756-3305-7-115
- Maia, C., Ferreira, A., Nunes, M., Vieira, M. L., Campino, L., & Cardoso, L. (2014b). Molecular detection of bacterial and parasitic pathogens in hard ticks from Portugal. *Tick Tick Borne Dis*, 5, 409–414. doi:10.1016/j.ttbdis.2014.01.009
- Maia C, Cardoso L. (2015). Spread of *Leishmania infantum* in Europe with dog travelling. *Vet Med*. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.05.003
- Marques, A. R. (2010). Lyme disease: a review. *Curr Allergy Asthma Rep* 10:13–20.
- Mattin, M. J., Solano-Gallego, L., Dhollander, S., Afonso, a., & Brodbelt, D. C. (2014). The frequency and distribution of canine leishmaniosis diagnosed by veterinary practitioners in Europe. *Vet J*, 200, 410–419. doi:10.1016/j.tvjl.2014.03.033
- Mayne, P. J. (2015). Clinical determinants of Lyme borreliosis , and ehrlichiosis in an Australian cohort, 15–26. *Int J Gen Med*.
- Mencke, N. (2013). Future challenges for parasitology: Vector control and “One health” in Europe: The veterinary medicinal view on CVBDs such as tick borreliosis, rickettsiosis and canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*, 195(3-4), 256–271. doi:10.1016/j.vetpar.2013.04.007
- Metzger, B., Paduan, K. D. S., Rubini, A. S., Oliveira, T. G. De, Pereira, C., & O'Dwyer, L. H. (2008). The first report of *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) in neotropical felids from Brazil. *Vet Parasitol*, 152, 28–33. doi:10.1016/j.vetpar.2007.12.006
- Mierzejewska, E. J., Welc-Faleciak, R., Karbowiak, G., Kowalec, M., Behnke, J. M., & Bajer, A. (2015). Dominance of *Dermacentor reticulatus* over *Ixodes ricinus* (Ixodidae) on livestock, companion animals and wild ruminants in eastern and central Poland. *Exp App Acarol*. doi:10.1007/s10493-015-9889-0
- Montandon, C., Yoshinari, N., Milagres, B., Mazioli, R., Gomes, G. G., Moreira, H. N., Wanderley, G. G. (2014). Evidence of *Borrelia* in wild and domestic mammals from the state of Minas Gerais , Brazil, 2961, 287–290. *Rev Bras Parasitol Vet*.

Moraes, P. H. G., Rufino, C. P., Reis, T., Aguiar, D. C. F., Meneses, A. M. C., & Gonçalves, E. C. (2014). Optimization of a molecular method for the diagnosis of canine babesiosis. *Rev Bras Parasitol Vet*, 23, 105–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24728371>

Mørch, K., Holmaas, G., Frolander, P. S., & Kristoffersen, E. K. (2015). International Journal of Infectious Diseases Severe human *Babesia divergens* infection in Norway. *Int J Infect Dis*, 33, 37–38. doi:10.1016/j.ijid.2014.12.034

Mylonakis, M. E., Soubasis, N., Balakrishnan, N., Theodorou, K., Kasabalis, D., Saridomichelakis, M., Breitschwerdt, E. B. (2014). Molecular identification of *Bartonella* species in dogs with leishmaniosis (*Leishmania infantum*) with or without cytological evidence of arthritis. *Vet Microbiol*, 174(1-2), 272–275. doi:10.1016/j.vetmic.2014.08.035

Najm, N. A., Meyer-Kayser, E., Hoffmann, L., Pfister, K., & Silaghi, C. (2014). *Hepatozoon canis* in German red foxes (*Vulpes vulpes*) and their ticks: Molecular characterization and the phylogenetic relationship to other *Hepatozoon* spp. *Parasitol Res*, 113(7), 2979–2985. doi:10.1007/s00436-014-3923-8

Nasereddin, A., Rishq, A., Harrus, S., Azmi, K., Ereqat, S., Baneth, G., Mumcuoglu, K. Y. (2014). *Bartonella* species in fleas from Palestinian territories: Prevalence and genetic diversity, 39(2), 261–270. *J Vector Ecol*.

Norte, A. C., Alves da Silva, A., Alves, J., da Silva, L. P., Nuncio, M. S., Escudero, R., Lopes de Carvalho, I. (2015). The importance of lizards and small mammals as reservoirs for *Borrelia lusitaniae* in Portugal. *Environ Microbiol Rep*, n/a–n/a. doi:10.1111/1758-2229.12218

O'Dwyer, L. H. (2011). Brazilian canine hepatozoonosis. *Rev Bras Parasitol Vet*, 20, 181–193. doi:10.1590/S1984-29612011000300002

ONLEISH (2014). Observatório Nacional de leishmanioses. www.onleish.org, acessado em 6 de Janeiro de 2015.

Orkun, O., Karaer, Z., Cakmak, A., & Nalbantoğlu, S. (2014). Identification of Tick-Borne Pathogens in Ticks Feeding on Humans in Turkey. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(8), e3067. doi:10.1371/journal.pntd.0003067

Ortuño, A., Castellà, J., Criado-Fornelio, A., Buling, A., & Barba-Carretero, J. C. (2008). Molecular detection of a *Hepatozoon* species in stray cats from a feline colony in North-eastern Spain. *Vet J*, 177, 134–135. doi:10.1016/j.tvjl.2007.04.009

Oskouizadeh, K., Zahraei-Salehi, T., & Aledavood, S. J. (2010). Detection of *Bartonella henselae* in domestic cats' saliva. *Iran J Microbiol*, 2(2), 80–84.

Ostfeld, R. S., Levi, T., Jolles, A. E., Martin, L. B., Hosseini, P. R., & Keesing, F. (2014). Life History and Demographic Drivers of Reservoir Competence for Three Tick-Borne Zoonotic Pathogens, 9(9). *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0107387

Otranto, D., Dantas-Torres, F., & Breitschwerdt, E. B. (2009). Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part two. *Trend Parasitol*, 25, 228–235. doi:10.1016/j.pt.2009.02.005

Otranto, D., Testini, G., Dantas-Torres, F., Latrofa, M., Diniz, P., Caprariis, D., Lia, R., Mencke, N., Stanneck, D., Capelli, G., Breitschwerdt, E. (2010). Diagnosis of Canine Vector-Borne Diseases in Young Dogs: a Longitudinal Study. *J Clin Microbiol*, 48, 3316–3324. doi:10.1128/JCM.00379-10

Otranto, D., Dantas-Torres, F., Brianti, E., Traversa, D., Petrić, D., Genchi, C., & Capelli, G. (2013). Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. *Parasit Vectors*, 6, 16. doi:10.1186/1756-3305-6-16

Paulauskas, A., Radzijeuskaja, J., Karvelienė, B., Grigonis, A., Aleksandravičienė, A., Zamokas, G., Petkevičius, S. (2014). Detection and molecular characterization of canine babesiosis causative agent *Babesia canis* in the naturally infected dog in Lithuania. *Vet Parasitol*, 205(3-4), 702–706. doi:10.1016/j.vetpar.2014.09.001

Pantchev, N., Schaper, R., Limousin, S., Norden, N., Weise, M., & Lorentzen, L. (2009). Occurrence of *dirofilaria immitis* and tick-borne infections caused by *anaplasma phagocytophilum*, *borrelia burgdorferi* sensu lato and *ehrlichia canis* in domestic dogs in france: Results of a countrywide serologic survey. *Parasitol Res*, 105(SUPPL. 1), 101–114. doi:10.1007/s00436-009-1501-2

Pawar, R. M., Poornachandar, A., Srinivas, P., Rao, K. R., Lakshmikantan, U., & Shivaji, S. (2012). Molecular characterization of *Hepatozoon* spp. infection in endangered Indian wild felids and canids. *Vet Parasitol*, 186(3-4), 475–479. doi:10.1016/j.vetpar.2011.11.036

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*, 88(3), 379–384. doi:10.1016/j.rvsc.2009.11.005

Pennisi, M. G. (2015). Leishmaniosis of companion animals in Europe: An update. *Vet Parasitol*, 208(1-2), 35–47. doi:10.1016/j.vetpar.2014.12.023

Pérez, C., Maggi, R. G., Diniz, P. P. V. P., & Breitschwerdt, E. B. (2011). Molecular and serological diagnosis of *Bartonella* infection in 61 dogs from the United States. *J Vet Int Med*, 25(4), 805–810. doi:10.1111/j.1939-1676.2011.0736.x

Popov, V. L., Korenberg, E. I., Nefedova, V. V., Han, V. C., Wen, J. W., Kovalevskii, Y. V., Walker, D. H. (2007). Ultrastructural evidence of the ehrlichial developmental cycle in naturally infected *Ixodes persulcatus* ticks in the course of coinfection with *Rickettsia*, *Borrelia*, and a flavivirus. *Vect Borne Zoon Dis* (Larchmont, N.Y.), 7(4), 699–716. doi:10.1089/vbz.2007.0148

Prusinski, A. M., Kokas, J. E., Hukey, K. T., Kogut, S. J., Lee, J., & Backenson, B. (2014). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales: Spirochaetaceae), *Anaplasma phagocytophilum* (Rickettsiales: Anaplasmataceae), and *Babesia microti* (Piroplasmida: Babesiidae) in *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) Collected From Recreational Lands in th. *J Med Entomol*, 51(1), 226–236. doi:10.1603/ME13101

Ramos, R. A. N., Latrofa, M. S., Giannelli, A., Lacasella, V., Campbell, B. E., Dantas-Torres, F., & Otranto, D. (2014). Detection of *Anaplasma platys* in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* group ticks by a quantitative real-time PCR. *Vet Parasitol*, 205(1-2), 285–288. doi:10.1016/j.vetpar.2014.06.023

Rejmanek, D., Bradburd, G., & Foley, J. (2012). Molecular characterization reveals distinct genospecies of *Anaplasma phagocytophilum* from diverse North American hosts. *J Med Microbiol*, 61(2), 204–212. doi:10.1099/jmm.0.034702-0

René, M., Chêne, J., Beauvils, J. P., Valiente Moro, C., Bourdoiseau, G., Mavingui, P., & Chabanne, L. (2012). First evidence and molecular characterization of *Babesia vogeli* in naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in southern France. *Vet Parasitol*, 187(2010), 399–407. doi:10.1016/j.vetpar.2012.01.030

René-Martellet, M., Lebert, I., Chêne, 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. *Parasit Vectors*, 8(1), 1–10. doi:10.1186/s13071-014-0613-4

Ribeiro, A. J., Cardoso, L., Maia, J. M., Coutinho, T., & Cotovio, M. (2013). Prevalence of *Theileria equi*, *Babesia caballi*, and *Anaplasma phagocytophilum* in horses from the north of Portugal. *Parasitol Res*, 112, 2611–2617. doi:10.1007/s00436-013-3429-9

Richter, D., Schröder, B., Hartmann, N. K. and F-R. Matuschka. 2013. Spatial stratification of various Lyme disease spirochetes in a Central European site. *FEMS Microbiol Ecol* 83:738–44.

Rizzoli, A., Silaghi, C., Obiegala, A., Rudolf, I., (2014). *Ixodes ricinus* and Its Transmitted Pathogens in Urban and Peri-Urban Areas in Europe: New Hazards and Relevance for Public Health. *Front Pub Health*, 2(December), 1–26. doi:10.3389/fpubh.2014.00251

Roberts, T., Barratt, J., Sandaradura, I., Lee, R., Harkness, J., Marriott, D., Stark, D. (2015). Molecular Epidemiology of Imported Cases of Leishmaniasis in Australia from 2008 to 2014. *Plos One*, 10(3), e0119212. doi:10.1371/journal.pone.0119212

Rolla, D., Conti, N., Ansaldo, F., Panaro, L., & Lusenti, T. (2014). Post-infectious glomerulonephritis presenting as acute renal failure in a patient with Lyme disease, 3(1), 17–20. doi:10.12861/jrip.2014.07

Rossi, M. a., Balakrishnan, N., Linder, K. E., Messa, J. B., & Breitschwerdt, E. B. (2015). Concurrent *Bartonella henselae* infection in a dog with panniculitis and owner with ulcerated nodular skin lesions. *Vet Dermatol*, 26(1), 60–e22. doi:10.1111/vde.12174

Rubinov, A., Blumenthal, E. Z., & Beiran, I. (2014). Cat Scratch Disease Associated with Retinal Vein Occlusion, 16(august), 2–3, *Isr Med Assoc J*.

Sainz, Á., Roura, X., Miró, G., Estrada-Peña, A., Kohn, B., Harrus, S., & Solano-Gallego, L. (2015). Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasit Vectors*, 8(1), 1–20. doi:10.1186/s13071-015-0649-0

Santos, A. S., Bacellar, F., & Dumler, J. S. (2006). Human exposure to *Anaplasma phagocytophilum* in Portugal. *Ann N Y Acad Sci*, 1078, 100–105. doi:10.1196/annals.1374.014

Santos, H. a, Thomé, S. M., Baldani, C. D., Silva, C. B., Peixoto, M. P., Pires, M. S., Massard, C. L. (2013). Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. *Parasit Vectors*, 6, 348. doi:10.1186/1756-3305-6-348

Savi, S. (2014). Emerging vector-borne diseases – incidence through vectors, 2(December), 1–4, *Front Public Health*. doi:10.3389/fpubh.2014.00267

Schaarschmidt, D., Gilli, U., Gottstein, B., Marreros, N., Kuhnert, P., Daeppen, J., Frey, C. F. (2013). Questing *Dermacentor reticulatus* harbouring *Babesia canis* DNA associated with outbreaks of canine babesiosis in the Swiss Midlands. *Tick Tick Borne Dis*, 4(4), 334–340. doi:10.1016/j.ttbdis.2013.01.007

Schnieder, T., Wolken, S., & Mencke, N. (2008). Comparative efficacy of imidacloprid, selamection, fipronil-(S)-methoprene, and metaflumizone against cats experimentally infested with *Ctenocephalides felis*. *Vet Ther*. 9(3):176-83

Schulze, T. L., Jordan, R. A., Healy, S. P., Vivien, E., Schulze, T. L., Jordan, R. A., & Healy, S. P. (2013). Detection of *Babesia microti* and *Borrelia burgdorferi* in Host- Seeking Ixodes scapularis (Acari : Ixodidae) in Monmouth County , New Jersey Detection of *Babesia microti* and *Borrelia burgdorferi* in Host-Seeking Ixodes scapularis (Acari : Ixodidae) in Monmouth County, New Jersey. *J Med Entomol*, 50(2): 379-83.

Schurer, J. M., Ndao, M., Quewezance, H., Elmore, S. a., & Jenkins, E. J. (2014). People, pets, and parasites: One health surveillance in southeastern Saskatchewan. *Am J Tropical Med Hyg*, 90(6), 1184–1190. doi:10.4269/ajtmh.13-0749

Schwarz, A., Honig, V., Vavrusková, Z., Grubhoffer, L., Balczun, C., Albring, A. and G. A. Schaub. 2012. Abundance of *Ixodes ricinus* and prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in the nature reserve Siebengebirge, Germany, in comparison to three former studies from 1978 onwards. *Parasit Vectors* 5:1–15.

Scoles, G. a., & Ueti, M. W. (2015). Vector Ecology of Equine Piroplasmosis. *Ann Rev Entomol*, 60(1), 561–580. doi:10.1146/annurev-ento-010814-021110

Scorza, A. V., Duncan, C., Miles, L., & Lappin, M. R. (2011). Prevalence of selected zoonotic and vector-borne agents in dogs and cats in Costa Rica. *Vet Parasitol*, 183(2010), 178–183. doi:10.1016/j.vetpar.2011.06.025

Shamasna, M., Nunes, J., Cortez, J., Valente, C., Pissara, F. and G. Gonçalves. 2012. Neuroborreliose: uma forma de apresentação atípica. *Rev Port Dis Infec* 8:35–40.

Silva, A. B., Silva, Á. B., Canseco, S. P., Gabriel, P., & Torre, D. (2014). Infección humana asintomática por contacto con perros. Un caso de ehrlichiosis humana, 171–174, *Gac Med Mex*.

Silva, I. P. C. Da. (2011). Estudo De Hemoparasitas Transmitidos Por Vectors, Em Cães De Canil, Setúbal, Portugal., 99. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.

Skotarczak, B. (2014). Why are there several species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato detected in dogs and humans? *Infect Genet Evol*, 23, 182–188. doi:10.1016/j.meegid.2014.02.014

Smith, F. D., Ballantyne, R., Morgan, E. R., & Wall, R. (2012). Estimating Lyme disease risk using pet dogs as sentinels. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 35(2), 163–167. doi:10.1016/j.cimid.2011.12.009

Smith, F. D., & Wall, L. E. R. (2013). Prevalence of *Babesia* and *Anaplasma* in ticks infesting dogs in Great Britain. *Vet Parasitol*, 198(1-2), 18–23. doi:10.1016/j.vetpar.2013.08.026

Smith, G., Gemmill, I., & Moore, K. (2012). Management of tick bites and lyme disease during pregnancy. *J Obstet Gynaecol Can*, 1087–1091. Retrieved from http://www.jogc.com/abstracts/full/201211_Commentary_1.pdf

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*, 165(1-2), 1–18. doi:10.1016/j.vetpar.2009.05.022

Solano-Gallego, L., & Baneth, G. (2011). Babesiosis in dogs and cats-Expanding parasitological and clinical spectra. *Vet Parasitol*, 181(1), 48–60. doi:10.1016/j.vetpar.2011.04.023

Stanneck, D., & Fourie, J. J. (2013). Imidacloprid 10 % / Flumethrin 4.5 % Collars (Seresto®, Bayer) Successfully Prevent Long-Term Transmission of *Ehrlichia canis* by Infected *Rhipicephalus sanguineus* Ticks to Dogs. *Parasitol Res*, 112(S1), 21–32. doi:10.1007/s00436-013-3278-6

Stich, R. W., Schaefer, J. J., Bremer, W. G., Needham, G. R., & Jittapalapong, S. (2008). Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. *Vet Parasitol*, 158(4), 256–273. doi:10.1016/j.vetpar.2008.09.013

Stutzer, B., & Hartmann, K. (2012). Chronic Bartonellosis in Cats: What are the potential implications? *J Fel Med Surg*, 14(9), 612–621. doi:10.1177/1098612X12458208

Schwarz, A., Honig, V., Vavrusková, Z., Grubhoffer, L., Balczun, C., Albring, A. & G. A. Schaub. 2012. Abundance of *Ixodes ricinus* and prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in the nature reserve Siebengebirge, Germany, in comparison to three former studies from 1978 onwards. *Parasit Vectors* 5:1–15.

Tabar, M.-D., Francino, O., Altet, L., Sánchez, A., Ferrer, L., & Roura, X. (2009). PCR survey of vectorborne pathogens in dogs living in and around Barcelona, an area endemic for leishmaniasis. *Vet Rec*, 164, 112–116. doi:10.1136/vr.164.4.112

Talbi, F. Z., El Ouali Lalami, A., Janati Idrissi, A., Sebti, F., & Faraj, C. (2015). Leishmaniasis in Central Morocco: Seasonal Fluctuations of Phlebotomine Sand Fly in Aichoun Locality, from Sefrou Province. *Pathol Res Int*, 2015, 1–4. doi:10.1155/2015/438749

Teng, C.-H., Barr, S. C., & Chang, Y.-F. (2003). Cloning and characterization of putative zinc protease genes of *Ehrlichia canis*. *DNA Sequence : J DNA Seq Mapp*, 14(2), 109–121. doi:10.1080/1042517031000073736

Teshale, S., Geysen, D., Ameni, G., Asfaw, Y., & Berkvens, D. (2015). Ticks and Tick-borne Diseases Improved molecular detection of *Ehrlichia* and *Anaplasma* species applied to *Amblyomma* ticks collected from cattle and sheep in Ethiopia. *Tick Tick Borne Dis*, 6(1), 1–7. doi:10.1016/j.ttbdis.2014.04.023

Tilly, K., Rosa, P. a., & Stewart, P. E. (2008). Biology of Infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Dis Clin North Am*, 22(2), 217–234. doi:10.1016/j.idc.2007.12.013

Toledo-Machado, C. M., Machado de Avila, R. A., NGuyen, C., Granier, C., Bueno, L. L., Carneiro, C. M., Fujiwara, R. T. (2015). Immunodiagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis Using Mimotope Peptides Selected from Phage Displayed Combinatorial Libraries. *BioMed Res Int*, 2015(Cv1), 1–10. doi:10.1155/2015/401509

Trotta, M., Fogliazza, a., Furlanello, T., & Solano-Gallego, L. (2009). A molecular and serological study of exposure to tick-borne pathogens in sick dogs from Italy. *Clin Microbiol Infect*, 15(SUPPL. 2), 62–63. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02279.x

Tuya, X. L., Escalante-Kanashiro, R., Tinco, C., Pons, M. J., Petrozzi, V., Ruiz, J., & del Valle, J. (2014). Possible Vertical Transmission of *Bartonella bacilliformis* in Peru. *Am J Trop Med Hyg*, 92(1), 126–128. doi:10.4269/ajtmh.14-0098

Ulutaş, B., Bayramli, G., & Karagenc, T. (2007). First case of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* infection in a dog in Turkey. *Turk J Vet Animal Sc*, 31(1), 279–282. doi:10.1186/1756-3305-5-49

Varanat, M., Maggi, R. G., Linder, K. E., & Breitschwerdt, E. B. (2013). Infection of human brain vascular pericytes (HBVPs) by *Bartonella henselae*. *Med Microbiol Immun*, 202(2), 143–151. doi:10.1007/s00430-012-0279-5

Vera, C., Kapiainen, S., Junnikkala, S., Aaltonen, K., Spillmann, T., & Vapalahti, O. (2014). Survey of selected tick-borne diseases in dogs in Finland. *Parasit Vectors*, 7, 285. doi:10.1186/1756-3305-7-285

Vieira, T. S. W. J., Vieira, R. F. D. C., Nascimento, D. A. G. Do, Tamekuni, K., Toledo, R. D. S., Chandrashekar, R., Vidotto, O. (2013). Serosurvey of tick-borne pathogens in dogs from urban and rural areas from Parana State, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, 22(Pr 445), 104–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24252955>

Vilhena, H., Martinez-Díaz, 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*, 6, 99. doi:10.1186/1756-3305-6-99

Wagner, B., & Erb, H. N. (2012). Dogs and horses with antibodies to outer-surface protein C as on-time sentinels for ticks infected with *Borrelia burgdorferi* in New York State in 2011. *Prev Vet Med*, 107(3-4), 275–279. doi:10.1016/j.prevetmed.2012.07.002

Wagner, B., Goodman, L. B., Rollins, a., & Freer, H. S. (2013). Antibodies to OspC, OspF and C6 antigens as indicators for infection with *Borrelia burgdorferi* in horses. *Eq Vet J*, 45(5), 533–537. doi:10.1111/evj.12033

Waner, T., Nachum-Biala, Y., & Harrus, S. (2014). Evaluation of a commercial in-clinic point-of-care polymerase chain reaction test for *Ehrlichia canis* DNA in artificially infected dogs. *Vet J*, 202(3), 618–621. doi:10.1016/j.tvjl.2014.10.004

Welc-Falęciak, R., Kowalec, M., Karbowski, G., Bajera, A., Behnke, J. M., & Siński, E. (2014). Rickettsiaceae and Anaplasmataceae infections in *Ixodes ricinus* ticks from urban and natural forested areas of Poland. *Parasit Vectors*, 7, 121. doi:10.1186/1756-3305-7-121

Who. (2009). World Health Statistics 2009, 149. Retrieved from http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=osms0oMN_qwC&oi=fnd&pg=PA7&dq=World+Health+Statistics+2009&ots=iZZVF1tmhC&sig=B5eH3XqrwcTQvBD0J9XJyNcq0qg

Who, W. H. O. (2012). World Health Statistics. WHO World Health Organization (Vol. 27). doi:10.2307/3348165

Wodecka, B., Leońska, A., & Skotarczak, B. (2010). A comparative analysis of molecular markers for the detection and identification of *Borrelia spirochaetes* in *Ixodes ricinus*. *J Med Microbiol*, 59(Pt 3), 309–314. doi:10.1099/jmm.0.013508-0

Yancey, C. B., Hegarty, B. C., Qurollo, B., Levy, M. G., Birkenheuer, A. J., Weber, D. J., Breitschwerdt, E. B. (2014). Regional Seroreactivity and Vector-Borne Disease Co-Exposures in Dogs in the United States from 2004 – 2010 : Utility of Canine Surveillance. *Vect Borne Zoonot Dis*, 14(10), 724–732. doi:10.1089/vbz.2014.1592

Yabsley, M. J., McKibben, J., Macpherson, C. N., Cattán, P. F., Cherry, N. a., Hegarty, B. C., Sylvester, W. (2008). Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii berkhoffii*, and *Rickettsia* spp. in dogs from Grenada. *Vet Parasitol*, 151(2-4), 279–285. doi:10.1016/j.vetpar.2007.11.008

Zimmerman, K. L., McMillan, K., Monroe, W. E., Sponenberg, D. P., Evans, N., Makris, M., Boudreaux, M. K. (2013). Leukocyte adhesion deficiency type I in a mixed-breed dog. *J Vet Diagnost Inv*, 25(2), 291–6. doi:10.1177/1040638713478814

Zobba, R., Chessa, G., Mastrandrea, S., Pinna Parpaglia, M. L., Patta, C., & Masala, G. (2009). Serological and molecular detection of *Bartonella* spp. in humans, cats and dogs from northern Sardinia, Italy. *Clin Microbiol Infect*, 15(SUPPL. 2), 134–135. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02203.x

Apêndice I - Inquérito preenchido pelos Médicos Veterinários que recolheram as amostras dos cães em estudo

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Unidade de Parasitologia Médica

Identificação do animal

Data colheita: __/__/__

Nome: _____

Sexo: Macho ☐ Fêmea ☐

Idade /data nascimento: _____

Freguesia onde vive o animal: _____

Concelho onde vive o animal: _____

O animal permanece: Exclusivamente de interior ☐

Interior e exterior ☐

Exclusivamente de exterior ☐

Deslocações dentro ou fora de Portugal?

Sim ☐ Não ☐ Onde? _____

O animal recebe regularmente inseticidas/repelentes ?

Sim ☐ Não ☐ Qual? _____

Se clinicamente suspeito, por favor indique os sinais clínicos presentes:

Lesões dérmicas (seborreia e/ou alopecia e/ou ulceração)	<input type="checkbox"/>	Lesões oculares	<input type="checkbox"/>
Linfadenopatia	<input type="checkbox"/>	Epistaxis	<input type="checkbox"/>
Perda de peso progressiva	<input type="checkbox"/>	Onicogribose	<input type="checkbox"/>
Atrofia muscular	<input type="checkbox"/>	Palidez das mucosas	<input type="checkbox"/>
Diminuição do apetite	<input type="checkbox"/>	Poliúria e polidipsia	<input type="checkbox"/>
Febre	<input type="checkbox"/>	Vómito e/ou diarreia	<input type="checkbox"/>
Letargia	<input type="checkbox"/>	Claudicação	<input type="checkbox"/>
Intolerância ao exercício	<input type="checkbox"/>		

Doenças concomitantes:

Sim ☐ Não ☐ Qual? _____

Produto a analisar: Soro ☐ Sangue em pp de filtro ☐

Colheita efetuada por:

Consentimento:
