



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**DETEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *BABESIA* SPP. EM *CANIS*  
*FAMILIARIS* E DE OUTROS AGENTES TRANSMITIDOS POR IXODÍDEOS NA ÁREA  
METROPOLITANA DE LISBOA E OESTE, PORTUGAL**

ANA MAFALDA DUARTE DORDIO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Doutor Jacinto José Carneiro Gomes

ORIENTADOR

Doutor Jacinto José Carneiro Gomes

COORIENTADOR

Doutora Isabel Maria Soares Pereira

da Fonseca de Sampaio

ANO 2018

LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**DETEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *BABESIA* SPP. EM *CANIS*  
*FAMILIARIS* E DE OUTROS AGENTES TRANSMITIDOS POR IXODÍDEOS NA ÁREA  
METROPOLITANA DE LISBOA E OESTE, PORTUGAL**

ANA MAFALDA DUARTE DORDIO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Doutor Jacinto José Carneiro Gomes

ORIENTADOR

Doutor Jacinto José Carneiro Gomes

COORIENTADOR

Doutora Isabel Maria Soares Pereira  
da Fonseca de Sampaio

ANO 2018

LISBOA

*Aos meus pais e ao meu irmão*



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Doutor Jacinto Gomes, pela sua incansável transmissão de conhecimentos, por me ter ajudado em todas as fases deste processo desta dissertação e pelas oportunidades que me foram proporcionadas.

À minha coorientadora, Professora Doutora Isabel Pereira da Fonseca, por me cultivar a paixão pela parasitologia, pela disponibilidade demonstrada desde o início e pelo seu contributo substancial nesta dissertação.

To the Parasitology department, from the Croatia Veterinary Institute, specially to Doctor Relja Beck, for financial support to develop part of this study and make my traineeship possible. Also thank you for making sure I wouldn't leave the country without knowing Croatia culture.

Ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) por ter disponibilizando os meios materiais e financeiros necessários à realização deste trabalho.

Ao Doutor Marcos Santos e à Dra. Lídia Gomes pelo apoio prestado e pela paciência durante a realização das técnicas laboratoriais.

À Professora Doutora Ana Duarte por ter disponibilizado as amostras do Laboratório de Virologia e Imunologia da FMV, que foram incluídas na presente dissertação.

Ao Dr. Telmo Nunes pela disponibilidade, ajuda na análise de dados e transmissão de confiança no trabalho desenvolvido.

Aos responsáveis e funcionários dos Canis Municipais e Associações de Proteção Animal que colaboraram neste trabalho e foram incansáveis para me auxiliar nas minhas visitas.

Ao Dr. Gonçalo Vicente por me dar a oportunidade de o acompanhar durante o meu estágio curricular no Hospital Escolar Veterinário, por todos os ensinamentos e, pela boa disposição e motivação que me transmitiu ao longo do estágio.

A toda a equipa do Hospital Escolar Veterinário, médicos e enfermeiros, pelos ensinamentos e pelo bom ambiente que marcou o meu estágio. Um especial obrigada aos meus colegas estagiários, que tornaram este período inesquecível.

Agradeço à minha família, em especial aos meus avós e tios, pelo apoio incondicional e por me terem transmitido valores que foram essenciais durante todo este percurso.

Aos meus pais, sem os quais não seria possível atingir esta etapa, por me terem proporcionado a oportunidade de seguir o curso e por me incentivarem a dar o melhor de mim em tudo. Ao meu irmão, por me apoiar ao longo deste percurso sem nunca duvidar do que eu poderia alcançar.

À Dra. Sónia Farrim, médica veterinária da Clínica Veterinária da Vigia, que sempre me encorajou a seguir este caminho e me ajudou nas grandes decisões. Ensinou-me a exercer veterinária com ética e compaixão para com os animais.

To the Nute Veterinary Surgery team, thank you for all the trust you put on me and for sharing all your knowledge. Thank you to the family Bass and Leavold for your support and for receiving me every day during my traineeship with such a good energy.

A todos os colegas com quem partilhei estes 6 anos de grande luta: Inês Prata, Sara Prata, Gustavo Ayres, Catarina Nascimento, Luís Belo, Rúben Silva, Sofia Monteiro, Bárbara Abrantes e tantos outros! Em especial à Carolina Melo, por me ter recebido de braços abertos na FMV, pela força e amizade transmitidas desde o início.

À minha amiga Alexandra Pereira, uma das melhores pessoas que já conheci, por estar sempre presente. Ao grupo de infância “Santa Vice” por toda a vossa amizade e intrigantes discussões ao longo de 15 anos.

A toda a equipa da Emergosol Lusitanos, especialmente à Emma Franco e Anne Langan, que me acolheram e me deram oportunidade de ter o meu lugar preferido de escape.

E por último, aos meus companheiros de 4 patas, Boris, Bianca, Adão e Ozzy, por me despertarem esta paixão e vontade de querer dedicar-me aos animais.

*Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si,  
levam um pouco de nós. - Antoine de Saint-Exupéry*

## RESUMO

### DETEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *BABESIA* SPP. EM CANIS FAMILIARIS E DE OUTROS AGENTES TRANSMITIDOS POR IXODÍDEOS NA ÁREA METROPOLITANA DE LISBOA E OESTE, PORTUGAL

As doenças dos canídeos cujos agentes são transmitidos por vetores (DCTV), são causadas por um número abrangente de agentes patogénicos transmitidos por artrópodes e são um problema crescente no mundo nos últimos anos. A Babesiose canina faz parte dessas doenças, sendo causada por diversas espécies pertencentes ao género *Babesia*. Até ao momento sabe-se que a Babesiose canina é provocada pelas espécies *Babesia canis* e *Babesia microti-like* no Norte e *Babesia vogeli* em todas as regiões de Portugal. No entanto, as informações relativas às espécies de *Babesia*, bem como a sua prevalência molecular, distribuição geográfica e a gravidade do quadro clínico são escassas. A pesquisa de possíveis agentes transmitidos por vetores é igualmente importante, uma vez que os cães podem estar infetados com múltiplos destes agentes patogénicos, o que torna a abordagem clínica e tratamento um desafio para o Médico Veterinário. A amostra deste estudo foi constituída por dois grupos, de forma a contribuir para uma perceção real dos agentes patogénicos encontrados em 94 animais aparentemente saudáveis, provenientes de canis, e 49 animais doentes com suspeita de Babesiose canina, ambos provenientes da área metropolitana de Lisboa e do Oeste. Este estudo baseou-se na deteção de *Babesia* e agentes coinfectantes o método de observação de esfregaços sanguíneos ao Microscópio ótico, PCR convencional, RFLP e sequenciação de DNA.

A infeção por *B. canis* foi detetada apenas no grupo de animais doentes, em 2 cães (1,40%) com um quadro clínico descrito e compatível com Babesiose canina aguda, enquanto a espécie *B. vogeli* foi detetada em 1 animal doente e 3 animais aparentemente saudáveis (2,81%). Foram detetadas infeções únicas em 35 animais (24,64%), dos quais: 17 (11,97%) com *Hepatozoon canis*, 4 (2,82%) com *Anaplasma platys*, 1 (0,70%) com *Ehrlichia canis* e 7 (4,93%) com *Mycoplasma haemocanis*. As coinfeções foram detetadas em 13 animais (9,15%), dos quais: 5 (3,52%) com *H. canis* e *A. platys*; 5 (5,52%) com *H. canis* e *M. haematoparvum*; e 1 (0,70%) com *A. platys* e *M. haematoparvum*. A partir do grupo de animais aparentemente saudáveis, a prevalência de infeções únicas e coinfeções foi de 26,6%, e de 12,7% respetivamente.

Esta foi a primeira identificação, a partir de métodos moleculares, de *Babesia canis* e *Mycoplasma haematoparvum* no Sul de Portugal. A identificação de agentes transmitidos por vetores auxilia os Médicos Veterinários na sua abordagem clínica e reforça a importância de atuar de acordo com o conceito *One Health* para a prevenção dos riscos de transmissão.

**Palavras chave:** Cães, DCTV, *Babesia* spp., esfregaços sanguíneos, cPCR, sequenciação.



## ABSTRACT

### DETECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *BABESIA* SPP. IN *CANIS FAMILIARIS* AND OTHER PATHOGENS TRANSMITTED BY TICKS IN THE METROPOLITAN AREA OF LISBON AND WESTERN REGION, PORTUGAL

Canine vector-borne diseases (CVBD) are caused by a wide range of pathogens transmitted by arthropods, and it is an issue of growing importance from the past years. Canine Babesiosis is englobed in this group of diseases, furthermore is caused by different species from the *Babesia* genera. Currently it's known that Canine Babesiosis it's caused in the northern of Portugal by *Babesia canis* and *Babesia microti-like*, and by *Babesia vogeli* in all the country. There is a lack of information about the species that could cause the disease in Portugal, as well as the molecular prevalence, geographic distribution and severity of clinical manifestations of these parasites. Also, the detection of possible pathogens transmitted by vectors are equally important since the dogs can be infected with multiple pathogens, which makes the clinical approach and treatment a challenge for veterinarians. This study includes two groups, with the aim of contribution for a real perspective of pathogens that can be found, both the metropolitan area of Lisbon and Western region of Portugal. 94 dogs apparently healthy from shelters, that had previous contact with ticks, and 49 dogs clinically suspected of Canine Babesiosis. This study assessed, by means of blood smear examination, conventional PCR, RFLP and DNA nucleotide sequencing, the presence of *Babesia* spp. and co-infecting agents.

*Babesia canis* was detected only in the group of sick dogs, in two animals (1,40%), with clinical manifestations described and compatible with an acute Canine Babesiosis, while *B. vogeli* was detected in one animal suspect of disease and 3 animals apparently health (2,81%). Single infections were detected in 35 animals (24,64%): *H. canis* in 17 (11,97%), *A. platys* in 4 (2,82%), *E. canis* in 1 (0,70%) and *M. haemocanis* in 7 (4,93%). Coinfections were detected in 13 animals (9,15%): *H. canis* and *A. platys* in 5 (3,52%); *H. canis* and *M. haematoparvum* in 5 (5,52%) and *A. platys* with *M. haematoparvum* in 1 (0,70%). In dogs apparently healthy the prevalence of single infections and coinfections was 26,6%, and 12,7% respectively.

This is the first molecular identification of *B. canis* and *M. haematoparvum* in dogs from southern Portugal. This identification of pathogens of CVBD agents helps to guide the clinical approach of veterinarians at the practice and reinforces the importance of a One Health approach, to prevent the risk of the transmission.

**Keywords:** Dogs, CVBD, *Babesia* spp., blood smears, cPCR, DNA nucleotide sequencing

## ÍNDICE GERAL

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO II – ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR .2	
1. Hospital Escolar Veterinário da FMV-ULisboa .....	2
2. Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LPDP) da FMV – ULisboa .....	4
3. Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV).....	4
4. Croatia Veterinary Institute, Zagreb .....	4
5. Nute’s Veterinary Surgery, CVS Group Plc .....	4
6. Queen Mother Hospital for animals, Royal Veterinary College .....	6
CAPÍTULO III – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	7
1. Babesiose canina.....	7
1.1. Etiologia.....	7
1.2. Ciclo de vida e Transmissão.....	9
1.3. Distribuição geográfica do vetor de <i>Babesia</i> spp em Portugal .....	11
1.4. Distribuição geográfica e epidemiologia de <i>Babesia</i> spp. na Europa .....	13
1.5. Fisiopatologia .....	16
1.6. Sinais Clínicos e Exames complementares de diagnóstico .....	18
1.7. Diagnóstico de infeção por <i>Babesia</i> ou Babesiose canina .....	20
1.7.1. Diagnóstico Clínico.....	20
1.7.2. Diagnóstico Laboratorial .....	21
1.7.3. Diagnóstico post-mortem .....	25
1.8. Tratamento e Prognóstico .....	25
1.9. Controlo e Profilaxia.....	28
1.11. Importância em Saúde Pública.....	30
1.12. Agentes de coinfeção com <i>Babesia</i> spp. ....	31
1.12.1. Bactérias.....	31
1.12.2. Outros protozoários.....	34
1.12.3. Nemátodes .....	35

CAPÍTULO IV - DETEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>BABESIA</i> SPP. EM CANIS FAMILIARIS E DE OUTROS AGENTES TRANSMITIDOS POR IXODÍDEOS NA ÁREA METROPOLITANA DE LISBOA E OESTE, PORTUGAL .....	36
1. Objetivos .....	36
2. Material e Métodos .....	37
2.1. Caracterização da amostra e da área geográfica .....	37
2.2. Inquérito .....	38
2.3. Colheita e conservação das amostras .....	38
2.4. Coloração de esfregaços sanguíneos e posterior observação direta ao Microscópio ótico.....	38
2.5. Extração e quantificação de DNA.....	39
2.6. Métodos moleculares para deteção de <i>Babesia</i> spp.....	39
2.6.1. Amplificação gene 18S pelo Método 1 e PCR RFLP .....	39
2.6.2. Amplificação gene 18S pelo Método 2, purificação e sequenciação.....	40
2.7. Métodos moleculares para deteção de outros agentes .....	41
2.8. Análise de dados.....	42
3. Resultados .....	43
3.1. Caracterização da amostra em estudo .....	43
3.2. Deteção de hemoparasitas por Microscopia ótica em esfregaço sanguíneo.....	47
3.3.1. Deteção de <i>Babesia</i> spp., através da amplificação do gene 18S pelo Método 1 e PCR RFLP .....	49
3.3.2. Deteção de <i>Babesia</i> spp., através da amplificação do gene 18S pelo Método 2 e sequenciação nucleotídica .....	51
3.4. Deteção de DNA por PCR convencional de outros agentes e sequenciação nucleotídica .....	52
3.5. Descrição dos resultados sorológicos, moleculares e por observação direta de parasitas utilizados neste estudo.....	57
3.7. Manifestações clínicas encontradas no primeiro grupo (Hospital) .....	59
3.8. Manifestações clínicas encontradas no segundo grupo (Canil) .....	63
4. Discussão.....	64
CAPÍTULO V – CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS .....	76
BIBLIOGRAFIA.....	78

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo I. Critérios de inclusão de amostras para o grupo 1, constituído por cães apresentados à consulta no Hospital Escolar Veterinário. ....	92
Anexo II. Inquérito preenchido pelos tutores responsáveis pelo cão incluído no presente estudo, e em concordância com os dados fornecidos pelo Médico Veterinário. ....	93
Anexo III. Inquérito preenchido pelo Médico Veterinário ou técnico responsável do Canil Municipal ou Associação de Proteção Animal. ....	95
Anexo IV. Protocolo de extração de DNA a partir de sangue total (DNeasy Blood & Tissue Kit®). ....	97
Anexo V. Programa do termociclador para a recção da PCR convencional, para pesquisa de Babesia spp. pelo Método 1, Método 2 e pesquisa de outros agentes patogénicos transmitidos por ixodídeos. ....	98
Anexo VI. Listagem de resultados dos questionários individuais realizados aos responsáveis pelos cães do grupo 1, com suspeita de Babesiose Canina e resultados de infeções detetadas por observação direta ao MO e cPCR (n= 49). ....	99
Anexo VII. Listagem de resultados dos questionários individuais realizados aos responsáveis pelos cães do grupo 2, aparentemente saudáveis e com contacto prévio com ixodídeos e resultados de infeções detetadas por observação direta ao MO e cPCR (n= 94). ....	102

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Caso clínico de quilotórax presenciado num gato doméstico <i>Felis silvestres catus</i> (Original). .....	5
Figura 2 - Ciclo de vida do parasita <i>Babesia</i> spp., tendo como hospedeiro vertebrado o cão doméstico (desenho original por Dordio & Lopo 2017). .....	9
Figura 3 – Babésia de grandes dimensões - Merozítos no interior de um eritrócito, através da observação ao microscópio ótico, obj. x100, oc. x10 (Fotografia original). .....	48
Figura 4 - <i>Hepatozoon</i> spp. no interior de um monócito (A) e uma mórula de <i>Anaplasma platys</i> numa plaqueta (B), observados ao microscópio ótico, obj. x100, oc. x10 (Fotografias originais). .....	48
Figura 5 - <i>Mycoplasma</i> spp. na periferia de um eritrócito (A) e <i>Ehrlichia canis</i> no interior de um monócito com desfragmentação do núcleo (B), observados ao microscópio ótico, obj. x100, oc. x10 (Fotografias originais). .....	48
Figura 6 - Produtos de amplificação de 26 amostras (A1-A10; B1-B10 e C1-C6) por PCR convencional em gel de agarose a 1,5%. Resultado positivo para a deteção de <i>Babesia</i> spp. nas amostras B5, B8, B10 (Original). .....	49
Figura 7 - Produtos de amplificação, com utilização dos primers PIRO A e PIRO B, após digestão com as enzimas de restrição HingI (h) e TaqI (t) (Original). Coluna A e E: <i>Babesia canis</i> ; Coluna B e D: <i>Babesia vogeli</i> ; Coluna F: controlo positivo correspondente a <i>Babesia canis</i> ; Coluna G e H: controlo positivo correspondente a <i>Babesia rossi</i> . .....	50
Figura 8 - Produtos de amplificação de 10 amostras (D1-D10), através de PCR convencional por eletroforese de capilaridade da QIAEXEL (Qiagen, Hilden, Germany), utilizando o kit QIAxcel DNA Fast Analysis, obtida a partir do Método 2. Resultado positivo para a deteção de <i>Babesia</i> spp. nas amostras bab/39, bab/42 e bab/44 (Originais). .....	51
Figura 9 - Produtos de amplificação de 10 amostras (F9-G5), através de PCR convencional por eletroforese de capilaridade da QIAEXEL (Qiagen, Hilden, Germany), utilizando o kit QIAxcel DNA Fast Analysis, obtida a partir do Método 2. Resultado positivo para a deteção de agentes patológicos pertencentes à família Anaplasmataceae nas amostras ana/43, ana/47 e ana/49 (Original). .....	52
Figura 10 - Produtos de amplificação de 10 amostras (B1-B10), através de PCR convencional por eletroforese de capilaridade da QIAEXEL (Qiagen, Hilden, Germany), utilizando o kit QIAxcel DNA Fast Analysis, obtida a partir do Método 2. Resultado positivo para a deteção de parasitas do género <i>Hepatozoon</i> nas amostras hep/18 e hep/19 (Original). .....	53
Figura 11 - Produtos de amplificação de 10 amostras (F1-F10), através de PCR convencional por eletroforese de capilaridade da QIAEXEL (Qiagen, Hilden, Germany), utilizando o kit	

QIAxcel DNA Fast Analysis, obtida a partir do Método 2. Resultado positivo para a deteção de agentes patológicos do género <i>Mycoplasma</i> na amostra myco/86 (Original). .....	53
Figura 12 - Distribuição geográfica dos agentes patogénicos transmitidos por Ixodídeos, detetados por PCR em amostras sanguíneas de animais provenientes de diferentes concelhos, do distrito de Lisboa (Original Dordio & Lopo, 2017). .....	56
Figura 13 - Animal em internamento, no Hospital Escolar Veterinário, infetado com <i>Anaplasma platys</i> e apresentado à consulta com sinais compatíveis com Anaplasmosse trombocítica canina (Originais). .....	62

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição dos 49 cães domésticos, pertencentes ao grupo 1, dos concelhos constituintes da área metropolitana de Lisboa e Oeste. ....	43
Gráfico 2 - Proporção de cães, pertencentes ao grupo 1, que tiveram contacto com carraças observadas pelo tutor (n=49). ....	44
Gráfico 3 - Sexo e estado reprodutivo dos cães incluídos na amostra (n=143). ....	44
Gráfico 4 - Distribuição da população alvo por faixas etárias (n=143). ....	45
Gráfico 5 - Distribuição de casos de animais positivos pela observação ao microscópio ótico de <i>Babesia</i> spp., <i>Hepatozoon</i> spp., <i>Ehrlichia</i> spp./ <i>Anaplasma</i> spp., <i>Mycoplasma</i> spp. pelos dois grupos incluídos nesta dissertação: Grupo 1, cães apresentados à consulta com sinais clínicos compatíveis com Babesiose canina (n=48); Grupo 2, cães de canil (n=94). ....	47
Gráfico 6 - Distribuição de casos de animais positivos por PCR convencional para <i>Babesia</i> spp., <i>Hepatozoon</i> spp., <i>Ehrlichia</i> spp./ <i>Anaplasma</i> spp., <i>Mycoplasma</i> spp. pelos dois grupos incluídos nesta dissertação: Grupo 1, cães apresentados à consulta com sinais clínicos compatíveis com Babesiose canina (n=48) e Grupo 2, cães de canil (n=94) .....	54

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição geográfica das diferentes espécies de <i>Babesia</i> descritas na Europa e seus respetivos vetores.....	15
Tabela 2 - Primers utilizados para amplificação de agentes patogénicos descritos na presente dissertação. ....	42
Tabela 3 - Frequência absoluta e relativa (%) da distribuição de raças e cruzamentos de cães domésticos da amostra (n=143).....	45
Tabela 4 - Discriminação das principais espécies de <i>Babesia</i> com capacidade para infetar o cão, utilizando os primers PIROA e PIROB e com abordagem à técnica RFLP, baseado no estudo de Carret <i>et al</i> , 1999.....	50
Tabela 5 - Infecções únicas e coinfeções observadas através da deteção por métodos moleculares e frequência absoluta de animais coinfectados, por espécie, na amostra de 142 cães domésticos.....	55
Tabela 6 - Distribuição das infeções detetadas por PCR convencional e posterior sequenciação, no grupo 2, constituído por cães provenientes de canis municipais ou associações de proteção animal, em diferentes concelhos pertencentes ao distrito de Lisboa (n=94). ....	57
Tabela 7 – Utilização de IFI e de cPCR no diagnóstico de infeção por <i>Babesia</i> spp.....	58
Tabela 8 - Comparação dos resultados obtidos através da observação direta de <i>Babesia</i> spp. em esfregaços sanguíneos com os obtidos por PCR convencional para <i>Babesia</i> spp. ....	58
Tabela 9 - Comparação dos resultados obtidos através da observação direta de <i>Hepatozoon</i> spp. em esfregaços sanguíneos com os obtidos por PCR convencional para <i>Hepatozoon</i> spp. ....	58
Tabela 10 – Hemograma completo dos 3 casos clínicos, pertencentes ao grupo 1, que se apresentaram à consulta no HEV, com um quadro clínico compatível com Babesiose Clínica e onde foi detetada infeção por <i>Babesia</i> spp.. ....	60
Tabela 11 - Dados, manifestações clínicas e resposta ao tratamento nos cães com Babesiose Canina.....	60
Tabela 12 - Presença de sinais clínicos apresentados em animais infetados por agentes transmitidos por ixodídeos, pertencentes ao grupo 1.....	61
Tabela 13 - Alterações hematológicas apresentadas em animais infetados por agentes transmitidos por ixodídeos, pertencentes ao grupo 1.....	62
Tabela 14 - Manifestações clínicas encontradas em animais, provenientes de canis, com infeções únicas ou coinfeções. ....	63
Tabela i - Sinais clínicos e biológicos utilizados na inclusão de casos clínicos para o grupo 1. ....	92



Tabela ii - Programa de amplificação dos géneros Babesia e Theileria por PCR convencional. Método 1 realizado com utilização do termociclador MJ Mini Gradient Thermal Cyclor (BIO-RAD®) e Método 2 realizado com utilização do termociclador Alpha Cyclor 2 (PCRmax®). ...98

Tabela iii- Programa de amplificação de outros agentes etiológicos, anteriormente referidos por PCR convencional, realizado no termociclador Alpha Cyclor 2 (PCRmax®).....98

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius

µL – Microlitro

µm – Micrometro

AHIM – Anemia hemolítica imunomediada

AML – Área Metropolitana de Lisboa

cPCR – PCR convencional (do inglês *conventional PCR*)

DCTV - Doenças caninas transmitidas por vetores (do inglês CVBD – *Canine Vector-borne Diseases*)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic acid*)

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

EDTA - *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

ESCCAP - *European Scientific Counsel Companion Animal Parasites*

FMV – Faculdade de Medicina Veterinária

HEV – Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária

IFI – Imunofluorescência indireta

IgG – Imunoglobulina G

IM – Via intramuscular

kg – Quilograma

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio

mL – Mililitro

mg/kg – miligrama por quilograma

PI – Período de incubação

PO – Por via oral (*Per os*)

qPCR – PCR quantitativa em tempo real (do inglês *quantitative real-time PCR*)

mm – milímetro

n – Número de animais

n.a – Não aplicável

NaCl - Cloreto de sódio

pb – Pares de base

PCR – Reacção em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase chain reaction*)

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

rpm – Rotações por minuto

rRNA – Ácido ribonucleico ribossómico (do inglês *Ribosomal ribonucleic acid*)

SRIS - Síndrome de Resposta Inflamatória Sistémica

sp. - Espécie

spp. – Espécies

TP – Tempo de protrombina

TT – Tempo de trombina

TTPA – Tempo de tromboplastina parcial ativada

## CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

A Babesiose canina incluída no grupo de doenças transmitidas por vetores (DCTV), é emergente em diversas áreas e tem uma distribuição geográfica cosmopolita. A infecção por *Babesia* spp. é importante não só em canídeos domésticos como em canídeos silváticos (Alvarado-Rybak, Solano-Gallego, & Millán, 2016). A classificação taxonômica tem sido feita através da morfologia do protozoário, designado por piroplasmas enquanto merozoitos no interior dos eritrócitos. Esta classificação divide-os em babésias de grandes dimensões e babésias de pequenas dimensões (Birkenheuer, 2012; Irwin, 2009). Nas últimas décadas, foi possível identificar novas espécies com capacidade para infectar cães domésticos, através de técnicas moleculares (René-Martellet *et al.*, 2015). Foram identificadas na Europa, até à data, quatro espécies: *B. canis* e *B. vogeli* que pertencem aos piroplasmas de grandes dimensões; e *B. gibsoni* e *Babesia microti-like*, que pertencem aos piroplasmas de pequenas dimensões (Solano-Gallego, Sainz, Roura, Estrada-Peña, & Miró, 2016). Contudo, existiu ainda um caso isolado de infecção por *B. rossi* em França, num animal sem história de deslocações (Fritz, 2010). A distribuição geográfica, transmissão, sinais clínicos, tratamento e prognóstico de *Babesia* spp. varia entre espécies. Para além da espécie envolvida, os principais fatores que determinam a gravidade do quadro clínico incluem a idade e o estado imunitário do hospedeiro definitivo (Solano-Gallego *et al.*, 2016).

Atualmente, a importância de doenças transmitidas por vetores e do seu potencial zoonótico tem aumentado na medicina veterinária e humana. As alterações climáticas, a transformação de terrenos e o aumento do transporte de animais domésticos entre países tem afetado a distribuição geográfica de infeções transmitidas por vetores e a introdução das mesmas em áreas consideradas não endémicas. Consequentemente, existe um aumento de coinfeções em regiões endémicas, que poderão estar associadas à infecção por *Babesia* spp. e poderão complicar o diagnóstico clínico. As coinfeções têm um impacto negativo na saúde do animal, podendo exacerbar os sinais clínicos, reduzir a eficácia do tratamento e piorar o prognóstico (Homer, Aguilar-Delfin, Telford, Krause, & Persing, 2000; René-Martellet *et al.*, 2015; Irwin, 2016). Os animais poderão apresentar uma infecção subclínica durante meses ou anos, sem que sejam diagnosticadas infeções. Estas têm uma grande importância epidemiológica, na medida em que os animais podem ser reservatórios para outros hospedeiros vertebrados. Estas circunstâncias requerem uma abordagem tendo em conta o programa *One Health*, alertando a comunidade veterinária, tutores e autoridades de saúde pública para prevenir a transmissão de agentes patogénicos transmitidos por vetores (Alvarado-Rybak *et al.*, 2016; Schurer, Mosites, Li, Meschke, & Rabinowitz, 2016).

Em Portugal, a informação sobre a Babesiose canina é escassa, sendo necessários mais estudos relativos à deteção e identificação das espécies presentes, de forma a compreender melhor a situação epidemiológica no país.

Na presente dissertação será apresentada uma revisão bibliográfica e resultados da deteção de infeções por piroplasmas em cães domésticos na área metropolitana de Lisboa clinicamente suspeitos de Babesiose. Para além disso, pretendeu-se identificar também agentes patogénicos coinfectantes tais como *Anaplasma/Ehrlichia*, *Hepatozoon* e *Mycoplasma*.

## **CAPÍTULO II – ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR**

A realização do Estágio Curricular insere-se no Plano de Estudos do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-ULISBOA) e teve como objetivos a aprendizagem, o treino e o aprofundamento de conhecimentos na clínica de pequenos animais. Durante este período foram realizados dois estágios: no âmbito do programa de ERASMUS+ na Clínica Nute Veterinary Surgery, CVS Group Plc; e um segundo estágio extracurricular no Queen Mother Hospital for Animals, do Royal Veterinary College (RVC).

A presente Dissertação de Mestrado resulta de quatro componentes práticas:

- 1) Estágio Curricular no Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (HEV, FMV-ULisboa), sob supervisão do Dr. Gonçalo Vicente;
- 2) Estágio em atividades de investigação no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LPDP) da FMV – ULisboa, sob orientação da Professora Doutora Isabel Pereira da Fonseca;
- 3) Estágio em atividades de investigação no Laboratório de Parasitologia do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) em Oeiras, sob a orientação do Doutor Jacinto Gomes;
- 4) Estágio em atividades de investigação no Instituto Nacional da Croácia, em Zagreb, sob orientação do Doutor Relja Beck.

### **1. Hospital Escolar Veterinário da FMV-ULisboa**

O Estágio Curricular no Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (HEV FMV-ULisboa), teve a duração de quatro meses, compreendidos entre os dias 5 de setembro de 2016 a 5 de fevereiro de 2017, sob supervisão do Dr. Gonçalo Vicente.

Durante este período foi possível a rotação em diferentes áreas de atuação deste Hospital, nomeadamente Medicina Interna (consultas, consultas de especialidade, urgências e internamento), Cirurgia (tecidos moles, ortopedia e exóticos), Imagiologia (Radiografia, Ecografia,

Tomografia) e outras especialidades médico veterinárias (Neurologia, Dermatologia, Ortopedia, Reprodução, Odontologia, Oftalmologia, Comportamento animal e Medicina de exóticos).

Nas consultas de Medicina Interna, foi possível acompanhar consultas diárias de profilaxia (vacinação, desparasitações internas e externas, primeira consulta e colocação de *microchip* para fins de identificação animal), reavaliações e pós-cirurgia. As consultas de primeira opinião compreendiam anamnese completa, exame físico detalhado, recolha de amostras biológicas (colheita de sangue venoso periférico, colheita de urina por algaliação, zaragatoas orais e auriculares, entre outras), administração de fármacos pela diferentes vias (*per os*, subcutânea, intramusculares e endovenosas, e executar pequenos procedimentos como exame otológico, drenagem de otohematomas e derrames (torácicos e abdominais), limpeza auricular, sob supervisão do médico veterinário responsável pelo caso clínico; discussão da abordagem diagnóstica com o mesmo. Foi ainda possível participar na equipa de triagem, receção e intervenção em urgências.

As consultas de especialidades médico-veterinárias, que a autora teve oportunidade de participar com maior frequência foram Oncologia e Neurologia. Em Oncologia, teve oportunidade de realizar punção aspirativa com agulha fina (PAAF), preparação de pacientes para administração de quimioterápicos e colocação de cateteres endovenosos com aplicação de medidas essenciais à biossegurança; nas consultas de Neurologia houve a oportunidade de realizar o exame neurológico e observar eventuais colheitas de líquido cefalorraquidiano.

No Internamento Geral, o horário foi dividido entre turnos diurnos e noturnos, com a duração de 12 horas cada; as principais funções desempenhadas foram: monitorização dos pacientes internados e manutenção da higiene e conforto dos mesmos, cálculo de doses, preparação e administração da medicação diária de acordo com as instruções fornecidas pelo médico veterinário responsável, preparação e administração de alimentação entérica; foi ainda possível a realização de procedimentos por rotina tais como, limpeza e desinfeção de feridas, algaliação de cães e gatos, medição de glicémia, monitorização de fluidoterapia, suplementação com soros, monitorização de pacientes durante transfusões sanguíneas, fixação de dreno torácico, abdominocentese; e por fim a participação na transferência e discussão de casos entre as equipas médicas responsáveis. Foi ainda possível acompanhar a realização de exames complementares de diagnóstico (radiografias, ecografias, eletrocardiografias, mielografias e tomografias computadorizadas).

Na Unidade de Doenças Infecto-Contagiosas a autora teve oportunidade de realizar turnos de 5 horas, com adoção de cuidados especiais de forma a cumprir regras de biossegurança. Nesta unidade hospitalar foram monitorizados animais com quadros clínicos de esgana, parvovirose e leptospirose canina, panleucopénia felina, peritonite infecciosa felina, leucemia felina síndrome de

imunodeficiência felina, calicivirose, hespervirose felina e infeções cutâneas por bactérias multirresistentes.

Durante o estágio, a autora participou ainda em reuniões científicas e apresentações com o intuito de atualização de conhecimentos técnico-científicos, com a presença de médicos veterinários de serviço.

## **2. Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LPDP) da FMV – ULisboa**

No LPDP da FMV-ULisboa foi desenvolvida a componente laboratorial desta dissertação, no período entre 5 de setembro de 2016 a 5 de agosto de 2017, sob a orientação da Professora Doutora Isabel Pereira da Fonseca e apoio da Dra. Lídia Gomes. Neste Laboratório realizou-se a conservação das amostras, esfregaços sanguíneos com coloração Giemsa e observação dos mesmos ao Microscópio Ótico.

## **3. Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV)**

A realização do estágio, no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, decorreu de setembro de 2016 a agosto de 2017 e foi fundamental para a execução do trabalho proposto nesta dissertação. Sob a orientação do Doutor Jacinto Gomes foi realizada a preparação das amostras e métodos moleculares aplicados. Estes últimos incluíram a extração de DNA, PCR convencional para amplificação do gene 18S RNA designado nesta dissertação como Método 1, e por fim a técnica de PCR-RFLP para diferenciar as espécies de *Babesia* existentes.

## **4. Croatia Veterinary Institute, Zagreb**

Este estágio foi realizado num período de 10 dias, e decorreu de 5 de julho a 17 de julho, no departamento de Parasitologia sob orientação do Doutor Relja Beck. Após a extração de DNA das amostras utilizadas para o estudo, estas foram transportadas para o Instituto Veterinário da Croácia, de acordo com as normas de segurança aplicadas no Aeroporto de Lisboa. No período de estágio foi possível realizar outra técnica de PCR convencional para deteção de *Babesia* e *Theileria* spp., bem como a utilização de equipamentos avançados na realização dos métodos moleculares. Após a interpretação dos resultados e sendo oportuno realizar um diagnóstico diferencial para outros agentes, foi realizado PCR convencional para deteção de *Hepatozoon* spp., Anaplasmataceae e *Mycoplasma* spp. Foi bastante enriquecedor, não só para a realização da presente dissertação, como para o conhecimento do trabalho realizado no Laboratório de Parasitologia e de Biologia Molecular.

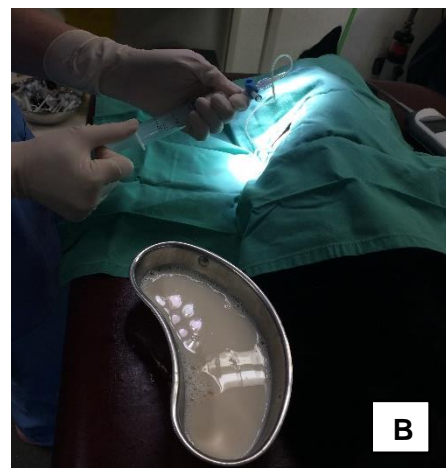
## **5. Nute's Veterinary Surgery, CVS Group Plc**

O estágio nesta clínica foi realizado, no âmbito do programa ERASMUS +, durante um período de 3 meses, que decorreu entre 20 de fevereiro de 2017 e 20 de maio de 2017, sob supervisão da

Médica Veterinária Nicky Hallows, tendo sido possível aplicar e aprofundar conhecimentos teóricos e práticos em Inglês, reforçando a comunicação médico-veterinário/tutor na língua inglesa.

A autora teve possibilidade de participar na preparação pré-cirúrgica dos animais (preparação e administração da pré-medicação e anestesia, intubação endotraqueal, tricotomia, lavagem e desinfecção do animal). No período intracirúrgico, realizou funções de anestesista, circulante, ajudante de cirurgião e cirurgiã com acompanhamento do Médico Veterinário de serviço, tendo oportunidade de realizar intervenções tais como: orquiectomias em cães e gatos, ovariectomia em cadelas e gatas, remoção de massas, suturas de feridas traumáticas com aproximação dos planos musculares, subcutâneos, suturas de pele e da cavidade oral. Para além disso, foi possível realizar destartarizações em cães e gatos, drenagens torácicas (Figura 1); realizar a monitorização e acompanhamento do paciente no período pós-operatório, que envolveu a remoção de pontos de pele, limpeza de feridas cirúrgicas e realização de pensos simples e pensos Robert Jones, assim como a discussão das recomendações de alta do paciente. O período de cirurgia decorreu durante todos os dias da semana das 10h às 13h e permitiu participar em 150 cirurgias, das quais 23 foram cirurgias ortopédicas e 127 cirurgias de tecidos moles.

Figura 1 - Caso clínico de quilotórax presenciado num gato doméstico *Felis silvestres catus* (Original). A - Imagem radiográfica em decúbito lateral esquerdo. B - Drenagem torácica do conteúdo.





## **6. Queen Mother Hospital for animals, Royal Veterinary College**

Ainda durante o período de estágio curricular, para o aprofundamento dos conhecimentos teóricos e práticos, foi importante a realização de um estágio extracurricular no serviço de referência de Emergências e Cuidados Críticos durante 2 semanas, com turnos de 12h, sob supervisão do Especialista de Emergências e Cuidados Críticos Dr. Dominic Barfield.

Neste estágio foram designados à autora casos de emergências, onde ficou responsável pelo acompanhamento dos mesmos, tendo como funções: triagem do animal, recolha da anamnese com os donos, leitura da anamnese ao veterinário responsável com posterior discussão do caso clínico (lista de problemas, diagnósticos diferenciais e abordagem ao diagnóstico e monitorização do animal) e acompanhamento da consulta; colocação de cateter venoso, recolha de amostras sanguíneas, realização de *EcoFast* sob supervisão do médico responsável na sala de emergências ou nos Cuidados Intensivos. Na sala dos Cuidados Intensivos a autora teve ainda como rotina a monitorização e *check up* dos animais internados, incluindo recolha de valores de Pressão Arterial com auxílio de um “doppler”; participação no suporte básico de vida em animais em paragem cardiorrespiratória, através de compressões cardíacas, ventilação mecânica e no Suporte Avançado de vida através da preparação de fármacos.

## CAPÍTULO III – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. Babesiose canina

No final do século XIX, Victor Babes identificou, pela primeira vez, microrganismos presentes no interior de eritrócitos de bovinos, associados a hemoglobinúria, e mais tarde também em ovinos. Em tributo a Victor Babes, foram designados como *Babesia bovis* e *Babesia ovis*, respetivamente. O termo “piroplasma” foi referido originalmente pelo facto de os parasitas após a multiplicação terem uma forma piriforme à observação direta. Atualmente o termo Piroplasmoses engloba as babesioses e theilerioses (Boozer & Macintire, 2003; Uilenberg, 2006).

Os géneros *Babesia* e *Theileria* pertencem ao Filo Apicomplexa, classe Piroplasmae e ordem Piroplasmida. Estas espécies estão também relacionadas filogeneticamente com as espécies do género *Plasmodium*, nomeadamente o que causa Malária nos humanos (Sánchez-Vizcaíno *et al.*, 2016).

A Babesiose é considerada uma doença emergente, de distribuição mundial, que infeta animais domésticos, silvestres e seres humanos. É causada por protozoários intra-eritrocitários do género *Babesia*, família Babesiidae (Boozer & Macintire, 2003; Irwin, 2009). As espécies de *Babesia* spp. são transmitidas por ixodídeos, estando a sua distribuição geográfica associada à distribuição do seu vetor. A infeção causa anemia hemolítica, acompanhada por um quadro clínico moderado a grave, e podem ainda estar associadas complicações multissistémicas (Boozer & Macintire, 2003; Irwin, 2016).

A análise molecular tem permitido demonstrar que estes protozoários são bastante mais prevalentes e genotipicamente diferentes do que era esperado pela observação da morfologia ao microscópio ótico (Boozer & Macintire, 2003; Lempereur *et al.*, 2017).

#### 1.1 Etiologia

Até à presente data, foram identificadas, através de técnicas moleculares, 12 espécies de piroplasmas que parasitam cães domésticos. Quatro destas espécies têm sido reportadas na Europa: *Babesia canis*, *Babesia vogeli*, *Babesia gibsoni* e *Babesia microti-like* (Solano-Gallego *et al.*, 2016).

As espécies de *Babesia* e *Theileria* que infetam o cão foram inicialmente agrupadas, consoante a sua morfologia, em piroplasmas de grandes e de pequenas dimensões. *B. canis*, *B. rossi* e *B. vogeli* pertencem ao grupo dos grandes piroplasmas (aproximadamente 2,5 a 5 µm) e têm uma forma piriforme enquanto *B. gibsoni*, *B. microti-like* pertencem ao grupo dos pequenos piroplasmas

(aproximadamente 1,0 a 2,5 µm) e podem adotar seis diferentes morfologias, descritas nos métodos de diagnóstico (Boozer & Macintire, 2003; Irwin, 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011). Todavia, não é possível distinguir piroplasmas de pequenas dimensões entre gêneros *Babesia* spp. e *Theileria* spp. através de microscopia, sendo necessário técnicas moleculares para a identificação dos mesmos (Boozer & Macintire, 2003; Irwin, 2009).

Na literatura é encontrada a espécie *B. canis* subdividida em três subespécies distintas: *B. canis*, *B. rossi* e *B. vogeli*. Apesar de pertencerem ao grupo de grandes piroplasmas e serem consideradas previamente como subespécies, estas apresentam uma diferença evidente em relação às características genéticas, distribuição geográfica, especificidade para o vetor e ainda sinais clínicos causados, pelo que atualmente são consideradas espécies diferentes. Por este motivo, nesta dissertação foram consideradas como independentes (Boozer & Macintire, 2003; Kjemtrup *et al.*, 2000; Solano-gallego & Baneth, 2011; Zahler, Schein, Rinder, & Gothe, 1998).

Foi ainda descrita uma quarta espécie de *Babesia* de grandes dimensões no Norte da América, geneticamente distinta de outras espécies já descritas, mas ainda sem nomenclatura associada (*Babesia* sp). Esta espécie é capaz de infectar o cão e causar alterações clínicas e de hemograma consistentes com babesiose canina. Foi encontrada em animais submetidos a esplenectomia ou a um tratamento quimioterápico. No entanto permanece desconhecido se o cão doméstico atua como hospedeiro reservatório primário desta nova espécie de *Babesia* (Birkenheuer, Neel, Ruslander, Levy, & Breitschwerdt, 2004; Sikorski *et al.*, 2010).

Em 1910 foi identificado pela primeira vez na Índia o protozoário *B. gibsoni*, e desde então que se assume que os animais infectados com *Babesia* de pequenas dimensões estavam parasitados por *B. gibsoni*. Com a evolução dos métodos moleculares e análises filogenéticas, foi demonstrada a existência de pelo menos três espécies distintas de *Babesia* de pequenas dimensões capazes de infectar e causar doença no cão: uma localizada na Ásia, outra na Califórnia e uma terceira na Europa (Kjemtrup *et al.*, 2000). Para o isolado asiático foi atribuída a designação de *B. gibsoni* (Boozer & Macintire, 2003). O estudo realizado por Kjemtrup *et al.* (2006) utilizou análise ITS-2 para demonstrar tratar-se de uma espécie distinta e foi proposto para o isolado californiano a denominação de *Babesia conradae*. Esta está relacionada filogeneticamente com espécies de piroplasmas de ungulados e do ser humano (Kjemtrup, Wainwright, Miller, Penzhorn, & Carreno, 2006). Nos casos reportados, além das manifestações clínicas de anemia hemolítica, mucosas pálidas, uma grande proporção dos cães apresentava história de vômito (Irwin, 2016).

O terceiro isolado, encontrado na Europa, foi designado inicialmente por *Spanish isolate*, mais tarde por *Theileria annae* e *Babesia microti-like* (Yeagley *et al.*, 2009; Zahler, Rinder, Schein, & Gothe, 2000). Até à data, não existem evidências de uma fase extra-eritrocitária no hospedeiro vertebrado ou transmissão transovárica no Ixodídeo, motivos pelos quais não está definido se este protozoário

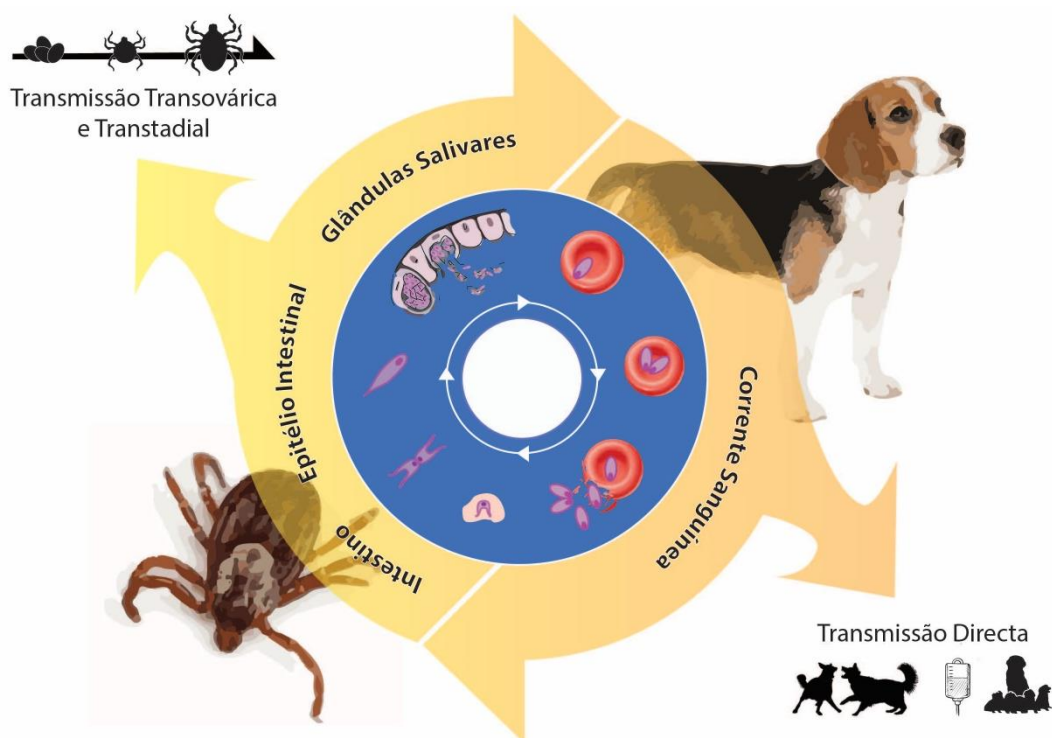
pertence ao género *Babesia* ou *Theileria*. A análise filogenética desta espécie, comparativamente com outras espécies do grupo *Theileria*, indicou ser filogeneticamente relacionada com o piroplasma *B. microti* (grupo *B. microti*) que parasita roedores e causa Babesiose em Humanos (Birkenheuer *et al.*, 2010; Simões, Cardoso, Araújo, Yisaschar-Mekuzas, & Baneth, 2011; Zahler *et al.*, 2000). Recentemente, tendo em conta a análise filogenética e a possibilidade de a raposa vermelha *Vulpes vulpes* ser um hospedeiro natural deste piroplasma, Baneth *et al* (2015) sugeriram a reclassificação do mesmo como *Babesia vulpes* sp. nov (Baneth, Florin-Christensen, Cardoso, & Schnittger, 2015). Na presente dissertação a espécie irá ser designada como *B. microti-like*.

Esporadicamente, foram ainda reportados, através de técnicas moleculares, cães infetados com *Theileria equi*, *Theileria annulata* e *Babesia caballi*. Contudo, a epidemiologia e importância clínica destas infeções é desconhecida (Irwin, 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011).

## 1.2 Ciclo de vida e Transmissão

A transmissão natural de espécies *Babesia* em hospedeiros vertebrados ocorre, através da inoculação pelo ixodídeo enquanto vetor. No entanto, podem ocorrer outras formas de transmissão direta entre hospedeiros vertebrados, representadas Figura 2.

Figura 2 - Ciclo de vida do parasita *Babesia* spp., tendo como hospedeiro vertebrado o cão doméstico (desenho original por Dordio & Lopo 2017).



Existem evidências de transmissão placentária nas espécies *B. gibsoni* e *B. canis* (Cardoso *et al.*, 2010; Jefferies *et al.*, 2007a). Foi ainda demonstrado que a infeção por *B. gibsoni* pode ocorrer através de transfusão sanguínea, ou por contaminação do material em contacto com a via sanguínea (Fukumoto, Suzuki, Igarashi, & Xuan, 2005; Jefferies *et al.*, 2007a). No entanto, a inoculação durante a alimentação do vetor parece ser a forma mais comum de transmissão do parasita. Estudos realizados nos EUA (Yeagley *et al.*, 2009), Japão (Miyama *et al.*, 2005) e Austrália (Jefferies *et al.*, 2007a) indicam também que a *B. gibsoni* é transmitida de forma direta através da mordedura de feridas de cães infetados ou sangue ingerido. Ainda que a espécie *B. gibsoni* possa afetar qualquer raça de cão, existe uma prevalência elevada desta última via direta de transmissão em raças de cães como Pit-Bull Terrier, Staffordshire Terrier e Tosa, possivelmente por serem as raças mais utilizadas nas lutas de cães. No estudo realizado por Miyama *et al.* (2005), realizado no Japão, os cães infetados por *B. gibsoni* tinham menor exposição a carraças, mas um elevado número de feridas por mordeduras de outros cães, comparativamente com os casos negativos, o que levou a suspeitar que a transmissão direta de *B. gibsoni* é possivelmente a forma de transmissão mais comum nestas raças (Jefferies *et al.*, 2007a; Miyama *et al.*, 2005; Yeagley *et al.*, 2009). Mais tarde o estudo realizado por Yeagley *et al.* (2009) nos EUA veio reforçar esta teoria, ao confiscar cães de luta e comparar a prevalência de *B. gibsoni* dos mesmos com 218 cães sem histórias de lutas provenientes de canis. Os resultados da PCR indicaram que 34% dos cães confiscados foram positivos para *B. gibsoni*, enquanto apenas um cão de canil (0,5%) foi positivo para esta espécie. Os cães confiscados, com cicatrizes tinham 5,5 vezes mais probabilidade de serem infetados com *B. gibsoni* comparativamente com os cães sem cicatrizes observadas. Dos cães confiscados da raça Pit-Bull incluídos no estudo e positivos para *B. gibsoni* foram também testados para agentes de doenças transmitidas por ixodídeos (*E. ewingii*, *E. chaffeensis*, *E. canis*, *A. phagocytophilum* e *A. platys*), através de técnicas moleculares. No entanto, nenhum destes animais testados teve um resultado positivo o que seria expectável se a transmissão de *B. gibsoni* tivesse ocorrido através destes vetores (Yeagley *et al.*, 2009).

No estudo realizado por Simões *et al.* (2011) identificou-se infeção por *B. microti-like* no norte de Portugal em 2 cães adultos, que viajaram num período de 10 dias para Galícia, em um cachorro proveniente da ninhada dos mesmos sem história de viagem para outros países. O facto de os sinais clínicos nos cães adultos surgirem 2 meses após o regresso da viagem, sugeriu que a espécie tenha um maior período de incubação em comparação com outras espécies de *Babesia* ou que a infeção tenha ocorrido em Portugal. Na medida em que o cachorro descendente nunca tenha saído de Portugal, a possibilidade de existir transmissão de *B. microti-like* via transplacentária foi apontada (Simões *et al.*, 2011).

As espécies de *Babesia* poderão ser infetantes 2-3 dias após a fixação do ixodídeo no animal (Schein *et al.* 1979). Desta forma, presume-se que a mudança de temperatura ou a presença de

sangue ingerido na carraça atuam como estímulos para a maturação dos esporozoítos infetantes (Uilenberg, 2006; Chauvin, Moreau, Bonnet, Plantard, & Malandrin, 2009; Irwin, 2016). Estes esporozoítos são injetados juntamente com os componentes salivares no hospedeiro vertebrado durante a alimentação da carraça. No hospedeiro, estes piroplasmas invadem o citoplasma dos eritrócitos onde formam trofozoítos. O parasita replica-se dentro do eritrócito e forma merozoítos. Consequentemente, com a multiplicação assexuada repetida, ocorre lise do eritrócito e os merozoítos são libertados no sangue do hospedeiro vertebrado, ficando disponíveis para infetarem novas células (Chauvin *et al.*, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Durante a alimentação de sangue no hospedeiro vertebrado infetado, o ixodídeo ingere formas do parasita capazes de sobreviver e continuar o ciclo. Ao atingirem o intestino do vetor, estes diferenciam-se em gametócitos (gâmetas femininos e masculinos) e fundem-se no lúmen intestinal para darem origem ao zigoto, que penetra nas células epiteliais do intestino. A partir desta fase evolui para uma forma móvel, o ooquinetos, capaz de atingir a glândula salivar e os oócitos do ixodídeo. Os ooquinetos que invadem as glândulas salivares, onde ocorre a última fase do desenvolvimento no ciclo, evoluem para esporozoítos, sendo capazes de infetar o hospedeiro vertebrado. A sua manutenção no vetor é garantida através da transmissão transovárica e transtadial, podendo infetar diversas gerações de ixodídeos (Chauvin *et al.*, 2009), como representado na figura 2. No hospedeiro vertebrado, o género *Babesia* diferencia-se do género *Theileria* pelo facto deste último apresentar uma fase pré-eritrocitária no interior dos leucócitos, e posteriormente nos eritrócitos. No género *Theileria*, a transmissão no ixodídeo ocorre apenas pela via transtadial (Uilenberg, 2006; Chauvin *et al.*, 2009).

O período de incubação para *B. canis* é aproximadamente 10 a 21 dias, enquanto para *B. gibsoni* está documentado um PI de 7 a 21 dias (Boozer *et al.*, 2003).

Nas infeções crónicas, os piroplasmas ficam sequestrados nas redes capilares do baço, fígado e outros órgãos, sendo libertados periodicamente para a circulação sanguínea (Irwin, 2016; Solano-Gallego *et al.*, 2016).

### **1.3 Distribuição geográfica do vetor de *Babesia* spp em Portugal**

Em Portugal conhecem-se cerca de 22 espécies pertencentes à família Ixodidae. A perpetuação na natureza depende da alimentação que realizam para manter o ciclo de vida (INSA, 2016). As condições climáticas e vegetação em Portugal beneficiam a distribuição e manutenção dos ixodídeos, nomeadamente o clima Atlântico e Mediterrâneo, no noroeste e sul do país, respetivamente (Estrada-Peña & Santos-Silva 2005). Em Portugal casos clínicos de Babesiose canina parecem não acompanhar o período suposto de maior atividade destes ixodídeos, uma vez que ocorrem ao longo de todo o ano (Cardoso *et al.*, 2010).

No âmbito do relatório REVIVE 2011-2015, foram colhidos 5717 ixodídeos, onde foram identificadas 11 espécies. A lista atualizada de espécies de carraças, presentes em Portugal, engloba 22 espécies. Destas espécies, foram identificadas como vetores de espécies de *Babesia* spp.: *Dermacentor reticulatus*, *Ixodes hexagonus*, *Ixodes canisuga* e *Rhipicephalus sanguineus* (INSA, 2016).

*Rhipicephalus sanguineus* apresenta uma distribuição mundial. Segundo o relatório REVIVE, realizado entre 2011 e 2015, esta é a espécie mais abundante em Portugal, com uma abundância relativa de 81,4%. Esta espécie está adaptada a temperaturas altas e sobrevive com facilidade em climas secos, pelo que as maiores densidades populacionais foram encontradas nos meses mais quentes. Apesar de os adultos se encontrarem ativos todo o ano, o período de maior atividade ocorre durante a Primavera/Verão. É abundante principalmente em países do Mediterrâneo com climas temperados, mas sendo endófilo consegue tolerar regiões com baixas temperaturas. Quando introduzido nestas zonas, poderá sobreviver em infraestruturas como os canis. A hibernação ocorre a temperaturas inferiores a 6°C, pelo que será provável existir uma maior incidência de Babesiose canina nos animais que habitam em canis (INSA, 2016; Solano-Gallego *et al.*, 2016).

*Dermacentor reticulatus* encontra-se distribuído pela Europa e Ásia. Na Europa é uma espécie que se encontra em evidente expansão devido às alterações climáticas ou modificações na utilização de terrenos agrícolas e florestais. Em Portugal encontra-se distribuída na região Norte, com uma abundância relativa inferior a 1%. No entanto, já foi encontrado em zonas limitadas do Centro e Sul de Portugal. A espécie *D. reticulatus* suporta temperaturas baixas ou mesmo negativas, necessita de alguma humidade relativa, pelo que os adultos estão ativos durante todo o ano, mas especialmente no período de Novembro a Março (Földvári, Široký, Szekeres, Majoros, & Sprong, 2016; INSA, 2016).

A parasitação externa de cães por *Ixodes hexagonus* e *Ixodes canisuga* está associada ao norte da Europa. Contudo, em Portugal *Ixodes canisuga* tem sido reportada apenas nos distritos de Évora e Beja, estando confinados no Sul de Portugal. A sua distribuição revela que esta espécie está adaptada a diferentes habitats e hospedeiros. A forma adulta foi também encontrada em canídeos silváticos, nomeadamente na raposa *Vulpes vulpes*. *Ixodes hexagonus* foi encontrado em 14 distritos de Portugal distribuídos por todo o país (Santos-Silva *et al.*, 2011).

#### 1.4 Distribuição geográfica e epidemiologia de *Babesia* spp. na Europa

A Babesiose era originalmente conhecida como uma doença predominante em países com clima tropical ou subtropical, mas atualmente o número de casos reportados tem aumentado nas regiões temperadas. Em regiões endêmicas, a prevalência de anticorpos contra *Babesia* spp. poderá abranger 3,8% a 80%, sendo que as elevadas prevalências correspondem a animais recolhidos na rua ou com proveniência de canis (Irwin, 2006).

A distribuição geográfica, assim como a ocorrência de Babesiose está relacionada com o habitat das espécies de ixodídeos enquanto vetores. No entanto, com o transporte internacional de animais, é possível que tenham sido reportadas infecções em novas áreas geográficas (Irwin, 2016). Os animais estão cada vez mais expostos a novos agentes patogênicos que se dispersam para zonas não endêmicas e existe assim a possibilidade de se estabelecerem ciclos silváticos (Solano-Gallego & Baneth, 2011).

*Babesia canis* é um piroplasma transmitido por *Dermacentor reticulatus* e encontra-se amplamente distribuído pela Europa. Afeta a maioria dos países da mesma, sendo considerada uma infecção endêmica do centro da Europa, principalmente devido à elevada abundância do vetor nesta região (Irwin, 2016; Földvári *et al.*, 2016). Através da utilização métodos moleculares, verificou-se a prevalência de 1,3% em Espanha (Tabar *et al.*, 2009), 6% na Itália (Cassini *et al.*, 2009); 4,6% na Eslovênia (Duh, Tozon, Petrovec, Strasek, & Avi-Zupanc, 2004); 25,3% na Polónia (Welc-Faleciak, Rodo, Siński, & Bajer, 2009) e cerca de 44.8% na Roménia (Alvarado-Rybak *et al.*, 2016). Além do cão doméstico, *Dermacentor reticulatus* parasita ainda outros mamíferos silváticos. Um estudo realizado por Beck *et al* (2017), que pretendia determinar a prevalência e impacto das infecções por *Babesia* spp. nos lobos (*Canis lupus*), levantou a hipótese de este funcionar como hospedeiro natural uma vez que não foram observadas alterações clínicas ou patológicas significativas. A espécie *B. canis* tem ainda capacidade de infetar raposas vermelhas, no entanto tem sido reportados casos esporádicos. São necessárias mais evidências para suportar a suspeita de que estes são potenciais portadores sem a presença de sinais clínicos. (Beck *et al.*, 2017). Estudos levantaram também a hipótese de que o cão doméstico pode constituir um hospedeiro reservatório, na medida em que o piroplasma persiste em cães que se tornam subclínicos, o que poderia explicar a recente expansão da Babesiose canina na Europa (Földvári *et al.*, 2016).

*Babesia vogeli* é transmitida por *Rhipicephalus sanguineus*, ixodídeo cosmopolita, o que faz com que este piroplasma seja amplamente distribuído pelo Mundo, incluindo regiões tropicais e subtropicais (Irwin, 2009; Irwin, 2016).

*Babesia rossi* é uma espécie transmitida por *Haemaphysalis elliptica* e a sua distribuição encontra-se limitada ao continente africano, nomeadamente à região subsariana. Esta espécie já foi reportada na África do Sul (Matjila, Leisewitz, Jongejan, Bertschinger, & Penzhorn, 2008), Nigéria (Sasaki *et*



al., 2007) e Sudão (Oyamada, Davoust, Dereure, & Bucheton, 2005). Contudo, em França foi reportado um caso de infeção por *B. rossii* num animal sem história de viagem. Os autores indicaram a espécie *Haemaphysalis punctata* como possível vetor, mas esta identificação continua sem explicação porque se acreditava que a espécie estava confinada ao continente Africano (Fritz, 2010). Recentemente foi demonstrado que os Chacais-de-dorso-negro, da espécie *Canis mesomelas*, podem ser portadores subclínicos do piroplasma, sendo hospedeiros naturais do mesmo (Penzhorn, Vorster, Harrison-White, & Oosthuizen, 2017).

*Babesia gibsoni* é endémica na Ásia e faz parte do grupo de Babesias de pequenas dimensões que apresenta uma distribuição geográfica mais ampla. As informações relativas à prevalência das espécies de Babesias de pequenas dimensões é escassa, no entanto foi relatada uma prevalência de *B. gibsoni* de 0,7% na Croácia (Beck, Vojta, Mrljak, Marinculic, & Beck, 2009) e 2% em Espanha (Tabar *et al.*, 2009). Esta é transmitida por *Rhipicephalus sanguineus* (Chao, Liao, Ho, & Shih, 2017), *Haemaphysalis longicornis* e *Haemaphysalis bispinosa* (Miyama *et al.*, 2005). Enquanto na Europa o principal vetor pertence à espécie *R. sanguineus*, na Ásia, a sua distribuição depende principalmente da espécie *H. longicornis* (Solano-Gallego *et al.*, 2016). A presença desta espécie foi reportada na Europa de forma esporádica (Criado-Fornelio, González-Del-Río, Buling-Saraña, & Barba-Carretero, 2003). Recentemente, um estudo realizado por Chao *et al.* (2017) na Ásia, identificou *B. gibsoni* em ixodídeos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* e em diferentes estádios do ciclo. Este estudo explica o facto de serem descritas anteriormente infeções por *B. gibsoni*, em cães domésticos sem evidência de lesões por mordedura e em áreas livres dos vetores anteriormente identificados. A determinação da prevalência da infeção de *Babesia* em ixodídeos da espécie *R. sanguineus* enquanto ectoparasitas de canídeos domésticos é um ponto crítico a ser estudado para identificar a importância epizootica de *Babesia spp.* (Chao *et al.*, 2017; Miyama *et al.*, 2005).

*Babesia microti-like* já foi reportada em alguns países da Europa (Tabela 1), tendo uma prevalência em cães domésticos na Croácia de 0,1% (Beck *et al.*, 2009) e 0,7 em França (René-Martellet *et al.*, 2015). Estudos detetaram que esta espécie infecta também uma grande proporção de raposas, da espécie *Vulpes vulpes*, na Europa e não parece ser virulenta para as mesmas. *B. microti-like* foi reportada em raposas vermelhas na Croácia (Dezek *et al.*, 2010), Alemanha (Najm *et al.*, 2014), Portugal (Cardoso *et al.*, 2013), Espanha (Criado-Fornelio, Martinez-Marcos, Buling-Saraña, & Barba-Carretero, 2003c), Itália (Zanet *et al.*, 2014), Hungria (Farkas *et al.*, 2015) e Bósnia e Herzegovina (Hodžić *et al.*, 2015).

Nas raposas a prevalência deste piroplasma em Portugal é de 82,8% (Cardoso *et al.*, 2013) e 5% na Croácia (Dezek *et al.*, 2010). Isto suporta a teoria de as raposas servirem como reservatório e fonte de infeção para os cães domésticos (Adam J. Birkenheuer *et al.*, 2010; Cardoso *et al.*, 2013).

O ixodídeo da espécie *Ixodes hexagonus* tem sido um possível candidato enquanto vetor da espécie *B. microti-like*, devido à sua presença em cães infetados e o isolamento do piroplasma aquando de infestação em raposas. Foi também isolada nas espécies *Ixodes ricinus*, *I. canisuga* e *I. hexadonus*, que infestavam raposas. No entanto pode refletir a infeção do ixodídeo por se ter alimentado em pequenos mamíferos e não se pode concluir que participem efetivamente no ciclo biológico do piroplasma (Alvarado-Rybak *et al.*, 2016; Birkenheuer *et al.*, 2010).

No Norte de Portugal já foram detetadas as espécies *B. canis*, *B. vogeli* e piroplasma *B. microti-like* (Cardoso *et al.*, 2010); enquanto no Sul de Portugal apenas foram reportados casos de *B. vogeli*. Os estudos realizados em países mediterrânicos reportam na distribuição temporal de casos que o Outono e o Inverno são os períodos com mais casos clínicos de Babesiose canina (Cardoso *et al.*, 2010; García, 2006).

Tabela 1 - Distribuição geográfica das diferentes espécies de *Babesia* descritas na Europa e seus respetivos vetores.

Espécies	Distribuição Geográfica	Vetor	Referências
<i>Babesia canis</i>	Por toda a Europa. Endémica no norte de Espanha, Portugal, França e centro da Europa.	<i>Dermacentor reticulatus</i>	Portugal (Cardoso <i>et al.</i> , 2008), Espanha (Criado-Fornelio <i>et al.</i> , 2003c), Itália (Cassini <i>et al.</i> , 2009), França (Bourdoiseau, 2006), Polónia (Cacciò <i>et al.</i> , 2002), Hungria (Földvári, Hell, & Farkas, 2005), Suíça (Porchet <i>et al.</i> , 2007), Alemanha (Zahler <i>et al.</i> , 1998), Albânia (Chauvin <i>et al.</i> , 2009), Croácia (Cacciò <i>et al.</i> , 2002), Holanda (Matjila <i>et al.</i> , 2005), Noruega (Øines, Storli, & Brun-Hansen, 2010), Letónia (Berzina <i>et al.</i> , 2013), Inglaterra (Marco <i>et al.</i> , 2017)
<i>Babesia vogeli</i>	Portugal, Espanha, Eslovênia, Itália, França, Croácia, Polónia, Grécia, Roménia, Sérvia e Turquia	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	(Cardoso <i>et al.</i> , 2008), (Criado-Fornelio <i>et al.</i> , 2007), (Duh <i>et al.</i> , 2004), (Cassini <i>et al.</i> , 2009), (Cacciò <i>et al.</i> , 2002), (Ionita <i>et al.</i> , 2012), (Solano-Gallego & Baneth, 2011), (Duh <i>et al.</i> , 2004), (Gülenber, Gorenflot, Schetters, & Carcy, 2006)
<i>Babesia gibsoni</i>	Alemanha, Croácia, Itália, Sérvia, Eslováquia, Espanha e Reino Unido.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	(Hartelt <i>et al.</i> 2007), (Beck <i>et al.</i> , 2009), (Trotta, Carli, Novari, Furlanello, & Solano-Gallego, 2009), (Davitkov <i>et al.</i> , 2015), (Víchová <i>et al.</i> , 2016) (Criado-Fornelio, González-Del-Río, <i>et al.</i> , 2003a), (Smith, Ballantyne, Morgan, & Wall, 2011)

Tabela 1 (continuação) - Distribuição geográfica das diferentes espécies de Babesia descritas na Europa e seus respectivos vetores.

<i>Babesia microti-like</i>	Portugal, Espanha, Croácia, França, Sérvia	<i>Ixodes hexagonus</i> , <i>Ixodes canisuga</i>	(Simões <i>et al.</i> , 2011), (Miró <i>et al.</i> , 2015; Simões <i>et al.</i> , 2011), (Beck <i>et al.</i> , 2009), (René-Martellet <i>et al.</i> , 2015), (Davitkov <i>et al.</i> , 2015)
<i>Babesia rossi</i>	França	<i>Haemophysalis leachi</i>	(Fritz, 2010)

## 1.5 Fisiopatologia

A gravidade da Babesiose canina é determinada pela estirpe e a espécie, que causa a infecção (Eichenberger, Ramakrishnan, Russo, Deplazes, & Hehl, 2017; Solano-Gallego *et al.*, 2016). No entanto existem também fatores associados ao hospedeiro vertebrado, como a idade, o estado imunitário do cão, a presença de infecções ou doenças concomitantes e o grau de resposta imunológica desenvolvida face ao hemoparasita e ao vetor. A elevada parasitemia não parece estar associada com a gravidade dos sinais clínicos, pois não depende diretamente da destruição eritrocitária, mas com a resposta imunitária do organismo face ao parasita. Porém, ainda existe uma informação limitada relativamente à importância da parasitemia na doença (Birkenheuer, 2012; Solano-Gallego *et al.*, 2016).

A Babesiose canina pode ser classificada como complicada ou não complicada. Esta última é geralmente associada a uma anemia ligeira a moderada, trombocitopenia, prostração, hepatomegalia e esplenomegalia. Geralmente é causada por *B. vogeli*, tendo em conta a sua virulência ser baixa a moderada. Quando ocorre febre geralmente esta é associada à libertação de mediadores inflamatórios ou pirogênicos endógenos devido à inflamação e hipoxia nos tecidos afetados (Birkenheuer, 2012; Caeiros, 2012).

Na Babesiose canina complicada, provocada principalmente por *B. rossi* e *B. canis*, as manifestações clínicas são geralmente agudas e a mortalidade excede os 80% (Irwin, 2016). A patogenicidade das espécies de pequenas dimensões, tais como *B. gibsoni* e *B. microti-like* pode ser moderada a grave (Solano-Gallego *et al.*, 2016).

A Babesiose complicada pode ter como manifestações clínicas: anemia hemolítica imunomediada (AHIM), Insuficiência renal aguda, Babesiose cerebral, coagulopatias, icterícia e hepatopatia, Síndrome de stress respiratório agudo, hemoconcentração e choque. O consumo de plaquetas e fatores de coagulação poderá levar a hemorragias. Na presença de uma hemólise intravascular

abundante é frequente existir hemoglobinúria, bilirrubinemia e bilirrubinúria (Solano-Gallego & Baneth, 2011).

O Síndrome de disfunção multiorgânica, que ocorre na Babesiose complicada, é causado pela hipotensão e inflamação sistêmica, resultante da síndrome de resposta inflamatória sistêmica SRIS (Birkenheuer, 2012). A hipoxia dos tecidos é o principal contributo para a disfunção dos órgãos e é resultante da anemia, choque hipotensivo, estase vascular, produção excessiva de monóxido de carbono e a diminuição da capacidade da hemoglobina para transporte de oxigênio. A consequente produção de ácido láctico pode justificar a presença de acidose metabólica, no entanto se o animal conseguir compensar esta alteração, através de hiperventilação, poderá haver alcalose respiratória (Boozer & Macintire, 2003; Birkenheuer, 2012).

Neste caso a anemia é justificada pela combinação de hemólise hemolítica intravascular e extravascular, que surge através de mecanismos: metabólicos, parasitários, de resposta secundária imunomediada, lesões oxidativas, osmóticas e lesão traumática face aos eritrócitos (Irwin, 2016). Os eritrócitos parasitados incorporam os antigénios do parasita na sua superfície e induzem a opsonização por parte dos anticorpos, e consequentemente à ativação do sistema mononuclear fagocitário para a remoção dos mesmos. Estes antigénios solúveis aderem também à superfície de eritrócitos e plaquetas. A estase nos capilares em associação com protéases parasitárias solúveis induz a ativação do sistema inflamatório e consequentemente a produção de fibrinogénio. Isto promove a agregação eritrocitária, provocando o desenvolvimento de isquémia e trombozes (Birkenheuer, 2012). A trombocitopenia não está só relacionada com a destruição imunomediada, mas também com o consumo de plaquetas em casos de vasculite e com o sequestro esplénico. Nas infeções por *B. gibsoni* verifica-se um aumento da produção de superóxido, que leva à peroxidação lipídica dos eritrócitos parasitados. Consequentemente, aumenta a rigidez dos eritrócitos, diminuindo a velocidade destes ao passarem nos capilares sanguíneos. Este mecanismo contribui da mesma forma para a estase nos capilares, como referido anteriormente. (Birkenheuer, 2012; Otsuka, Yamasaki, Yamato, & Maede, 2001).

Existem dois mecanismos que poderão explicar a existência de insuficiência renal. A primeira, tem sido atribuída ao desenvolvimento da anemia hemolítica grave, provocando potencialmente lesões tubulares, nefrite intersticial e glomerulopatia. No entanto, pode ainda desenvolver-se uma glomerulonefrite membranoproliferativa devido à deposição de imunocomplexos no glomérulo. São necessários mais estudos que envolvam exame *post-mortem*, de forma a tirar conclusões relativas ao tipo de lesão existente e excluir a possibilidade de uma azotemia pré-renal (García, 2006; Birkenheuer, 2012).

O choque hipotensivo é frequente na Babesiose complicada. A hipotensão deve-se a uma combinação de vasodilatação, volume vascular diminuído, desidratação e/ou depressão do miocárdio. A detioração do quadro clínico e o estado de coma ou morte é frequente nestes casos (Birkenheuer, 2012).

A Babesiose cerebral é designada aquando da apresentação de sinais neurológicos associados à infeção por *Babesia*. Os sinais mais comuns são ataxia, paresia dos membros posteriores, tremores musculares, nistagmos, anisocoria, perda intermitente da consciência, convulsões, estado de estupor ou coma, agressão, *paddling* ou vocalização. Estas podem ocorrer devido a estados de hipoglicémia, descrita em infeções por *B. rossi*, e ainda alterações patológicas no cérebro como congestão, hemorragias micro e macroscópicas, sequestro dos eritrócitos parasitados nos capilares sanguíneos e pavimentação do endotélio por células parasitadas (Birkenheuer, 2012).

### **1.6 Sinais Clínicos e Exames complementares de diagnóstico**

Os sinais mais frequentes descritos pelo tutor do animal são prostração e anorexia. Ocasionalmente os tutores podem identificar alterações como icterícia ou mucosas pálidas, ou ainda alterações na cor da urina - bilirubinúria ou hemoglobínúria (Birkenheuer, 2012; Nalubamba *et al.*, 2015).

A infeção por *Babesia* spp. nos cães pode evoluir de forma hiperaguda, aguda ou crónica. Esta última poderá ainda ter um carácter subclínico (Birkenheuer, 2012).

A infeção hiperaguda é rara e apresenta uma elevada taxa de mortalidade, associada a lesões tecidulares extensas. O colapso súbito ocorre principalmente nesta forma, devido a um choque hipotensivo e inclui a presença de mucosas pálidas ou por vezes cianóticas, aumento da frequência cardíaca e pulso fraco (Birkenheuer, 2012).

Segundo um estudo de Nalubamba *et al.* (2015), a doença aguda é expressa principalmente por febre, prostração, mucosas pálidas, linfadenomegália e presença de carraças. A febre foi o problema mais consistente em 87,3% dos cães infetados, e a linfadenomegália em 47,4%. A infeção por *B. canis* está relacionada com quadros clínicos agudos bastante variáveis e associados a uma parasitémia baixa. Dependendo do genoma de *B. canis*, esta espécie poderá causar um quadro clínico grave semelhante a *B. rossi* (Birkenheuer, 2012; Solano-Gallego *et al.*, 2016; Eichenberger, *et al.*, 2017).

Nos diagnósticos laboratoriais complementares, apesar de as alterações que ocorrem na Babesiose canina não serem específicas, as mais consistentes são anemia, aumento da contagem de reticulócitos e trombocitopenia (Reddy, Sivajothi, Reddy, & Raju, 2014; Nalubamba *et al.*, 2015). No hemograma as alterações mais consistentes são anemia e trombocitopenia. A trombocitopenia está muitas vezes associada a um aumento do volume plaquetário médio, e para compensar esta alteração são libertadas plaquetas imaturas pela medula óssea (García, 2006). Na infeção aguda, inicialmente esta anemia é classificada enquanto não regenerativa, normocítica e normocrómica. Mas 6 dias após a infeção, torna-se evidente a regeneração eritrocitária, macrocítica, hipocrómica (Birkenheuer, 2012). Os parâmetros eritrócitários, frequentemente relacionados com o tipo de anemia existente são: anisocitose, poiquilocitose e policromasia. Em 33% dos casos é possível a observação de corpos Howell-Jolly, possivelmente relacionados com aplasia funcional esplénica (García, 2006; Birkenheuer, 2012). A leucopenia, incluindo neutropenia e linfopenia, ocorre

inicialmente após a infecção, no entanto poucos dias após a mesma é seguida de leucocitose e neutrofilia com desvio à esquerda (Nalubamba *et al.*, 2015). No entanto este facto não é constante nos estudos realizados, o que sugere que esta reação celular pode ser consequência da produção de corticosteroides induzidos pelo stress causado pela doença ou um artefacto dos contadores automáticos, pela inclusão de eritrócitos nucleados aquando de contagem (García, 2006). A neutropenia é uma alteração encontrada em grandes proporções nos casos de infeções por *B. canis* (Birkenheuer, 2012).

Não existem alterações patognomónicas nas análises bioquímicas ou urianálise associados à Babesiose canina. As alterações dependem da gravidade da doença e do grau de hipóxia tecidual. Os achados bioquímicos comuns são hiperglonulinemia, aumento das transaminases hepáticas, da fosfatase alcalina sérica (FAS), da creatinina quinase e da ureia (sem aumento da creatinina). A hiperbilirubinemia é uma alteração consistente apenas nas espécies *B. canis* e *B. rossi* (Birkenheuer, 2012; Sudhakara Reddy *et al.*, 2014). A suspeita de insuficiência renal, deve ocorrer na presença de hipostenúria ou isostenúria, anúria ou oligúria após reidratação do animal. Quando existe uma hemólise exacerbada ou lesão renal, pode ser identificada na urianálise: bilirrubinúria, hemoglobinúria, proteinúria e células do epitélio tubular renal (Birkenheuer, 2012). Em Espanha, 30 a 40% dos casos de infecção por *B. microti-like* foram acompanhados por insuficiência renal. Nestes animais, para além das alterações clínicas comuns aquando infecção aguda anteriormente descritas, apresentavam anemia regenerativa grave, azotemia e proteinuria, elevadas concentrações de fosforo inorgânico, hipoalbuminemia, hipercolesterolemia e por fim um rácio de proteína/creatinina elevado (García, 2006).

A autocoagulação de eritrócitos em NaCl pode ocorrer em 21% dos casos de Babesiose canina, enquanto quase 85% dos cães infetados apresenta um teste de Coombs positivo. O teste indica que a infecção induz a produção de anticorpos e proteínas complementares contra a membrana dos eritrócitos. No entanto, não permite distinguir uma Anemia Hemolítica Imunomediada como primária ou secundária (Irwin, 2016).

A síndrome de stress respiratório ocorre de forma frequente e é caracterizada por taquipneia, dispneia, tosse e corrimento nasal sanguíneo. É necessário realizar gasometria sanguínea e radiografia torácica (Birkenheuer, 2012).

O perfil de coagulação é relevante na medida em que a babesiose pode causar alterações hemostáticas, que se traduzem num prolongamento do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), do tempo de protrombina (TP), e do tempo de trombina (TT) e aumento dos produtos de degradação do fibrinogénio (PDF) e do dímero-D (Trotta *et al.*, 2009; Birkenheuer, 2012).

O estudo realizado por Kuleš *et al* (2016), considerou a utilização de diferentes biomarcadores para diferenciar a presença de SIRS- síndrome de resposta inflamatória sistémica ou MODS - síndrome de disfunção multiorgânica associados à Babesiose canina. A SIRS é caracterizada por um aumento

da paraoxonase 1 e apoA-I, enquanto a MODS tem um aumento dos complementos inibitórios que prolongam a ativação do complemento e diminuem a vitamina D, que participa no processo de hemólise e ativação da cascata de coagulação (Kuleš *et al.*, 2016).

A Ecografia poderá ser importante para evidenciar a presença de hepatomegália e esplenomegália, que resultam do aumento de atividade do sistema linfático nestes órgãos e da dilatação dos micro vasos sanguíneos internos (Birkenheuer, 2012)

A fase crónica da Babesiose canina está pouco caracterizada, mas estão descritos sinais clínicos como pirexia intermitente, anorexia parcial e linfadenopatia. A doença crónica ou mesmo subclínica, está descrita em cães adultos imunocompetentes, com infeções provocadas por *B. gibsoni* e *B. vogeli*. Esta última parece ter menor virulência, comparativamente às Babesias de grandes dimensões. Nas infeções crónicas, nas quais o animal poderá tornar-se um portador de *Babesia* spp., não se observam alterações clínicas a menos que exista um comprometimento do estado imunitário. Os cães parecem tolerar este estado de premunidade, onde a exposição periódica ao antigénio conduz ao desenvolvimento de anticorpos e à maior resistência a infeções futuras por *Babesia* spp.. Todavia, a resposta imunitária parece ser espécie-específica, não ocorrendo imunidade cruzada entre espécies (Solano-Gallego *et al.*, 2016).

## **1.7 Diagnóstico de infeção por *Babesia* ou Babesiose canina**

### **1.7.1 Diagnóstico Clínico**

Numa consulta, os Médicos Veterinários devem suspeitar e descartar infeção por *Babesia* spp. aquando da presença de anemia hemolítica, febre, trombocitopenia e esplenomegalia. Na recolha da história clínica devem também incluir questões relacionadas com possível contato com ixodídeos, mordedura por outro cão nas últimas 4 a 8 semanas e deslocações deste para outros países ou para outras regiões do país de origem (Boozer & Macintire, 2003; Irwin, 2016; Solano-Gallego *et al.*, 2016). O uso de técnicas moleculares e sorológicas utilizadas em paralelo maximizam a possibilidade de detetar infeção por *Babesia* ou exposição ao agente. Um resultado positivo em ambas nem sempre confirma a existência de Babesiose canina, pelo que o diagnóstico realizado pelo médico veterinário deverá ter também em conta os sinais clínicos encontrados, alterações laboratoriais e resposta do animal ao tratamento realizado (Boozer & Macintire, 2003; Solano-Gallego *et al.*, 2016).

## 1.7.2 Diagnóstico Laboratorial

Na medida em que existem diversas opções de tratamento consoante a espécie que provoca a Babesiose canina, é importante que os veterinários realizem um correto diagnóstico etiológico.

O diagnóstico de Babesiose canina deverá ser realizado de forma integrada e, para que a sensibilidade e especificidade do diagnóstico sejam maximizadas, é ideal combinar diversos testes de diagnóstico. De acordo com o algoritmo realizado por Solano-Gallego *et al* (2016), deverá ser realizada primariamente um esfregaço sanguíneo para observação direta do parasita. Nesta fase, é importante a distinção de formas de *Babesia*, entre grande ou pequenas dimensões, uma vez que existem diferenças em relação à abordagem clínica, tratamento e prognóstico. Mesmo após a identificação de parasitemia é aconselhada a realização de um método molecular que permita posteriormente discriminar a espécie ou espécies envolvidas. Caso o parasita não seja detetado na amostra sanguínea, deverá ainda assim ser realizado um método molecular para descartar a infeção por *Babesia* spp. O método serológico é utilizado quando continuam a existir suspeitas e ainda assim, poderá ser repetido 4-8 semanas após um resultado negativo, para coincidir com a seroconversão (Solano-Gallego *et al.*, 2016).

### 1.7.2.1 Pesquisa de parasitas em esfregaço sanguíneo

A identificação dos piroplasmas no interior dos eritrócitos através da observação microscópica de esfregaços sanguíneos, corados com derivados de Romanowsky, é uma técnica pouco dispendiosa, simples e acessível para a maioria dos médicos veterinários. Os derivados de Romanowsky utilizados são Giemsa, Diff-Quick e Wright. A sensibilidade e especificidade deste método encontra-se dependente da experiência e capacidades do Médico Veterinário (Irwin, 2009; Lempereur *et al.*, 2017).

Durante as infeções agudas, em que ocorre parasitemia moderada a elevada, este método é relativamente sensível para a identificação de piroplasmas e deverá ser o primeiro método de diagnóstico a ser realizado. Contudo, durante as infeções subclínicas e crónicas provocadas por espécies de *Babesia* de grandes dimensões a parasitemia é geralmente baixa e intermitente. O mesmo ocorre na avaliação de esfregaços sanguíneos provenientes de animais com alterações sanguíneas, nomeadamente anemia hemolítica e trombocitopenia, originando falsos negativos (Irwin, 2009; Lempereur *et al.*, 2017; Solano-Gallego & Baneth, 2011).

Como foi referido anteriormente, a distinção entre piroplasmas de grande e pequenas dimensões e o conhecimento de espécies endémicas da área presente, poderão transmitir mais informações relativamente à identificação do piroplasma observado. A morfologia das espécies *B. microti-like* e *B. conradae* diferem-se das restantes, uma vez que ao microscópio ótico podem estar agrupadas em tétradas no interior de eritrócitos, designando-se como “cruz de Malta” (García, 2006; Kjemtrup *et al.*, 2006). Todavia, os piroplasmas de pequenas dimensões são dificilmente observáveis ao



microscópio ótico, tendo método uma sensibilidade fraca a moderada. Assim sendo, poderá ser necessária a utilização de métodos moleculares (Solano-Gallego & Baneth, 2011).

Relativamente aos piroplasmas de grandes dimensões, estes acumulam-se nos capilares, sendo ideal a observação de sangue proveniente de capilares sanguíneos. Este pode ser obtido no pavilhão auricular ou na base da unha. Outra alternativa para aumentar a sensibilidade na observação direta de piroplasmas poderá ser a partir do microhematócrito, com a utilização do concentrado de eritrócitos adjacentes à linha da fração leucocitária. Desta forma, existe uma maior probabilidade de encontrar células parasitadas, uma vez que os reticulócitos têm uma maior quantidade de ácidos nucleicos, aminoácidos, adenosina trifosfato e menor quantidade de glutatona (Birkenheuer, 2012; Lempereur *et al.*, 2017).

### 1.7.2.2 Métodos Serológicos

Devido à dificuldade dos clínicos em detetar infeção por *Babesia* spp. por microscopia ótica foram desenvolvidos métodos serológicos. Estes providenciam informação quanto à existência de uma exposição do animal ao agente patogénico e permitem quantificar o título de anticorpos (Irwin, 2016).

Existem dois testes sorológicos disponíveis: Imunofluorescência indireta (IFI) ou ELISA (do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay*). Para o diagnóstico laboratorial de agentes como *B. canis*, *E. canis* e *R. conorii* utiliza-se usualmente a técnica de IFI. Em casos de animais saudáveis não medicados (nomeadamente por imunossupressores), os resultados negativos por IFI excluem normalmente a presença de infeção (Xufre, 2014). Contudo, a espécie *B. canis* é um caso de exceção uma vez que os anticorpos só são produzidos oito a dez dias após infeção. Assim poderão existir sinais clínicos antes de ser possível a deteção dos anticorpos. Pode haver suspeita de infeção quando na consulta se confirmar uma titulação média a elevada de anticorpos, que corresponderá à fase de convalescência, ou seja, 3 a 4 semanas após infeção (Solano-Gallego *et al.*, 2016). A limitação da técnica de IFI, no caso de *B. canis*, está ainda associada à elevada ocorrência de falsos-positivos. Devido a reações cruzadas com diferentes espécies, nomeadamente em infeções causadas por outras espécies de *Babesia* ou por *Leishmania* spp. Assim, não poderá ser concluída a espécie a partir destes métodos. Outra restrição da técnica está associada ao facto de estes anticorpos se manterem em circulação até três meses após a eliminação do parasita, permitindo a sua deteção a títulos superiores ao critério de valorização (>1:128). Também em animais vacinados para piroplasmose são detetáveis anticorpos vacinais anti-*Babesia* por um período de três meses pós-vacinação (Xufre, 2014; Lempereur *et al.*, 2017). A dissertação de Caeiros (2012), constatou discrepâncias nos resultados obtidos por IFI e por qPCR para a deteção de *Babesia* spp., uma vez que apenas 5 dos 14 animais positivos por IFI (35,7%) apresentaram DNA de um parasita

pertencente a *Babesia* spp.. Pelo contrário, em 9 desses 14 animais (64,3%) foram detetados anticorpos anti-*Babesia* por IFI, mas não foi detetado DNA parasitário através dos métodos moleculares utilizados (Caeiros, 2012). Estudos que utilizaram métodos sorológicos e moleculares, detetaram casos em que existia positividade para *Babesia* spp. no PCR mas não existia seroconversão na fase aguda ou convalescente. Isto pode dever-se ao facto de os animais terem sido submetidos a uma terapêutica com fármacos imunossupressores ou o estado imunitário do animal não permitir a seroconversão (Kidd *et al.*, 2017)

Após o tratamento, os títulos de anticorpos para a *Babesia* spp. começam a diminuir às 3 semanas e a partir daí diminuem gradualmente até aos 160 dias. No entanto, foram encontrados animais infetados cujos anticorpos se mantinham persistentes após o tratamento, pelo que a técnica não é aconselhada para monitorização do tratamento (Jefferies, Ryan, Jardine, Robertson, & Irwin, 2007b).

Nos resultados de um estudo recente, realizado por Eichenberger *et al* (2017), a técnica de ELISA para deteção de antigénios circulantes apresentou uma especificidade de 86,4% e valores de sensibilidade de 100% e 53,8% para cães infetados por *B. canis* e *B. vogeli*, respetivamente. Na fase aguda de *B. canis*, os resultados positivos das amostras foram demonstrados tanto no PCR como por ELISA, concluindo que a AgELISA é potencial método para o diagnóstico rápido de infeções por *B. canis*, em fase aguda ou hiperaguda. (Eichenberger *et al.*, 2017).

### 1.7.2.3 Métodos moleculares

Os métodos moleculares para a deteção de *Babesia* spp, como a PCR (do inglês *polymerase chain reaction* – PCR) têm elevada sensibilidade e especificidade. Esta técnica permite a amplificação exponencial de uma região específica do DNA genómico do parasita. Atualmente, o gene alvo mais comum para a deteção e identificação de *Babesia* e *Theileria* spp. é o gene 18S, que codifica para a subunidade menor do RNA ribossomal.

A PCR *multiplex* tem utilidade clínica no diagnóstico diferencial em simultâneo de vários agentes e poderá detetar potenciais coinfeções por *Babesia* spp. e outras doenças transmitidas por ixodídeos. Nesta técnica são utilizados múltiplos pares de *primers* numa mesma reação, permitindo amplificar várias sequências genómicas alvo (Cunha & Inácio, 2014). Recentemente Rodríguez *et al* 2015, desenvolveram um PCR multiplex para deteção de *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma* spp. e *Babesia* spp., com elevada importância tendo em conta o carácter ou potencial zoonótico de algumas espécies (Rodríguez, Burri, Noda, Douet, & Gern, 2015). Annoscia *et al* (2017), desenvolveram uma técnica de PCR convencional para deteção e diferenciação em simultâneo de *B. canis* e *B. vogeli*. Este método permite um diagnóstico etiológico rápido, em áreas onde estas espécies ocorrem em simultâneo (Annoscia *et al*, 2017).

Quando o objetivo clínico é a confirmação da espécie de *Babesia* responsável pela infecção, a *nested* PCR poderá ser útil no diagnóstico etiológico. Consiste na utilização sequencial de dois pares de *primers*, conseguindo deste modo aumentar a especificidade e sobretudo a sensibilidade da reação de amplificação. Contudo, o risco mais elevado de ocorrência de contaminações que levam a falsos positivos faz com que sejam necessários cuidados acrescidos na sua execução (Cunha & Inácio, 2014). Já foram desenvolvidos testes *seminested* PCR para a deteção de espécies pertencentes ao grupo de Babesias de grandes dimensões e de *B. gibsoni* (Birkenheuer, Levy, & Breitschwerdt, 2003)

A PCR em tempo real constituiu um avanço muito significativo da tecnologia de PCR. Esta baseia-se na deteção de produtos da reação de amplificação à medida que estes vão sendo sintetizados. A sua quantificação nas amostras por PCR em tempo real poderá ser relevante na monitorização do sucesso das terapias aplicadas e discriminar entre infecção ou possível contaminação das amostras (Costa-Júnior *et al.*, 2012; Cunha & Inácio, 2014). Qurollo *et al* (2017) desenvolveram uma técnica de PCR quantitativo, tendo como alvo a região *lsu5-lsy4* do DNA mitocondrial LSU mais conservada e mais sensível, comparativamente ao estabelecido anteriormente com a utilização do gene 18S (Qurollo *et al.*, 2017).

A monitorização do tratamento, através de um teste molecular, é importante na prática clínica tendo em conta que alguns animais poderão ter uma infecção persistente e desenvolver uma doença crónica. Este deve ser realizado aproximadamente 2 meses após a terminar o tratamento completo, especialmente para monitorizar babesias de pequenas dimensões. Se possível, para descartar infecções de forma rigorosa podem ser realizados dois PCRs com um intervalo de 15 dias (Solano-Gallego *et al.*, 2016).

Os métodos moleculares têm ainda como vantagens a rapidez na obtenção de resultados e facilidade na partilha e análise dos dados moleculares usando bases de dados públicas e programas bioinformáticos. São também uma grande mais-valia para a complementaridade de diagnóstico. Poderão ser uma desvantagem relativamente ao custo elevado, por requererem controlos de qualidade rigorosos e o por a deteção de ácidos nucleicos não diferenciar microrganismos viáveis e não viáveis. Para além disso, é necessário ter em conta que a deteção de ácidos nucleicos de *Babesia* spp. pode não implicar o envolvimento direto destes nos processos de infecção e doença (Cunha & Inácio, 2014; Maggi *et al.*, 2014)

Têm sido reportados falsos negativos em infecções crónicas causadas por *B. gibsoni*, que podem ser explicados pelo facto de o parasita não se encontrar em circulação sanguínea no hospedeiro, existência de parasitemia intermitente ou parasitemia inferior ao limiar de deteção da reação de PCR. Assim, em infecções crónicas, é aconselhado recorrer ao diagnóstico sorológico (Lempereur *et al.*, 2017; Solano-Gallego *et al.*, 2016).

A PCR pode ser utilizada para a detecção de portadores subclínicos em situações específicas como a importação para países ou regiões livres do agente ou para realização de rastreio de possíveis infecções em potenciais dadores de sangue (Birkenheuer, 2012).

### **1.7.3 Diagnóstico *post-mortem***

Eventualmente, em casos de morte súbita e quando o tutor pretende realizar um diagnóstico definitivo, este só pode ser estabelecido ou confirmado através de necropsia e avaliação histopatológica de diversos órgãos, em particular dos que constituem o sistema mononuclear fagocitário. As alterações patológicas evidentes correspondem geralmente à forma complicada da doença, incluem esplenomegália, hepatomegália, linfadenomegália e ainda alteração da cor dos tecidos provocada por pigmentos de hemoglobina e bilirrubina. Quando existe um quadro clínico com lesões vasculares e hipoxia, é possível encontrar edema, hemorragias e necrose tecidual. Aquando da coagulação vascular disseminada são encontrados microtrombos em diversos tecidos (Birkenheuer, 2012).

A realização de citologia por aposição de amostras de baço pode ser útil no diagnóstico *post-mortem*, sendo possível a observação de eritrócitos parasitados. Existem evidências de que a morfologia inicial de babesias de grandes dimensões, como *B. canis*, pode ser modificada por alterações *post-mortem* ou após armazenamento dos tecidos. Estas podem apresentar uma forma circular e dimensões de 1 a 2 µm, semelhantes a babesias de pequenas dimensões. A utilização de métodos moleculares para a detecção da espécie é fundamental nestes casos (Beck *et al.*, 2017; Demeter *et al.*, 2011).

## **1.8 Tratamento e Prognóstico**

As terapêuticas existentes para a Babesiose canina têm como base a experiência clínica ao longo de vários anos e estudos experimentais, que avaliam os tratamentos disponíveis para a doença. Um dos fármacos mais estudados e utilizados para o tratamento de Babesiose, causado por babesias de grandes dimensões, é o dipropionato de imidocarb, utilizado numa dose única de 6,6 mg/kg administrado via intramuscular (IM) ou subcutânea (SC). No entanto alguns autores sugerem a administração de uma segunda dose de dipropionato de imidocard, com um intervalo de 15 dias. Caso não haja uma resposta adequada ao tratamento será necessário reconsiderar a dose necessária, tendo em conta que é nefrotóxico em sobredosagem. Os efeitos secundários frequentemente associados a este fármaco são a dor no local de injeção e efeito anti-colinesterásico, nomeadamente anorexia, salivação transitória, epífora, dor abdominal, vômito e

diarreia. Caso estes efeitos persistam poderá ser benéfica a administração prévia de atropina ou glicopirrolato (Vial & Gorenflot, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2016).

Relativamente às babesias de pequenas dimensões, a combinação de atovaquona (13,3mg/kg, PO, a cada 8h) com azitromicina (10-12,5mg/kg, PO, BID) durante 10 dias demonstrou ser capaz de que reduzir significativamente a parasitémia por *B. gibsoni* e *B. conradae*, abaixo do limiar de deteção por PCR. Esta combinação parece ser também eficaz contra a infeção por *B. conradae* (Krause *et al.*, 2000; Di Cicco *et al.*, 2012). No entanto, já foi reportado que a parasitémia poderá ser de difícil monitorização e persistir após o tratamento, devido à resistência a atavaquona (Lin, Chueh, Lin, Hsieh, & Su, 2012; Liu, Lin, Lin, & Su, 2016). As resistências encontradas e os custos elevados desta combinação de atavaquona com azitromicina relembram a necessidade de existência de alternativas a esta estratégia terapêutica (Birkenheuer, 2012; Lin *et al.*, 2012). Tendo isto em conta, Kirk *et al* (2017) realizaram um estudo com uma amostragem cães infetados com *B. gibsoni* e concluíram que a terapêutica de azitromicina (10mg/kg PO, BID) combinada com atovaquona (13,4 mg/kg PO, a cada 8h administrado durante a refeição) durante 10 dias não comprometia a eficácia do tratamento, tendo em conta o resultado negativo na PCR em 39 cães (93%) após 30 e 60 dias (Kirk, Levy, & Crawford, 2017).

O uso de Clindamicina (25-30 mg/kg PO, BID, durante 14 dias) tem demonstrado uma redução nos sinais clínicos e alterações laboratoriais (Wulansari *et al*, 2003). Em associação com sulfato de quinina foi demonstrado ser o tratamento de eleição em humanos (Vial & Gorenflot, 2006). A clindamicina em combinação com aceturato de diminazeno e dipropionato de imidocarb poderá ser também promissora para o tratamento de *B. gibsoni*, nomeadamente se identificam resistências à atavaquona (Lin *et al.*, 2012).

A terapêutica de suporte poderá ser necessária nos casos de Babesiose moderada ou grave. A fluidoterapia intravenosa com cristalóides e correção eletrolítica estão indicados para a manutenção do volume sanguíneo, equilíbrio ácido-base e diurese. Em cães com sinais e hemograma sugestivo de anemia poderá ser necessária transfusão sanguínea, preferencialmente com concentrado de eritrócitos, considerando o carácter agudo de doença, a capacidade de regeneração eritrocitária e os valores de hematócrito. A transfusão de sangue total é aconselhada para casos de Babesiose canina complicada. Os fluídos cristalóides devem ser administrados com cuidado em animais com anemia para evitar hemodiluição ou exacerbação de dispneia respiratória (Irwin, 2016).

O uso de fármacos imunossupressores, na terapêutica de Babesiose canina, em cães com anemia hemolítica imunomediada (AIHM) ou trombocitopenia é controverso. No entanto deve ser realizada em animais que requerem hospitalização, tendo em conta não só com os resultados de hematócrito e contagem de plaquetas, mas também com os sinais clínicos apresentados. A administração de prednisona numa dose de 2 mg/kg SID, durante cerca de 10 dias parece ser suficiente. Animais

tratados com fármacos imunossupressores, antes do tratamento para Babesiose, não têm uma resposta clínica adequada, e poderão estar predispostos a outras infecções e reinfeção (Solano-Gallego *et al.*, 2016). Para o manejo da trombocitopenia grave, uma vez que a administração de glucocorticóides está contraindicada, poderá ser vantajosa a administração injetável de vincristina (numa dose única 0,01-0,025 mg/kg IV), durante a hospitalização. A vincristina permite estimular a libertação precoce de plaquetas pela medula óssea e permite reduzir a hospitalização destes animais (BSAVA, 2014).

Existem ainda outros fármacos úteis na terapêutica de suporte, que deverão ser utilizados conforme os sinais clínicos e alterações laboratoriais apresentadas, sejam causados pela Babesiose ou pelo tratamento etiológico instituído (Birkenheuer, 2012).

Os indicadores de prognóstico mais utilizados no decorrer de um processo agudo da doença são as alterações ácido-base e níveis de lactato. Um valor de lactato persistente com concentrações superiores a 40 mg/dl sugere um prognóstico reservado (Birkenheuer, 2012). Num estudo recente demonstrou-se ainda que os marcadores de prognóstico, após tratamento, incluem também o nível de proteínas de fase aguda, entre as quais proteína C reativa e amiloide A sérica e ainda alterações laboratoriais tais como trombocitopenia e contagem de leucócitos. Enquanto os animais sobreviventes demonstraram um perfil de hematócrito com leucocitose, os que morreram apresentaram uma leucopenia evidente (Eichenberger, Riond, Willi, Hofmann-Lehmann, & Deplazes, 2016).

Nos cães infetados por *B. canis* e *B. vogeli*, as melhoras clínicas devem ocorrer 1-7 dias após o tratamento. No geral, os cães infetados por babesias de grandes dimensões têm uma resposta clínica mais rápida, 24-48h após o tratamento e um melhor prognóstico comparativamente às babesias de pequenas dimensões. No entanto, um estudo com 15 animais infetados com *B. canis* reportou uma elevada mortalidade, de 53% nas primeiras 24-48h após o tratamento (Eichenberger *et al.*, 2016; Solano-Gallego *et al.*, 2016).

A terapêutica utilizada pode não ser suficiente para eliminar completamente o parasita na dose recomendada, apenas limitando a morbilidade e mortalidade da doença. Nas infeções causadas por Babesias de pequenas dimensões a eliminação completa do parasita é considerada rara (Lin *et al.*, 2012; Solano-Gallego *et al.*, 2016).

Em suma, existe ainda uma escassa informação relativa às opções de terapêutica contra a Babesiose canina. É importante na prática clínica o diagnóstico etiológico e uma terapêutica direcionada ao agente patogénico responsável pela doença (Solano-Gallego *et al.*, 2016).

## 1.9 Controlo e Profilaxia

O principal meio de prevenção de doenças transmitidas por Ixodídeos é o controlo destes artrópodes, assim o mesmo é aplicado na prevenção de Babesiose canina (Irwin, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2016). A inspeção visual frequente para detetar a presença de ixodídeos é importante tendo em conta que a transmissão pode ocorrer 2 a 3 dias após a fixação. Este controlo mecânico, pela remoção dos ixodídeos fixados ao animal, deve ser realizado com luvas e pinças próprias. Antes da introdução de um animal em canis, este deverá ser colocado em quarentena e preferencialmente testado para possíveis infeções. A utilização de produtos acaricidas para controlo de ixodídeos deve ser regular, de acordo com instruções e recomendações do fabricante. Em determinadas áreas da Europa, nomeadamente Portugal, é recomendada a utilização durante todo o ano, com especial atenção aos meses entre Primavera e Outono. A escolha do tratamento tópico acaricida deve ser realizada pelo médico veterinário responsável, de acordo com o estilo de vida e a região onde vive o animal (INSA, 2016; Solano-Gallego *et al.*, 2016). Existe um elevado espectro de produtos acaricidas licenciados para cães, com diferentes apresentações: colares com uma eficácia de 6-8 meses, unções punctiformes de 3 a 5 meses, pulverizações de 2-3 dias e em comprimidos para administração PO com duração de 1 a 3 meses. Estes últimos requerem que se verifique o início da alimentação por parte do vetor para que possam ser ingeridas as moléculas necessárias. No entanto todos estes componentes permitem matar o ixodídeo antes das 48h que antecedem a esporogonia de *Babesia* spp. (Solano-Gallego *et al.*, 2016). Numa área endémica, os produtos típicos para controlo de ixodídeos com um tratamento tópico de uma solução combinada de imidaclopramida-permetrina resulta numa redução de 94,4% da incidência da densidade da infeção por *Babesia* spp., comparativamente aos cães cujo tratamento não foi aplicado (Irwin, 2016). O uso de colares impregnados com amitraz estão associados também a uma redução significativa de novas infeções em áreas endémicas de *B. rossi*, tendo prevenido a infeção a 20 cães (73,4% dos animais), altamente expostos ao agente patogénico (Last, Hill, Matija, Rème, 2007). Recentemente, Geurden *et al* (2017), avaliaram a eficácia de Sarolaner, na prevenção de transmissão de *B. canis* e verificaram que administrada 21 a 28 dias antes da infestação é o suficiente para prevenir a transmissão do parasita (Geurden *et al.*, 2017). Uma única administração tópica de fluralaner, em solução de *spot-on*, tem uma eficácia cerca de 100% na prevenção da transmissão de *B. canis* através de *Dermacentor reticulatus*, por mais de 1 a 2 semanas (Taenzler, Liebenberg, Roepke, & Heckerroth, 2016).

No caso da transmissão de *B. gibsoni* é importante o manejo dos cães diagnosticados e principalmente a prevenção de lutas de cães, sendo importante para impedir a dispersão do agente (Jefferies *et al.*, 2007a).

Os cães domésticos que vivem numa área não endémica não devem viajar para áreas endémicas, tendo em conta que geralmente desenvolvem doença com maior gravidade. Caso o façam, os tutores responsáveis pelos mesmos deverão ter um especial cuidado para a prevenção de ixodídeos e potencial transmissão da doença. A mortalidade é maior nas zonas não endémicas, uma vez que os animais destas áreas não tiveram contacto com o piroplasma para desenvolver uma imunidade parcial (Eichenberger *et al.*, 2016).

A vacinação contra a infeção por *Babesia* tem sido estudada durante longos anos e existem duas vacinas registadas em alguns países na Europa. Em Portugal existem duas vacinas licenciadas: a Pirodog<sup>®</sup> - Merial e Novibac<sup>®</sup> Piro - Schering-Plough. Estas vacinas diminuem a gravidade dos sinais clínicos, mas não impedem a infeção. Devido às diferenças antigénicas entre as diferentes espécies, este tipo de vacinas não permite proteção cruzada. A vacina Pirodog<sup>®</sup>, induz uma proteção parcial contra *B. canis*, o que diminui a parasitemia e a gravidade dos sinais clínicos, mas não impede a infeção. A Novibac<sup>®</sup> Piro é bivalente, conferindo uma proteção imunitária, ainda que limitada, contra estirpes heterólogas de *B. canis* e *B. rossi*. (Schetters *et al.*, 2001; Freyburger *et al.*, 2011; Solano-Gallego *et al.*, 2016). Devem ser administradas de preferência antes da época de maior atividade dos ixodídeos. A primovacinação consiste em duas administrações subcutâneas, com 3 a 6 semanas de intervalo e pode ser administrada a partir dos 5 e 6 meses de idade, para a Pirodog<sup>®</sup> e Novibac<sup>®</sup> Piro, respetivamente. A revacinação é realizada a cada ano ou a cada 6 meses, todavia este último intervalo é recomendado apenas em áreas endémicas (Schetters *et al.*, 2001; Freyburger *et al.*, 2011).

A quimioprofilaxia tem sido objeto de estudo, e foram testados diferentes fármacos. No entanto ainda não foram obtidos resultados satisfatórios e não é considerada devido à possibilidade de resistências aos antibióticos. Foi proposta a utilização de Doxiciclina como profilaxia contra *B. canis*. Este fármaco pode ser administrado numa dose de 5 mg/kg por dia via subcutânea, permitindo diminuir a gravidade da doença enquanto numa dose de 20 mg/kg/dia é obtida proteção clínica, mas também não impede efetivamente a infeção. Foi demonstrada uma proteção parcial durante 2 semanas. Esta pratica poderá ser útil também na prevenção da Erliquiose canina e é utilizada especialmente em animais imunodeprimidos, que tenham maior risco de exposição ao viajarem para áreas endémicas (Vercammen, De Deken, & Maes, 1996).

Deve ser realizado um rastreio nos cães esplenectomizados pelo menos 2 semanas após a cirurgia, através do diagnóstico serológico e da observação de esfregaços sanguíneos por microscopia ótica (Solano-Gallego *et al.*, 2016).

Tendo em conta outra forma de transmissão, por transfusão sanguínea, é aconselhada a realização de um teste de rastreio sorológico ou molecular para descartar a presença de infeção aquando de



uma transfusão sanguínea. Os cães que sejam positivos num dos testes não deverão ser utilizados como doadores de sangue (Solano-Gallego *et al.*, 2016).

### 1.11 Importância em Saúde Pública

A Babesiose humana é uma doença zoonótica emergente. A infeção está associada ao aumento de atividade de ixodídeos e fatores na mudança do ambiente, nomeadamente a urbanização, que por sua vez aumenta a densidade populacional de ixodídeos e o potencial de hospedeiros reservatórios (Yabsley & Shock, 2013). Tendo em conta que é o parasita mais associado a transfusões sanguíneas e a Babesiose é uma doença de declaração obrigatória em alguns estados do Estados Unidos, é expectável que o número de casos venha a aumentar (Yabsley & Shock, 2013). A transfusão sanguínea continua a ser uma ameaça emergente para a saúde pública, tendo em conta que não é realizado um rastreio obrigatório para este agente etiológico em doadores de sangue (Ord & Lobo, 2016). Estão ainda documentados casos de transmissão congénita em Medicina Humana (Rozej-Bielicka, Stypułkowska-Misiurewicz, Gołąb, 2015).

As quatro espécies de *Babesia* que infetam os Humanos e estão confirmadas até à data são: 1) *Babesia microti* é a espécie mais comum que parasita pequenos roedores nos Estados Unidos; 2) *Babesia divergens*, é o principal agente etiológico da babesiose humana descrito na Europa, que parasita os bovinos e pode provocar um quadro clínico grave; 3) *Babesia duncani*, provoca um quadro moderado a grave e ocorre na América Central e do Norte (Homer *et al.*, 2000; Vial *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2014); 4) *Babesia venatorum*, infeções por esta espécie foram reportadas na Áustria, Alemanha e Itália (Vannier & Krause, 2012). A infeção por *Babesia* spp. é geralmente assintomática, porém poderá provocar doença moderada ou subclínica em indivíduos imunocompetentes. O principal grupo de risco são os indivíduos imunodeprimidos, devido à exposição a quimioterápicos, os esplenectomizados ou infetados com HIV (do inglês Human Immunodeficiency Virus) positivos. Neste grupo de risco estão descritos casos de doença grave (Yabsley *et al.*, 2013).

Em Portugal foi reportado o primeiro caso fatal de Babesiose humana num indivíduo esplenectomizado. Este estaria infetado com *B. divergens*, cujo vetor *Ixodes ricinus* parasita frequentemente bovinos em Portugal (Centeno-Lima *et al.*, 2003).

Com o aumento de casos e expansão de técnicas de diagnóstico mais sensíveis, ocorreram evidências de que as espécies “*B. microti-like*” e *B. divergens-like* têm a capacidade de causar infeção em humanos (Ord *et al.*, 2016)

Em 2011 foi descrito um caso de uma criança com Babesiose, e suspeitou-se ter sido adquirida a partir do seu cão. Esteve estava infestado com *Rhipicephalus sanguineus* e igualmente doente com

Babesiose canina, daí a suspeita da possibilidade de transmissão de Babesiose canina para humanos (El-Bahnasawy, Khalil, Morsy, 2011).

O aumento da informação clínica disponível em Medicina Humana tornou também evidente que existem ainda lacunas significativas na compreensão da biologia básica deste parasita. Além disso, alguns casos de Babesiose humana são reportados sem a confirmação da espécie do protozoário envolvido (Ord *et al.*, 2016).

### **1.12 Agentes de coinfeção com *Babesia* spp.**

Recentemente, com as alterações climáticas e a dispersão de vetores, as regiões endémicas dos mesmos têm sido expandidas. Por outro lado, têm sido introduzidas diversas infeções transmitidas por vetores em regiões endémicas na Europa o que aumenta o risco de coinfeções. O diagnóstico pode ser um desafio para o médico veterinário, uma vez que os mesmos sinais clínicos podem ser provocados por diferentes doenças transmitidas por vetores. Os animais coinfetados poderão ter sido expostos a artrópodes infetados com diferentes agentes patogénicos em diferentes períodos, ou por um vetor infetado simultaneamente por múltiplos agentes (Boozer & Macintire, 2003; Berzina *et al.*, 2013; Solano-Gallego *et al.*, 2016). O mesmo vetor pode ser competente para mais do que um agente patogénico, tendo como exemplo *Rhipicephalus sanguineus* que transmite *Ehrlichia canis*, *B. vogeli* e *Rickettsia conorii*. Estas coinfeções podem ainda complicar a Babesiose através do exacerbamento dos sinais clínicos e influenciar o sucesso do tratamento, na medida em que a terapêutica deve ser direcionada para o agente etiológico em causa e esta depende do correto diagnóstico etiológico. Os métodos moleculares são considerados mais sensíveis e específicos (Irwin, 2016; Otranto *et al.*, 2010).

#### **1.12.1 Bactérias**

Os micoplasmas hematrópicos são bactérias de pequenas dimensões que parasitam diversas espécies de mamíferos e têm uma distribuição mundial. Estes parasitam a superfície dos eritrócitos e são capazes de provocar anemias hemolíticas de grau variável. Anteriormente, estes organismos eram classificados enquanto pertencentes ao género *Haemobartonella*, mas com o avanço das técnicas moleculares e sequenciação este passou a ser designado e incluído no género *Mycoplasma*. Até à data estão descritas duas espécies capazes de infetar os cães domésticos: *M. haemocanis* e *M. haematoparvum*. As formas de transmissão do parasita ainda não foram estabelecidas, no entanto *Rhipicephalus sanguineus* parece ser o principal vetor, funcionando ainda como reservatório dos mesmos e existe ainda a suspeita de que os sifonápteros possam ser potenciais vetores. A hipótese da transmissão por via direta oral tem sido igualmente questionada entre interações de animais, na medida em que foi encontrado DNA de haemoplasmas em saliva

de gatos com infecção aguda (Barker & Tasker, 2016). Ao contrário de *M. haemocanis*, os cocos de *M. haematoparvum* têm cerca de 0,3 µm de diâmetro pelo que poderá ser de difícil identificação ao microscópio ótico. Os métodos moleculares desenvolvidos são sensíveis o suficiente para identificar também animais com infecções subclínicas. Relativamente às alterações hematológicas associadas, geralmente não existe anemia pois existe uma resposta atempada, que resulta num aumento de reticulócitos, policromasia, anisocitose, eritrócitos nucleados e frequentemente corpos de Howell-Jolly. As tetraciclina são eficazes no tratamento de infecções por *M. haemocanis*, no entanto não existem estudos relativamente à eficácia deste tratamento em infecções por *M. haematoparvum* (Novacco *et al.*, 2010; Messick & Harvey, 2012).

A Família Anaplasmataceae atualmente contém como géneros: *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia* e *Wolbachia* (Harrus, Waner & Neer, 2012). As espécies de *Ehrlichia* são bactérias intracelulares obrigatórias, gram-negativa. A espécie *Ehrlichia canis* é o agente etiológico da Eriquiose Monocítica Canina (EMC), sendo uma endémica nos países mediterrânicos. Tem como principal hospedeiro vertebrado o cão e *Rhipicephalus sanguineus* enquanto vetor. No vetor a transmissão ocorre de forma transtadial, mas não transovária. A transmissão de *E. canis* do vetor para o animal ocorre 3h após o início da sua refeição. Subsequentemente é distribuída através do sistema fagocitário mononuclear para o fígado, baço e linfonodos e tem um período de incubação de 8 a 20 dias. Esta infecta principalmente linfócitos ou monócitos, sob a forma de mórulas. Apenas em cerca de 4 a 6% das infecções por *E. canis* é possível a observação das mesmas ao microscópio ótico (Sainz *et al.*, 2015; Harrus, Waner & Bjöersdorff, 2016). A espécie *Ehrlichia canis* pode causar alterações na função plaquetária, sequestro e destruição de plaquetas. Assim as alterações hematológicas incluem leucopenia, trombocitopenia, anemia normocítica, normocromica e não regenerativa. As alterações bioquímicas mais consistentes são hipoalbuminémia e hipergamaglobulinémia. A fase aguda da doença dura cerca de 2 a 4 semanas e é caracterizada por prostração, anorexia, dispneia, febre, linfadenomegália, esplenomegália, vômito e alterações de coagulação apresentadas sob a forma de petéquias, equimoses e hemorragias. A fase crónica é bastante complexa e geralmente têm um prognóstico reservado, incluindo para além das manifestações clínicas descritas: edema periférico dos membros posteriores e escroto, mucosas pálidas, corrimento ocular e nasal mucopurulento e hematúria. Poderão ainda apresentar infecções secundárias como pneumonia intersticial, insuficiência renal, artites e polimiosites. Na existência de sinais oculares pode apresentar uveíte anterior, opacidade corneal e tortuosidade dos vasos da retina. Os sinais neurológicos são menos comuns, mas podem ocorrer em ambas as fases aguda e crónica. Estes resultam de meningite ou meningoencefalite, evidenciadas pela extensa infiltração linfoplasmocítica e monocítica. Em casos excepcionais, é possível detetar mórulas no fluido cefalorraquidiano aquando da presença de sinais clínicos (Harrus *et al.*, 2016). A fase aguda e crónica são difíceis de distinguir na prática clínica. Através da realização de hemograma e citologia por aspirado de medula, na fase

crónica, é encontrado hipoplasia da médula e uma pancitopenia acentuada. A PCR convencional é um método sensível para a deteção de *E. canis* 4 a 10 dias após a inoculação (Harrus *et al.*, 2012; Dahmani *et al.*, 2015; Sainz *et al.*, 2015).

Na Europa foram referidas em cães, até à data, duas espécies de *Anaplasma*: *A. phagocytophilum* e *A. platys*, que causam Anaplasmoze Granulocítica canina e Trombocitopénia Infeciosa, respetivamente. As infeções por *A. phagocytophilum* têm-se verificado principalmente no norte e centro da Europa; e têm como vetor *Ixodes ricinus*. Tem uma grande importância em saúde pública, uma vez que é responsável pela Anaplasmoze granulocítica nos humanos. *A. platys* tem sido detetada principalmente nos países mediterrânicos. A incubação destas duas espécies é de 1 a 2 semanas. Após este período decorrem períodos alterados com trombocitopenia e febre, que tendem a ocorrer e a desaparecer de forma clínica a cada 1-2 semanas. A deteção de *A. platys* através da observação direta ao microscópio pode ser possível a partir de 8 a 15 dias após a inoculação. No entanto, os animais poderão manifestar trombocitopenia grave 7 dias após a inoculação/infeção (Sainz *et al.*, 2015; Bouzouraa *et al.*, 2016). As principais manifestações clínicas descritas em estudos de infeção experimental e natural incluem prostração, anorexia, perda de peso, mucosas pálidas sugestivas de anemia, petéquias, febre, corrimento nasal e linfadenomegália (Bouzouraa *et al.*, 2016). A infeção crónica é caracterizada por uma trombocitopenia moderada e baixa bacteremia (Sainz *et al.*, 2015). A observação direta ao microscópio ótico poderá ser o método com maior sensibilidade na fase aguda de infeção. As mórulas de *A. platys* podem ser encontradas principalmente nas plaquetas mas também em megacariócitos (Harvey, 2012; Sainz *et al.*, 2015).

Outra forma de transmissão destes agentes é através da transfusão sanguínea. Por este motivo, é recomendado testar os animais dadores por métodos moleculares, especialmente em áreas endémicas (Harrus *et al.*, 2016).

A utilização de métodos sorológicos quantitativos para a deteção de *Ehrlichia* ou *Anaplasma*, têm uma maior sensibilidade e especificidade comparativamente com os testes rápidos. Na interpretação dos resultados um resultado positivo pode indicar persistência de anticorpos após a infeção, mas não indica que o animal esteja infetado. Assim é sugerida a avaliação de dois ou mais testes sorológicos com 2 a 4 semanas de intervalo. No entanto é preferível a realização de métodos moleculares, uma vez que esta deteção indica a existência de uma infeção ativa (Sainz *et al.*, 2015).

Para estas doenças o tratamento com tetraciclinas garante uma resposta na maioria dos casos, sendo utilizada na prática clínica a Doxiciclina numa dose de 10 mg/kg durante 14 a 21 dias para *A. platys* e 4 semanas para *E. canis*. Nos casos agudos de Ehrliquiose Monocítica Canina e Anaplasmoze os animais deverão mostrar melhorias dos sinais clínicos 24 a 48 horas após o início de tratamento. No entanto, já foi demonstrado que alguns cães permanecem positivos após este tratamento. Mesmo após a terapêutica, os anticorpos são persistentes durante meses ou anos, no

entanto existe uma diminuição das concentrações de gamaglobulinas. Estes anticorpos não conferem uma proteção contra novas infecções ou reinfeções (Harrus *et al.*, 2016).

### 1.12.2 Outros protozoários

Os protozoários do género *Hepatozoon* pertencem ao Filo Apicomplexa, Subordem Adeleorina, Família Hepatozoidae. Até ao momento, foram identificadas duas espécies em cães: *H. canis*, em países da África, Ásia, Europa e América enquanto *H. americanum* apenas foi encontrado nos EUA. O principal vetor é *R. sanguineus* e a infeção poderá ocorrer no estágio de ninfa ou adulto. O cão é infetado após ingestão do ixodídeo, cujos esporozoítos são libertados e penetram na parede intestinal ou ainda via transplacentária, no caso de *H. canis*. Existe ainda a possibilidade de ocorrer transmissão através da ingestão de tecidos contaminados de hospedeiros paraténicos, como os roedores ou coelhos. O ciclo engloba o ixodídeo enquanto hospedeiro definitivo, onde intercorre a reprodução sexual, e um hospedeiro intermediário onde decorre a reprodução assexuada (Baneth, 2011). Os merozoítos libertados de merontes atingem os tecidos hemolinfáticos através da linfa ou corrente sanguínea. Ao infetarem os neutrófilos ou monócitos desenvolvem-se também em gamontes. Os gamontes têm aproximadamente 11 µm x 4 µm e apresentam uma forma elipsoidal e um núcleo central. No entanto estes só são observados ao microscópio ótico 28 a 43 dias após a infeção. A utilização da fração leucocitária para esfregaço é mais sensível que a utilização de sangue total, no entanto a PCR é o método de diagnóstico de eleição (Cardoso *et al.*, 2010; Baneth, 2011). Os merontes poderão ser detetados através da punção por aspiração de agulha fina ou impressão de tecidos hemolinfáticos. *Hepatozoon canis* atua como um agente oportunista, relacionado com doenças concomitantes imunodepressoras ou infeções por outros parasitas, dificultando a caracterização dos seus sinais clínicos. Provoca ainda imunodepressão que influencia a reinfeção por novos *H. canis* ou a reativação dos preexistentes. A Hepatozoonose de grau moderado é comum e está associada a uma baixa parasitémia com 1-5% de neutrófilos afetados (Baneth, 2012; Baneth & Vicent-Johnson, 2016). Nos casos de elevada parasitémia, com aproximadamente 100% dos neutrófilos infetados, os animais apresentam um quadro clínico grave caracterizado por leucocitose, neutrófilia (superior a  $150 \times 10^9/L$ ), anemia, hiperglobulinemia e febre. O tratamento da hepatozoonose é controverso relativamente à sua eficácia, uma vez que nenhum dos tratamentos se verificou eficaz contra todas as formas do parasita. No entanto é recomendada a administração de dipropionato de imidocarb 5 a 6 mg/kg SC ou IM, com intervalo de 14 dias até à eliminação completa de gamontes na monitorização de amostras sanguíneas, juntamente com doxiciclina 10mg/kg PO durante 21 dias (Baneth, 2011; Baneth, 2012). Num estudo de caso controlo, que pretendiam avaliar a eficácia do tratamento com dipropionato de imidocarb e toltrazuril em associação com clindamicina, concluíram que apesar da redução de animais infetados, ambos os tratamentos não providenciaram a cura parasitológica. Assim, são necessários mais estudos

sobre protocolos ou compostos ativos, para estabelecer a terapêutica que deve ser aplicada (Tommasi *et al.*, 2014; Baneth, 2016).

### 1.12.3 Nemátodes

As regiões cujas condições climáticas favorecem a propagação de mosquitos e ixodídeos poderão ser áreas de risco para a existência de coinfeções associadas a *Dirofilaria* spp. As regiões do Sul da Europa são consideradas endêmicas. Recentemente, Vichová *et al* (2014) isolaram DNA de 366 amostras de sangue provenientes de cães com microfilarémia na Eslovénia, Europa Central. Cerca de 3.55% das amostras testadas tinham uma infecção mista por *D. repens* e *B. canis*. Foi ainda encontrado um único caso de uma coinfeção de *D. repens* com *B. canis* e *A. phagocytophilum* (Vichová, Miterpáková, & Iglódyová, 2014). *D. repens* representa um maior risco zoonótico comparativamente com *D. immitis*. No entanto, esta última tem maior importância clínica e geográfica na infecção dos cães domésticos. Os formas adultas de *Dirofilaria immitis* localizam-se nas artérias pulmonares, ventrículo e aurícula esquerda do coração. Esta é transmitida aquando da refeição de um culicídeo fêmea infetado, que ingere microfilárias. Os primeiros sinais clínicos de infecção por *D. immitis* estão associados com a primeira fase da doença que dura 3 a 6 meses após a infecção. Após este período a presença de adultos nematodes provoca hipertensão pulmonar e hipertrofia excêntrica do ventrículo direito. Esta compromete o funcionamento da válvula tricúspide e provoca uma insuficiência cardíaca direita. Como resultado, inicia-se um processo de síndrome da veia cava caracterizado por hepatomagália, hemólise intravascular e débito cardíaco diminuído. Atualmente está indicada a realização de métodos serológicos, tal como ELISA para pesquisa de antígenos, para deteção de infeções por *D. immitis*. Além de terem uma sensibilidade maior, permitem identificar a infecção mesmo quando não existem microfilárias em circulação. Podem ainda ser utilizados para determinar a eficácia do tratamento adulticida, uma vez que a concentração dos níveis de antígenos diminui para níveis indetetáveis 8 a 12 semanas após tratamento (AHS - Current canine guidelines, 2014).

*Wolbachia pipiens* é uma bactéria *gram* negativa e pertence à ordem das Rickettsiales. Existe uma relação simbiótica entre esta bactéria e diversas espécies de filarídeos. Não só esta bactéria é indispensável para a sobrevivência do nemátode, mas também a interação da mesma com o sistema imunitário do hospedeiro é um importante mecanismo de patogénese. Esta parece contribuir para o processo inflamatório pulmonar e renal através de uma proteína de superfície, induzindo uma resposta de IgG nos hospedeiros. Assim a doxiciclina deve ser incorporada no protocolo de tratamento antes da administração de malarsomina, de forma a que *Wolbachia* e os seus metabólitos sejam reduzidos ou mesmo ausentes antes de os nemátodes morrerem (AHS - Current canine guidelines, 2014).

## CAPÍTULO IV - DETEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *BABESIA* SPP. EM CANIS FAMILIARIS E DE OUTROS AGENTES TRANSMITIDOS POR IXODÍDEOS NA ÁREA METROPOLITANA DE LISBOA E OESTE, PORTUGAL

### 1. Objetivos

As motivações que conduziram à realização deste trabalho de investigação laboratorial foram as seguintes:

- a. Aumento do risco de transmissão de agentes patogénicos por Ixodídeos, devido a alterações climáticas globais, urbanização de áreas naturais e alargamento de espectro de atividades recreativas praticadas por humanos e animais de companhia, bem como o aumento de abundância de hospedeiros reservatórios silváticos, com alteração dos ciclos biológicos destes agentes (Millán *et al.*, 2016; Solano-Gallego *et al.*, 2016);
- b. Crescente mobilidade dos animais de estimação entre áreas endémicas e não endémicas tem contribuído para a expansão de agentes patogénicos, levando à necessidade de pesquisa dos mesmos na área em estudo e possíveis coinfeções que poderão potenciar a patogenicidade do agente envolvido (Alvarado-Rybak *et al.*, 2016; Millán *et al.*, 2016);
- c. Estes agentes transmitidos por ixodídeos têm um potencial zoonótico, pelo que requer uma abordagem de *One Health*, sendo importante informar também a comunidade veterinária, os tutores dos animais e autoridades de saúde pública, em relação aos mesmos (Zhou *et al.*, 2014; Solano-Gallego *et al.*, 2016);
- d. A perceção de que a informação sobre Babesiose canina no Sul de Portugal era escassa, nomeadamente a deteção e identificação de espécies envolvidas na infeção por *Babesia* spp.,
- e. Parca informação relativamente à manifestação clínica associada a agentes patogénicos transmitidos por ixodídeos e a influência de coinfeções (Solano-Gallego & Baneth, 2011);

Partindo destas premissas, a presente dissertação de MIMV teve como objetivos:

1. Deteção de *Babesia* spp. numa população de cães domésticos provenientes do HEV da FMV/ULisboa e de canis da Área Metropolitana de Lisboa (AML) e da ocorrência de infeções por outros agentes pertencentes à família Anaplasmataceae, do género *Hepatozoon* e *Mycoplasma*, através de esfregaço sanguíneo com observação direta ao microscópio ótico e PCR convencional;
2. Discutir as diferentes metodologias de diagnóstico utilizados para a deteção de *Babesia* spp;
3. Avaliar as manifestações clínicas e laboratoriais associadas à infeção por *Babesia* spp e outros agentes coinfetantes;

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Caracterização da amostra e da área geográfica

A população em estudo teve um número total de 143 cães e foi constituída por dois grupos: grupo 1, constituído por 49 cães (33,57%) apresentados à consulta veterinária no Hospital Escolar Veterinário (HEV) e na Clínica Veterinária APAVET; e o grupo 2, que incluiu 94 cães (65,43%) provenientes de um Canil Municipal ou de Associação de proteção aos animais. A colheita de amostras destes animais decorreu entre os meses de setembro de 2016 a julho de 2017.

A área metropolitana de Lisboa (AML) engloba 18 concelhos da Grande Lisboa e da Península de Setúbal, nomeadamente: Alcochete, Almada, Amadora, Barreiro, Cascais, Lisboa, Loures, Mafra, Moita, Montijo, Odivelas, Oeiras, Palmela, Seixal, Sesimbra, Setúbal, Sintra e Vila Franca de Xira. Esta área metropolitana é a maior concentração populacional e económica de Portugal, com quase 3 milhões de habitantes (AML, 2017). A Região Oeste de Portugal incorpora os distritos de Lisboa e Leiria, e é composta e tem cerca de 400 mil habitantes, sendo formada pelos municípios de Alcobaça, Alenquer, Arruda dos Vinhos, Bombarral, Cadaval, Caldas da Rainha, Lourinhã, Nazaré, Óbidos, Peniche, Sobral de Monte Agraço e Torres Vedras (Comunidade Intermunicipal do Oeste, 2016).

A inclusão de cães do primeiro grupo, no presente estudo, foi realizada pelos veterinários responsáveis, abrangendo apenas cães com suspeita de Babesiose canina, associados a pelo menos um dos seguintes critérios:

- a. Apresentação à consulta com pelo menos dois sinais clínicos compatíveis com Babesiose canina, entre a lista de sinais clínicos sugestivos de doença apresentada no Anexo I, na tabela i.
- b. Resultado positivo para *B. canis*, através de imunofluorescência indireta (IFI);
- c. Resultado positivo para *Babesia* spp, através de qPCR com resultado positivo.

Para o segundo grupo, a escolha dos cães foi realizada aleatoriamente, independentemente do sexo, idade, raça e estado clínico do animal. A premissa foi o contacto dos cães com ixodídeos a quando da sua recolha no canil ou historial anterior de contacto com estes artrópodes no canil. As recolhas foram realizadas dois períodos distintos, tendo sido realizada uma primeira recolha nos meses de novembro e outubro de 2016, correspondentes ao Outono, e uma segunda recolha no mês de junho 2017, correspondente ao Verão. Antes da realização do esfregaço sanguíneo, para cada animal foi realizado um hematócrito e doseamento de proteínas totais, através de um refratómetro, no Hospital Escolar Veterinário (HEV).



## **2.2. Inquérito**

Durante a comunicação com os responsáveis do canil e tutor do animal, foi realizada uma recolha de informação individual sobre o mesmo, sob a forma de um Inquérito (Anexo II e III). Este teve como objetivo a recolha do maior número de dados relativos ao animal, pelo que as questões foram formuladas tendo em conta os riscos associados, historia do animal e possível transmissão de piroplasmas. Para a obtenção do inquérito final, os primeiros inquéritos foram sujeitos a uma fase de validação que resultou numa alteração estrutural, de forma a obter informações pertinentes.

O inquérito incluiu dados essenciais sobre o animal como a idade, sexo, estado reprodutivo, raça, assim como a sua proveniência, aptidão, o concelho e desde quando residia com os donos, ambiente em que habita, viagens realizadas no exterior e interior do país. Para além disso, foram incluídas questões acerca do contacto com ixodídeos ou outras formas alternativas de transmissão de Babesiose canina, dos hábitos de profilaxia contra ectoparasitas, relativamente às vacinas contra Babesiose canina e história de Febre da Carraça, e ainda presença de infeções ou doenças concomitantes.

Relativamente aos animais provenientes de canis municipais do distrito de Lisboa, apesar de a história anterior à entrada no canil ser desconhecida, foi realizado um questionário sobre cada animal ao veterinário ou aos técnicos responsáveis. Neste questionário foram também incluídos dados essenciais sobre o animal, assim como nos questionários dos cães apresentados à consulta, direcionados à permanência no canil e às circunstâncias em que foram recolhidos.

## **2.3. Colheita e conservação das amostras**

A cada animal foi colhido 1 ml de sangue de uma veia periférica, nomeadamente da veia safena, cefálica ou jugular. De seguida foi colocado 1mL em cada tubo com anticoagulante EDTA (do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*) de 1ml, sendo mantidos em temperaturas de refrigeração até serem transportados para o laboratório. Foram realizados a partir destas amostras três esfregaços sanguíneos, e a restante foi armazenada a -20°C para posterior extração de DN.

## **2.4. Coloração de esfregaços sanguíneos e posterior observação direta ao Microscópio ótico**

A partir da amostras sanguínea colhida em tubo com EDTA foi realizado o esfregaço sanguíneo em lâmina de vidro, identificada com o nome do respetivo animal e data da colheita. Estes foram corados no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LPDP) da FMV – UL, segundo a coloração rápida de Giemsa, descrita por ordem de procedimento. Após a sua secagem ao ar durante cerca de 10 minutos foi realizada a fixação com metanol durante um minuto e seguida de coloração com corante Giemsa puro durante mais um minuto. As lâminas foram então lavadas com

água corrente, de forma a remover o excesso de corante, secas ao ar e armazenadas à temperatura ambiente.

Por cada animal foram realizados dois esfregaços sanguíneos. A observação microscópica de cada esfregaço sanguíneo foi realizada através das ampliações de x400 e x1000. Em cada lâmina foram observados 100 campos aleatórios para a pesquisa de hemoparasitas.

## **2.5. Extração e quantificação de DNA**

A extração do DNA das amostras de sangue armazenadas em tubos com EDTA congeladas a -20° foi realizada no Laboratório de Parasitologia do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária. Para a extração de DNA do sangue utilizou-se o kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit® (Qiagen, GmbH, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante com algumas adaptações (Anexo IV). Seguidamente foi realizado um controlo da qualidade da extração através da quantificação do DNA por espectrofotometria (Nanodrop 2000, thermoScientific) e as amostras foram armazenadas a -20°C para posterior amplificação por reação de PCR.

## **2.6. Métodos moleculares para deteção de *Babesia* spp**

Na presente dissertação foram utilizados dois Métodos moleculares, referidos como Método 1 (utilizado no Instituto de Investigação Agrária e Veterinária em Oeiras – INIAV) e Método 2 (utilizado no Instituto Veterinário da Croácia em Zagreb). Ambos consistem na deteção e amplificação de uma região do gene 18S rRNA (do inglês *Ribosomal ribonucleic acid*) de todas as espécies pertencentes aos géneros *Babesia* e *Theileria*. Tanto o método 2 como os protocolos para a deteção de agentes coinfectantes foram realizados no Instituto Veterinário da Croácia, pelo que a autora da presente dissertação foi integrada na equipa de laboratório e tendo utilizado os métodos previamente estabelecidos.

### **2.6.1. Amplificação gene 18S pelo Método 1 e PCR RFLP**

No Método 1, os *primers* selecionados para a pesquisa de *Babesia* e *Theileria* spp. e o protocolo utilizado teve como referência o artigo de Carret *et al.* (1999). Estes *primers* foram alinhados com sequências disponíveis no GenBank, através de uma análise BLAST (do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*). Isto permitiu verificar o emparelhamento dos *primers* utilizados com sequências correspondentes às espécies de *Babesia* que infetam o cão.

Para cada amostra (5 µl de DNA), foram preparados 20 µl de mistura de reação constituída por 9.8 de água bidestilada, 5 µl de tampão de reação, 2,5 de MgCl<sub>2</sub> (25Mm), 0,5 µL de dNTP's (10 Mm), 1µl de cada *primer* Piro A e Piro B, e por fim NZY Taq Mix (NZYTech, Lisboa, Portugal). Foram utilizados ainda 5 µl de DNA genómico de *Babesia rossi* como controlo positivo e 5 µl de água bidestilada como controlo negativo.

Posteriormente, os produtos de amplificação de 447 pb foram visualizados após eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5%, 90 volts na presença de 5% de GelRed™. Para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado o marcador de pesos moleculares HyperLadder™ I (Bioline, London, Uk).

Para a técnica de RFLP (do inglês *restriction fragment length polymorphism*) foram utilizados os produtos de amplificação a partir dos *primers* PIRO-A e PIRO-B, 1/5 de cada produto amplificado foi submetido a uma hidrolise de 3h (Carret, Walas, & Carcy, 1999). Desta forma, foram preparados para cada 10 µl de cada produto amplificado: 1 µl (10U) de Enzimas de restrição Hinf I e Taq I, 2,5 µl de água bidestilada, 1,5 µl de tampão 10x. A digestão dos produtos, que originou fragmentos amplificados, foi posteriormente detetada por eletroforese em gel de agarose e coloração com 5% de GelRed™. Para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado o marcador de pesos moleculares NZDNA Ladder VI (NZTech, Lisboa, Portugal).

### **2.6.2. Amplificação gene 18S pelo Método 2, purificação e sequenciação**

O Método 2 permitiu amplificar um fragmento do gene 18S rRNA, com aproximadamente 560 pb (Beck *et al.*, 2009). De acordo com o protocolo, para cada amostra (2 µl de DNA), foram preparados 20 µl de mistura de reação constituída por 7,2 µl de água bidestilada, 0,4 µl de cada *primer* Bab F e Bab R, e por fim GOTaq Master mix (Promega, Madison, WI, USA) de 10 µl por amostra, que contem o tampão de reação, a enzima Taq polimerase, MgCl<sub>2</sub> e dNTP's necessários à reação de amplificação. Foram utilizados ainda 5 µl de DNA genómico de *Babesia spp.* como controlo positivo e 5 µl de água bidestilada como controlo negativo.

Os produtos de amplificação de PCR foram observados através da eletroforese por capilaridade da QIAEXEL (Qiagen, Hilden, Germany), utilizando o kit QIAxcel DNA Fast Analysis, o Marcador de alinhamento (DNA QXAlignmentMarker15bp/3kb) e um Marcador de pesos moleculares QX DNA 50 pb-3000 pb. Os produtos de PCR amplificados, foram ainda purificados através de EXOSAP-it® (USB® Products AffyInc., Ohio, USA) de acordo com as instruções do fabricante e sequenciados em ambas as direções dos *primers* (Macrogen, Amsterdam, The Netherlands). As reações de sequenciação foram realizadas com recurso aos pares de *primers* utilizados nas reações de amplificação anteriormente descritas. Um nível de homologia maior ou igual a 99% foi considerado para os resultados obtidos, tendo em conta o elevado grau de confiança.

## 2.7. Métodos moleculares para detecção de outros agentes

Os protocolos utilizados na PCR convencional que irão ser descritos estavam já estabelecidos e aplicados como meios de diagnóstico no Instituto Veterinário da Croácia.

Na detecção de *Hepatozoon* spp. foi amplificada um fragmento da pequena subunidade de RNA ribossomal, 18S SSU rRNA, com aproximadamente 666 pb. De acordo com o protocolo, para cada amostra (2 µl de DNA), foram preparados 20 µl de mistura de reação constituída por 7,2 µl de água bidestilada, 0,4 µl (10 pmol/µl) de cada *primer* Bab F e Bab R, e por fim GOTaq *Master mix* (Promega, Madison, WI, USA) de 10 µl por amostra, este último contém o tampão de reação, a enzima Taq polimerase, MgCl<sub>2</sub> e dNTP's necessários à reação de amplificação. Foram utilizados ainda 5 µl de DNA genómico de *Hepatozoon canis* como controlo positivo e 5 µl de água bidestilada como controlo negativo. Este protocolo foi aplicado da mesma forma para os restantes agentes patogénicos que se pretendia detetar, com a exceção dos *primers* e controlos positivos utilizados. As condições ótimas da PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 2 min, seguida de 40 ciclos que englobava desnaturação a 94°C durante 40 seg., hibridação a 59°C durante 40 seg., extensão a 72°C durante 60 seg., e por fim uma extensão final a 72°C durante 7 min. Os ciclos térmicos utilizados no termociclador Alpha Cycler 2 (PCRmax<sup>®</sup>) para detecção destes agentes, encontram-se descritos na tabela iii dos anexos.

Para a detecção de agentes da família Anaplasmataceae, foi amplificado o fragmento do gene 16S rRNA com aproximadamente 345 pb, através da PCR convencional (Parola *et al.*, 2000). As condições ótimas da PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 2 min, seguida de 40 ciclos que englobava desnaturação a 94°C durante 30 seg., hibridação a 53°C durante 30 seg., extensão a 72°C durante 30 seg., e por fim uma extensão final a 72°C durante 7 min.

Para a detecção de *Mycoplasma* spp. foi utilizado como controlo positivo o fragmento da região 16S com 560pb, de *Mycoplasma hematoparvum* (Varanat *et al.*, 2011). As condições ótimas destas PCR foram as seguintes e representadas em anexo, na tabela iii

Os produtos de amplificação de PCR foram observados dos produtos de PCR foi confirmado através da eletroforese por capilaridade da QIAEXEL (Qiagen, Hilden, *Germany*), utilizando o kit QIAxcel DNA *Fast Analysis*, o Marcador de alinhamento (DNA QXAlignmentMarker15bp/3kb) e um Marcador de pesos QX DNA 50 pb-3000 pb. Os produtos de PCR amplificados, foram ainda purificados através de EXOSAP-it<sup>®</sup> (USB<sup>®</sup> Products AffyInc., Ohio, USA) de acordo com as instruções do fabricante e sequenciadas ambas as cadeias (Macrogen, Amsterdam, The Netherlands). Um nível de homologia maior ou igual a 99% foi considerado para os resultados obtidos, tendo em conta o elevado grau de confiança.

Tabela 2 - *Primers* utilizados para amplificação de agentes patogênicos descritos na presente dissertação.

Gene alvo	Agente	Nome dos primers	Sequências dos <i>primers</i> (5'-3')	Dimensão dos Fragmentos (pb)	Referência
18S rRNA	<i>Babesia</i> sp.	BAB F BAB R	GTCTTGTAATTGGAATGATGG CCAAAGACTTTGATTTCTCTC	550	(Beck <i>et al.</i> , 2009)
18S rRNA	<i>Babesia</i> sp.	Piro-A Piro-B	AAT ACC CAA TCC TGACAC AGG G TTA AAT ACG AAT GCC CCC AAC	408	(Carret <i>et al.</i> , 1999)
18S rDNA	<i>Hepatozoon</i> sp.	Hep F Hep R	ATACATGAGCAAAATCTCAAC CTTATTATTCCATGCTGCAG	666	(Inokuma <i>et al.</i> , 2002)
16S rRNA	Anaplasmataceae	EHR16SD EHR16SR	GGT ACC YAC AGA AGA AGT CC TAG CAC TCA TCG TTT ACA GC	345	(Parola <i>et al.</i> , 2000)
16S rRNA	<i>Mycoplasma</i> sp.	Myc0322s Myc0938as	GCCCATATTCCTACGGGAAGCAGCAGT CTCCACCACTTGTTTCAGGTCCCCGTC	560	(Varanat <i>et al.</i> , 2011)

## 2.8 Análise de dados

Os dados foram armazenados e analisados no Software Microsoft Excel 2007<sup>®</sup> e a sua análise estatística foi realizada recorrendo à plataforma de cálculo *Epitools*. Para a realização da distribuição geográfica foi utilizado um software de design gráfico Adobe Illustrator CS6. Foi determinada a prevalência das infeções detetadas e o respetivo intervalo de confiança, utilizando um nível de confiança de 95% segundo os Limites de Wilson. Para os testes de cPCR foram consideradas sensibilidades e especificidades de 100%, pelo que a prevalência calculada diz respeito à Prevalência Real e Aparente. A concordância entre os resultados dos métodos moleculares e a observação direta ao microscópio ótico foi calculada como a proporção de concordância entre os resultados de ambas as provas, utilizando tabelas de contingência 2x2. A medida estatística para avaliar a concordância observada foi o kappa de Cohen ( $\kappa$ ), que permite calcular o nível de concordância entre os resultados concordantes em excesso daquilo que seria esperado por acaso. A concordância entre as provas foi avaliada de acordo com Landis & Koch, 1977, com base nos seguintes critérios: 0,00 corresponde a uma concordância pobre; 0,01 - 0,02 ligeira; 0,21–0,40 razoável, 0,41 - 0,60 como moderada, 0,61 - 0,80 como substancial e por fim; 0,81 - 1,00 corresponde a uma concordância excelente.

### 3. Resultados

#### 3.1 Caracterização da amostra em estudo

No primeiro grupo (Hospital), constituído por cães apresentados à consulta, foi realizado um inquérito que permitiu a recolha de dados sobre os animais, nomeadamente o concelho onde viviam, sendo representada a distribuição dos mesmos no Gráfico 1. Relativamente ao seu estilo de vida, correspondente ao local de habitação, 46,94% (23/49) viviam no interior das habitações, 30,61% (15/49) viviam num espaço exterior e 22,45% (11/49) variaram entre estes dois últimos locais. Neste grupo de 49 animais, 14,28 % (7/49) tinham história de uma viagem pontual para o estrangeiro: 4 animais para Espanha, 1 para Marrocos, 1 Bélgica e 1 para Bélgica e Alemanha. A questão sobre se o tutor observou carraças no animal foi incluída no questionário e verificou-se que 67,34% (33/49) dos cães tiveram contacto com ixodídeos, enquanto que em 32,66% (16/49) dos animais o tutor nunca constatou a presença de carraças, tal como demonstrado no gráfico 2. A partir do historial clínico, foi verificado que nenhum destes animais era esplenectomizado.

Gráfico 1 - Distribuição dos 49 cães domésticos, pertencentes ao grupo 1, dos concelhos constituintes da área metropolitana de Lisboa e Oeste.

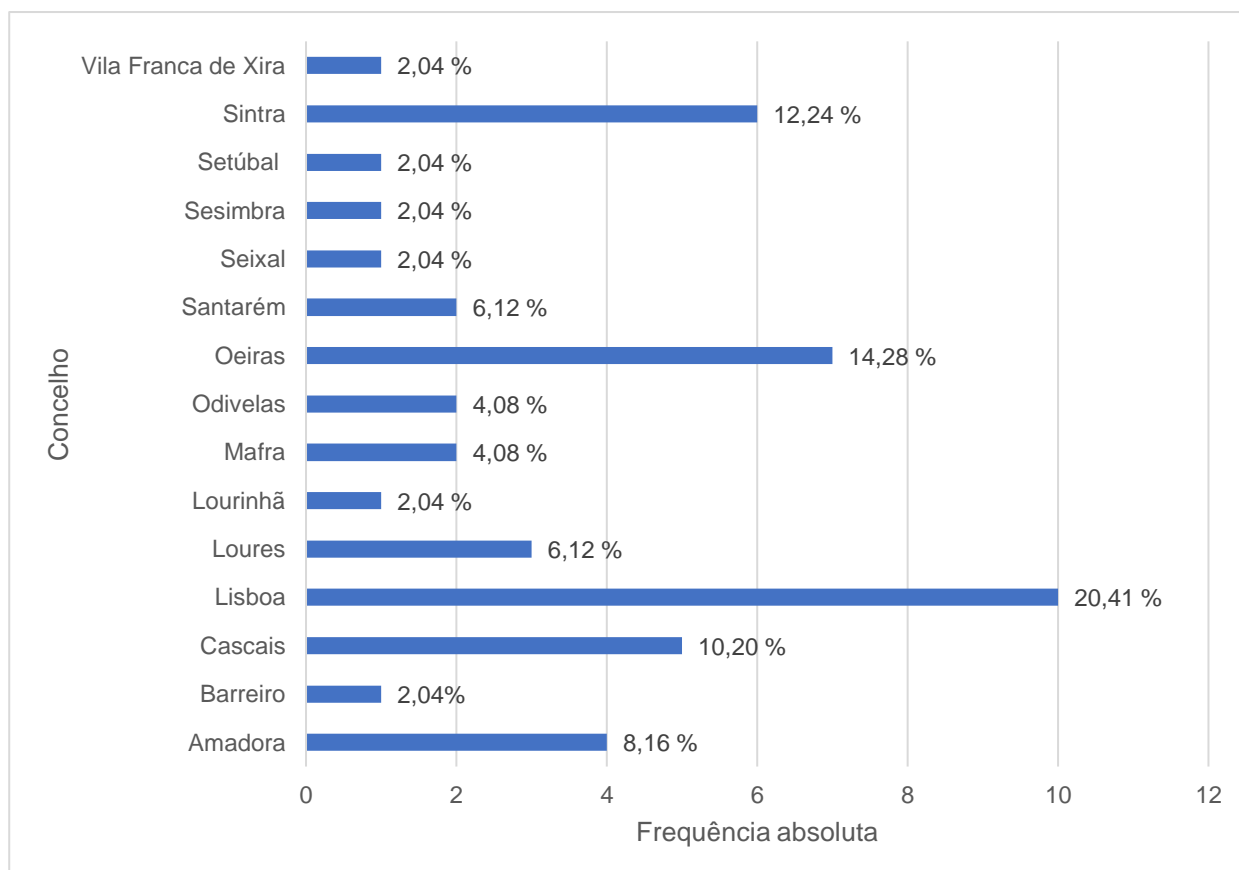
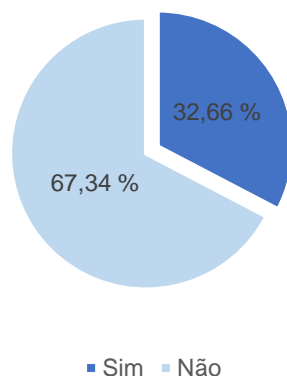


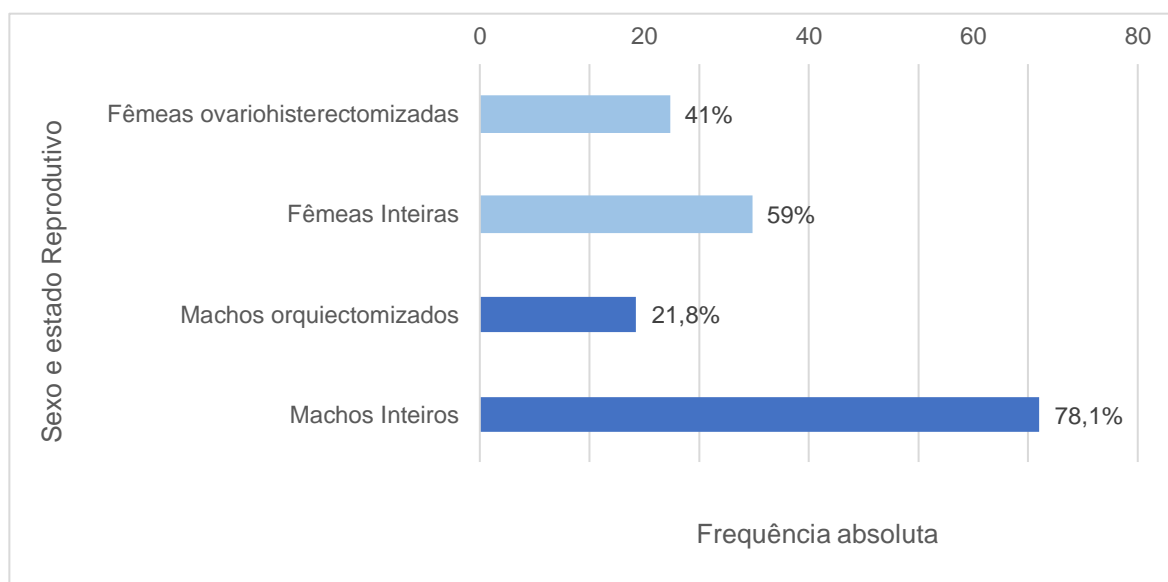
Gráfico 2 - Proporção de cães, pertencentes ao grupo 1, que tiveram contacto com carraças observadas pelo tutor (n=49).



O segundo grupo (Canil), incluiu canis pertencentes ao distrito de Lisboa: 11 cães do canil do Projeto JAVA do concelho da Lourinhã, 7 cães do canil da Associação Protetora de Animais do Cadaval (APAC) do concelho do Cadaval, 29 cães do canil Municipal de Torres Vedras, 4 cães do canil da Associação para Proteção dos Animais de Torres Vedras (APA) do concelho de Torres Vedras, 7 cães do canil Municipal de Arruda dos Vinhos, 26 cães do canil Municipal de Lisboa conhecido como a Casa dos Animais de Lisboa, 6 cães do canil da AMIAMA do concelho da Amadora e 4 cães do canil Municipal de Odivelas. O número de animais integrados em cada canil foi limitado, tendo em conta o número de animais residentes e consoante a observação de carraças nos animais por parte do responsável pelo canil.

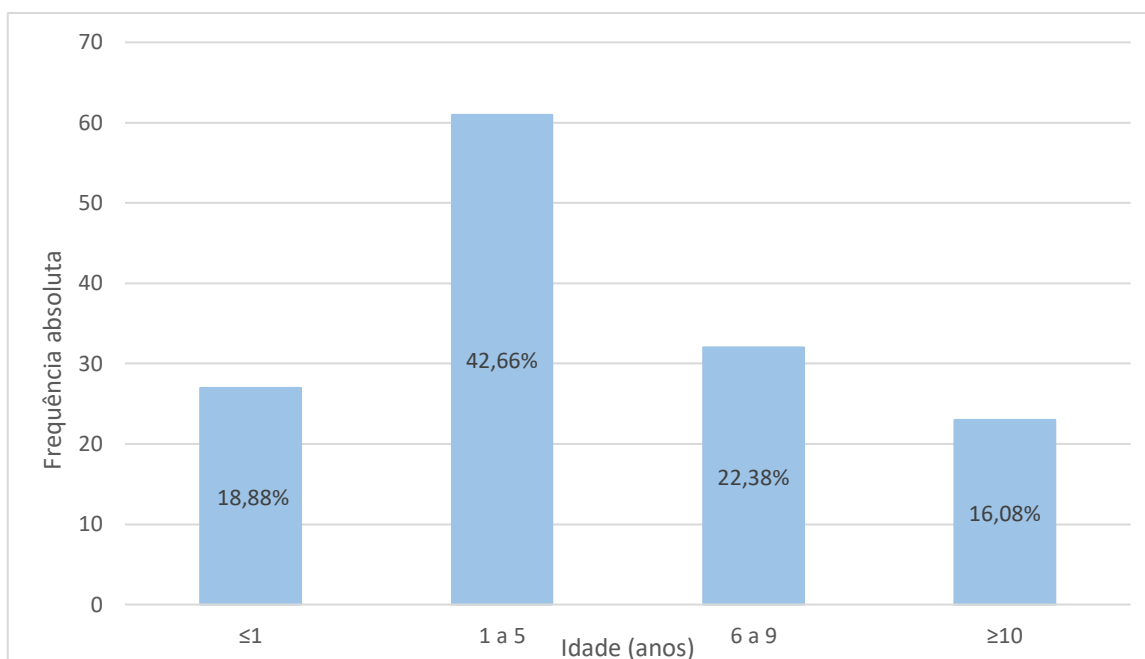
Na amostra obtida, 39,16% (56/143) dos cães domésticos eram do sexo feminino, dos quais 41% (23/56) eram fêmeas ovariectomizadas e 59% (33/56) eram inteiras. Relativamente ao sexo masculino, 21,84% (19/87) estavam orquiectomizados e 78,16% (68/87) eram inteiros (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Sexo e estado reprodutivo dos cães incluídos na amostra (n=143).



No que diz respeito à idade, para facilitar a análise de dados, os cães foram agrupados por faixas etárias, como representado no gráfico 4.

Gráfico 4 - Distribuição da população alvo por faixas etárias (n=143).



Relativamente à raça dos cães incluídos neste estudo, em ambos os grupos, a maioria era de raça indeterminada, representando 64,33% da amostra, tabela 3.

Tabela 3 - Frequência absoluta e relativa (%) da distribuição de raças e cruzamentos de cães domésticos da amostra (n=143).

Raça	Frequência absoluta	Frequência relativa aproximada (%)
Basset Hound	1	0,70
Boxer	1	0,70
Braco Alemão	3	2,09
Bull Terrier	1	0,70
Bulldog Inglês	1	0,70
Castro Labreiro	1	0,70
Cocker Spaniel	4	2,80
Dálmata	3	2,09
Dog Argentino	1	0,70
Epagneul Breton	4	4,90
Galgo Inglês	1	0,70
Husky Siberiano	1	0,70
Indeterminada	92	64,33



Tabela 3 (continuação) - Frequência absoluta e relativa (%) da distribuição de raças e cruzamentos de cães domésticos da amostra (n=143).

Labrador Retriever	<b>7</b>	<b>4,89</b>
Papillon	1	0,70
Pastor Alemão	3	2,09
Pastor Australiano	1	0,70
Perdigueiro Português	3	2,09
Podengo Português	7	4,89
Pointer Inglês	1	0,70
Rottweiler	1	0,70
Setter Inglês	1	0,70
Shar-pei	1	0,70
Teckel	2	1,40
Yorkshire	1	0,70

Tendo em conta a análise de resultados obtidos no inquérito relativamente à prevenção de infeção por Babesiose canina e outros agentes transmitidos por ixodídeos, foi verificado que a administração do desparasitante era bastante variável em relação ao princípio ativo e marcas utilizadas ao longo do ano. Esta situação ocorreu tanto no grupo 1, cujos tutores têm responsabilidade sob a desparasitação externa, e no grupo 2, tendo como responsável o técnico ou Médico Veterinário do canil. Para além de variar em relação à estação do ano em que se encontram, sendo mais rigorosa durante o verão, a utilização do princípio ativo varia consoante a disponibilidade no mercado e condições económicas existentes. Foi ainda verificado que alguns produtos, aplicados em pulverização, eram utilizados apenas após a observação de carraças no animal. Assim sendo, apensar de terem sido incluídas questões relativas à prevenção, esta não foi considerada consistente para analisar na presente dissertação, sendo apenas apresentada enquanto regular ou não regular em anexo. Sendo que, os animais do grupo 2 (Canil), que se apresentavam no canil há menos de 6 meses não foram considerados tendo uma desparasitação regular. Na população de cães pertencentes ao grupo 1, 65,31% (32/49) dos tutores responderam que os animais se encontravam desparasitados externamente de forma regular, enquanto 34,69% (17/49) dos tutores afirmaram que não realizavam a desparasitação externa de forma regular. Relativamente à vacinação, apenas um animal do grupo 1 se encontrava vacinado, nomeadamente com a vacina Pirodog® da Merial, e não foram detetadas infeções por *Babesia* spp.. Este animal residia em Santarém e tinha uma historia de viagem para o norte de Portugal. No inquérito, para o grupo 1 (Hospital), foi ainda incluída a questão se foi realizada uma transfusão sanguínea anterior à consulta e conseqüente recolha de amostra sanguínea, à qual todos os tutores responderam que não.

### 3.2 Detecção de hemoparasitas por Microscopia ótica em esfregaço sanguíneo

Na pesquisa nos esfregaços sanguíneos foram evidenciados todos os parasitas morfológicamente semelhantes aos que se pretendia detectar inicialmente. Para melhor compreensão dos resultados obtidos por observação direta ao microscópio ótico ao esfregaço sanguíneo e PCR convencional, agruparam-se os resultados obtidos por *E. canis* e *A. platys* na análise de resultados, uma vez que pertencem à família Anaplasmataceae e a cPCR permite a detecção simultânea de ambas as bactérias. Como representado no gráfico 5, nos 141 animais testados apenas foi observada *Babesia* de grandes dimensões (Figura 3) em 1,42% da amostra (2/141), num animal que se apresentou ao Hospital Veterinário com sinais clínicos e num animal era proveniente de canil. Relativamente a *Anaplasma platys*/*Ehrlichia canis* foram observados em 3,54% da amostra estudada (5/141). Destes animais apenas um animal do grupo 1 (Hospital) apresentava estruturas morfológicamente semelhantes com *A. platys* (Figura 4), 3 animais do grupo 2 (Canil) foram positivos para *A. platys* e apenas 1 foi positivo para *Ehrlichia canis* (Figura 5). *Hepatozoon* spp. foi o parasita maioritariamente encontrado, em cerca de 11,34% (16/141) das amostras, com 5 positivos no grupo 1 (Hospital) e 13 positivos no grupo 2 (Canil). Na pesquisa de *Mycoplasma* spp., 9,22% (13/141) das amostras apresentaram estruturas morfológicamente semelhantes, tendo 1 positivo pertencente ao grupo 1, e 12 positivos provenientes do grupo 2 (Figura 5). Apesar de não constar nos objetivos iniciais desta dissertação, foi ainda possível visualizar ao microscópio ótico microfírias, um caso de infeção mista, onde foi identificada a presença de *Dirofilaria immitis* por métodos sorológicos e ainda um caso de infeção única por *Acantocheilonema reconditum*.

Gráfico 5 - Distribuição de casos de animais positivos pela observação ao microscópio ótico de *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp., *Mycoplasma* spp. pelos dois grupos incluídos nesta dissertação: Grupo 1, cães apresentados à consulta com sinais clínicos compatíveis com Babesiose canina (n=48); Grupo 2, cães de canil (n=94).

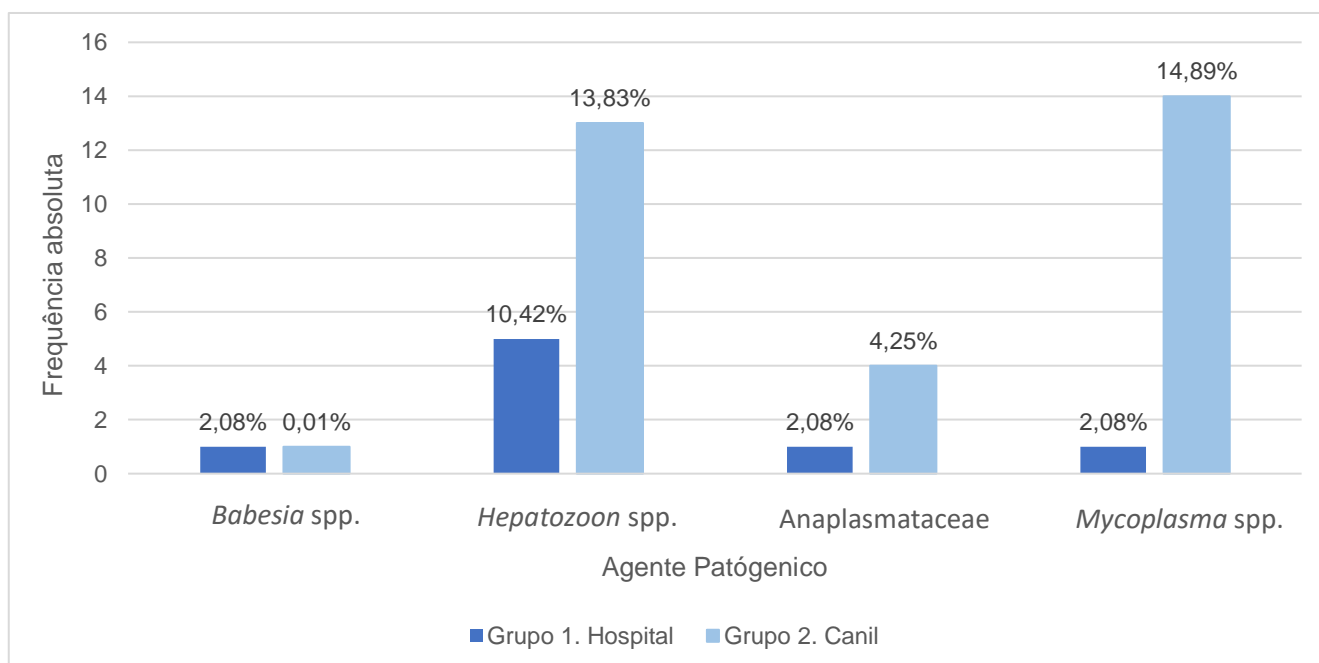


Figura 3 – Babésia de grandes dimensões - Merozítos no interior de um eritrócito, através da observação ao microscópio ótico, obj. x100, oc. x10 (Fotografia original).

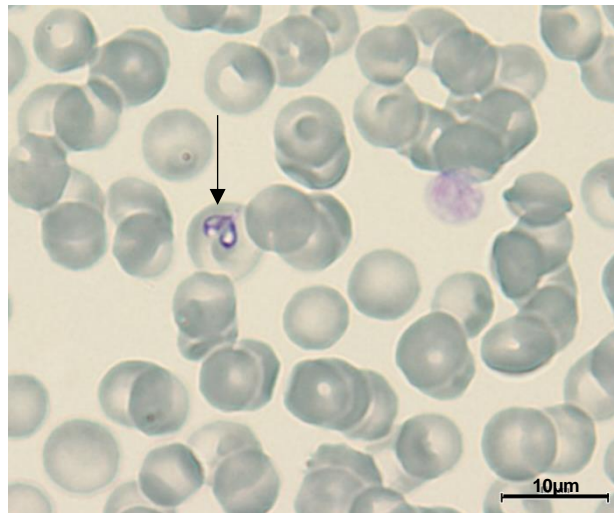


Figura 4 - *Hepatozoon* spp. no interior de um monócito (A) e uma mórula de *Anaplasma platys* numa plaqueta (B), observados ao microscópio ótico, obj. x100, oc. x10 (Fotografias originais).

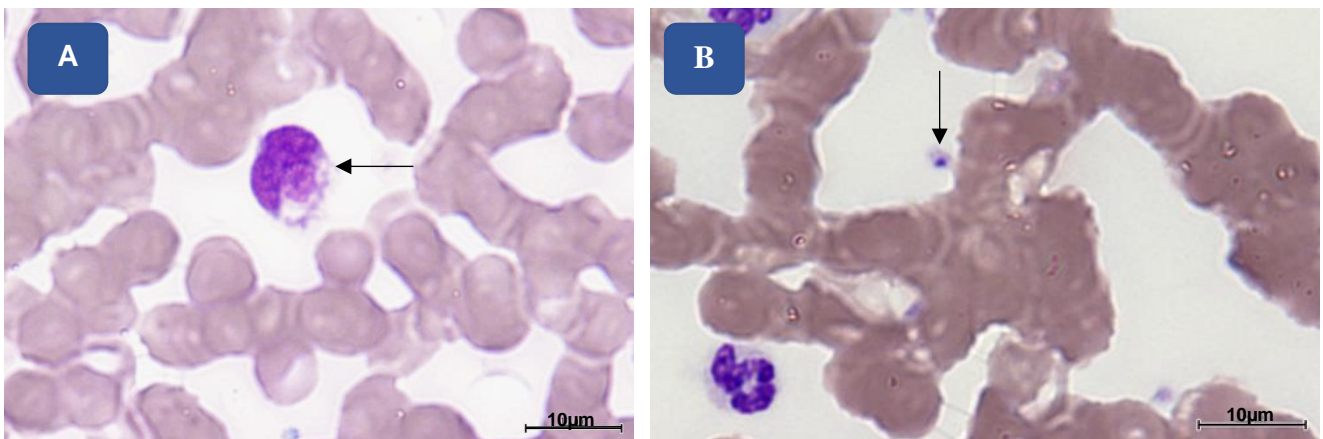
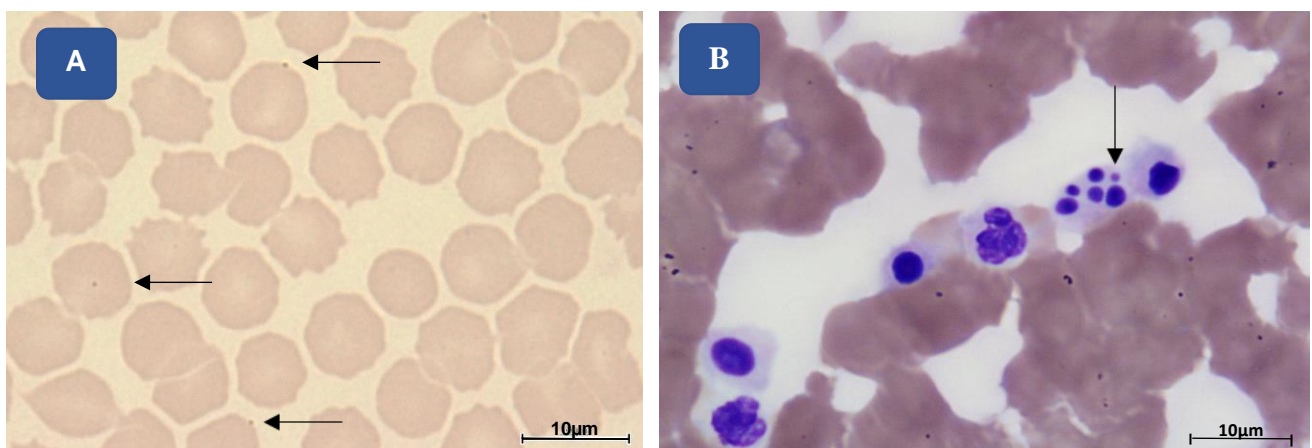


Figura 5 - *Mycoplasma* spp. na periferia de um eritrócito (A) e *Ehrlichia canis* no interior de um monócito com desfragmentação do núcleo (B), observados ao microscópio ótico, obj. x100, oc. x10 (Fotografias originais).



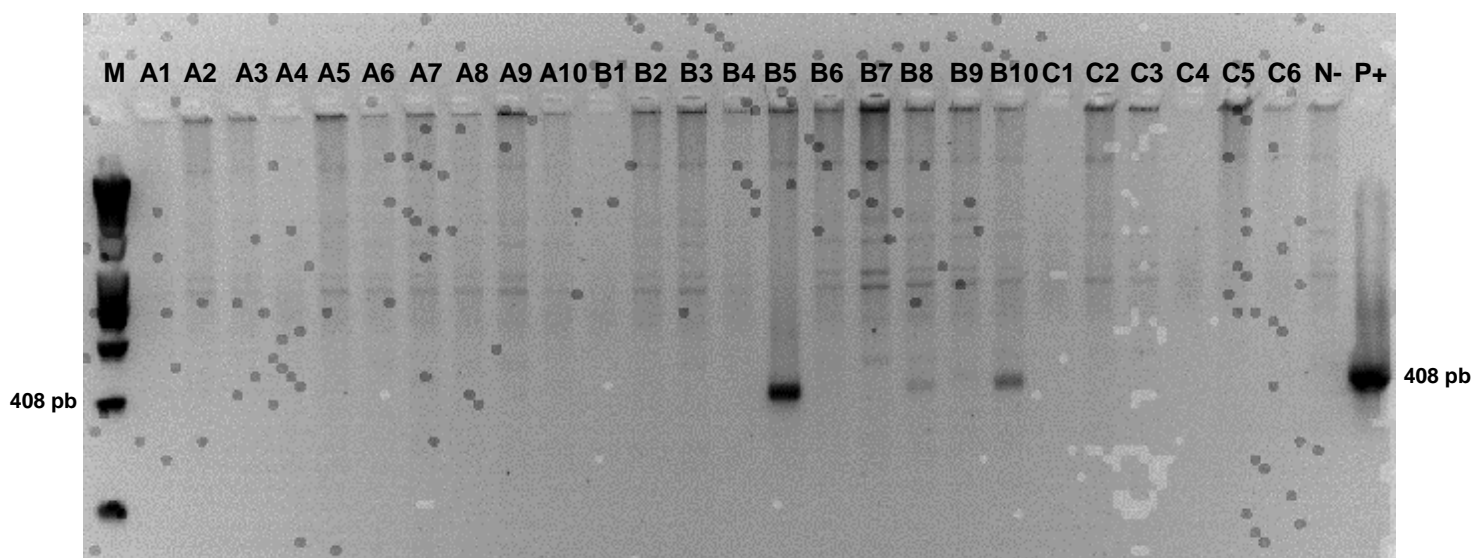
### 3.3 Detecção de DNA de *Babesia* spp por PCR convencional

#### 3.3.1 Detecção de *Babesia* spp., através da amplificação do gene 18S por PCR RFLP

No método 1, a amplificação dos ácidos nucleicos de *Babesia/Theileria* spp. por cPCR, utilizando os *primers* PIRO A e PIRO B com uma temperatura de hibridação de 60°C (Anexo V), resultou num produto de amplificação com a dimensão esperada de 408 pb (Figura 6).

Todos os resultados cuja amplificação foi negativa, ou revelaram a presença de produtos de amplificação inespecíficos, não serão mencionados por não serem considerados relevantes na argumentação deste trabalho. Apesar de duas das amostras revelarem bandas de menor intensidade, B8 e B10 como demonstrado na figura 6, estas foram consideradas igualmente como positivas no método 2. Assim todos os resultados encontrados pelo método 1 tiveram correspondência como esperado no método 2 supramencionado.

Figura 6 - Produtos de amplificação de 26 amostras (A1-A10; B1-B10 e C1-C6) por PCR convencional em gel de agarose a 1,5%. Resultado positivo para a deteção de *Babesia* spp. nas amostras B5, B8, B10 (Original).



M: marcador de pesos moleculares HyperLadder™ I DNA 200 pb-10000 pb; P+: controlo positivo; N-: controlo negativo

Após a eletroforese dos produtos de PCR submetidos a hidrolise enzimática, foi possível a interpretação dos resultados. Para tal foi necessário comparar as bandas descritas na tabela 4, que refere a ação das duas enzimas utilizadas e resultados esperados. Nas amostras A e E (Figura 7), observa-se uma banda de aproximadamente 410pb, nos dois poços, não tendo ocorrido o corte

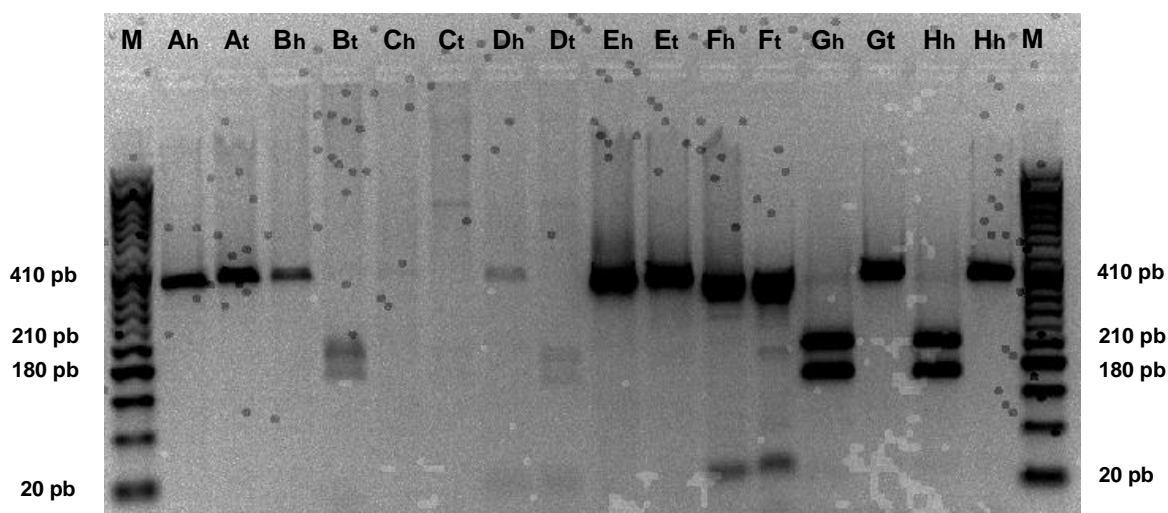
pelas enzimas, pelo que corresponde à espécie *Babesia canis*. Na amostra B e D, existe uma banda na digestão por Hinf de aproximadamente 410 pb, e três bandas pouco intensas após digestão por Taq, com aproximadamente 20, 180 e 210 pb, o que corresponde à espécie *Babesia vogeli*. Na amostra C, não houve restrição de bandas.

Tabela 4 - Discriminação das principais espécies de *Babesia* com capacidade para infetar o cão, utilizando os *primers* PIROA e PIROB e com abordagem à técnica RFLP, baseado no estudo de Carret *et al*, 1999.

Espécies de <i>Babesia</i> spp. capazes de infetar o cão		Perfil de PCR-RFLP esperado		
		Número aproximado de pares de bases		Restrição enzimática
		TaqI digestão	HinfI digestão	(+) corta, (-) não corta
Grandes dimensões	<i>B. canis</i>	410	410	Taq (-), Hinf (-)
	<i>B. vogeli</i>	20 + 180 + 210	410	Taq (+), Hinf (-)
	<i>B. rossi</i>	410	180 + 230	Taq (-), Hinf (+)
Pequenas dimensões	<i>B. gibsoni</i>	410	200 + 210	Taq (-), Hinf (+)
	<i>B. conradae</i>	440	70 + 370	Taq (-), Hinf (+)
	<i>B. microti-like</i>	50 + 390	70 + 370	Taq (+), Hinf (+)

Figura 7 - Produtos de amplificação, com utilização dos *primers* PIRO A e PIRO B, após digestão com as enzimas de restrição HingI (h) e TaqI (t) (Original). Coluna A e E: *Babesia canis*; Coluna B e D: *Babesia vogeli*; Coluna F: controlo positivo correspondente a *Babesia canis*; Coluna G e H: controlo positivo correspondente a *Babesia rossi*.

M: marcador de pesos moleculares NZDNA Ladder VI 50 pb-1500 pb

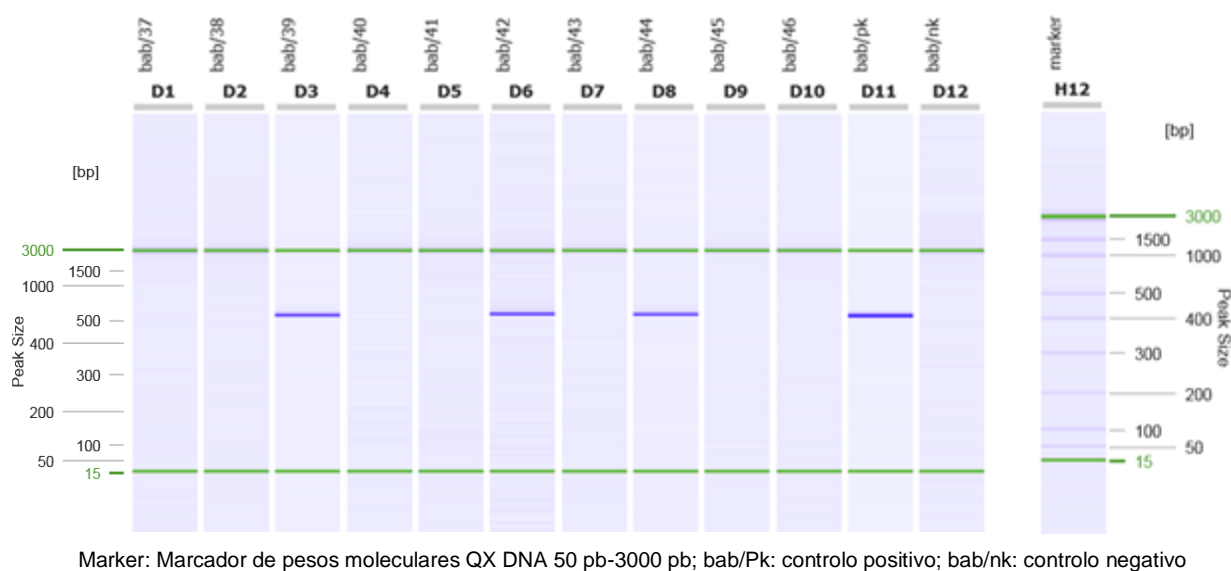


### 3.3.2 Detecção de *Babesia* spp., através da amplificação do gene 18S pelo Método 2 e sequenciação nucleotídica

No método 1, a amplificação dos ácidos nucleicos de *Babesia/Theileria* spp. por cPCR, utilizando os *primers* BabF e BabR com uma temperatura de hibridação de 53°C (Anexo III), resultou num produto de amplificação com a dimensão esperada de 550 pb (Figura 8).

Dos 5 animais positivos por PCR a *Babesia* spp, 3 eram cães de canil e 2 eram cães que foram levados à consulta do HVE, apresentando sinais clínicos compatíveis com Babesiose canina. Para um destes dois animais, pertencentes ao grupo 1, não foi possível realizar a pesquisa de possíveis agentes coinfectantes, embora tenha sido realizada a sequenciação dos produtos de cPCR.

Figura 8 - Produtos de amplificação de 10 amostras (D1-D10), através de PCR convencional por eletroforese de capilaridade da QIAEXEL (Qiagen, Hilden, Germany), utilizando o kit QIAxcel DNA *Fast Analysis*, obtida a partir do Método 2. Resultado positivo para a deteção de *Babesia* spp. nas amostras bab/39, bab/42 e bab/44 (Originais).



### 3.4 Detecção de DNA por PCR convencional de outros agentes e sequenciação nucleotídica

Na presente dissertação todos os casos, mesmo em que sequenciação não foi possível, foram incluídos no gráfico 6, de forma a avaliar apenas as espécies encontradas. Após eletroforese, em 17,14% (6/35) dos produtos de PCR considerados inicialmente como positivos para *Hepatozoon* spp. não foi possível a sua sequenciação; o mesmo ocorreu em 26,31% (5/19) dos produtos de PCR positivos para a família Anaplasmataceae e em 16,67% (3/18) dos produtos de PCR positivos para *Mycoplasma* spp.

Relativamente à deteção por cPCR, verificou-se que ocorreu um maior número de casos de infeção por *Hepatozoon* spp. com 29 (20,42%) no total da amostra. No grupo 1 (Hospital), as infeções ocorreram em 10,42% (5/48) dos animais ocorreram tanto por *Hepatozoon canis* como por *Anaplasma platys*, tendo sido os principais agentes patogénicos detetados neste grupo. Enquanto no grupo 2, constituído por cães provenientes de canil, 25,53% (24/94) encontravam-se infetados por *Hepatozoon canis*.

Figura 9 - Produtos de amplificação de 10 amostras (F9-G5), através de PCR convencional por eletroforese de capilaridade da QIAEXEL (Qiagen, Hilden, Germany), utilizando o kit QIAxcel DNA Fast Analysis, obtida a partir do Método 2. Resultado positivo para a deteção de agentes patológicos pertencentes à família Anaplasmataceae nas amostras ana/43, ana/47 e ana/49 (Original).

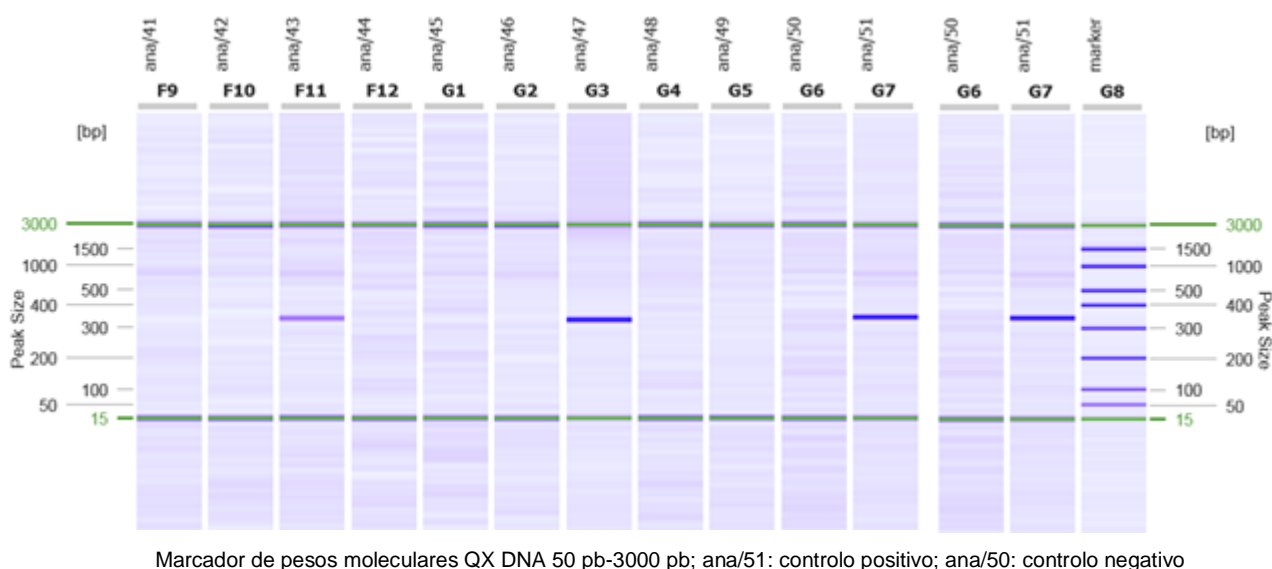
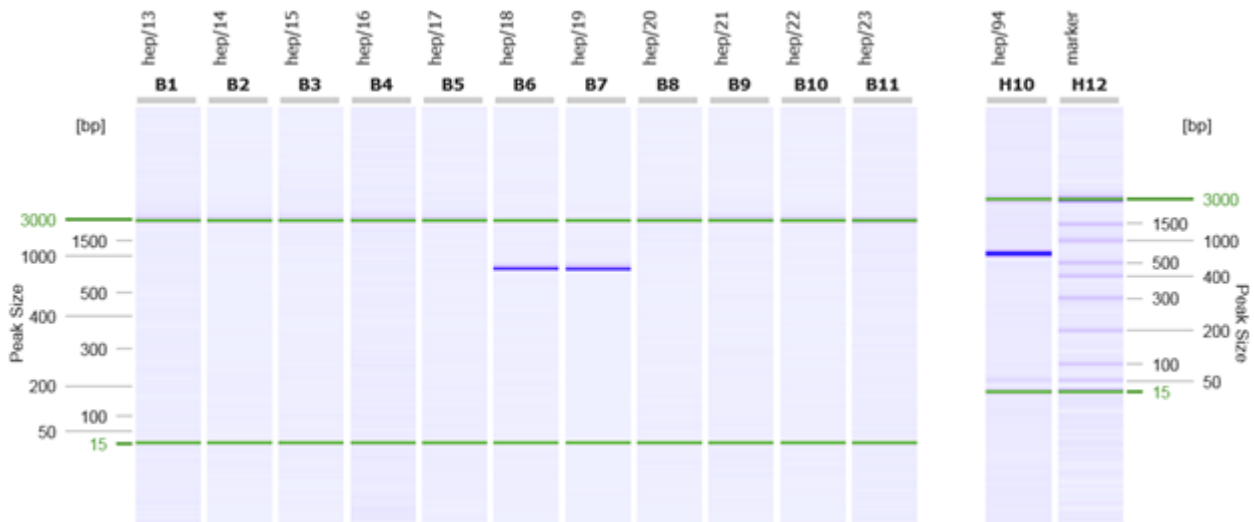


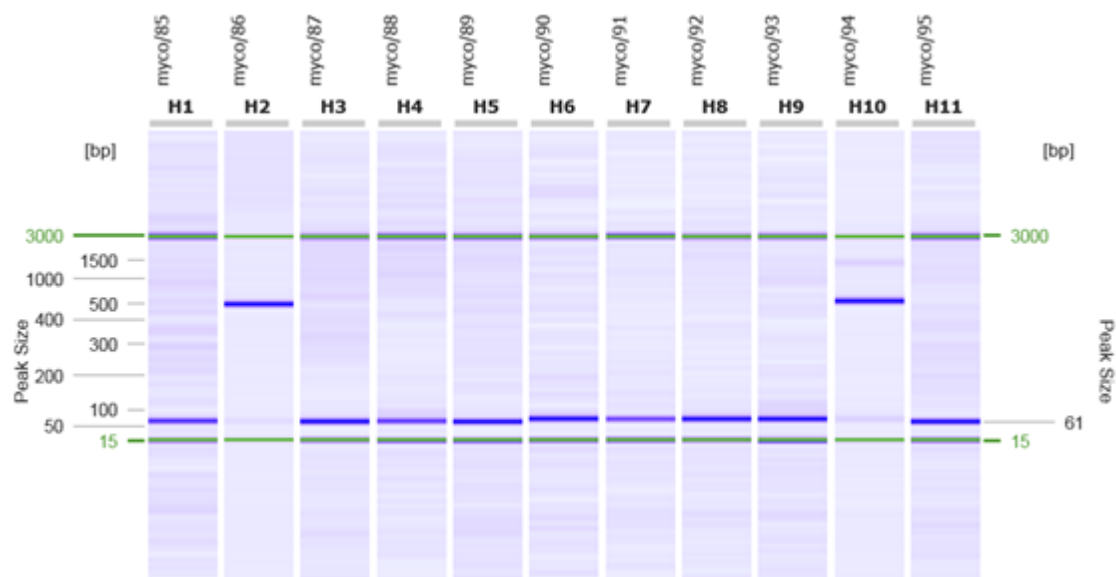


Figura 10 - Produtos de amplificação de 10 amostras (B1-B10), através de PCR convencional por eletroforese de capilaridade da QIAEXEL (Qiagen, Hilden, Germany), utilizando o kit QIAxcel DNA Fast Analysis, obtida a partir do Método 2. Resultado positivo para a detecção de parasitas do género *Hepatozoon* nas amostras hep/18 e hep/19 (Original).



Marker: Marcador de pesos moleculares QX DNA 50 pb-3000 pb; hep/23: controlo positivo; hep/94: controlo negativo

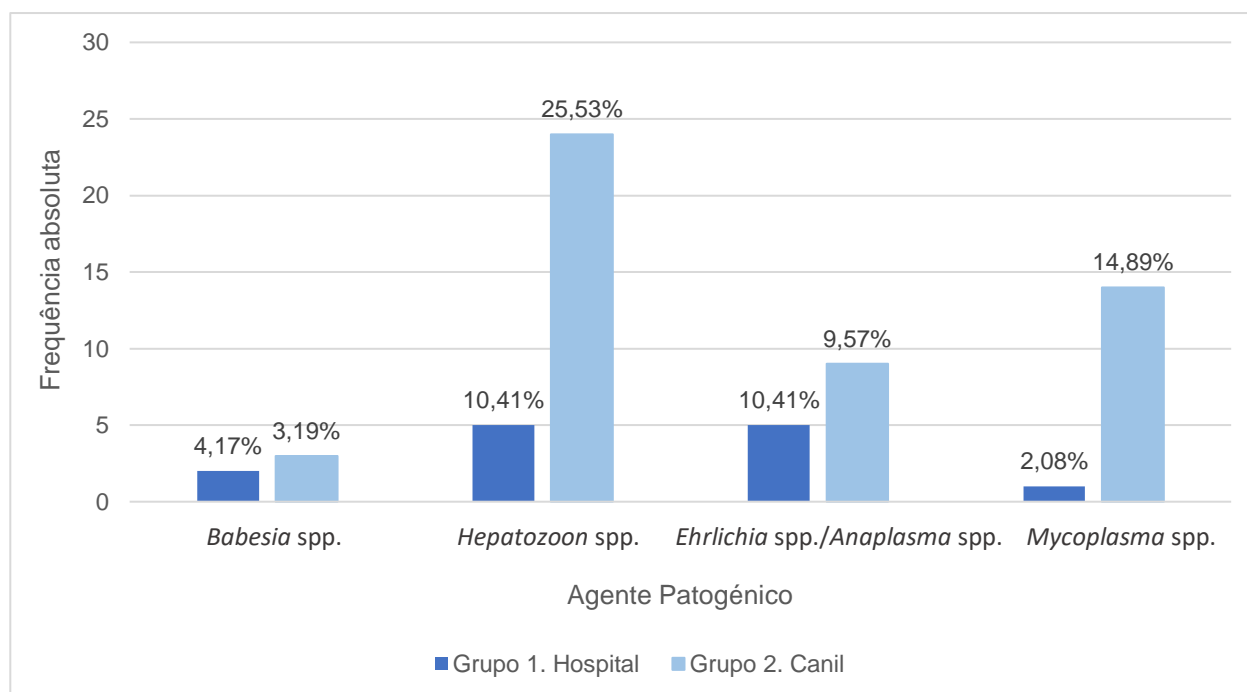
Figura 11 - Produtos de amplificação de 10 amostras (F1-F10), através de PCR convencional por eletroforese de capilaridade da QIAEXEL (Qiagen, Hilden, Germany), utilizando o kit QIAxcel DNA Fast Analysis, obtida a partir do Método 2. Resultado positivo para a detecção de agentes patológicos do género *Mycoplasma* na amostra myco/86 (Original).



Marcador de pesos moleculares QX DNA 50 pb-3000 pb; myco/94: controlo positivo; myco/95: controlo negativo



Gráfico 6 - Distribuição de casos de animais positivos por PCR convencional para *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp., *Mycoplasma* spp. pelos dois grupos incluídos nesta dissertação: Grupo 1, cães apresentados à consulta com sinais clínicos compatíveis com Babesiose canina (n=48) e Grupo 2, cães de canil (n=94)



Após a sequenciação de produtos de cPCR foi possível verificar as espécies envolvidas nas infeções causadas por um único agente patogénico, representando 24,64% da amostra total, e 9,5% em coinfeções. Uma vez que foi realizado uma cPCR para deteção de agentes pertencentes à família Anaplasmataceae, os produtos de PCR foram enviados para sequenciação, sendo possível distinguir o género e espécies envolvidas nas amostras positivas. Uma das espécies detetadas, num animal onde foi identificada anteriormente *Dirofilaria immitis*, foi *Wolbachia pipiens*. Apesar de não estar incluído nos objetivos da presente dissertação, é um dado clínico relevante, na medida em que pertencia ao grupo 1 de cães provenientes do HEV e seria espectável encontrar a bactéria associada a esta infeção, devido à sua associação de simbiose.

Na presente dissertação não foram detetadas coinfeções com *Babesia* spp., no entanto foram detetadas coinfeções entre outros agentes patogénicos, demonstradas na tabela 5. Apenas um animal do grupo 1, que se apresentou à consulta no HEV, apresentou uma coinfeção, enquanto as restantes foram detetadas no grupo 2. Neste animal coinfetado do grupo 1, foi detetado *Hepatozoon canis* e *Anaplasma platys*, e apresentou-se à consulta com história de prostração, anorexia, fraqueza dos membros posteriores; teve como alterações hematológicas e clínicas anemia (hematócrito - 18,1% de HT), trombocitopenia (contagem de plaquetas -  $8,64 \times 10^3$ );

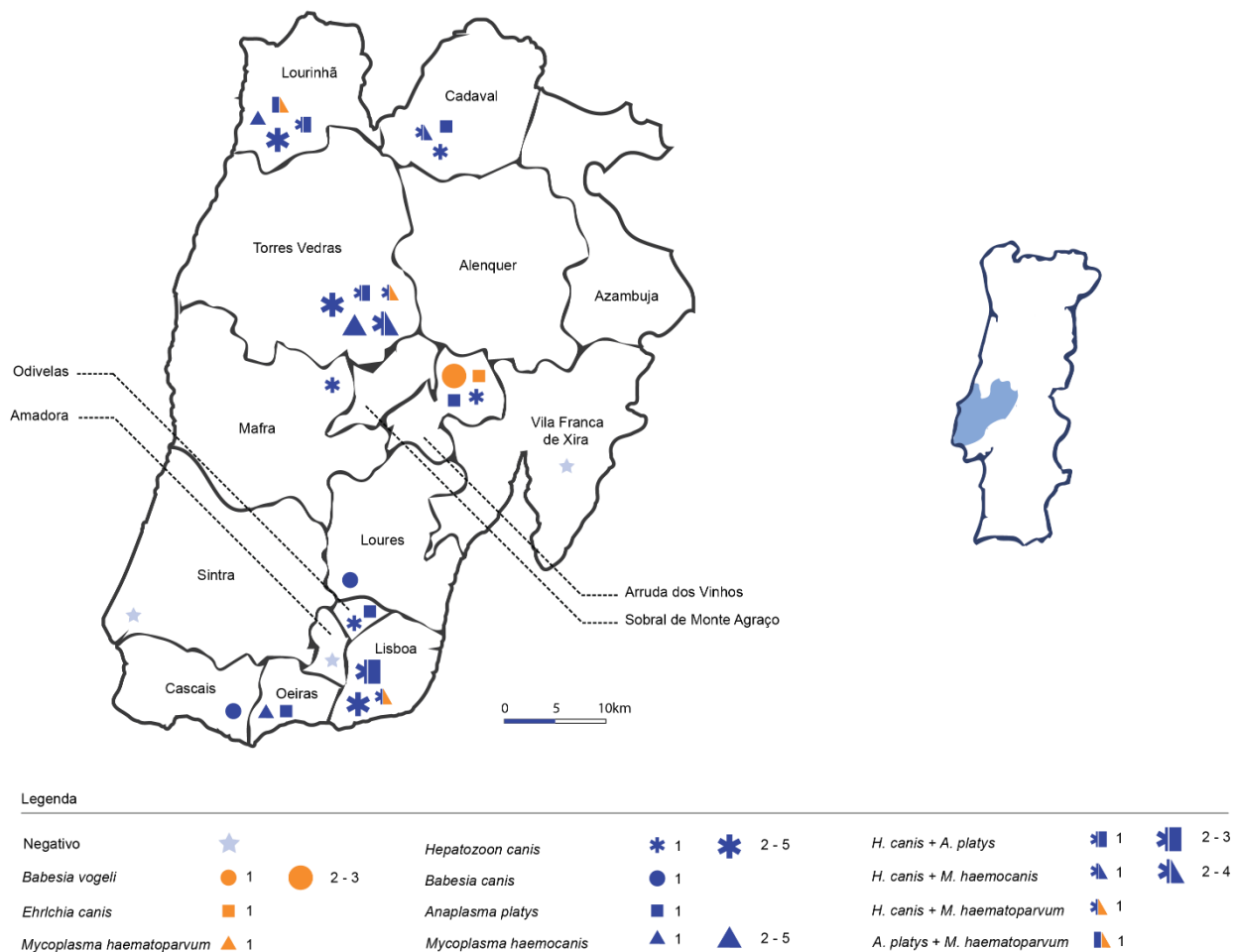
esplenomegalia e hepatomegalia na ecografia abdominal. A espécie *Mycoplasma haematoparvum* foi detetada apenas em circunstância de coinfeção outros agentes patogénicos, nomeadamente com *Anaplasma platys* e *Hepatozoon canis*.

Tabela 5 - Infeções únicas e coinfeções observadas através da deteção por métodos moleculares e frequência absoluta de animais coinfectados, por espécie, na amostra de 142 cães domésticos.

<b>Agentes patogénicos</b>	<b>Nº de casos (%)</b>
<b>Infeções únicas</b>	35 (24,64%)
<i>Babesia vogeli</i>	4 (2,81%)
<i>Babesia canis</i>	2 (1,40%)
<i>Hepatozoon canis</i>	17 (11,97%)
<i>Mycoplasma haemocanis</i>	7 (4,93%)
<i>Anaplasma platys</i>	4 (2,82%)
<i>Ehrlichia canis</i>	1 (0,70%)
<b>Coinfeções</b>	13 (9,15%)
<i>Hepatozoon canis</i> + <i>Anaplasma platys</i>	5 (3,52%)
<i>Hepatozoon canis</i> + <i>Mycoplasma haemocanis</i>	5 (3,52%)
<i>Hepatozoon canis</i> + <i>Mycoplasma haematoparvum</i>	2 (1,41%)
<i>Anaplasma platys</i> + <i>Mycoplasma haematoparvum</i>	1 (0,70%)

Para representar geograficamente a ocorrência dos casos de forma geográfica foi realizado um mapa, que contém a distribuição dos mesmos por concelhos do Distrito de Lisboa. Foi ainda detetada *B. vogeli* num cão que compareceu à consulta no HVE, e que vivia no concelho do Barreiro, pertencente ao distrito de Setúbal. No entanto foi o único animal em que não foi possível realizar cPCR para deteção de outros agentes patogénicos, pelo que não se encontra representado no mapa.

Figura 12 - Distribuição geográfica dos agentes patogénicos transmitidos por Ixodídeos, detetados por PCR em amostras sanguíneas de animais provenientes de diferentes concelhos, do distrito de Lisboa (Original Dordio & Lopo, 2017).



É possível constatar na Figura 12 que a maioria das infeções ocorreu no Oeste, comparativamente à Área Metropolitana de Lisboa. Ao avaliar a distribuição de infeções detetadas por PCR convencional e posterior sequenciação, verifica-se que as infeções por *Hepatozoon canis* ocorrem em todos os concelhos do distrito de Lisboa, com a exceção do concelho da Amadora onde não foi detetado nenhum agente patogénico em estudo.

Na amostra pertencente ao grupo 2, constituído por 94 cães, residentes em canis municipais e associações de proteção animal existentes no distrito de Lisboa, obteve-se uma prevalência de infeção neste grupo de 39,36% (37/94) [IC 95%: 30,09-40,47%], das quais 26,60% (25/94) [IC 95%: 18,71-36,32%] dos animais apresentavam infeções únicas e 12,77% (12/94) [IC 95%: 7,46-21%] dos animais do grupo 2 apresentavam coinfeções. Tendo em conta as dimensões e afluência de animais ao Canil Municipal de Torres Vedras e à Casa dos Animais de Lisboa, estes dois concelhos

tiveram consequentemente um maior número de amostras. A prevalência de infeções encontradas em Lisboa e Torres Vedras, foram de 19,23% (5/26) [IC 95%: 8,51-37,88%] e 48,48% (16/33) [IC 95%: 32,50-64,78%], respetivamente. Ao realizar o Teste Z para comparação de duas proporções, verifica-se um valor de  $z$  igual a 2,3 e um valor de  $p$  igual a 0.0198, pelo que a diferença estatística destas prevalências é significativa. O canil com uma maior prevalência de infeções de 85,71% (6/7) [IC 95%: 48,69-97,43%] foi o canil municipal de Arruda dos Vinhos, onde a prevalência de infeção causada por *Babesia vogeli* foi maior que os restantes agentes patogénicos estudados, com cerca de 42,85% (3/7) [IC 95%: 15,82-74,95%]. No canil da Lourinhã obteve-se uma prevalência de 36,36% (4/11) [IC 95%: 15,17-64,62%]; enquanto para os restantes canis com um menor número de amostra, como Cadaval e Odivelas, obteve-se uma prevalência de 42,86% (3/7) [IC 95%: 15,82-74,95%] e 50% (2/4) [IC 95%: 15-85%], respetivamente. A prevalência encontrada em cada um dos concelhos para cada agente está representada na tabela 6.

Tabela 6 - Distribuição das infeções detetadas por PCR convencional e posterior sequenciação, no grupo 2, constituído por cães provenientes de canis municipais ou associações de proteção animal, em diferentes concelhos pertencentes ao distrito de Lisboa (n=94).

Concelho	Nº de animais (n)	Infeções únicas				Coinfeções			
		<i>Babesia vogeli</i>	<i>Hepatozoon canis</i>	<i>Mycoplasma haemocanis</i>	<i>Anaplasma platys/E. canis</i>	<i>A. platys</i> + <i>H. canis</i>	<i>A. platys</i> + <i>M. haematoparvum</i>	<i>H. canis</i> + <i>M. haemocanis</i>	<i>H. canis</i> + <i>M. haematoparvum</i>
Torres Vedras	33	-	5 (15,1%)	5 (15,1%)	-	1 (3,0%)	-	4 (12,1%)	1 (3,0%)
Lisboa	26	-	2 (7,7%)	-	-	2 (7,7%)	1 (3,9%)	-	-
Lourinhã	11	-	3 (27,3%)	1 (9,1%)	-	1 (9,1%)	-	-	1 (9,1%)
Arruda dos Vinhos	7	3 (42,9%)	1 (14,3%)	-	2 (28,6%)	-	-	-	-
Cadaval	7	-	1 (14,3%)	-	1 (14,3%)	-	-	1 (14,3%)	-
Amadora	6	-	-	-	-	-	-	-	-
Odivelas	4	-	1 (25%)	-	1 (25%)	-	-	-	-
	94	3 (3,19%)	13 (13,9%)	6 (6,4%)	4 (4,25%)	4 (4,25%)	1 (1,06%)	5 (5,3%)	2 (2,1%)

### 3.5 Descrição dos resultados sorológicos, moleculares e por observação direta de parasitas utilizados neste estudo

Na presente dissertação, no grupo 1 foi recolhida informação relativa aos métodos sorológicos realizados em alguns cães, em que se suspeitava encontrarem-se doentes com Babesiose canina. No método sorológico vulgarmente utilizado em Lisboa para descartar a designada “Febre da carraça” é realizada uma análise imunológica/ perfil de hemoparasitas que corresponde à pesquisa de anticorpos: anti-*Babesia*, anti-*Ehrlichia* e anti-*Rickettsia*. Estes dados foram recolhidos através da ficha clínica do animal e realizados por um laboratório externo certificado, *DNATech*, num total de 26 animais pertencentes ao grupo 1. No diagnóstico de infeção por *Babesia spp.* os resultados

obtidos, tanto por métodos sorológicos como por métodos moleculares, foram descritos sob a forma de tabela (Tabela 7). Os valores foram considerados positivos para uma titulação de 1/32. Para a detecção de anticorpos de *Ehrlichia canis*, é realizada ELISA enquanto método sorológico de eleição, com uma titulação de anticorpos de 1/50. Dos 26 casos onde foi realizada ELISA, apenas 5 foram positivos mas em nenhum destes foi detetada *Ehrlichia* spp. no PCR convencional. Uma vez que ocorreu uma discrepância significativa nos resultados obtidos por cPCR para *Hepatozoon* spp. com os resultados por observação direta ao MO, foi realizada a tabela 9 de comparação dos mesmos.

Tabela 7 – Utilização de IFI e de cPCR no diagnóstico de infecção por *Babesia* spp.

		Resultado obtido por IFI para <i>Babesia</i> spp.	
		Negativo (n=13)	Positivo (n=13)
Detecção de <i>Babesia</i> spp. por PCR convencional	Negativo (n=25)	12	13
	Positivo (n=1)	1	0

n representa o número de animais

Tabela 8 - Comparação dos resultados obtidos através da observação direta de *Babesia* spp. em esfregaços sanguíneos com os obtidos por PCR convencional para *Babesia* spp.

		Observação direta de <i>Babesia</i> spp. ao Microscópio ótico	
		Negativo (n=141)	Positivo (n=2)
Detecção de <i>Babesia</i> spp. por PCR convencional	Negativo (n=139)	139	0
	Positivo (n=4)	2	2

n representa o número de animais

Tabela 9 - Comparação dos resultados obtidos através da observação direta de *Hepatozoon* spp. em esfregaços sanguíneos com os obtidos por PCR convencional para *Hepatozoon* spp.

		Observação direta de <i>Hepatozoon</i> spp. ao Microscópio ótico	
		Negativo (n=125)	Positivo (n=16)
Detecção de <i>Hepatozoon</i> spp. por PCR convencional	Negativo (n=112)	111	1
	Positivo (n=29)	14	15

n representa o número de animais

As infecções por *Babesia* spp., detetadas na PCR convencional pelo método 1, foram 100% (5/5) detetadas através do PCR convencional método 2. No diagnóstico de infecção por *Babesia* spp., 13 dos resultados positivos na IFI corresponderam a um resultado negativo, tanto no PCR convencional como na observação direta ao Microscópio ótico, enquanto 1 dos resultados positivos no PCR e na observação direta ao MO correspondeu a um resultado negativo na IFI. A concordância destes métodos de diagnóstico não foi avaliada, uma vez o método serológico apenas deteta anticorpos contra o agente.

Para o diagnóstico de infecção por *Babesia* spp. entre os resultados do PCR convencional e da observação direta obteve-se uma boa concordância substancial ( $\kappa = 0,66$ ). Para a detecção da espécie *Hepatozoon* através do método molecular e a observação ao microscópio ótico, obteve-se igualmente uma concordância considerável ( $\kappa = 0,61$ ). Apesar de não estarem representados os resultados para *A. platys*, devido ao reduzido número de casos, obteve-se uma concordância moderada ( $\kappa = 0,43$ ), entre a observação de esfregaços sanguíneos ao MO e o método molecular utilizado.

### **3.7 Manifestações clínicas encontradas no primeiro grupo (Hospital)**

No primeiro grupo, constituído por cães apresentados à consulta no Hospital Escolar Veterinário, foram detetadas 3 infecções por *Babesia* spp., que por sequenciação foram identificadas as espécies *Babesia canis* em 2 casos e *Babesia vogeli* num único caso. Neste último não foi possível identificar a existência de coinfeções anteriormente mencionadas, no entanto foi considerado relevante inserir o caso neste estudo. Em ambos os casos de *Babesia canis* os principais problemas foram prostração e anorexia, e as principais alterações hematológicas, descritas na tabela 10, foram linfopenia e trombocitopenia, esta última confirmada por contagem manual de plaquetas. No terceiro caso, com infecção causada por *Babesia vogeli*, para além dos problemas descritos observou-se também vômito e hipertermia, bem como anemia moderada (HT=21,2%). Todos os casos tiveram uma melhoria da resposta clínica após a administração de dipropionato de imidocarb (Tabela 11). Tendo em conta que foi detetada infecção associada a sinais clínicos característicos de Babesiose, é possível afirmar que os 3 animais padeciam desta doença.

Tabela 10 – Hemograma completo dos 3 casos clínicos, pertencentes ao grupo 1, que se apresentaram à consulta no HEV, com um quadro clínico compatível com Babesiose Clínica e onde foi detetada infecção por *Babesia* spp..

Parâmetros Hematológicos	Valores de referência	Bonnie*	Samanta*	Minni
Leucócitos	6-17 x 10 <sup>3</sup> /µL	6,53	6,18	7,42
Neutrófilos (segmentados)	3000-11500/µL	5289	5562	6233
Linfócitos	1000-4800/µL	784	371	742
Monócitos	150-1350/µL	457	247	445
Eosinófilos	100-1250/µL	0	0	0
Basófilos	Raros	0	0	0
Eritrócitos	5,5-8,5 x 10 <sup>6</sup> /mL	6,70	3,11	6,45
Plaquetas	200-500 x 10 <sup>3</sup> /µL	189	325	18
Hemoglobina	12/28 g/dl	16,50	6,93	21,2
Hematócrito	37-55%	47	21,2	42,1
VCM	60-77fl	70,1	68,2	65,3
HCM	19,5-24,4 pg	24,6	22,3	24
CHCM	32-36 d/dl	35	32,7	36,8

(\*): Anisocitose e policromasia

Tabela 11 - Dados, manifestações clínicas e resposta ao tratamento nos cães com Babesiose Canina.

Caso Clínico	Agentes	Género	Raça	Sinais Clínicos	Temperatura (°C)	Mês	Resposta clínica ao tratamento com dipropionato de imidocarb
A	<i>Babesia canis</i>	Fêmea Inteira	Indeterminada	Prostração Anorexia	38,6	Abril	Recuperada
B	<i>Babesia canis</i>	Fêmea Inteira	Indeterminada	Prostração Anorexia	39,7	Janeiro	Recuperada
C	<i>Babesia vogeli</i>	Fêmea Inteira	Labrador Retriever	Prostração Anorexia Vômito Esplenomegália	40,5	Maior	Recuperada

No Hospital Veterinário escolar, onde foram recolhidas amostras provenientes de 48 animais com sinais clínicos compatíveis com Doenças transmitidas por ixodídeos, foi apenas detetada infecção por estes agentes em 20,83% (10/48) dos cães. Destes 10 animais, 4 encontravam-se infetados unicamente com *Hepatozoon* spp. e os sinais mais comuns foram: prostração, anorexia e palidez

das mucosas, representados na tabela 12. Nas alterações hematológicas associadas a estes casos, as mais comuns foram anemia (3/4) e leucocitose (2/4), tabela 13. A leucocitose apresentada no caso 3 ( $44 \times 10^3/\text{ml}$ ), era caracterizada por uma neutrófilia ( $31932 \times 10^3/\text{ml}$  neutrófilos segmentados e  $1331 \times 10^3/\text{ml}$  neutrófilos não segmentados), linfocitose ( $5322 \times 10^3/\text{ml}$ ) e eosinofilia ( $2218 \times 10^3/\text{ml}$ ); enquanto no caso 4 era caracterizada apenas por neutrófilia ( $15900 \times 10^3/\text{ml}$  neutrófilos segmentados). Ocorreu ainda uma infecção por *Mycoplasma haemocanis*, cujos sinais clínicos foram prostração e anorexia e não apresentou qualquer alteração hematológica. A infecção por *Anaplasma platys* foi detetada igualmente em apenas um animal que apresentava como sinais clínicos: prostração, anorexia, palidez das mucosas, hipertermia ( $39,8^\circ\text{C}$ ), eritema e edema dos membros posteriores, como demonstrada na figura 13. Este último quadro clínico seria compatível com Anaplasmose Trombocítica Canina, uma vez que apresentou ainda como alterações clínicas trombocitopenia grave ( $98 \times 10^3/\text{ml}$ ) e leucocitose ( $24,25 \times 10^3/\text{ml}$ ). A manifestação clínica de trombocitopenia grave, foi também verificada no caso de coinfeção com *Anaplasma platys* e *Hepatozoon canis* para além de doença renal crónica concomitante. Nas infeções por *Hepatozoon canis* as alterações hematológicas mais encontradas foram a anemia (4/5), e leucocitose (2/5).

Tabela 12 - Presença de sinais clínicos apresentados em animais infetados por agentes transmitidos por ixodídeos, pertencentes ao grupo 1.

Agente Patogénico	Sinais Clínicos							
	Prostração	Anorexia	Vómito	Palidez das mucosas	Hipertermia ( $> 39^\circ\text{C}$ )	Hemorragias	Esplenomegalia	Alterações musculoesqueléticas
<i>Hepatozoon canis</i> Caso 1	-	-	-	+	-	Epistaxis	n.a	-
<i>Hepatozoon canis</i> Caso 2	+	-	-	-	+	-	-	Tetraparesia
<i>Hepatozoon canis</i> Caso 3	-	+	+	+	-	-	n.a	-
<i>Hepatozoon canis</i> Caso 4	+	+	-	-	-	-	n.a	-
<i>Mycoplasma haemocanis</i>	+	+	-	-	-	-	n.a	-
<i>Anaplasma platys</i>	+	+	-	+	+	Eritema	-	-
<i>Hepatozoon canis</i> + <i>Anaplasma platys</i>	-	+	-	+	-	-	+	Fraqueza dos membros posteriores

( - ) : não encontrado, ( + ) : presente, n.a: não aplicável



Tabela 13 - Alterações hematológicas apresentadas em animais infetados por agentes transmitidos por ixodídeos, pertencentes ao grupo 1.

Agente Patogénico	Alterações hematológicas			
	Plaquetas	Hematócrito	Leucócitos	
	Trombocitopenia <200 x 10 <sup>3</sup> / ml	Anemia HT <37%	Leucocitose >17 x 10 <sup>3</sup> / ml	Leucopenia <6 x 10 <sup>3</sup> / ml
<i>Hepatozoon canis</i> Caso 1	-	33,3	-	-
<i>Hepatozoon canis</i> Caso 2	-	23,9	-	-
<i>Hepatozoon canis</i> Caso 3	-	36,7	44,35	-
<i>Hepatozoon canis</i> Caso 4	-	-	21,60	-
<i>Mycoplasma haemocanis</i>	-	-	-	-
<i>Anaplasma platys</i>	98	-	24,25	-
<i>Hepatozoon canis</i> + <i>Anaplasma platys</i>	8,64	18	-	-

( - ): valores normais

Figura 13 - Animal em internamento, no Hospital Escolar Veterinário, infetado com *Anaplasma platys* e apresentado à consulta com sinais compatíveis com Anaplasmosse trombocítica canina (Originais).

A – Animal Internado com presença de equimoses em ambos os membros posteriores; B – Destaque do membro posterior esquerdo que foi previamente tosquiado e delimitado a marcador a região afetada com equimoses, de forma a avaliar a evolução das mesmas.



### 3.8 Manifestações clínicas encontradas no segundo grupo (Canil)

Apesar de terem sido registadas todas as alterações clínicas encontradas nos animais provenientes do canil, as manifestações clínicas que consideramos mais objetivas e relevantes para o estudo foram: Hipertermia, quando a temperatura rectal excedeu os 39°C e presença de anemia, quando o microhematócrito realizado foi inferior a 37%. No caso das infeções únicas, provocadas por *Hepatozoon canis* 38,46% dos animais infetados manifestou hipertermia e 30,77% manifestou anemia. Esta última alteração hematológica foi igualmente verificada em 3 dos 4 casos de infeção por *Hepatozoon canis* nos animais do grupo 1, que compareceram à consulta. Curiosamente, a alteração hematológica de anemia não foi encontrada em nenhuma das coinfeções e a hipertermia foi verificada apenas num animal com coinfeção por *Hepatozoon canis* e *Anaplasma platys*.

Tabela 14 - Manifestações clínicas encontradas em animais, provenientes de canis, com infeções únicas ou coinfeções.

Agente patogénico	Manifestações clínicas	
	Hipertermia T >39°C	Anemia HT < 37%
<b>Infeção única</b>		
<i>Hepatozoon canis</i>	5/13	4/13
<i>Mycoplasma haemocanis</i>	1/6	1/6
<i>Babesia vogeli</i>	1/3	0/3
<i>Anaplasma platys</i>	1/3	1/3
<i>Ehrlichia canis</i>	1/1	0/1
<b>Coinfeção</b>		
<i>Hepatozoon canis</i> + <i>Mycoplasma haemocanis</i>	0/5	0/5
<i>Hepatozoon canis</i> + <i>Anaplasma platys</i>	1/4	0/4
<i>Hepatozoon canis</i> + <i>Mycoplasma haematoparvum</i>	0/2	0/2
<i>Anaplasma platys</i> + <i>Mycoplasma haematoparvum</i>	1/1	0/1

#### 4. Discussão

Este estudo teve como objetivo a deteção de *Babesia* spp. e possíveis agentes de coinfeção em cães residentes na área metropolitana de Lisboa e Oeste. Para tal foi analisada uma amostra de 143 cães, que pertenciam a dois grupos distintos: 94 cães provenientes de canis, aparentemente saudáveis e outro de 43 cães apresentados à consulta veterinária com sinais compatíveis com Babesiose canina. Destes, 35 animais (24,64%) encontravam-se infetados por um único agente e 13 animais (9,15%) apresentavam uma coinfeção. Uma vez que não foi possível realizar um exame físico rigoroso e hemograma completo aos animais do grupo 2 (Canil), o presente estudo não foi designado formalmente para a descrição de sinais e manifestações clínicas dos animais, nem para a avaliação de fatores gerais e específicos. No entanto, a interpretação das informações recolhidas levou-nos a considerar que poderia ser interessante referir as apresentações clínicas para cada agente patogénico encontrado. A criação de dois grupos distintos adveio em obter, por um lado uma população com sinais compatíveis com Babesiose canina, e por outro, uma população aparentemente saudável e assintomática, de forma a ter uma ideia mais aprofundada sobre a infeção por *Babesia* spp. e possíveis agentes coinfetantes na área de estudo.

É importante referir que os dados recolhidos, através do inquérito individual para os tutores dos animais e para o Médico veterinário responsável pelo canil, devem ser encarados apenas como caracterização da amostra obtida, mas a sua discussão é importante para a compreensão da mesma, a perceção da exposição aos vetores, e a outras formas de transmissão dos agentes em estudo.

A amostra total de 143 cães, obtida durante o período de estudo, incluiu cães com idades compreendidas entre os 18 meses e os 16 anos de idade, sendo que todos os cães já tinham atingido um ano de idade (81,12%). Relativamente ao sexo verificou-se uma diferença maior entre a proporção de fêmeas ovariectomizadas (41%) comparativamente aos machos orquiectomizados (21,84%). Apesar de o número total de machos e fêmeas presentes no HEV não ter sido estabelecido, é possível que a maior predominância de animais do sexo masculino seja justificada pelo facto de estes se encontrarem em maior número na população. Em relação à raça, a maioria dos cães não tinha uma raça definida, o que pode relacionar-se com o facto de a maioria da amostra ser constituída por animais provenientes do canil (65,43%), onde por vezes a política instituída é apenas a recolha de cães da rua. A atual preocupação com o realojamento e adoção destes cães, especialmente nas grandes cidades, poderá contribuir para serem igualmente encontrados animais com raça indeterminada no grupo 1.

Na amostra do estudo apenas um cão, pertencente ao grupo 1 (Hospital), apresentava uma vacinação completa contra piroplasmose, especificamente com a Pirodog®. Este animal residia em Santarém e a vacinação é importante neste caso, tendo em conta que o animal tinha história de

deslocações para o Norte de Portugal, onde este agente patogénico é endémico. Devido às diferenças antigénicas entre espécies e a inexistência de proteção cruzada, esta vacina apenas atua contra infeção por *Babesia canis*. A vacinação com Novibac<sup>®</sup> Piro, uma vez que é uma vacina bivalente contra estirpes heterólogas de *B. canis* e *B. rossi*, faz especial sentido ser administrada em Portugal apenas para os cães que vão viajar para o continente africano, onde foi identificada a espécie *B. rossi*.

Embora tenha sido recolhida a informação relativa aos princípios ativos utilizados nos animais em estudo, não foi possível averiguar a eficácia dos mesmos para a prevenção dos agentes patogénicos estudados. Isto porque, após a realização dos inquéritos, foi verificado que tanto os tutores como o técnico ou Médico Veterinário responsável pelo canil, variam a escolha do princípio ativo consoante a disponibilidade no mercado e a sua condição económica. Assim, tendo em conta a importância da prevenção de agentes transmitidos por ixodídeos, foi avaliada a desparasitação externa do animal enquanto “regular” ou “não regular”. Relativamente a estes regimes, foi concluído através do inquérito realizado, que 65,31% dos animais se encontravam desparasitados externamente de forma regular, enquanto 34,69% dos tutores responderam que não realizavam qualquer desparasitação externa ou não a realizavam de forma regular. Esta aplicação irregular de acaricidas por parte dos donos deve-se ao facto de aplicarem a medida preventiva apenas quando observam ixodídeos ou no período de verão, consoante a sua disponibilidade económica e tendo em conta o desconhecimento da importância e da correta aplicação dos mesmos. Sendo assim um dos papéis fundamentais do Médico Veterinário informar e aconselhar corretamente os proprietários relativamente à importância da prevenção, e aconselhar uma junção de medidas preventivas e princípios ativos/produtos comerciais mais adequados para a área em que o animal é residente ou vai viajar de forma a evitar o desenvolvimento de resistências.

Os esfregaços sanguíneos são um método de diagnóstico económico e de rápida execução, realizados na presente dissertação, no entanto podem originar falsos positivos, em especial nas infeções por espécies de *Babesia* de grandes dimensões e nas infeções subclínicas e crónicas, quando a parasitémia é baixa e intermitente (Irwin, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2016). Neste estudo 4 animais foram positivos na PCR convencional e foram identificados por sequenciação como espécies de Babesias de grandes dimensões, no entanto apenas em 2 destes animais os piroplasmas foram observados microscopicamente. O falso negativo através da observação direta do esfregaço sanguíneo, poderá ser explicado pelo facto de estes animais do segundo grupo, provenientes do canil, terem desenvolvido uma infeção subclínica ou crónica ou ainda pelo facto de o sangue ter sido colhido de uma veia periférica. Como já foi referido, nestes casos é pertinente a recolha de sangue em capilares sanguíneos, de forma a obter um maior número de eritrócitos infetados. Para o diagnóstico de infeção por *Babesia* spp. entre os resultados do PCR convencional e da observação direta obteve-se uma concordância substancial ( $\kappa = 0,66$ ). Estudos anteriores

verificaram uma sensibilidade relativa de 38% e uma especificidade relativa de 99% para o diagnóstico por observação ao MO, e com uma concordância moderada ( $kappa=0,54$ ) entre ambos os métodos, com a utilização de diferentes protocolos moleculares (Pantchev *et al.*, 2015).

A grande diferença entre animais positivos na PCR convencional e a sua observação ao microscópio ótico foi verificada principalmente no agente patogénico *Hepatozoon canis*, mais tarde identificada a espécie por sequenciação. Dos 29 animais positivos na análise molecular, apenas em 15 foram observados gametócitos através do MO em esfregaços sanguíneos, demonstrando que esta última técnica é pouco sensível para a deteção. Isto pode ser explicado pelo facto de a parasitémia deste agente ser intermitente e existir um baixo número de parasitas circulantes. No entanto, a deteção citológica de *H. canis* através de um esfregaço a partir do fração leucocitária poderá aumentar 3,8x mais a sensibilidade deste método de diagnóstico (Otranto *et al.*, 2011). Deve ser realizada em todos os casos, especialmente quando as restrições financeiras dos proprietários impossibilitam a realização de outros exames específicos de diagnóstico, e é importante iniciar o terapêutico. Adicionalmente, deve ser realçada a necessidade de integrar este método na realização de análises que monitorizem a resposta ao tratamento e à parasitémia presente. Para a deteção do género *Hepatozoon* através do método molecular e a observação ao microscópio ótico, obteve-se uma concordância igualmente substancial ( $\kappa = 0,61$ ). Num estudo realizado em 83 animais, apenas em 10,8% foi obtido um resultado positivo por observação ao MO de esfregaços sanguíneos, enquanto 50% dos animais foram positivos para *H. canis*, (Otranto *et al.*, 2011). Assim como na presente dissertação, demonstra uma maior sensibilidade dos métodos moleculares para a deteção de um maior número de indivíduos positivos.

A visualização de mórulas de *A. platys*, no esfregaço sanguíneo de 4 animais, com e sem presença de sinais clínicos, mostrou uma concordância moderada com o método molecular utilizado ( $\kappa = 0,43$ ). Reforçando a importância da inclusão deste agente patogénico aquando da observação do esfregaço para diagnóstico de agentes patogénicos transmitidos por vetores.

A deteção de hemoparasitas por esfregaço sanguíneo é um método pouco dispendioso e de fácil utilização em qualquer prática clínica. Neste estudo foi possível a observação da maioria dos agentes patogénicos, reforçando a importância da utilização deste método. Contudo, depende da experiência do Médico Veterinário que a realiza, e a baixa sensibilidade faz com que seja desejável aliá-la a outros métodos, nomeadamente a PCR.

A utilização de métodos sorológicos como método único, pode levar a resultados falsos negativos nos casos de doença aguda, na medida em que demonstra apenas exposição ao agente, influenciando de forma negativa o diagnóstico final e a abordagem clínica. Adicionalmente, a confirmação da doença crónica torna-se mais difícil de estabelecer nas zonas endémicas, devido à existência de títulos persistentes de anticorpos nos animais saudáveis. O método de diagnóstico

para a Babesiose canina mais utilizado na prática clínica, e que foi utilizado como informação adicional ao estudo, foi a imunofluorescência indireta. No entanto, o método serológico não é indicado para o diagnóstico da Babesiose canina aguda, uma vez que a seroconversão para a *B. canis* ocorre apenas 1-2 semanas após a infeção, e ainda porque a seroprevalência é elevada em áreas endémicas, permitindo apenas concluir a existência de um contacto prévio com o parasita (Birkenheuer, 2012; Solano-Gallego *et al.*, 2016). Nos testes de Imunofluorescência indireta, 13 dos resultados positivos corresponderam a um resultado negativo, tanto no PCR convencional como na observação direta ao Microscópio ótico, o que poderá ser justificado pelos animais terem tido um contacto com o agente patogénico, anticorpos persistentes ou ainda pela existência de reações cruzadas, tendo em conta que o Sul de Portugal não é considerado como endémico para *Babesia canis*. Um dos resultados positivos na PCR e na observação direta ao MO correspondeu a um resultado negativo na IFI, pelo que o animal poderá ainda não ter desenvolvido anticorpos contra *Babesia canis* e, de acordo com os sinais clínicos apresentados se encontrar numa fase aguda da doença.

Relativamente aos resultados da PCR convencional, como já referido nos métodos, apenas foram considerados casos positivos aqueles cuja sequenciação dos produtos de PCR foi possível. De forma, não só a facilitar a análise dos resultados obtidos, mas também especificar a espécie envolvida nas infeções.

As alterações clínicas e laboratoriais que serviram como critério de inclusão dos casos foram anemia, trombocitopenia e febre, que são frequentemente reportadas e associadas com doenças transmitidas por ixodídeos (Solano-Gallego & Baneth, 2011). Contudo, estas manifestações estão também associadas com doença imunomediada idiopática, neoplasias e outras doenças infecciosas, que apenas foram tidas em conta no grupo 1, aquando da abordagem ao caso clínico. A existência de doenças concomitantes, passíveis de induzir imunossupressão, nomeadamente neoplasias e leishmaniose, poderá aumentar a suscetibilidade dos animais a doença aguda ou mesmo permitir o desenvolvimento de doença crónica, em animais portadores (Criado-Fornelio *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2016). A diminuição do hematócrito encontrada nos animais do presente estudo pode ser traduzida por uma anemia que pode demonstrar o carácter inflamatório das doenças, à hemólise causada pelo parasita de forma mecânica ou imunomediada, cujos mecanismos foram descritos anteriormente (Solano-Gallego *et al.*, 2016). No entanto é de realçar que as alterações de sinais clínicos e hematológicas poderão ter causas não detetadas, principalmente nos animais do grupo 2, onde não foram realizados exames complementares de diagnóstico e se encontravam aparentemente saudáveis. Estes valores poderão ainda encontrar-se subestimados uma vez que situações como a desidratação provocam um aumento do hematócrito e influenciam a interpretação dos resultados.

Embora já tenha sido detetada *B. canis*, *B. vogeli* em cães no norte de Portugal (Cardoso *et al.*, 2010), este é o primeiro estudo que deteta infeção por *B. canis* em cães no Sul de Portugal. O estudo realizado em 2015 por René-Martellet *et al* identificou pela primeira vez a espécie *B. vogeli* no Sul de Portugal, num cão com quadro clínico compatível com Eriquiose monocítica canina. Este último estudo, realizado no Sul da Europa, verificou ainda que Portugal teve o maior número de infeções por agentes patogénicos transmitidos por carrças. Seria assim espectável detetar *B. vogeli* no Sul de Portugal, uma vez que já foi igualmente detetada a sua presença em ixodídeos *R. sanguineus*, o qual se encontra amplamente distribuído no Sul do país (Maia *et al.*, 2015).

A infeção por *B. canis* foi detetada apenas no grupo de animais doentes, em 2 cães (1,40%) com um quadro clínico descrito e compatível com Babesiose canina aguda, enquanto a espécie *B. vogeli* foi detetada em 1 animal doente e 3 (2,81%) animais aparentemente saudáveis. Neste estudo, a prevalência detetada da espécie *B. vogeli*, incluindo apenas cães aparentemente saudáveis, foi de 3,19% (IC 95%: 1,09-8,97%); sendo superior às prevalências verificadas em França de 0,9% (Criado-Fornelio *et al.*, 2009) e 2% em Espanha (Tabar *et al.*, 2009).

No estudo realizado por Maia *et al* (2015), nenhum dos animais testados apresentou resultado positivo através de PCR, com utilização dos mesmos *primers*, PIRO-A e PIRO-B. A ausência de *B. canis* poderia ser expectável tendo em conta que o seu vetor, *D. reticulatus* é mais abundante no Norte do país (Maia *et al.*, 2015). Neste estudo foi detetada infeção por *B. canis* em dois cães que pertenciam ao primeiro grupo, que se apresentaram à consulta com sinais compatíveis com Babesiose canina, e ambos eram residentes na área metropolitana de Lisboa. No entanto, ambos os cães têm história de viagem anterior para o Norte de Portugal, onde este agente é endémico, pelo que não é possível concluir em que região terá ocorrido a infeção dos mesmos e nem se esta espécie se encontra efetivamente no Sul do país. A presença de *B. canis* no Sul de Portugal pode sugerir uma dispersão da mesma, justificada pela expansão do habitat do vetor *D. reticulatus* ou ainda pela adaptação de *Babesia* à transmissão da espécie *Ixodes ricinus* (Berzina *et al.*, 2013). Uma vez que não existem sinais patognomónicos para doenças transmitidas por ixodídeos, para além da interpretação do exame físico completo, é necessária a recolha detalhada da história pregressa, nomeadamente se o animal viajou no interior ou para fora do país, de forma a delinear a abordagem ao diagnóstico. Poderá ainda ser implementada uma agenda de viagem do animal, de forma a que exista um registo que facilita a ação do Médico Veterinário na prevenção destas doenças.

Na Europa a Babesiose Clínica é causada principalmente por *B. canis* e *B. vogeli*, enquanto os casos clínicos causados por babesias de pequenas dimensões são raramente reportados. No entanto, a *B. microti-like* tem causado quadros clínicos graves em cães e foi demonstrada como sendo endémica na Galiza, no norte de Espanha (Miró *et al.*, 2015). *Ixodes hexagonus* tem sido o

principal candidato enquanto vetor deste piroplasma, e encontra-se distribuído de norte a sul de Portugal (INSA, 2015). No entanto, não foram detetadas espécies pertencentes ao grupo de Babesias de pequenas dimensões no presente estudo.

A morfologia eritrocitária encontrava-se normal na maior parte das amostras sanguíneas, tendo como principais alterações observadas: anisocitose e policromasia, o que revela que em alguns casos pode existir uma certa regeneração com produção de eritrócitos imaturos (Irwin, 2016). A medula óssea necessita de 3-4 dias para libertar eritrócitos suficientes para a circulação sanguínea, de forma a compensar a anemia presente. Neste período seria espectável encontrar anemias não regenerativas normocíticas e normocrómicas, revelando uma fase aguda da doença. Nos dois casos de Babesiose canina, pertencentes ao grupo 1, verificou-se a presença de anemia regenerativa, que está de acordo com o período superior a 4 dias entre o aparecimento dos sintomas e a consulta no HEV.

A infeção por *B. canis* será eventualmente mais encontrada na prática clínica, tendo em conta a gravidade do quadro clínico comparativamente a *B. vogeli*. No presente estudo foram detetadas 3 infeções causadas por *B. vogeli* em cães provenientes do mesmo canil, e apenas um deles apresentava hipertermia como sinal clínico compatível com a doença. Devido a um insuficiente número de casos clínicos, não foi possível criar uma correlação clara das manifestações clínicas provocadas pelas diferentes espécies. Ainda assim, o maior número de infeções por *B. vogeli* em cães provenientes de canis e aparentemente saudáveis, suporta o facto de esta ser considerada a espécie menos patogénica que infeta o cão, estando frequentemente associada a infeção subclínica (Irwin, 2009; Birkenheuer, 2012). Seria ainda espectável encontrar esta espécie em maior número nesta área, uma vez que a distribuição de *R. sanguineus* em Portugal é superior à de *D. reticulatus* (INSA, 2015). Após o exame físico e posterior realização de microhematócrito aos cães pertencentes ao grupo 2, verificou-se que apenas um dos cães infetados com *B. vogeli* apresentava anemia e todos estes apresentavam uma temperatura retal normotérmica.

Os principais motivos de consulta dos animais infetados, descrito pelos tutores, foram principalmente anorexia, prostração e letargia aguda, com duração de 2 a 4 dias. As manifestações clínicas apresentadas em ambos os casos foram compatíveis com Babesiose canina aguda (Boozer & Macintire, 2003; Birkenheuer, 2012) e refletiram trombocitopenia moderada a grave (2/3), resposta inflamatória acompanhada com hipertermia (3/6), anemia hemolítica (2/6) e linfopenia (3/3). Estas observações são compatíveis com o estudo realizado por Kirtz *et al* 2013, que definiram *guidelines* para auxiliar o diagnóstico com a interpretação dos resultados hematológicos, onde as alterações mais consistentes em 113 cães infetados por *B. canis* foram trombocitopenia, alteração encontrada em todos os animais infetados, linfopenia existente em 54,9% dos cães e um valor de hematócrito inferior aos valores de referência em 61,1% (Kirtz, Leschnik, Hooijberg, Tichy, & Leidinger, 2012).



De acordo com os diferentes estudos, a frequência de anemia varia entre os 53% (Davitkov *et al.*, 2015) e os 60% (Kirtz *et al.*, 2012). A trombocitopenia tem vindo a ser a alteração hematológica mais consistente para ambas as espécies *B. canis* e *B. vogeli*, no entanto o mecanismo que provoca a trombocitopenia ainda não é claro, mas foi verificada a sua origem como periférica, possivelmente devido a uma destruição imunomediada de plaquetas e um aumento do seu consumo (Salem & Farag, 2014; Solano-Gallego *et al.*, 2016). No leucograma, foram apresentados valores aproximados ao limite inferior de referência de contagem de leucócitos e linfopenia nos 3 casos de Babesiose canina, que ocorre principalmente na fase aguda, assim como em outras infeções detetadas, possivelmente devido a um aumento de consumo, sepsis ou sequestro esplénico podendo ter uma duração de 4 a 28 dias (Birkenheuer, 2012; Kirtz *et al.*, 2012). Em todos os casos de Babesiose canina houve uma recuperação clínica favorável logo após a primeira administração de dipropionato de imidocarb, na dose recomendada. Apesar de ser importante a pesquisa de coinfeções com outros agentes transmitidos por ixodídeos (*H. canis*, *E. canis*, *A. platys*, *Mycoplasma* spp.), uma vez que podem também interferir na gravidade, na variedade dos sinais clínicos encontrados e na resposta do animal ao tratamento, apenas foram detetadas infeções únicas. A hipertermia foi encontrada em 50% (3/6) dos animais infetados por *Babesia* spp.. Depende da espécie, estado imunitário do animal e da fase da doença, uma vez que a hipertermia é atribuída à libertação de agentes pirogénicos endógenos a partir da lise eritrocitária, destruição do parasita e ainda à ativação de mediadores inflamatórios (Salem *et al.*, 2014).

O hemograma completo é o exame complementar mais requisitado de forma constante pelos médicos veterinários, uma vez que os sinais clínicos são inespecíficos. Os restantes exames complementares associados a cada agente patogénico são mais difíceis de avaliar na população estudada, visto que não foram realizados uniformemente em todos os animais.

Os cães infetados por *B. canis* e que se apresentaram à consulta no HEV com sinais compatíveis com Babesiose canina, incidem em dois períodos específicos, no inverno (janeiro) e primavera (abril), que coincidem com os de outros estudos (Cardoso *et al.*, 2010; Solano-Gallego *et al.*, 2016), uma vez que reúnem as condições climáticas favoráveis à atividade do ixodídeo *D. reticulatus*, vetor desta espécie. Este período coincide com a época alta de caça, e conseqüentemente os animais com aptidão para a caça têm uma maior exposição ao habitat natural de *D. reticulatus* e *R. sanguineus*. No entanto, neste estudo os animais infetados não tinham aptidão para a caça. Ambos os cães não se encontravam desparasitados externamente e teriam sido observados ixodídeos por parte dos tutores na Área Metropolitana de Lisboa. O aumento de deslocações dos cães para zonas endémicas poderá potenciar a transmissão deste agente em áreas não endémicas, pelo que a desparasitação externa é fundamental para prevenir a distribuição destes agentes patogénicos (Dantas-Torres & Otranto, 2016). A sazonalidade da ocorrência de *B. canis* foi igualmente verificada no estudo de Kirtz *et al* (2012), onde concluíram que se observa em dois períodos críticos: na

Primavera quando as temperaturas são superiores a 8°C e no Outono quando as temperaturas são inferiores a 18°C. O conhecimento da ocorrência de Babesiose canina ser dependente do clima, devido à atividade do seu vetor, pode ser um factor determinante para o médico veterinário decidir realizar mais exames de diagnóstico para a deteção do agente patogénico, ou mesmo o reforço de medidas preventivas por parte dos tutores (Cardoso *et al.*, 2010; Kirtz *et al.*, 2012).

Ambas as técnicas moleculares utilizadas demonstraram ter a especificidade esperada para a deteção do género *Babesia*, mas podem também amplificar *Hepatozoon* simultaneamente sabendo-se que a coinfeção por ambos os agentes poderá dificultar a análise dos resultados de sequenciação (Criado-Fornelio, *et al.*, 2003c; Oyamada *et al.*, 2005). No entanto, em nenhum dos resultados positivos da PCR convencional pelos métodos 1 e 2, houve amplificação do gene pertencente a *Hepatozoon* spp.. O método 1 detetou a presença de *Babesia* spp. em 100% (5/5) das amostras positivas no método 2, este último predefinido no Laboratório Nacional da Croácia.

Estudos realizados no sul de Portugal mostraram que *H. canis* tem sido um dos agentes patogénicos com maior prevalência, o que está de acordo com os resultados obtidos (Maia *et al.*, 2015). A prevalência de *H. canis* em cães domésticos neste estudo foi de 13,93% (IC 95%: 8,26-22,24%) para infeções únicas, superior à prevalência ocorrida no sul de Portugal com 3,1% (Maia *et al.*, 2015), 0,9% em França (Criado-Fornelio *et al.*, 2009) e por fim, à prevalência encontrada em Espanha de 3,3% (Tabar *et al.*, 2009). Este protozoário esteve fortemente associado a coinfeção com *M. haemocanis*, tendo uma prevalência de 5,32% (IC 95%: 2,29-11,85%). Foram detetadas ainda coinfeções deste agente com *A. platys* com uma prevalência de 4,25% (IC 95%: 1,67-10,44%), e *M. haematoparvum* com 2,13% (IC 95%: 0,50-7,43%). Foi detetada igualmente uma elevada prevalência de *H.n canis* em raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) de 75.6%, presumindo que estas são um possível reservatório para a infeção nos cães domésticos (Cardoso *et al.*, 2014).

Curiosamente, nas coinfeções em geral, não foram identificadas alterações clínicas avaliadas, como seria esperado uma vez que estas podem potenciar a patogénese da doença. Apenas as infeções por um único agente patogénico, nomeadamente por *H. canis* apresentaram manifestações clínicas, o que sugere que apesar de a maioria das infeções ser subclínica e os animais estarem aparentemente saudáveis, esta infeção não deve ser negligenciada pois poderá evoluir para doença.

No grupo 1, constituído por cães que se apresentaram à consulta veterinária, o agente maioritariamente detetado (5/48) foi *Hepatozoon canis*, podendo ser a causa de doença em alguns dos casos clínicos com sinais compatíveis com Hepatozoonose canina ou existir uma infeção enquanto agente patogénico oportunista. Nas monoinfeções por *H. canis*, as alterações hematológicas encontradas estão de acordo com estudos realizados (Baneth, 2011; Chhanabra, Uppal, Singla, 2013). Nos animais do grupo 2, aparentemente saudáveis, as principais alterações

observadas no hemograma completo foram: anemia (3/4), correspondendo à alteração mais consistente em estudos anteriores; linfocitose (2/4) e neutrófila (2/4). Apesar de a eosinofilia ser habitualmente a alteração mais consistente do leucograma (Baneth, 2011), foi encontrada apenas em um dos casos clínicos. Neste grupo, existiu apenas uma coinfeção causada por *H. canis* e *A. platys*, que apresentou como alterações hematológicas trombocitopenia e anemia, acompanhadas com esplenomegalia. O plasma hemolisado foi encontrado apenas em duas amostras do grupo 1 e grupo 2, onde foram detetadas coinfeção por *H. canis* e *A. platys*. Neste caso, ao existir uma infecção aguda e um quadro clínico mais grave comparativamente aos animais monoinfetados é suspeita a existência de uma potencialização das manifestações clínicas pela presença de uma coinfeção.

O estudo realizado por Novacco *et al.* (2010), teve como objetivo avaliar a prevalência e distribuição geográfica de infecções por micoplasmas hematótrópicos em cães nos países mediterrâneos como Itália, Espanha e Portugal, bem como fatores de risco associados. A prevalência foi superior em Portugal, cerca de 40%, e todas as espécies de *Mycoplasma* spp. encontradas no país pertenciam à espécie *M. haemocanis* (Novacco *et al.*, 2010). Esta prevalência é igualmente superior à encontrada na presente dissertação para infecções únicas por *M. haemocanis* de 6,4% (IC 95%: 2,96-13,23). O estudo realizado na presente dissertação é o primeiro que descreve a presença de *M. haematoparvum* em Portugal, com prevalências de 1,06% (IC 95%: 0,19-5,78) e 2,1% (IC 95%: 0,5-7,43%) em coinfeção com *A. platys* e *H. canis*, respetivamente. Existe uma prevalência elevada de *Mycoplasma* em cães mantidos em canil, devido à maior exposição dos mesmos a parasitas externos e maior risco de transmissão direta. Os sinais clínicos poderão ocorrer associados a outros estados de imunodepressão como neoplasias linfóides ou fármacos imunodepressores (Messic *et al.*, 2012).

Para a pesquisa de *Anaplasma* e *Ehrlichia* foram utilizados *primers* não específicos, o que resulta em amplificações não específicas e a sua espécie só foi confirmada por sequenciação. Os produtos de PCR cujo resultado foi positivo, mas onde não foi possível a sequenciação, foram considerados não conclusivos. A existência de falsos negativos nas amostras pode ocorrer quando a bacteremia é intermitente como na infecção por *A. platys* ou é inferior aos níveis de deteção (Sainz *et al.*, 2015).

A prevalência de infecções únicas por *Anaplasma* spp./*Ehrlichia* spp. neste estudo foi de 4,25% (IC 95%: 1,67-10,44%), superior às prevalências citadas de 0,8% no Sul de Portugal (Maia *et al.*, 2015); 1,9% em Espanha (Tabar *et al.* 2009) e 3,7-6,0% em Itália (Trotta *et al.*, 2009). Enquanto o primeiro estudo foi realizado com uma amostra de animais aparentemente saudáveis, os estudos em Espanha e Itália foram realizados com uma amostra de cães clinicamente suspeitos de DCTV.

A presença de *A. platys* nesta amostra veio corroborar os resultados previamente obtidos em cães (Maia *et al.*, 2015; René-Martellet *et al.*, 2015), reforçando uma maior suscetibilidade dos cães nesta região, tendo sido obtida uma prevalência de infecções únicas de 3,19% (IC 95%: 1,09-8,97%) e uma

prevalência de coinfeções de 5,30% (IC 95%: 2,29-11,85%). Ainda que a infecção por *A. platys* seja normalmente assintomática, poderá provocar um quadro clínico grave e a presença de infecções concomitantes e/ou processos imunomediados poderão ter sido responsáveis pela presença de sinais clínicos nos animais. As duas infecções por *A. platys* detetadas no grupo 1, cães apresentados à consulta no HEV, evidenciaram sinais clínicos compatíveis com Anaplasmosse Trombocítica Canina, o que revela a importância da sua inclusão nos diagnósticos diferenciais perante trombocitopenia persistente. A variabilidade dos sinais clínicos desta infecção ainda não se encontra associada a variações de estirpes, no entanto são necessários mais estudos neste sentido.

A prevalência de infecção por *E. canis* neste estudo foi de 1,06 % (1/94), o que vai ao encontro da prevalência de infecção verificada em outros estudos onde se utilizaram métodos moleculares para deteção do agente patogénico no Sul de Portugal (Maia *et al.*, 2015). No Norte de Portugal foi verificada uma prevalência de 4% *E. canis*, em cães clinicamente suspeitos de Babesiose canina (Cardoso *et al.*, 2010). Num estudo realizado recentemente no sul da Europa, por Martellet *et al.* (2015), verificou-se que existe um maior número de infecções no Sul de Portugal. Para além disso, foi apurada uma incidência para *E. canis* de maior risco, comparativamente aos restantes países (0,14%), tendo 3 áreas de risco em Beja, Castelo Branco e Alentejo (René-Martellet *et al.*, 2015). Outros estudos revelaram uma maior seropositividade no Sul de Portugal, no entanto o vetor *R. sanguineus* responsável pela transmissão de *E. canis* encontra-se distribuído igualmente por todas as regiões do País (Cardoso, Mendão, & Madeira de Carvalho, 2012). A prevalência de infecção por *E. canis* foi ainda assim inferior comparativamente com estudos que utilizaram métodos sorológicos em cães aparentemente saudáveis no distrito de Lisboa, com cerca de 6,3% (Cardoso *et al.*, 2012). Isto porque no presente estudo foram utilizadas técnicas de PCR, onde foi amplificado DNA do agente patogénico, enquanto pelas técnicas serológicas foram detetados anticorpos produzidos pela presença de infecção ou ainda por um contato anterior com a bactéria. Este motivo poderá explicar também a presença de 5 animais pertencentes ao grupo 1, seropositivos para *Ehrlichia* spp., cujos resultados para a pesquisa de agentes da família Anaplasmataceae foram negativos.

A utilização de *primers* para a deteção de Anaplasmataceae, permitiu também descartar possíveis coinfeções com filárias. Um caso clínico do grupo de cães provenientes do HEV foi diagnosticado mais tarde com *D. immitis*, o que está de acordo com o diagnóstico indireto realizado através da pesquisa de *Wolbachia pipientis*. Num estudo realizado por Landum *et al.* (2014), o DNA de *Wolbachia* foi detetado por métodos moleculares em apenas 52,5% dos cães infetados por *D. immitis*. A pesquisa de *Wolbachia* spp. não é um método recomendado para a confirmação da presença de filárias, mas mais estudos são necessários para conhecer a associação da mesma com *D. immitis* para o controlo e manejo da Dirofilariose canina. Esta bactéria já foi também encontrada em espécies de nematodes como *Onchocerca volvulus* e *Wuchereria bancrofti* (Landum *et al.*, 2014).

Os artrópodes anteriormente descritos enquanto vetores, tais como *D. reticulatus* para *B. canis*, *R. sanguineus* para *B. vogeli*, *E. canis* e *H. canis*, estão presentes no Sul de Portugal, sendo espectável a deteção destes agentes patogénicos no estudo.

Na amostra pertencente ao grupo 2, constituído por 94 cães residentes em canis municipais e associações de proteção animal existentes no distrito de Lisboa, obteve-se uma prevalência de infeção neste grupo de 39,36% (IC 95%: 30,09-49,47%). A prevalência de infeções encontrada em Torres Vedras (48,48%) foi significativamente superior à prevalência encontrada em Lisboa (19,23%), como demonstrado de forma estatística. Apesar de ambas pertencerem ao mesmo distrito, este resultado seria expectável, uma vez que a zona do Oeste, nomeadamente a localização do canil de Torres Vedras, é uma zona rural onde é praticada a caça e onde se recolhem animais encontrados na rua provenientes desta prática. Enquanto a Casa dos Animais de Lisboa é localizada perto da grande cidade e apesar de ser um canil de maiores dimensões, existe uma menor concentração de animais por divisões ou área.

A elevada prevalência obtida neste estudo poderá estar relacionada com o fato da amostragem ter sido limitada, incluindo apenas animais cujo responsável pelo canil tenha observado presença de ixodídeos nas infraestruturas ou mesmo infestação aquando da entrada do animal. Assim a prevalência obtida neste estudo foi superior, comparativamente com outros trabalhos realizados no Sul de Portugal em que se utilizaram métodos moleculares para a pesquisa de agentes transmitidos por artrópodes numa amostragem aleatória (Maia *et al.*, 2015). No presente trabalho a prevalência de coinfeções foi de 12,77% (IC 95%: 7,46-21%), o que seria espectável, uma vez que as coinfeções são frequentemente reportadas em zonas endémicas. Estudos realizados em países do sul da Europa verificaram que Portugal é um país altamente endémico, onde foi detetado um maior número de infeções por agentes transmitidos por ixodídeos (René-Martellet *et al.*, 2015). No entanto, um estudo realizado por Maia *et al.* (2015) com uma maior amostragem constituída por 1010 animais residentes do Sul de Portugal, incluindo o distrito de Lisboa, detetou por técnicas moleculares, apenas uma coinfeção por *H. canis* e *A. platys*. A seleção de amostragem, como anteriormente referido poderá explicar igualmente esta diferença, no entanto o ano da recolha poderá ter influenciado igualmente os resultados obtidos. O facto de a recolha das amostras ter sido realizada de 2011 a 2014 poderá ser expectável um aumento de infeções únicas e coinfetantes atualmente (Maia *et al.*, 2015). Devido a alterações climáticas globais, urbanização de áreas naturais e alargamento de espectro de atividades recreativas praticadas por humanos e animais de companhia, bem como o aumento de abundância de hospedeiros reservatórios silváticos, existe um aumento da exposição dos cães domésticos a ixodídeos, e conseqüentemente uma maior predisposição para infeção de agentes transmitidos pelos mesmos (Alvarado-Rybak *et al.*, 2016; Millán *et al.*, 2016). O transporte de animais residentes em zonas não endémicas para zonas

endêmicas, ou vice-versa, poderá influenciar igualmente a expansão de agentes patogênicos, aumentando conseqüentemente as coinfeções existentes na população.

Os estudos epidemiológicos em Portugal acerca da ocorrência das espécies de agentes transmitidos por ixodídeos em canídeos com ou sem sinais clínicos, são imprescindíveis para orientar as decisões de diagnóstico clínico, tendo em conta que o falso diagnóstico de outras doenças poderá resultar num mau prognóstico por falta de especificidade terapêutica. Isto poderá ocorrer no caso do diagnóstico de infeção por *Babesia* spp., uma vez que a abordagem clínica e terapêutica difere nas espécies de *Babesia* de grandes e pequenas dimensões. A deteção de *B. microti-like* no norte de Portugal leva a crer ser possível a dispersão deste agente no Sul de Portugal, pelo que é necessário ter em consideração a presença deste agente na prática clínica principalmente quando o animal tem história de viagem para áreas endêmicas. Na presente dissertação houve ainda a oportunidade de realizar PCR convencional combinado com RFLP, e os resultados obtidos foram posteriormente confirmados por sequenciação. Esta técnica permite a deteção e diferenciação de cada uma das espécies de *Babesia* que infetam os canídeos, com potencial para ser utilizada na prática clínica (Carret *et al.*, 1999). Quando aplicada rotineiramente no laboratório, esta técnica assim como a técnica alternativa *semi-nested* PCR, poderão ser menos dispendiosas para a confirmação das espécies, comparativamente à sequenciação dos produtos de PCR convencional.

A informação relativa às manifestações clínicas demonstradas por *Babesia* spp. e outros agentes transmitidos por ixodídeos ainda é escassa, e por isso foi considerado relevante apresentar também as informações clínicas existentes dos mesmos. Contudo, mais estudos com análise de um maior número de amostras de diferentes tecidos e não apenas sangue periférico, com acompanhamento clínico e realização de hemograma e bioquímicas em todos os casos seguidos, podem reduzir as dificuldades de diagnóstico e transmitir uma ideia mais concreta das manifestações clínicas provocadas por cada agente patogênico e a influência de coinfeções no quadro clínico.

## CAPÍTULO V – CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

O estágio curricular, realizado no HEV, assim como os restantes estágios na área de pequenos animais, permitiram não só uma aprendizagem e aplicação prática de conhecimentos, como também a encarar realidades e métodos de trabalho diversificados. O estágio realizado no INIAV foi imprescindível, quer a nível de aprendizagem quer na experiência da aplicação de métodos moleculares de diagnóstico na presente dissertação, e em colaboração com o Instituto Veterinário da Croácia foram dadas oportunidades para a realização de outros métodos moleculares de deteção de outros agentes coinfectantes.

Relativamente à caracterização molecular, este estudo permitiu a primeira identificação de *Mycoplasma haematoparvum* em Portugal e de *Babesia canis* no Sul do país. O facto de incluir um grupo de animais doentes e um grupo de animais aparentemente saudáveis, contribuiu para uma perceção real dos agentes patogénicos presentes e possíveis coinfeções no Sul de Portugal. No grupo de animais doentes, apresentados em consulta, foram detetadas infeções causadas por *H. canis* e *A. platys*, as quais não são geralmente incluídas nos diagnósticos diferenciais na prática clínica. Estes resultados alertam para a necessidade de estudos, em anos consecutivos, no sentido de melhor auxiliar os médicos veterinários na sua abordagem clínica de casos de DCTV.

Através da experiência adquirida durante o estágio curricular foi verificado que a utilização de métodos serológicos continua a ser predominante, relativamente à observação direta ao MO e aos métodos moleculares. A presente dissertação reforça a necessidade de utilização de métodos alternativos de diagnóstico para a deteção do agente patogénico, principalmente em áreas endémicas, de forma a confirmar infeção verdadeira e diminuir a utilização de fármacos utilizados no tratamento dos mesmos.

Durante a realização da presente dissertação, várias limitações impediram a concretização de um estudo clínico mais completo, entre elas: o período de estágio apenas possibilitou a recolha de um número limitado de casos; restrições financeiras levaram à impossibilidade de realização de hemograma e análises bioquímicas para todos os animais em estudo; por questões logísticas a população do grupo 2 foi geograficamente circunscrita e raramente foi possível realizar um exame físico completo a cada animal.

Os resultados incluídos na presente Dissertação permitiram elaborar um artigo científico para submissão numa revista científica internacional, em colaboração com o Departamento de Parasitologia do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária de Portugal e o Instituto Veterinário da Croácia.

Em conclusão, a elevada prevalência de infeções únicas e coinfeções observadas neste estudo, comparativamente a estudos realizados em anos anteriores no Sul de Portugal, pode ser justificada pela maior exposição dos animais a ixodídeos e/ou uma eminente dispersão destes agentes patogénicos, o que reforça, cada vez mais, a importância de atuar de acordo com o conceito *One Health*. Neste contexto, a ação concertada dos tutores, médicos veterinários e laboratórios de diagnóstico, é essencial para prevenir a transmissão de agentes patogénicos com potencial zoonótico.



## BIBLIOGRAFIA

- Alvarado-Rybak, M., Solano-Gallego, L., & Millán, J. (2016). A review of piroplasmid infections in wild carnivores worldwide: importance for domestic animal health and wildlife conservation. *Parasites & Vectors*, *9*, 538.
- American Heartworm Society - AHS. (2014). Current canine guidelines. Acedido em: Agosto de 2017, disponível em: <https://www.heartwormsociety.org/veterinary-resources/american-heartworm-society-guidelines>
- Annoscia, G., Latrofa, S., Cantacessi, C., Olivieri, E., Manfredi, M., Dantas-Torres, F., Otranto, D. (2017). A new PCR assay for the detection and differentiation of *Babesia canis* and *Babesia vogeli*. *Tick and Tick-borne Diseases*, *8*, 862-865.
- Baneth, G. (2011). Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. *Veterinary Parasitology*, *181*, 3–11.
- Baneth, G. (2016) Hepatozoonosis - In M. J. Day (Ed.), *Infectious diseases in dog and cat*. (4<sup>th</sup> ed.) (pp 750-756). Philadelphia: Saunders, Elsevier.
- Baneth, G. (2012) Hepatozoonosis - *Hepatozoon canis* infection. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious diseases in dog and cat*. (4<sup>th</sup> ed.) (pp 750-756). Philadelphia: Saunders, Elsevier.
- Baneth, G., Florin-Christensen, M., Cardoso, L., & Schnittger, L. (2015). Reclassification of *Theileria annae* as *Babesia vulpes* sp. nov. *Parasites & Vectors*, *8*, 207.
- Barker, E., & Tasker, S. (2016). Haemoplasmosis. In M.J. Day (Eds.). *Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (pp. 97-106). London: Manson Publishing.
- Beck R, Vojta L, Mrljak V, Marinculic A, Beck A, et al. (2009) Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *International Journal for Parasitology*; *39*, 843–8.
- Beck, A., Huber, D., Polkinghorne, A., Kurilj, A. G., Benko, V., Mrljak, V., Reljic, S., Kusak, J., Reil, I., Beck, R. (2017). The prevalence and impact of *Babesia canis* and *Theileria* sp. in free-ranging grey wolf (*Canis lupus*) populations in Croatia. *Parasites & Vectors*, *10*, 168.
- Berzina, I., Capligina, V., Baumanis, V., Ranka, R., Cirule, D., & Matise, I. (2013). Autochthonous canine babesiosis caused by *Babesia canis canis* in Latvia. *Veterinary Parasitology*, *196*, 515–518.
- Birkenheuer, A. J. (2012) Babesiosis - In C.E. Greene (Ed.), *Infectious diseases in dog and cat*. (4<sup>th</sup> ed.) (pp 771-784) Philadelphia: Saunders, Elsevier.

- Birkenheuer, A. J., Horney, B., Bailey, M., Scott, M., Sherbert, B., Catto, V., Marr, H.S., Camacho, A.T., & Ballman, A. E. (2010). *Babesia microti-like* infections are prevalent in North American foxes. *Veterinary Parasitology*, 172, 179–182.
- Birkenheuer, A. J., Levy, M. G., & Breitschwerdt, E. B. (2003). Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in canine Blood Sample. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 4172–4177.
- Birkenheuer, A. J., Neel, J., Ruslander, D., Levy, M. G., & Breitschwerdt, E. B. (2004). Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in a dog. *Veterinary Parasitology*, 124, 151–160.
- Boozer, A., & Macintire, D. (2003). Canine Babesiosis. *The Veterinary Clinics Small Animal*, 33, 885-904.
- Bourdoiseau, G. (2006). Canine babesiosis in France. *Veterinary Parasitology*, 138(1–2), 118–125.
- Bouzouraa, T., René-Martellet, M., Chêne, J., Attipa, C., Lebert, I., Chalvet-Monfray, K., Cadoré, J., Halos, L., & Chabanne, L. (2016). Clinical and laboratory features of canine *Anaplasma platys* infection in 32 naturally infected dogs in the Mediterranean basin. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7, 1256–1264.
- BSAVA (2014). Small Animal Formulary. Gloucester: British Animal Veterinary Association, (pp 406-407).
- Cacciò, S. M., Antunovic, B., Moretti, A., Mangili, V., Marinculic, A., Baric, R. R., ... Pieniazek, N. J. (2002). Molecular characterisation of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. *Veterinary Parasitology*, 106, 285–292.
- 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. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.
- Cardoso, L., Cortes, H. C. E., Reis, A., Rodrigues, P., Simões, M., Lopes, A. P., Vila-Viçosa, M., Talmi-Frank, D., Solano-Gallego, L., Baneth, G. (2013). Prevalence of *Babesia microti-like* infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Portugal. *Veterinary Parasitology*, 196, 90–95.
- Cardoso, L., Cortes, H. C., Eyal, O., Reis, A., Lopes, A., Vila-Viçosa, M., Talmi-Frank, D., Eyal, O., Solano-Gallego, L., & Baneth, G. (2014). Molecular and histopathological detection of *Hepatozoon canis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Portugal. *Parasites & Vectors*, 7, 113.
- 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. *Veterinary Parasitology*, 156, 199–204.

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

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

Carret, C., Walas, F., & Carcy, B. (1999). *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossii*: Differentiation of the Three Subspecies by a Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis on Amplified Small Subunit Ribosomal RNA Genes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46, 298–303.

Cassini, R., Zanutto, S., di Regalbano, A. F., Gabrielli, S., Calderini, P., Moretti, A., Tampieri, M.P., & Pietrobelli, M. (2009). Canine piroplasmiasis in Italy: epidemiological aspects in vertebrate and invertebrate hosts. *Veterinary Parasitology*, 165, 30–35.

Centeno-Lima, S., do Rosário, V., Parreira, R., Maia, a J., Freudenthal, a M., Nijhof, a M., & Jongejan, F. (2003). A fatal case of human babesiosis in Portugal: molecular and phylogenetic analysis. *Tropical Medicine & International Health : TM & IH*, 8, 760–4.

Chao, L. L., Liao, H. T., Ho, T. Y., & Shih, C. M. (2017). First detection and molecular identification of *Babesia gibsoni* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Acta Tropica*, 166, 356–362.

Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O., & Malandrin, L. (2009). *Babesia* and its hosts: Adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary Research*, 40, 37.

Chhabra, S., Uppal, S., Singla, L., (2013) Retrospective study of clinical and hematological aspects associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon canis* in Ludhiana, Punjab, India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3, 483-486.

Cicco, M. F., Downey, M. E., Beeler, E., Marr, H., Cyrog, P., Kidd, L., Diniz, P., Cohn, L., & Birkenheuer, A. J. (2012). Re-emergence of *Babesia conradae* and effective treatment of infected dogs with atovaquone and azithromycin. *Veterinary Parasitology*, 187, 23–27.

Costa-Júnior, L. M., Zahler-Rinder, M., Ribeiro, M. F. B., Rembeck, K., Rabelo, E. M. L., Pfister, K., & Passos, L. M. F. (2012). Use of a Real Time PCR for detecting subspecies of *Babesia canis*. *Veterinary Parasitology*, 188, 160–163.

- Criado-Fornelio, A., Buling, A., Pingret, J. L., Etievant, M., Boucraut-Baralon, C., Alongi, A., & Torina, A. (2009). Hemoprotozoa of domestic animals in France: Prevalence and molecular characterization. *Veterinary Parasitology*, *159*, 73–76.
- Criado-Fornelio, A., González-Del-Río, M. A., Buling-Saraña, A., & Barba-Carretero, J. C. (2003a). Molecular characterization of a *Babesia gibsoni* isolate from a Spanish dog. *Veterinary Parasitology*, *117*, 123–129.
- Criado-Fornelio, A., Martínez-Marcos, A., Buling-Saraña, A., & Barba-Carretero, J. C. (2003b). Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe: Part I. Epizootiological aspects. *Veterinary Parasitology*, *113*, 189–201.
- Criado-Fornelio A, Martínez-Marcos A, Buling-Sarana A, Barba-Carretero JC. (2003c) Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. *Veterinary Microbiology*, *93*:307–17.
- Criado-Fornelio, A., Rey-Valeiron, C., Buling, A., Barba-Carretero, J. C., Jefferies, R., & Irwin, P. (2007). New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. *Veterinary Parasitology*, *144*, 261–269.
- Cunha, M., Inácio, J. (2014). Visão Geral e aplicação das tecnologias moleculares no diagnóstico laboratorial de doenças infecciosas. In Cunha, M., Inácio, J. (Eds.) *Abordagens Moleculares em Veterinária; Como desvendar a etiologia e a epidemiologia da infecção*. Lisboa: Lidel - edições técnicas.
- Dahmani, M., Loudahi, A., Mediannikov, O., Fenollar, F., Raoult, D., & Davoust, B. (2015). Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from Kabylie, Algeria. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *6*, 198–203.
- Dantas-Torres, F., & Otranto, D. (2016). Best Practices for Preventing Vector-Borne Diseases in Dogs and Humans. *Trends in Parasitology*, *32*, 43–55.
- Davitkov, D., Vucicevic, M., Stevanovic, J., Krstic, V., Tomanovic, S., Glavinic, U., & Stanimirovic, Z. (2015). Clinical babesiosis and molecular identification of *Babesia canis* and *Babesia gibsoni* infections in dogs from Serbia. *Acta Veterinaria Hungarica*, *63*, 199–208.
- Demeter, Z., Palade, E.A., Balogh, E., Jakab, C., Farkas, R., Táncoz, B., Hornok, S. (2011). Postmortem small *babesia*-like morphology of *Babesia canis*. *Acta Veterinaria Hungarica*. *59*: 427-32.
- Dezek, D., Vojta, L., Čurković, S., Lipej, Z., Mihaljević, Ž., Cvetnić, Ž., & Beck, R. (2010). Molecular detection of *Theileria annae* and *Hepatozoon canis* in foxes (*Vulpes vulpes*) in Croatia. *Veterinary Parasitology*, *172*, 333–336.

- Duh D, Tozon N, Petrovec M, Strasek K, Avsi-Zupanc T (2004) Canine babesiosis in Slovenia: Molecular evidence of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli*. *Veterinary Research*.35: 363–368
- Estrada-Peña, A., & Santos-Silva, M. (2005) The distribution of ticks (Acari: Ixodidae) of domestic livestock in Portugal. *Experimental and Applied Acarology*, 36, 233-246.
- Eichenberger, R. M., Ramakrishnan, C., Russo, G., Deplazes, P., & Hehl, A. B. (2017). Genome-wide analysis of gene expression and protein secretion of *Babesia canis* during virulent infection identifies potential pathogenicity factors. *Scientific Reports*, 7, 3357.
- Eichenberger, R. M., Riond, B., Willi, B., Hofmann-Lehmann, R., & Deplazes, P. (2016). Prognostic Markers in Acute *Babesia canis* Infections. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30, 174–182.
- Eichenberger, R. M., Štefanić, S., Naucke, T. J., Šarkūnas, M., Zamokas, G., Grimm, F., & Deplazes, P. (2017). An ELISA for the early diagnosis of acute canine babesiosis detecting circulating antigen of large *Babesia* spp. *Veterinary Parasitology*, 243, 162–168.
- El-Bahnasawy M., Khalil H., & Morsy T. A. (2011) Babesiosis in an Egyptian boy acquired from pet dog, and a general review [abstract] [versão electronica]. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 41, 99-108.
- Farkas, R., Takács, N., Hornyák, Á., Nachum-Biala, Y., Hornok, S., & Baneth, G. (2015). First report on *Babesia cf. microti* infection of red foxes (*Vulpes vulpes*) from Hungary. *Parasites & Vectors*, 8, 55.
- Földvári, G., Hell, É., & Farkas, R. (2005). *Babesia canis canis* in dogs from Hungary: Detection by PCR and sequencing. *Veterinary Parasitology*, 127, 221–226.
- Földvári, G., Široký, P., Szekeres, S., Majoros, G., & Sprong, H. (2016). *Dermacentor reticulatus*: a vector on the rise. *Parasites & Vectors*, 9, 314.
- Freyburger, L., Lemaitre, L., Médaille, C., Oberli, F., Fanchon, L., & Bergamo, P. (2011). Étude comparative de l'innocuité de deux vaccins commerciaux contre la babésiose canine provoquée par *Babesia canis*. *Parasite Journal*, 18, 311–318.
- Fritz, D. (2010). A PCR study of piroplasms in 166 dogs and 111 horses in France (March 2006 to March 2008). *Parasitology Research*, 106, 1339–1342.
- Fukumoto, S., Suzuki, H., Igarashi, I., & Xuan, X. (2005). Fatal experimental transplacental *Babesia gibsoni* infections in dogs. *International Journal for Parasitology*, 35, 1031–1035.

- García, A. T. C. (2006). Piroplasma infection in dogs in northern Spain. *Veterinary Parasitology*, 138, 97–102.
- Geurden, T., Six, R., Becskei, C., Maeder, S., Lloyd, A., Mahabir, S., Fourie, J., Liebenberg, J. (2017). Evaluation of the efficacy of sarolaner (Simparica®) in the prevention of babesiosis in dogs. *Parasites & Vectors*, 10, 415.
- Gülanber, A., Gorenflot, A., Schetters, T. P. M., & Carcy, B. (2006). First molecular diagnosis of *Babesia vogeli* in domestic dogs from Turkey. *Veterinary Parasitology*, 139, 224–230.
- Harrus, S., Waner, T., Bjöersdorff, A. (2016). Ehrlichiosis and Anaplasmosis - In M. J. Day (Ed.), *Infectious diseases in dog and cat*. (4th ed.) (pp 167-175). Philadelphia: Saunders, Elsevier.
- Harrus, S., Waner, T., & Neer, T. (2012). *Ehrlichia* and *Anaplasma* Infections: *Ehrlichia canis* - In C.E. Greene (Ed.), *Infectious diseases in dog and cat*. (4th ed.) (pp 227-238). Philadelphia: Saunders, Elsevier.
- Hartelt, K., Rieker, T., Oehme, R.M., Brockmann, S.O., Müller, W., Dorn, N., (2007). First evidence of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) in dogs in Western Europe. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 7, 163-6.
- Harvey, J. (2012) *Ehrlichia* and *Anaplasma* Infections: *Anaplasma platys* Infection (Thrombocytotropic Anaplasmosis). - In C.E. Greene (Ed.), *Infectious diseases in dog and cat*. (4th ed.) (pp 256-260). Philadelphia: Saunders, Elsevier.
- Hodžić, A., Alić, A., Fuehrer, H. P., Harl, J., Wille-Piazzai, W., & Duscher, G. (2015). A molecular survey of vector-borne pathogens in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Bosnia and Herzegovina. *Parasites & Vectors*, 8, 88.
- Homer, M. J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S. R., Krause, P. J., & Persing, D. H. (2000). Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13, 451–469.
- Ionita, M., Mitrea, I. L., Pfister, K., Hamel, D., Buzatu, C. M., & Silaghi, C. (2012). Canine babesiosis in Romania due to *Babesia canis* and *Babesia vogeli*: A molecular approach. *Parasitology Research*, 110, 1659–1664.
- Inokuma H, Okuda M, Ohno K, Shimoda K, Onishi T (2002) Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. *Veterinary Parasitology*, 106, 265–271.
- Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, INSA - Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac (2016). REVIVE 2011-2015 - Culicídeos e Ixodídeos: Rede de Vigilância de Vetores. Lisboa: INSA, IP
- Irwin, P. J. (2016). Canine Babesiosis. In M.J. Day (Eds.). *Arthropod-borne Infectious Diseases of*

the Dog and Cat. (pp. 97-106). London: Manson Publishing.

- Irwin, P. J. (2009). Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasites & Vectors*, 2, 4.
- Jefferies, R., Ryan, U. M., Jardine, J., Broughton, D. K., Robertson, I. D., & Irwin, P. J. (2007a). Blood, Bull Terriers and Babesiosis: Further evidence for direct transmission of *Babesia gibsoni* in dogs. *Australian Veterinary Journal*, 85, 459–463.
- Jefferies, R., Ryan, U. M., Jardine, J., Robertson, I. D., & Irwin, P. J. (2007b). *Babesia gibsoni*: Detection during experimental infections and after combined atovaquone and azithromycin therapy. *Experimental Parasitology*, 117, 115–123.
- Kidd, L., Qurollo, B., Lappin, M., Richter, K., Hart, J. R., Hill, S., Osmond, C., & Breitschwerdt, E. B. (2017). Prevalence of Vector-Borne Pathogens in Southern California Dogs With Clinical and Laboratory Abnormalities Consistent With Immune-Mediated Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31, 1081–1090.
- Kirk, S. K., Levy, J. K., & Crawford, P. C. (2017). Efficacy of Azithromycin and Compounded Atovaquone for Treatment of *Babesia gibsoni* in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31, 1108–1112.
- Kirtz, G., Leschnik, M., Hooijberg, E., Tichy, A., & Leidinger, E. (2012). In-clinic laboratory diagnosis of canine babesiosis (*Babesia canis canis*) for veterinary practitioners in Central Europe. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere - Heimtiere*, 40, 87–94.
- Kjemtrup, A. M., Kocan, A. A., Whitworth, L., Meinkoth, J., Birkenheuer, A. J., Cummings, J., Boudreaux, M.K., Stockham, S.L., Irizarry-Rovira, A., & Conrad, P. A. (2000). There are at least three genetically distinct small piroplasms from dogs. *International Journal for Parasitology*, 30(14), 1501–1505.
- Kjemtrup, A.M., Wainwright, K., Miller, M., Penzhorn, B.L., & Carreno, R.A., (2006) *Veterinary Parasitology*, 138, 103-111.
- Krause, P., Lepore, T., Sikand, V., Gadbaw, J., Burke, G., Telford, S., Brassard, P., Pearl, D., Azlanzadeh, J., Christianson, D., Mcgrath, D., & Splelman, A. (2000). Atavaquone and Azithromycin for the treatment of Babesiosis. *The New England Journal of Medicine*, 343, 1454-1458.
- Kuleš, J., de Torre-Minguela, C., Barić Rafaj, R., Gotić, J., Nižić, P., Ceron, J. J., & Mrljak, V. (2016). Plasma biomarkers of SIRS and MODS associated with canine babesiosis. *Research in Veterinary Science*, 105, 222–228.

- Landum, M., Ferreira, C. C., Calado, M., Alho, A. M., Maurício, I. L., Meireles, J. S., Cunha, C., & Belo, S. (2014). Detection of *Wolbachia* in *Dirofilaria* infected dogs in Portugal. *Veterinary Parasitology*, 204, 407-410.
- Last, R. D., Hill, F. M., Matjila P. T., & Rème CA. (2007). A field trial evaluation of the prophylactic efficacy of amitraz-impregnated collars against canine babesiosis (*Babesia canis rossii*) in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, 78, 63-5.
- Lempereur, L., Beck, R., Fonseca, I., Marques, C., Duarte, A., Santos, M., Zúquete, S., Gomes, J., Walder, G., Domingos, A., Antunes, S., Baneth, G., Silaghi, C., Holman, P., Zintl, A. (2017). Guidelines for the Detection of *Babesia* and *Theileria* Parasites. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 17, 51–65.
- Lin, E. C. Y., Chueh, L. L., Lin, C. N., Hsieh, L. E., & Su, B. L. (2012). The therapeutic efficacy of two antibabesial strategies against *Babesia gibsoni*. *Veterinary Parasitology*, 186, 159–164.
- Liu, P. C., Lin, Y. L., Lin, C. N., & Su, B. L. (2016). A SimpleProbe<sup>®</sup> real-time PCR assay for differentiating the cytochrome b M121I mutation in clinical specimens from dogs infected with *Babesia gibsoni*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7, 639–643.
- Maggi, R. G., Birkenheuer, A. J., Hegarty, B. C., Bradley, J. M., Levy, M. G., & Breitschwerdt, E. B. (2014). Comparison of serological and molecular panels for diagnosis of vector-borne diseases in dogs. *Parasites & Vectors*, 7, 127.
- Maia, C., Ferreira, A., Nunes, M., Vieira, M. L., Campino, L., & Cardoso, L. (2014). Molecular detection of bacterial and parasitic pathogens in hard ticks from Portugal. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5, 409–414.
- Marco, M. del M. F., Hernández-Triana, L. M., Phipps, L. P., Hansford, K., Mitchell, E. S., Cull, B., Swainsbury, C., Fooks, A., Medlock, J., & Johnson, N. (2017). Emergence of *Babesia canis* in southern England. *Parasites & Vectors*, 10, 241.
- Matjila, P. T., Leisewitz, A. L., Jongejan, F., Bertschinger, H. J., & Penzhorn, B. L. (2008). Molecular detection of *Babesia rossii* and *Hepatozoon* sp. in African wild dogs (*Lycaon pictus*) in South Africa. *Veterinary Parasitology*, 157, 123–127.
- Matjila, T. P., Nijhof, A. M., Taoufik, A., Houwers, D., Teske, E., Penzhorn, B. L., Lange, T., Jongejan, F. (2005). Autochthonous canine babesiosis in the Netherlands. *Veterinary Parasitology*, 131, 23–29.
- Messick, J., Harvey, J. (2012) Hemotropic Mycoplasmosis (Hemobartonellosis) - In C.E. Greene (Ed.), *Infectious diseases in dog and cat*. (4<sup>th</sup> ed.) (pp 310-319). Philadelphia: Saunders, Elsevier.



- Millán, J., Proboste, T., Fernández de Mera, I. G., Chirife, A. D., de la Fuente, J., & Altet, L. (2016). Molecular detection of vector-borne pathogens in wild and domestic carnivores and their ticks at the human-wildlife interface. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7, 284–290.
- Miró, G., Checa, R., Papparini, A., Ortega, N., González-Fraga, J. L., Gofton, A., Bartolomé, A., Montoya, A., Gálvez, R., Mayo, P., & Irwin, P. (2015). *Theileria annae* (syn. *Babesia microti-like*) infection in dogs in NW Spain detected using direct and indirect diagnostic techniques: clinical report of 75 cases. *Parasites & Vectors*, 8, 217.
- Miyama, T., Sakata, Y., Shimada, Y., Ogino, S., Watanabe, M., Itamoto, K., Okuda, M., Verdida, R., Xvan, X., Nagasawa, H., & Inokuma, H. (2005). Epidemiological survey of *Babesia gibsoni* infection in dogs in eastern Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science the Japanese Society of Veterinary Science*, 67, 467–471.
- Najm, N. A., Meyer-Kayser, E., Hoffmann, L., Herb, I., Fensterer, V., Pfister, K., & Silaghi, C. (2014). A molecular survey of *Babesia* spp. and *Theileria* spp. in red foxes (*Vulpes vulpes*) and their ticks from Thuringia, Germany. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5, 386–391.
- Nalubamba, K. S., Mudenda, N. B., Namwila, M. M., Mulenga, C. S., Bwalya, E. C., M'Kandawire, E., Saasa, N., Hankanga, C., Oparaocha, E., & Simuunza, M. (2015). A Study of Naturally Acquired Canine Babesiosis Caused by Single and Mixed *Babesia* Species in Zambia: Clinicopathological Findings and Case Management. *Journal of Parasitology Research*, 2015.
- Novacco, M., Meli, M. L., Gentilini, F., Marsilio, F., Ceci, C., Pennisi, M. G., Lombardo, G., Lloret, A., Santos, L., Carrapiço, T., Willi, B., Wolf, G., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2010). Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic mycoplasma infections in Mediterranean countries and analysis of risk factors for infection. *Veterinary Microbiology*, 142, 276–284.
- Øines, Ø., Storli, K., & Brun-Hansen, H. (2010). First case of babesiosis caused by *Babesia canis canis* in a dog from Norway. *Veterinary Parasitology*, 171, 350–353.
- Ord, R., & Lobo, C. (2016). Human Babesiosis: Pathogens, Prevalence, Diagnosis and Treatment - HHS Public Access. *Author Manuscript*, 8, 583–592.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Weigl, S., Latrofa, M., Stanneck, D., Decapariis, D., Capelli, G., & Baneth, G. (2011). Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR. *Parasites & Vectors*, 4, 55.
- Otranto, D., Testini, G., Dantas-Torres, F., Latrofa, M. S., De Paiva Diniz, P. P. V., De Caprariis, D., Lia, R., Mencke, N., Stanneck, D., Capelli, G., & Breitschwerdt, E. B. (2010). Diagnosis of canine vector-borne diseases in young dogs: A longitudinal study. *Journal of Clinical*

*Microbiology*, 48, 3316–3324.

- Otsuka, Y., Yamasaki, M., Yamato, O., & Maede, Y. (2001). Increased Generation of Superoxide in Erythrocytes infected with *Babesia gibsoni*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 63, 1077–1081.
- Oyamada, M., Davoust, B., Dereure, J., & Bucheton, B. (2005). Detection of *Babesia canis rossi*, *B. canis vogeli* and *Hepatozoon canis* in Dogs in a Village of Eastern Sudan by Using a Screening PCR and Sequencing Methodologies. *Clinical and Vaccine Immunology*, 12, 1343–1346.
- Pantchev, N., Pluta, S., Huisinga, E., Nather, S., Scheufelen, M., Vrhovec, M. G., Schweinitz, A., Hampel, H., & Straubinger, R. K. (2015). Tick-borne Diseases (Borreliosis, Anaplasmosis, Babesiosis) in German and Austrian Dogs: Status quo and Review of Distribution, Transmission, Clinical Findings, Diagnostics and Prophylaxis. *Parasitology Research*, 114, 19–54.
- Parola, P., Roux, V., Camicas, J.L., Baradji, I., Brouqui, P., Raoult, D., (2000). Detection of ehrlichiae in African ticks by polymerase chain reaction. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 94, 707-708.
- Penzhorn, B. L., Vorster, I., Harrison-White, R. F., & Oosthuizen, M. C. (2017). Black-backed jackals (*Canis mesomelas*) are natural hosts of *Babesia rossi*, the virulent causative agent of canine babesiosis in sub-Saharan Africa. *Parasites & Vectors*, 10, 124.
- Porchet, M. J., Sager, H., Muggli, L., Oppliger, A., Müller, N., Frey, C., & Gottstein, B. (2007). Etude épidémiologique descriptive de la Babésiose canine dans la Région Lémanique. *Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde*, 149, 457–465.
- Quorollo, B. A., Archer, N. R., Schreeg, M. E., Marr, H. S., Birkenheuer, A. J., Haney, K. N., Thomas, B., & Breitschwerdt, E. B. (2017). Improved molecular detection of *Babesia* infections in animals using a novel quantitative real-time PCR diagnostic assay targeting mitochondrial DNA. *Parasites & Vectors*, 10(1), 128.
- Reddy, B., Sivajothi, S., Varaprasad Reddy, L. S. S., & Solmon Raju, K. G. (2014). Clinical and laboratory findings of *Babesia* infection in dogs. *Journal of Parasitic Diseases*, 40, 268–272.
- René-Martellet, M., Lebert, I., Chêne, J., Massot, R., Leon, M., Leal, A., Badavelli, S., Chalvet-Monfray, K., Ducrot, C., Abrial, D., Chabanne, L., & Halos, L. (2015). Diagnosis and incidence risk of clinical canine monocytic ehrlichiosis under field conditions in Southern Europe. *Parasites & Vectors*, 8, 3.
- René-Martellet, M., Moro, C. V., Chêne, J., Bourdoiseau, G., Chabanne, L., & Mavingui, P. (2015). Update on epidemiology of canine babesiosis in Southern France. *BMC Veterinary Research*,

11, 223.

- Rodríguez, I., Burri, C., Noda, A. A., Douet, V., & Gern, L. (2015). Multiplex PCR for molecular screening of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. and *Babesia* spp. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 22, 642–646.
- Rożej-Bielicka, W., Stypułkowska-Misiurewicz, H., & Gołąb, E. (2015). Human babesiosis. *Przegląd Epidemiologiczny*, 69, 489-94.
- 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. *Parasites & Vectors*, 8, 75.
- Salem, N. Y., & Farag, H. S. (2014). Clinical, Hematologic, and Molecular Findings in Naturally Occurring *Babesia canis vogeli* in Egyptian Dogs. *Veterinary Medicine International*, 2014, 1–6.
- Sánchez-Vizcaíno, F., Wardeh, M., Heayns, B., Singleton, D. A., Tulloch, J. S. P., McGinley, L., Newman, J., Noble, P., Day, M., Jones, A.D., & Radford, A. D. (2016). Canine babesiosis and tick activity monitored using companion animal electronic health records in the UK. *The Veterinary Record*, 179, 358.
- Santos-Silva, M. M., Beati, L., Santos, A. S., De Sousa, R., Nuncio, M. S., Melo, P., Santos-Reis, M., Fonseca, C., Formosinho, P., Vilela, C., & Bacellar, F. (2011). The hard-tick fauna of mainland Portugal (Acari: Ixodidae): An update on geographical distribution and known associations with hosts and pathogens. *Experimental and Applied Acarology*, 55, 85–121.
- Sasaki, M., Omobowale, O., Tozuka, M., Ohta, K., Matsuu, A., Nottidge, H. O., Hirata, H., Ikadai, H., & Oyamada, T. (2007). Molecular survey of *Babesia canis* in dogs in Nigeria. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 69(11), 1191–1193.
- Shein, E., Mehlhorn, H., & Voigt, W.P. (1979) Electron microscopical studies on the development of "*Babesia canis*" (Sporozoa) in the salivary glands of the vector tick "*Dermacentor reticulatus*". *Acta Tropica* 36, 229-241
- Schettters, T. P. M., Kleuskens, J. A. G. M., Scholtes, N. C., Gorenflot, A., Moubri, K., & Vermeulen, A. N. (2001). Vaccination of dogs against heterologous *Babesia canis* infection using antigens from culture supernatants. *Veterinary Parasitology*, 100, 75–86.
- Schurer, J. M., Mosites, E., Li, C., Meschke, S., & Rabinowitz, P. (2016). Community-based surveillance of zoonotic parasites in a "One Health" world: A systematic review. *One Health*, 2, 166–174.

- Sikorski, L. E., Birkenheuer, A. J., Holowaychuk, M. K., McCleary-Wheeler, A. L., Davis, J. M., & Littman, M. P. (2010). Babesiosis caused by a large *Babesia* species in 7 immunocompromised dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *24*, 127–131.
- Simões, P. B., Cardoso, L., Araújo, M., Yisaschar-Mekuzas, Y., & Baneth, G. (2011). Babesiosis due to the canine *Babesia microti*-like small piroplasm in dogs—first report from Portugal and possible vertical transmission. *Parasites & Vectors*, *4*, 50.
- Smith, F. D., Ballantyne, R., Morgan, E. R., & Wall, R. (2011). Prevalence, distribution and risk associated with tick infestation of dogs in Great Britain. *Medical and Veterinary Entomology*, *25*, 377–384.
- Solano-Gallego, L., & Baneth, G. (2011). Veterinary Parasitology Babesiosis in dogs and cats — Expanding parasitological and clinical spectra. *Veterinary Parasitology*, *181*, 48–60.
- Solano-Gallego, L., Sainz, Á., Roura, X., Estrada-Peña, A., & Miró, G. (2016). A review of canine babesiosis: the European perspective. *Parasites & Vectors*, *9*, 336.
- 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. *Veterinary Record* *164*,112-6.
- Taenzler, J., Liebenberg, J., Roepke, R. K. A., & Heckerroth, A. R. (2016). Prevention of transmission of *Babesia canis* by *Dermacentor reticulatus* ticks to dogs after topical administration of fluralaner spot-on solution. *Parasites & Vectors*, *9*, 234.
- Tommasi, A. S., Giannelli, A., de Caprariis, D., Ramos, R. A. N., Di Paola, G., Crescenzo, G., Dantas-Torres, F., Baneth, G., & Otranto, D. (2014). Failure of imidocarb dipropionate and toltrazuril/emodepside plus clindamycin in treating *Hepatozoon canis* infection. *Veterinary Parasitology*, *200*, 242–245.
- Trotta, M., Carli, E., Novari, G., Furlanello, T., & Solano-Gallego, L. (2009). Clinicopathological findings, molecular detection and characterization of *Babesia gibsoni* infection in a sick dog from Italy. *Veterinary Parasitology*, *165*, 318–322.
- 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. *Clinical Microbiology and Infection*, *15*, 62–63.
- Uilenberg, G. (2006). *Babesia* — A historical overview. *Veterinary Parasitology*, *138*, 3–10.
- Vannier, E., & Krause P. (2012). Human Babesiosis - current concepts. *The New England Journal of Medicine*, *366*, 2397-707.

- Varanat, M., Maggi, R. G., Linder, K. E., & Breitschwerdt, E. B. (2011). Molecular prevalence of *Bartonella*, *Babesia*, and hemotropic *Mycoplasma* sp. in dogs with splenic disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25, 1284–1291.
- Vercammen, F., Deken, R., & Maes, L. (1996). Prophylactic treatment of experimental canine babesiosis (*Babesia canis*) with doxycycline. *Veterinary Parasitology*, 66, 251–255.
- Vial, H. J., & Gorenflot, A. (2006). Chemotherapy against babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 138, 147–160.
- Víchová, B., Horská, M., Blaňarová, L., Svihran, M., Andersson, M., & Pe'ko, B. (2016). First molecular identification of *Babesia gibsoni* in dogs from Slovakia, central Europe. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7, 54–59.
- Víchová, B., Miterpáková, M., & Iglódyová, A. (2014). Molecular detection of co-infections with *Anaplasma phagocytophilum* and/or *Babesia canis canis* in *Dirofilaria*-positive dogs from Slovakia. *Veterinary Parasitology*, 203, 167–172.
- Welc-Faleciak, R., Rodo, A., Siński, E., & Bajer, A. (2009). *Babesia canis* and other tick-borne infections in dogs in Central Poland. *Veterinary Parasitology*, 166, 191–198.
- Wulansari, R., Wijaya, A., Ano, H., Horii, Y., Nasu, T., Yamane, S., & Makimura, S. (2003). Clindamycin in the treatment of *Babesia gibsoni* infections in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 39, 558-62.
- Xufre, A. (2014). Integração e importância das estratégias moleculares na monitorização do estado de saúde em animais de companhia. In Cunha, M., Inácio, j., (Eds.) *Abordagens moleculares em Veterinária; Como desvendar a etiologia e a epidemiologia da infeção*. Lisboa: Lidel - edições técnicas.
- Yabsley, M. J., & Shock, B. C. (2013). Natural history of Zoonotic *Babesia*: Role of wildlife reservoirs. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 2, 18–31.
- Yeagley, T. J., Reichard, M. V, Hempstead, J. E., Allen, K. E., Parsons, L. M., White, M. a, Little, S., & Meinkoth, J. H. (2009). Detection of *Babesia gibsoni* and the canine small *Babesia* “Spanish isolate” in blood samples obtained from dogs confiscated from dogfighting operations. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 235, 535–539.
- Zahler, M., Rinder, H., Schein, E., & Gothe, R. (1998). Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. *Parasitology Research*, 84, 544–548.
- Zahler, M., Rinder, H., Schein, E., & Gothe, R. (2000). Detection of a new pathogenic *Babesia*

*microti-like* species in dogs. *Veterinary Parasitology*, 89, 241–248.

Zanet, S., Trisciuglio, A., Bottero, E., de Mera, I. G., Gortazar, C., Carpignano, M., & Ferroglio, E. (2014). Piroplasmosis in wildlife: *Babesia* and *Theileria* affecting free-ranging ungulates and carnivores in the Italian Alps. *Parasites & Vectors*, 7, 70.

Zhou, X., Xia, S., Huang, J. L., Tambo, E., Zhuge, H. X., & Zhou, X. N. (2014). Human babesiosis, an emerging tick-borne disease in the People's Republic of China. *Parasites & Vectors*, 7, 509.

## ANEXOS

### Anexo I. Critérios de inclusão de amostras para o grupo 1, constituído por cães apresentados à consulta no Hospital Escolar Veterinário.

Tabela i - Sinais clínicos e biológicos utilizados na inclusão de casos clínicos para o grupo 1.

Sinais Clínicos	Alterações de Hemograma
Febre	Trombocitopenia moderada a grave
Prostração	Anemia
Anorexia	
Mucosas pálidas	
Icterícia	
Linfoadenomegália	
Hematúria	
Esplenomegalia	

---

**Anexo II. Inquérito preenchido pelos tutores responsáveis pelo cão incluído no presente estudo, e em concordância com os dados fornecidos pelo Médico Veterinário.**

Eu abaixo assinado, declaro que autorizo a recolha dos dados clínicos e a colheita de 1mL de sangue do/a cão/cadela \_\_\_\_\_ (nome), com \_\_\_\_\_ meses/anos (idade), \_\_\_\_\_ (raça), no âmbito do estudo sobre "Babesiose canina" destinado às provas de Mestrado Integrado de Medicina Veterinária, da aluna Ana Mafalda Dordio.

\_\_\_\_\_  
(Assinatura)

\_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

(Data)

Dados importantes sobre o animal:

1. História pregressa:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

2. Sexo:

Macho Inteiro

Fêmea Inteira

Macho castrado

Fêmea esterilizada

3. Desde quando está com os donos? \_\_\_\_\_

4. Qual a aptidão?

Caça

Companhia

Guarda

Outra: \_\_\_\_\_

5. Qual a proveniência:

Loja

Criador

Canil

Oferecido por particular

Rua/Animal errante

6. Onde reside habitualmente? \_\_\_\_\_ (Concelho e distrito de residência)

7. Qual o local onde habita?

Dentro de casa

No exterior

Misto

8. Viajou para fora de Portugal?

Sim

Não

8.1. Se sim, para onde? \_\_\_\_\_ (País)



9. Viaja ou viajou dentro de Portugal?  Sim  Não

9.1. Se sim, para onde ? \_\_\_\_\_ (Concelho(s))

10. Alguma vez observou carraças no animal?  Sim  Não

11. Alguma vez teve história de febre da carraça?  Sim  Não

Se sim:

11.1 Quando? \_\_\_\_\_

11.2 Foi submetido a algum tratamento etiológico?  Sim  Não

a) Se sim, qual foi o tratamento aplicado? \_\_\_\_\_

b) Se sim, o animal recuperou clinicamente?  Sim  Não

c) Se não, o animal recuperou clinicamente de forma espontânea?

Sim  Não

12. Encontra-se desparasitado externamente?  Sim  Não

Se sim:

12.1 Qual o nome comercial/princípio ativo? \_\_\_\_\_

12.2 Qual a forma de aplicação? \_\_\_\_\_

12.3 Qual a regularidade de aplicação do desparasitante (Intervalo em meses)? \_\_\_\_\_

13. Encontra-se vacinado contra a Babesiose?  Sim  Não

Se sim:

13.1 Qual a vacina administrada?  Pirodog®  Novibac® Piro

13.2 Quando realizou a primovacinação? \_\_\_\_\_

13.3 A primovacinação foi completa?  Sim  Não

13.4 Tem feito os reforços desta vacina?  Sim  Não

14. Alguma vez foi submetido a uma transfusão sanguínea?  Sim  Não

14.1 Se sim: Quando ? \_\_\_\_\_

15. Tem doenças concomitantes?  Sim  Não

Se sim:

15.1 Quais? \_\_\_\_\_

15.2 Quando surgiram? \_\_\_\_\_

15.3 Fez tratamento etiológico? \_\_\_\_\_

16. Atualmente faz alguma medicação?  Sim  Não

16.1 Se sim: Qual a medicação: \_\_\_\_\_

17. Foi mordido por algum cão nas últimas 4-8 semanas?  Sim  Não

**Anexo III. Inquérito preenchido pelo Médico Veterinário ou técnico responsável do Canil Municipal ou Associação de Proteção Animal.**

Eu, \_\_\_\_\_, declaro que autorizo a recolha dos dados clínicos e a colheita de 1mL de sangue de cada animal abaixo indicados, que pertencem ao Canil \_\_\_\_\_, no âmbito do estudo sobre "Babesiose canina" destinado às provas de Mestrado Integrado de Medicina Veterinária, da aluna Ana Mafalda Dordio.

Nome \_\_\_\_\_; Idade \_\_\_\_\_ (meses/anos); Raça \_\_\_\_\_

1. História pregressa:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

2. Sexo:  Macho Inteiro  Fêmea Inteira  
 Macho castrado  Fêmea esterilizada

3. Desde quando está no canil? \_\_\_\_\_

4. Alguma vez teve história de febre da carraça?  Sim  Não

Se sim:

4.1 Quando? \_\_\_\_\_

4.2 Foi submetido a algum tratamento etiológico?  Sim  Não

a) Se sim, qual foi o tratamento aplicado? \_\_\_\_\_

b) Se sim, o animal recuperou clinicamente?  Sim  Não

c) Se não, o animal recuperou clinicamente de forma espontânea?

Sim  Não

5. Encontra-se desparasitado externamente?  Sim  Não

Se sim:

5.1 Qual o nome comercial/princípio ativo? \_\_\_\_\_

5.2 Qual a forma de aplicação? \_\_\_\_\_

5.3 Qual a regularidade de aplicação do desparasitante (Intervalo em meses)? \_\_\_\_\_

6. Encontra-se vacinado contra a Babesiose?  Sim  Não

Se sim:

6.1 Qual a vacina administrada?  Pirodog®  Novibac® Piro

6.2 Quando realizou a primovacinação? \_\_\_\_\_

6.3 A primovacinação foi completa?  Sim  Não

6.4 Tem feito os reforços desta vacina?  Sim  Não

7. Alguma vez foi submetido a uma transfusão sanguínea?  Sim  Não

7.1 Se sim: Quando? \_\_\_\_\_

8. Tem doenças concomitantes?  Sim  Não

Se sim:

8.1 Quais? \_\_\_\_\_

8.2 Quando surgiram? \_\_\_\_\_

8.3 Fez tratamento etiológico? \_\_\_\_\_

9. Atualmente faz alguma medicação?  Sim  Não

9.1 Se sim: Qual a medicação: \_\_\_\_\_

#### **Anexo IV. Protocolo de extração de DNA a partir de sangue total (DNeasy Blood & Tissue Kit®).**

Para a extração de DNA, foi realizado previamente um *pellet* sanguíneo, que permitiu obter uma maior concentração de material genético na amostra e facilitar a lise celular. A extração de ácidos nucleicos foi realizada com o kit DNeasy Blood & Tissue® (Qiagen, GmbH, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

1. Pipetar 800 µl de sangue com EDTA para um tubo de microcentrífuga, de 2 ml.
2. Adicionar 1ml de água bidestilada; agitar no vortex.
3. Centrifugar a 2500 x g durante 5 min.
4. Descartar o sobrenadante, deixando no fundo do tubo um *pellet* branco e líquido residual. Adicionar ao mesmo 1,5ml de água bidestilada; fazer um vortex durante 10 segundos para ressuspender as células no líquido residual.
5. Repetir os passos 3 e 4 por duas vezes consecutivas, de forma a que o sobrenadante fique límpido.
6. Adicionar 300 µL de água bidestilada ao *pellet*.
7. Adicionar 20 µL de Proteinase K a 200 µL do *pellet* sanguíneo.
8. Adicionar 200 µL de Tampão AL, vortexar e incubar a 56°C por 10 min.
9. Adicionar 200 µL de Etanol a 100% e vortexar.
10. Pipetar a amostra para uma coluna *DNeasy*, centrifugar 1 minuto a 8000 rpm.
11. Descartar o sobrenadante e adicionar 500 µL de tampão AW1, centrifugar 1 minuto a 8000 rpm.
12. Descartar o sobrenadante e adicionar 500 µL de tampão AW2, centrifugar 1 minuto a 8000 rpm.
13. Descartar o sobrenadante e centrifugar 3 minutos a 13.000 rpm.
14. Transferir a coluna para um novo eppendorf de 1,5 mL e adicionar 200 µL de Tampão AE (Pode-se usar menos tampão para aumentar a concentração do DNA). Centrifugar 1 minuto a 8000 rpm.
15. Quantificar cada amostra por espectrofotometria utilizando o Nanodrop 2000c (Thermo Scientific®).
16. Conservar as extrações de DNA a -20°C para futuras utilizações.

**Anexo V. Programa do termociclador para a recção da PCR convencional, para pesquisa de *Babesia* spp. pelo Método 1, Método 2 e pesquisa de outros agentes patogénicos transmitidos por ixodídeos.**

Tabela ii - Programa de amplificação dos géneros *Babesia* e *Theileria* por PCR convencional. Método 1 realizado com utilização do termociclador MJ Mini Gradient Thermal Cycler (BIO-RAD®) e Método 2 realizado com utilização do termociclador Alpha Cycler 2 (PCRmax®).

	Passo inicial de desnaturação	Ciclos da PCR			Passo final de extensão
		Desnaturação	Hibridação	Extensão	
<b>Método 1</b>	94°C/5 min	94°C/30 seg	60°C/30 seg	72°C/45 seg	72°C/5 min
			30 ciclos		
<b>Método 2</b>	94°C/2 min	94°C/30 seg	53°C/30 seg	72°C/30 seg	72°C/7 min
			40 ciclos		

Tabela iii - Programa de amplificação de outros agentes etiológicos, anteriormente referidos por PCR convencional, realizado no termociclador Alpha Cycler 2 (PCRmax®).

Agente etiológico	Passo inicial de desnaturação	Ciclos da PCR			Passo final de extensão
		Desnaturação	Hibridação	Extensão	
<b><i>Hepatozoon</i> spp.</b>	94°C/2 min	94°C/40 seg	59°C/40 seg	72°C/60 seg	72°C/7 min
			40 ciclos		
<b>Anaplasmataceae</b>	94°C/2 min	94°C/30 seg	53°C/30 seg	72°C/30 seg	72°C/7 min
			40 ciclos		
<b><i>Mycoplasma</i> spp.</b>	94°C/2 min	94°C/30 seg	68°C/30 seg	72°C/30 seg	72°C/7 min
			40 ciclos		

Anexo VI. Listagem de resultados dos questionários individuais realizados aos responsáveis pelos cães do grupo 1, com suspeita de Babesiose Canina e resultados de infeções detetadas por observação direta ao MO e cPCR (n= 49).

eN	Sexo	Idade	Raça	Idade com que foi para casa dos donos	Aptidão	Proveniência	Concelho Residência	Local Habitação	Viagem Estrangeiro	Viagem Portugal (Localização)	Observação Carraças	Historial Febre da carraça	Tratamento etiológico	Desparasitação externa	Observação Esfregaço sanguíneo	PCR convencional + Sequenciação
1	MI	≥ 10 a	Labrador Retriever	3 m	CO	CR	Cascais	M	N	Algarve	N	N	n.a	R	neg	neg
2	M C	2-5 a	Boxer	2 a	CO	CR	Lisboa	I	N	N	N	N	Não	R	neg	<i>H. canis</i>
3	MI	≥10 a	Cocker Spaniel	2 m	CO	CR	Lisboa	I	N	Algarve	S	S	DI	R	neg	<i>A. platys + H.canis</i>
4	FE	2-5 a	Bulldog Inglês	1,5 m	CO	CR	Lisboa	I	N	N	S	N	n.a	R	neg	neg
5	MI	2-5 a	Indeterminada	4 m	CO	AR	Cascais	M	N	Algarve, Leiria	N	N	n.a	R	neg	neg
6	FI	≥10 a	Cocker Spaniel	2 m	CO	CR	Sesimbra	M	N	Algarve	S	N	n.a	N	neg	neg
7	MI	2-5 a	Dálmata	1,5 m	CO	CR	Amadora	I	N	Algarve	S	N	n.a	N	neg	neg
8	FE	2-5 a	Bull Terrier	3 m	CO	CR	Setúbal	I	N	Algarve	N	N	n.a	R	neg	neg
9	FE	≥ 10 a	Epagneul Breton	1 d	CA	OP	Oeiras	E	N	Beira Alta, Arganil	S	S	Doxi	R	neg	neg
10	M C	6-9 a	Indeterminada	1 m	G	CA	Lisboa	E	N	Algarve, Alentejo	S	S	DI	N	neg	neg
11	MI	≤ 1 a	Labrador Retriever	2,5 m	CO	L	Loures	I	N	Tomar, Alentejo	N	N	n.a	R	neg	neg
12	MI	≤1 a	Pastor Australiano	10 m	CO	CA	Amadora	M	N	Setúbal	S	N	n.a	N	neg	neg
13	MI	≥10 a	Cocker Spaniel	4 m	CO	CR	Santarém	E	N	Caldas da Rainha e Algarve	S	N	n.a	R	neg	neg
14	MI	6-9 a	Pastor Alemão	2 m	G	OP	Sintra	E	N	N	S	N	n.a	R	neg	neg
15	MI	6-9 a	Labrador Retriever	3 m	CO	CR	Lisboa	I	N	Algarve	S	N	n.a	R	neg	neg

Legenda: FE: Fêmea Esterelizada; FI: Fêmea Inteira; MC: Macho castrado; MI: Macho Inteiro; a: anos; m: meses; CAC: Caça; G: Guarda; CO: Companhia; AR: Rua/animal errante; OP: Oferecido por particular; L: Loja; CR: Criador; CA: Canil; N: Não; S: Sim; n.a: Não aplicável; R: Regular; NR: Não regular; neg: negativo; DI: Dipropionato de imidocarb; Doxi: Doxicilina

N <sup>a</sup>	Sexo	Idade	Raça	Idade com que foi para casa dos donos	Aptidão	Proveniência	Concelho Residência	Local Habitação	Viagem Estrangeiro	Viagem Portugal (Localização)	Observação Carraças	Historial Febre da carraça	Tratamento etiológico	Desparasitação	Observação Esmregaço sanguíneo	PCR convencional + Sequenciação
16	FE	≥10 a	Perdigueiro Português	2 m	CO	OP	Sintra	M	N	Viseu	S	N	n.a	N	neg	neg
17	FI	2-5 a	Indeterminada	5a	CO	AR	Lisboa	I	N	N	S	N	n.a	R	<i>Hepatozoon</i> spp.	<i>H. canis</i>
18	MI	6-9 a	Indeterminada	3a	CO	CA	Odivelas	I	N	N	N	N	n.a	R	neg	neg
19	MI	≤1 a	Indeterminada	3 m	CO	CA	Lisboa	I	N	N	N	N	n.a	R	neg	<i>H. canis</i>
20	FI	2-5 a	Pastor Alemão	1,5 m	G	CR	Lourinhã	E	N	N	S	N	n.a	R	neg	neg
21	FI	6-9 a	Labrador R.	2 m	CO	OP	Cascais	I	Espanha	Alentejo	S	N	n.a	R	<i>Mycoplasma</i> spp.	neg
22	MI	2-5 a	Indeterminada	2 m	CO	OP	Mafra	E	N	N	N	N	n.a	N	<i>Hepatozoon</i> spp.	<i>H. canis</i>
23	MI	2-5 a	Basset ound	2 m	CO	CR	Sintra	E	N	N	N	N	n.a	R	neg	neg
24	FI	≥10 a	Dálmata	2 m	CO	OP	Cascais	E	N	N	N	N	n.a	N	neg	neg
25	MI	6-9 a	Indeterminada	3 m	G	OP	Lisboa	E	N	N	N	N	n.a	N	neg	neg
26	FE	≥10 a	Epagueul Breton	5 a	CAC	OP	Oeiras	E	N	Regiões Sul	S	N	n.a	R	Filárias e <i>Hepatozoon</i> spp.	neg
27	MI	≥10 a	Castro Labreiro	3,5 m	CO	L	Mafra	M	N	Alentejo, Algarve	S	N	n.a	R	neg	neg
28	FI	6-9 a	Dog Argentino	7 a	CO	CR	Loures	M	N	Castelo Branco	S	N	n.a	N	neg	neg
29	MI	≥10 a	Pastor Alemão	4 a	CO	CR	Lisboa	M	Marrocos	Alentejo	S	N	n.a	R	neg	neg
30	FI	6-9 a	Shar-pei	3 m	CO	L	VFX	I	N	Algarve	N	N	n.a	R	neg	neg
31	MC	≥10 a	Indeterminada	2 m	CO	OP	Sintra	I	N	N	N	N	n.a	N	neg	neg
32	FE	2-5 a	Teckel	2 m	CO	CR	Loures	I	N	Alentejo	N	N	n.a	R	neg	neg
33	MC	≥10 a	Indeterminada	7 sem	CO	CA	Sintra	I	Espanha	Alentejo, Algarve	S	S	Doxi	R	neg	neg
34	MI	6-9 a	Indeterminada	1 a	G	AR	Seixal	E	N	N	S	N	n.a	R	neg	neg

Legenda: FE: Fêmea Esterelizada; FI: Fêmea Inteira; MC: Macho castrado; MI: Macho Inteiro; a: anos; m: meses; CAC: Caça; G: Guarda; CO: Companhia; AR: Rua/animal errante; OP: Oferecido por particular; L: Loja; CR: Criador; CA: Canil; N: Não; S: Sim; n.a: Não aplicável; R: Regular; NR: Não regular, neg: negativo; DI: Dipropionato de imidocarb; Doxi: Doxicilina

N <sup>a</sup>	Sexo	Idade	Raça	Idade com que foi para casa dos donos	Aptidão	Proveniência	Concelho Residência	Local Habitação	Viagem Estrangeiro	Viagem Portugal (Localização)	Observação Historial	Tratamento etiológico	Desparasitação externa	Observação Esfregaço sanguíneo	PCR convencional + Sequenciação
35	MI	2-5 a	Setter Inglês	2 a	CA C	CR	Amadora	E	Espanha	Norte a Sul	S N	n.a	R	neg	neg
36	MI	≥ 10 a	Cocker Spaniel	2 m	CO	OP	Amadora	I	N	Algarve	S N	n.a	N	neg	neg
37	MI	≥ 10 a	Pointer Inglês	2 m	CA C	CR	Lisboa	I	N	Algarve, Santarém	S N	n.a	N	neg	neg
38	MI	6-9 a	Teckel miniatura	3 m	CO	CR	Oeiras	I	N	Abrantes	S N	n.a	R	neg	<i>M. haemocanis</i>
39	FE	≥ 10 a	Indeterminada	4 a	CO	AR	Santarém	E	Espanha	Porto, Ribatejo	S N	n.a	R	neg	neg
40	FI	2-5 a	Indeterminada	2 m	CO	OP	Odivelas	M	N	Setúbal	S N	n.a	N	neg	neg
41	FE	6-9 a	Indeterminada	1 ano	CO	CA	Oeiras	I	N	Algarve	N S	DI	R	neg	neg
42	M C	6-9 a	Rottweiler	2 m	CO	OP	Oeiras	M	N	Alentejo	S N	n.a	N	neg	neg
43	FE	≥ 10 a	Indeterminada	13 a	CO	OP	Oeiras	I	N	N	S N	n.a	R	<i>A. platys</i>	<i>A. platys</i>
44	FE	≥ 10 a	Yorkshire Terrier	2 m	CO	CR	Oeiras	I	N	Guarda	S N	n.a	R	neg	neg
45	FI	2-5 a	Indeterminada	2 m	CO	OP	Loures	I	N	Trás-os-montes	S N	n.a	N	<i>Babesia</i> de grandes dimensões	<i>B. canis</i>
46	M C	6-9 a	Labrador R.	6 m	CO	OP	Santarém	E	Bruxelas	N	N N	n.a	R	Filárias infeção mista	<i>W. pipiens</i>
47	MI	>= 10 a	Papillon	15 a	CO	CR	Sintra	I	Alemanha, Bélgica	N	S N	n.a	R	neg	neg
48	FE	>= 10 a	Indeterminada	2 m	CO	OP	Cascais	E	N	Chaves	S N	n.a	N	n.a.	<i>B. canis</i>
49	FE	>= 10 anos	Labrador Retriever	3 meses	CO	CR	Barreiro	M	N	N	S N	n.a	N	n.a.	<i>B. vogeli</i>

Legenda: FE: Fêmea Esterelizada; FI: Fêmea Inteira; MC: Macho castrado; MI: Macho Inteiro; m: meses; a: ano(s); CAC: Caça; G: Guarda; CO: Companhia; AR: Rua/animal errante; OP: Oferecido por particular; L: Loja; CR: Criador; CA: Canil; N: Não; S: Sim; n.a: Não aplicável; R: Regular; NR: Não regular; neg: negativo; DI: Dipropionato de imidocarb; Doxi: Doxicilina



**Anexo VII. Listagem de resultados dos questionários individuais realizados aos responsáveis pelos cães do grupo 2, aparentemente saudáveis e com contacto prévio com ixodídeos e resultados de infeções detetadas por observação direta ao MO e cPCR (n= 94).**

Nº	Sexo	Idade	Raça	Localização Canil	Tempo permanência	Historial Febre da carraça	Tratamento etiológico	Desparasitação externa	Observação Esgregaço sanguíneo	PCR convencional + Sequenciação
1	MI	2-5 a	Indeterminada	Odivelas	1 m	n.a	n.a	NR	neg	neg
2	FI	2-5 a	Indeterminada	Odivelas	3 sem	n.a	n.a	NR	neg	<i>A. platys</i>
3	FE	2-5 a	Indeterminada	Odivelas	1 m	n.a	n.a	NR	neg	<i>H. canis</i>
4	MI	2-5 a	Labrador R.	Odivelas	2 m	n.a	n.a	NR	neg	<i>H. canis</i>
5	MI	6-9 a	Dálmata	Torres Vedras	2 sem	n.a	n.a	NR	neg	<i>H. canis</i> + <i>M. haemocanis</i>
6	FI	2-5 a	Perdigueiro Português	Torres Vedras	2 sem	n.a	n.a	NR	<i>Hepatozoon spp.</i>	<i>H. canis</i>
7	FI	2-5 a	Indeterminada	Torres Vedras	1 sem	n.a	n.a	NR	neg	<i>H. canis</i>
8	MI	2-5 a	Indeterminada	Torres Vedras	2 sem	n.a	n.a	NR	<i>Hepatozoon spp.</i>	<i>H. canis</i>
9	FE	2-5 a	Galgo Inglês	Torres Vedras	1 sem	n.a	n.a	NR	neg	neg
10	MI	2-5 a	Braco Alemão	Torres Vedras	1 sem	n.a	n.a	NR	neg	neg
11	FE	2-5 a	Husky Siberiano	Torres Vedras	1 sem	n.a	n.a	NR	<i>Ehrlichia spp.</i> + <i>Anaplasma platys</i>	neg
12	MI	2-5 a	Indeterminada	Torres Vedras	3 m	n.a	n.a	NR	<i>Hepatozoon spp.</i>	<i>H. canis</i>
13	MI	≤ 1 a	Indeterminada	Torres Vedras	2 sem	n.a	n.a	NR	neg	neg
14	MI	2-5 a	Epagneul Breton	Torres Vedras	1 a	n.a	n.a	R	<i>Mycoplasma spp.</i>	<i>M. haemocanis</i>
15	FI	6-9 a	Braco Alemão	Torres Vedras	8 m	n.a	n.a	R	neg	neg
16	MI	6-9 a	Indeterminada	Torres Vedras	2 sem	n.a	n.a	NR	neg	neg
17	MI	6-9 a	Indeterminada	Torres Vedras	1 d	n.a	n.a	NR	neg	neg
18	MI	2-5 a	Podengo Português	Lisboa	3 sem	n.a	n.a	NR	neg	<i>A. platys</i> + <i>H. canis</i>
19	FI	2-5 a	Podengo Português	Lisboa	3 sem	n.a	n.a	NR	<i>Hepatozoon spp.</i>	<i>H. canis</i>
20	FI	2-5 a	Podengo Português	Lisboa	3 sem	n.a	n.a	NR	neg	neg
21	MI	2-5 a	Podengo Português	Lisboa	3 sem	n.a	n.a	NR	neg	neg
22	MI	2-5 a	Podengo Português	Lisboa	3 sem	n.a	n.a	NR	<i>Hepatozoon spp.</i>	<i>A. platys</i> + <i>H. canis</i>

Legenda: FE: Fêmea Esterelizada; FI: Fêmea Inteira; MC: Macho castrado; MI: Macho Inteiro; sem: semana(s); a: ano(s); m: mese(s); N: Não; S: Sim; n.a: Não aplicável; R: Regular; NR: Não regular; neg: negativo

Nº	Sexo	Idade	Raça	Localização Canil	Tempo permanência	Historial Febre da carraça	Tratamento etiológico	Desparasitação externa	Observação Estrepto sanguíneo	PCR convencional + Sequenciação
23	FI	2-5 a	Podengo Português	Lisboa	3 sem	n.a	n.a	NR	neg	neg
24	FI	2-5 a	Indeterminada	Amadora	1 sem	n.a	n.a	NR	neg	neg
25	MI	≤ 1 a	Indeterminada	Amadora	5 m	n.a	n.a	NR	neg	neg
26	MI	2-5 a	Indeterminada	Amadora	1 m	n.a	n.a	NR	neg	neg
27	MI	2-5 a	Indeterminada	Amadora	3 sem	n.a	n.a	NR	neg	neg
28	MC	6-9 a	Perdigueiro Português	Amadora	6 a	n.a	n.a	R	neg	neg
29	MI	6-9 a	Braco Alemão	Amadora	6 a	n.a	n.a	R	neg	neg
30	FI	2-5 a	Indeterminada	Lourinhã	2 sem	n.a	n.a	NR	neg	<i>A. platys + H.canis</i>
31	MI	6-9 a	Indeterminada	Lourinhã	3 sem	n.a	n.a	NR	<i>Mycoplasma spp. + Hepatozoon spp.</i>	<i>H. canis + M. haematoparvum</i>
32	FE	≤ 1 a	Indeterminada	Lourinhã	2 m	n.a	n.a	NR	neg	<i>H. canis</i>
33	FE	2-5 a	Indeterminada	Lourinhã	1 a	n.a	n.a	R	<i>Mycoplasma spp.</i>	neg
34	FE	6-9 a	Indeterminada	Lourinhã	2 m	n.a	n.a	NR	neg	<i>H. canis</i>
35	MC	2-5 a	Indeterminada	Lourinhã	1 a	n.a	n.a	R	neg	neg
36	MI	≤ 1 a	Indeterminada	Lourinhã	3 sem	n.a	n.a	NR	neg	neg
37	FI	≤ 1 a	Indeterminada	Lourinhã	2 m	n.a	n.a	NR	neg	neg
38	MI	≤ 1 a	Indeterminada	Lourinhã	1 sem	n.a	n.a	NR	neg	neg
39	MI	≤ 1 a	Indeterminada	Lourinhã	1 m	n.a	n.a	NR	<i>Hepatozoon spp.</i>	<i>H. canis</i>
40	FI	6-9 a	Indeterminada	Lourinhã	1 m	n.a	n.a	NR	<i>Mycoplasma spp.</i>	<i>M. haemocanis</i>
41	FI	≤ 1 a	Indeterminada	Cadaval	1 m	n.a	n.a	NR	neg	neg
42	FE	2-5 a	Indeterminada	Cadaval	5 m	n.a	n.a	NR	neg	neg
43	MI	2-5 a	Indeterminada	Cadaval	10 m	n.a	n.a	NR	neg	neg
44	FE	2-5 a	Podengo Português	Cadaval	1 a	n.a	n.a	NR	<i>Hepatozoon spp.</i>	<i>H. canis + M. haemocanis</i>
45	FE	≤ 1 a	Indeterminada	Cadaval	4 m	n.a	n.a	NR	neg	<i>H. canis</i>

Legenda: FE: Fêmea Esterilizada; FI: Fêmea Inteira; MC: Macho castrado; MI: Macho Inteiro; sem: semana(s); a: ano(s); m: mese(s); N: Não; S: Sim; n.a: Não aplicável; R: Regular; NR: Não regular; neg: negativo

Nº	Sexo	Idade	Raça	Localização Canil	Tempo permanência	Historial Febre da carraça	Tratamento etiológico	Desparasitação externa	Observação Esfregaço sanguíneo	PCR convencional + Sequenciação
46	MC	2-5 a	Indeterminada	Cadaval	8 m	n.a	n.a	NR	<i>A. platys</i>	<i>A. platys</i>
47	MC	2-5 a	Indeterminada	Cadaval	3 m	n.a	n.a	NR	neg	neg
48	MI	2-5 a	Indeterminada	Lisboa	2 sem	n.a	n.a	NR	<i>Hepatozoon</i> spp.	<i>H. canis</i>
49	MI	2-5 a	Indeterminada	Lisboa	1 m	n.a	n.a	NR	neg	neg
50	MC	6-9 a	Indeterminada	Lisboa	2 m	n.a	n.a	NR	neg	neg
51	MI	≥ 10 a	Indeterminada	Lisboa	1 m	n.a	n.a	NR	<i>A. platys</i> + <i>Mycoplasma</i> spp.	<i>A. platys</i> + <i>M. haematoparvum</i>
52	MC	2-5 a	Indeterminada	Lisboa	2 m	n.a	n.a	NR	neg	neg
53	FI	2-5 a	Indeterminada	Lisboa	2 sem	n.a	n.a	NR	neg	neg
54	MI	2-5 a	Indeterminada	Lisboa	1 d	n.a	n.a	NR	neg	neg
55	MI	6-9 a	Indeterminada	Lisboa	5 m	n.a	n.a	NR	neg	neg
56	MC	2-5 a	Indeterminada	Lisboa	2 a	n.a	n.a	R	neg	neg
57	FI	2-5 a	Indeterminada	Lisboa	1 sem	n.a	n.a	NR	neg	neg
58	MC	≤ 1 a	Indeterminada	Lisboa	2 m	n.a	n.a	NR	neg	neg
59	FI	≥ 10 a	Indeterminada	Lisboa	6 m	n.a	n.a	R	neg	neg
60	MI	2-5 a	Indeterminada	Lisboa	1 m	n.a	n.a	NR	neg	neg
61	MC	≤ 1 ano	Indeterminada	Lisboa	2 m	n.a	n.a	NR	neg	neg
62	MC	≤ 1 ano	Indeterminada	Lisboa	2 m	n.a	n.a	NR	neg	neg
63	MC	≥ 10 a	Indeterminada	Lisboa	1 a	n.a	n.a	R	neg	neg
64	MC	6-9 a	Indeterminada	Lisboa	3 m	n.a	n.a	NR	neg	neg
65	MC	2-5 a	Indeterminada	Lisboa	2 a	n.a	n.a	R	neg	neg
66	MI	6-9 a	Indeterminada	Lisboa	1 a	n.a	n.a	R	neg	neg
67	FE	2-5 a	Indeterminada	Lisboa	3 m	n.a	n.a	NR	neg	neg
68	FI	6-9 a	Epagneul Breton	Torres Vedras	2 sem	n.a	n.a	NR	neg	<i>A. platys</i> + <i>H. canis</i>
69	FI	2-5 a	Indeterminada	Torres Vedras	3 m	n.a	n.a	NR	<i>Mycoplasma</i> spp. + <i>Hepatozoon</i> spp.	<i>H. canis</i> + <i>M. haematoparvum</i>
70	FE	6-9 a	Indeterminada	Torres Vedras	1 m	n.a	n.a	NR	neg	neg

Legenda: FE: Fêmea Esterelizada; FI: Fêmea Inteira; MC: Macho castrado; MI: Macho Inteiro; sem: semana(s); a: ano(s); m: mese(s); N: Não; S: Sim; n.a: Não aplicável; R: Regular; NR: Não regular; neg: negativo

Nº	Sexo	Idade	Raça	Localização Canil	Tempo permanência	Historial Febre da carraça	Tratamento etiológico	Desparasitação externa	Observação Esfregaço sanguíneo	PCR convencional + Sequenciação
71	MI	≤ 1 a	Indeterminada	Torres Vedras	4 sem	n.a	n.a	NR	<i>Mycoplasma</i> spp.	neg
72	MI	≤ 1 a	Indeterminada	Torres Vedras	3 m	n.a	n.a	NR	neg	neg
73	MI	≤ 1 a	Indeterminada	Torres Vedras	9 m	n.a	n.a	R	neg	neg
74	MI	≤ 1 a	Indeterminada	Torres Vedras	1 d	n.a	n.a	NR	neg	neg
75	MI	≤ 1 a	Indeterminada	Torres Vedras	1 d	n.a	n.a	NR	neg	neg
76	MI	≤ 1 a	Indeterminada	Torres Vedras	1 d	n.a	n.a	NR	neg	neg
77	MI	≤ 1 a	Indeterminada	Torres Vedras	1 d	n.a	n.a	NR	neg	neg
78	MI	≤ 1 a	Indeterminada	Torres Vedras	1 d	n.a	n.a	NR	neg	neg
79	MI	≤ 1 a	Indeterminada	Torres Vedras	1 d	n.a	n.a	NR	neg	neg
80	MI	≤ 1 a	Indeterminada	Torres Vedras	1 d	n.a	n.a	NR	neg	<i>M. haemocanis</i>
81	FI	6-9 a	Indeterminada	Torres Vedras	2 m	n.a	n.a	NR	neg	neg
82	FI	2-5 a	Indeterminada	Torres Vedras	2 sem	n.a	n.a	NR	neg	<i>H. canis</i> + <i>M. haemocanis</i>
83	MI	2-5 a	Indeterminada	Torres Vedras	3 sem	n.a	n.a	NR	<i>Mycoplasma</i> spp. + <i>Hepatozoon</i> spp.	<i>H. canis</i> + <i>M. haemocanis</i>
84	MI	6-9 a	Indeterminada	Torres Vedras	3 m	n.a	n.a	NR	<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>M. haemocanis</i>
85	FI	6-9 a	Indeterminada	Torres Vedras	2 a	n.a	n.a	R	<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>M. haemocanis</i>
86	MI	6-9 a	Indeterminada	Torres Vedras	2 a	n.a	n.a	R	<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>M. haemocanis</i>
87	MI	2-5 a	Indeterminada	Torres Vedras	2 a	n.a	n.a	R	<i>Mycoplasma</i> spp. + <i>Hepatozoon</i> spp.	<i>H. canis</i> + <i>M. haemocanis</i>
88	FI	2-5 a	Indeterminada	Arruda dos vinhos	2 a	n.a	n.a	R	neg	<i>B. vogeli</i>
89	FI	2-5 a	Indeterminada	Arruda dos vinhos	10 m	n.a	n.a	R	<i>E. canis</i>	<i>E. canis</i>
90	MI	≤ 1 a	Indeterminada	Arruda dos vinhos	6 m	n.a	n.a	R	neg	neg
91	MI	2-5 a	Indeterminada	Arruda dos vinhos	8 m	n.a	n.a	R	<i>Babesia</i> de grandes dimensões	<i>B. vogeli</i>
92	FI	2-5 a	Indeterminada	Arruda dos vinhos	8 m	n.a	n.a	R	<i>A. platys</i>	<i>A. platys</i>
93	FI	2-5 a	Indeterminada	Arruda dos vinhos	1 a	n.a	n.a	R	neg	<i>B. vogeli</i>
94	MI	≤ 1 a	Indeterminada	Arruda dos vinhos	3 m	n.a	n.a	NR	<i>Hepatozoon</i> spp.	<i>H. canis</i>

Legenda: FE: Fêmea Esterelizada; FI: Fêmea Inteira; MC: Macho castrado; MI: Macho Inteiro; sem: semana(s); a: ano(s); m: mese(s); N: Não; S: Sim; n.a: Não aplicável; R: Regular; NR: Não regular; neg: negativo