



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

RIQUETSIOSES DO GRUPO DAS FEBRES EXANTEMÁTICAS EM CANÍDEOS  
DOMÉSTICOS EM PORTUGAL: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E ESTUDO  
RETROSPECTIVO

MARIA TERESA TEODORO ROCHA DUARTE

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Henrique Duarte Correia

Doutora Isabel Fonseca Sampaio

Doutor José Paulo Sales Luís

Dra. Maria João Dinis da Fonseca

ORIENTADORA

Dra. Maria João Dinis da Fonseca

CO-ORIENTADOR

Doutor José Paulo Sales Luís

2008  
LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

RIQUETSIOSES DO GRUPO DAS FEBRES EXANTEMÁTICAS EM CANÍDEOS  
DOMÉSTICOS EM PORTUGAL: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E ESTUDO  
RETROSPECTIVO

MARIA TERESA TEODORO ROCHA DUARTE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Henrique Duarte Correia

Doutora Isabel Fonseca Sampaio

Doutor José Paulo Sales Luís

Dra. Maria João Dinis da Fonseca

ORIENTADORA

Dra. Maria João Dinis da Fonseca

CO-ORIENTADOR

Doutor José Paulo Sales Luís

2008  
LISBOA

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram para a realização desta dissertação.

Ao Professor Doutor José Paulo Sales Luís (co-orientador) e à Dra. Maria João Fonseca (orientadora) por todo o apoio e conselhos prestados. À Doutora Rita de Sousa do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge por toda a sua coloraboração, paciência, experiência e conhecimentos transmitidos durante a realização deste trabalho, à Doutora Ângela Xufre coordenadora do Laboratório DNAtch pela disponibilidade e colaboração na realização do estudo retrospectivo e ao Dr. Diogo Magno por ter sugerido o tema escolhido e apoiado em todas as fases de realização desta dissertação. À Professora Doutora Isabel Neto pelos conselhos e experiência transmitidos no tratamento estatístico dos dados. À Professora Doutora Isabel Fonseca por toda a sua colaboração e paciência. A todos os médicos veterinários e auxiliares do Hospital Veterinário do Restelo pelos conhecimentos e experiências partilhadas no período de estágio.

Por último, um obrigado a toda a família e amigos pelo apoio e presença constantes durante todos os anos de percurso académico.

## Resumo

As riquetsias do grupo das febres exantemáticas estão amplamente distribuídas, em focos endémicos, por várias regiões geográficas do Mundo e são importantes causas de morbidade e mortalidade no Homem e nos animais domésticos. Em Portugal, *Rickettsia conorii* é o principal agente deste grupo e causa febre botonosa em humanos. Esta foi a única riquetsia identificada por métodos de biologia molecular em cães portugueses doentes. O vector de *R. conorii* no país é o ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus*. Os cães, os principais hospedeiros deste ixodídeo, podem servir como sentinelas e dar alguma indicação sobre a prevalência da infecção.

Apesar da elevada seroprevalência desta riquetsia em canídeos, existem poucos estudos que relacionam a infecção por este agente com doença nestes animais. O mesmo animal pode ser infectado concomitantemente por vários agentes transmitidos por vectores e muitas vezes os quadros clínicos das diferentes doenças são inespecíficos e semelhantes. Por isso, deve ser feito diagnóstico diferencial entre várias patologias e neste âmbito, as técnicas laboratoriais assumem maior importância que o diagnóstico clínico.

Foi realizado um estudo retrospectivo sobre uma amostra de 91 animais apresentados a consulta no Hospital Veterinário do Restelo, entre Maio de 2007 e Fevereiro de 2008, com sintomas suspeitos de doença transmitida por ixodídeos e aos quais foram pesquisados anticorpos anti-*R. conorii*. Alguns dos casos clínicos incluídos neste estudo decorreram fora do período de estágio pelo que houve conhecimento dos mesmos pelo acesso a base de dados do hospital. A técnica de Imunofluorescência Indirecta (IFI) foi utilizada para pesquisa de anticorpos contra *R. conorii* (n=91), *E. canis* (n=90), *L. infantum* (n=56) e *B. canis* (n=26). Na amostra, a seroprevalência de *R. conorii* foi de 73%, superior a de qualquer um dos outros agentes. Foram encontradas possíveis co-infecções de vários agentes em 38 dos 66 animais que possuíam anticorpos contra a riquetsia em questão. A associação de sinais clínicos com resultados de IFI positivos para *R. conorii* foi realizada em seis animais. Foram detectados vários sinais e sintomas como pirécia, uveíte, petéquias e hematomas, dor de origem inespecífica, rigidez muscular e esplenomegália. Anemia, trombocitopenia e hipoproteinemia foram as alterações hematológicas verificadas. Nesta amostra, a maioria dos cães de rua e dos animais com história de parasitismo por ixodídeos, possuía anticorpos contra agentes transmitidos por ixodídeos, nomeadamente *R. conorii*.

**Palavras-chave:** *Rickettsia conorii*, *Rhipicephalus sanguineus*, IFI, seroprevalência, canídeos, Portugal.

## Abstract

*Rickettsia* of the Spotted Fever group are widely distributed, in endemic foci, throughout the world and are important causes of morbidity and mortality in man and domestic animals worldwide. In Portugal, *Rickettsia conorii* is the main organism of this group, causing boutonneuse fever in humans. Also, this was the only rickettsia identified by molecular biology methods in sick portuguese dogs. In Portugal, the arthropod that transmits this rickettsia is the tick *Rhipicephalus sanguineus*. Dogs, the main hosts of this tick, may serve as sentinels and elucidate about the prevalence of infection.

Despite the high prevalence of this rickettsia in these animals, there are few studies that link infection by this agent and clinical signs in canines. The same animal can be infected by several vector-borne agents simultaneously which can cause overlapping and unspecific clinical signs. Therefore, some differential diagnosis should be included and, for this concern, the laboratorial techniques assume an important role to achieve the definitive diagnosis.

Between May 2007 and February 2008, several animals were assisted in Hospital Veterinário do Restelo for tick-borne disease symptoms. Of these, 91 were included in this retrospective study. Some of the animals came to the hospital out of the externship period therefore, knowledge of the cases was taken accessing the hospital data base.

An indirect fluorescent-antibody test (IFA) was performed to search for antibodies against *R. conorii* in (n=91), *E. canis* (n=90), *L. infantum* (n=56) and *B. canis* (n=26). In this sample, the *R. conorii* seroprevalence was 73%, higher than the seroprevalence for the other agents. Possible co-infections were found in 38 of the 66 canines that had antibodies against the rickettsia in question. The association between clinical signs in dogs and positive IFA results for *R. conorii* was done in 6 animals. In these canines, symptoms such as fever, uveitis, petequeal hemorrhages, bruises, unspecific pain, tremors, muscle stiffness and splenomegaly were detected. Anemia, thrombocytopenia and hypoproteinemia were the hematologic changes found.

In this sample, the majority of the stray dogs and animals with a history of parasitism by ticks featured antibodies against tick-borne agents, especially *R. conorii*.

**Keywords:** *Rickettsia conorii*, *Rhipicephalus sanguineus*, IFA, seroprevalence, canine, Portugal.

## Índice Geral

<b>Agradecimentos</b> .....	i
<b>Resumo</b> .....	ii
<b>Abstract</b> .....	iii
<b>Índice Geral</b> .....	iv
<b>Índice de Figuras</b> .....	vi
<b>Índice de Gráficos</b> .....	vi
<b>Índice de Tabelas</b> .....	vii
<b>Índice de Abreviaturas e Símbolos</b> .....	viii
<b>Nota Prévia</b> .....	1
<b>I. Revisão Bibliográfica</b> .....	2
1. Introdução .....	2
2. Taxonomia do Género <i>Rickettsia</i> .....	3
3. As riquetsias: morfologia, estrutura e composição química .....	4
4. Riquetsioses do grupo das febres exantemáticas no Mundo .....	5
5. Riquetsioses do grupo das febres exantemáticas em Portugal .....	7
5.1. Febre Botonosa .....	10
5.1.1. Epidemiologia .....	10
5.1.2. Estudos de seroprevalência e factores de risco em canídeos .....	11
5.1.3. Vector: características e ciclo biológico .....	12
5.1.4. Hospedeiros reservatório de <i>R. conorii</i> .....	15
5.1.5. Formas de infecção dos vectores .....	15
5.1.6. Ciclos epidemiológicos .....	16
5.1.7. Vias de infecção dos hospedeiros .....	17
5.1.8. Patogenia .....	18
5.1.9. Resposta imunitária .....	19
5.1.10. Quadro clínico .....	21
5.1.11. Diagnósticos diferenciais .....	24
5.1.12. Diagnóstico laboratorial .....	25
a) Diagnóstico indirecto .....	26
- Imunofluorescência Indirecta (IFI) .....	27
b) Diagnóstico directo .....	28
- Detecção de ácidos nucleicos pela Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	28

-	Isolamento de <i>Rickettsia conorii</i> em cultura de células.....	29
-	Imunodeteccção em sangue e tecidos .....	29
c)	Isolamento e detecccção de riquetsias a partir dos artrópodes vectores.....	30
5.1.13.	Tratamento específico e de suporte .....	30
5.1.14.	Profilaxia e controlo .....	34
<b>II.</b>	<b>Objectivos</b> .....	36
<b>III.</b>	<b>Material e métodos</b> .....	37
1.	Material .....	37
2.	Métodos .....	38
2.1.	Técnica de Imunofluorescência Indirecta para detecccção de anticorpos <i>anti-R. conorii</i> em soros de canídeos .....	39
2.2.	Técnica de Imunofluorescência Indirecta para detecccção de anticorpos contra os restantes agentes pesquisados .....	40
2.3.	Exames hematológicos .....	41
2.3.1.	Hemograma .....	41
2.3.2.	Parâmetros bioquímicos .....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
2.3.3.	Exame microscópico de esfregaço sanguíneo .....	42
2.4.	Cálculo da seroprevalência na amostra dos vários agentes pesquisados .....	43
2.5.	Métodos estatísticos.....	43
<b>IV.</b>	<b>Resultados</b> .....	43
1.	Resultados da titulação de anticorpos contra os vários agentes .....	43
2.	Resultados da titulação de anticorpos contra <i>R. conorii</i> .....	44
2.1.	Estudo do grupo de animais positivos para <i>R. conorii</i> mas suspeitos para outros agentes .....	45
2.2.	Estudo do grupo de animais com anticorpos contra outros agentes além de <i>R. conorii</i> 47	
2.3.	Estudo do grupo de animais apenas com anticorpos contra <i>R. conorii</i> .....	47
3.	Tratamento aplicado nos canídeos em estudo apenas infectados com <i>R. conorii</i>	48
4.	Estudo da prevalência de agentes transmitidos por ixodídeos na amostra de cães de rua em estudo .....	49
5.	Associação entre parasitismo por ixodídeos e presença de anticorpos contra os agentes transmitidos por estes vectores .....	49
<b>V.</b>	<b>Discussão dos resultados</b> .....	49
<b>VI.</b>	<b>Conclusão</b> .....	53
<b>VII.</b>	<b>Referências bibliográficas</b> .....	55
<b>VIII.</b>	<b>Anexos</b> .....	62

Anexo I- Resumo das tarefas realizadas durante o estágio curricular.....	62
1. Caracterização da população de animais assistida .....	62
2. Actividades desenvolvidas .....	63
 Anexo II – Protocolo de detecção de <i>R. conorii</i> por Imunofluorescência Indirecta do Laboratório DNAtch .....	 69

### Índice de Figuras

Figura 1- Taxonomia do Género <i>Rickettsia</i> (Euzéby, 2008).....	3
Figura 2- <i>R. rickettsii</i> em células de hemolinfa de ixodídeos (coloração Gimenez).....	4
Figura 3- Imagem de microscopia electrónica de <i>R. conorii</i> em cultura de células endoteliais humanas .....	4
Figura 4- Alguns vectores de <i>Rickettsia</i> do grupo das febres exantemáticas em Portugal.....	9
Figura 5- <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .....	13
Figura 6- Taxonomia do Género <i>Rickettsia</i> (Euzéby, 2008).....	14
Figura 7- Patogenia de <i>Rickettsia</i> spp.....	18
Figura 8- Diagnóstico de <i>Rickettsia</i> spp.....	26

### Índice de Gráficos

Gráfico 1- Habitat da amostra de canídeos em estudo .....	38
Gráfico 2- Mês do ano em que foi realizada a pesquisa de anticorpos anti- <i>R. conorii</i> .....	38
Gráfico 3- Resultados de IFI obtidos para cada um dos agente pesquisados .....	44
Gráfico 4- Resultados de titulação de anticorpos anti- <i>R. conorii</i> nos animais em estudo.....	44
Gráfico 5- Grupos de animais com anticorpos contra <i>R. conorii</i> .....	45
Gráfico 6- Tipos de co-infecção encontrados na amostra em estudo.....	47
Gráfico 7- Proporção das várias espécies de pacientes assistidos em consulta e internamento .....	62
Gráfico 8- Proporção de machos e fêmeas de canídeos e felídeos assistidos em consulta e internamento.....	63
Gráfico 9- Tipo de animais exóticos observados em consulta e internamento .....	63
Gráfico 10- Tipos de cirurgia assistidos.....	67

## Índice de Tabelas

Tabela 1- Alguns agentes transmitidos por vectores com importância em canídeos .....	2
Tabela 2- Espécies de <i>Rickettsia</i> descritas nos diferentes continentes .....	5
Tabela 3- Resumo de estudos de prevalência de <i>R. conorii</i> em canídeos de países endémicos	7
Tabela 4- Riquetsias do grupo das febres exantemáticas já isoladas em Portugal .....	8
Tabela 5- Características biológicas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .....	13
Tabela 6- Estudos que associaram infecção natural por <i>R. conorii</i> com quadro clínico em canídeos .....	22
Tabela 7- Grupos de antibióticos com eficácia conhecida contra riquetsias em animais .....	31
Tabela 8- Antibióticos utilizados no tratamento de febre das Montanhas Rochosas .....	32
Tabela 9- Principais grupos de acaricidas eficazes na eliminação de ixodídeos .....	35
Tabela 10- Parâmetros de hemograma avaliados e valores de referência para cada um dos contadores de células utilizado .....	41
Tabela 11- Parâmetros bioquímicos avaliados e valores de referência para cada um deles .....	42
Tabela 12- Tipo de consultas assistidas.....	64
Tabela 13- Proporção das várias áreas da patologia médica .....	64
Tabela 14- Tipos de neoplasias observadas em consulta .....	65
Tabela 15- Tipos de tratamento realizados em consulta e internamento .....	65
Tabela 16- Tipos de urgências assistidas.....	66
Tabela 17- Tipos de patologia de animais exóticos .....	66
Tabela 18- Proporção dos métodos complementares de diagnóstico utilizados.....	67
Tabela 19- Tipos de cirurgias de tecidos moles assistidas .....	68
Tabela 20- Pequenas intervenções cirúrgicas.....	68

## Índice de Abreviaturas e Símbolos

ADN	Ácido Desoxiribonucleíco
ARN	Ácido Ribonucleíco
ALP	Fosfatase Alcanina
ALT	Alanina Aminotransferase
°C	Grau Centígrado
dL	Decilitro
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay</i>
EV	Endovenoso
fL	Fento-Litro
g	Grama
IFI	Técnica de Imunofluorescência Indirecta
Ig	Imunoglobulina
IM	Intramuscular
INF	Interferão
Kg	Quilograma
L	Litro
LPS	Lipopolissacáridos
m	Mil
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm <sup>3</sup>	Milímetro cúbico
NK	<i>Natural killer</i>
Omp	<i>Outer membrane protein</i>
PBS	Tampão Fosfato Alcalino
PCR	Polimerase chain reaction
Pg	Picograma
PO	<i>Per os</i>
<i>Primer</i>	Oligonucleótido iniciador
rARN	<i>Ácido ribonucleico ribossómico</i>
SC	Subcutâneo
FNT	Factor de necrose tumoral
UI	Unidades internacionais
µL	Microlitro

## **Nota Prévía**

Este trabalho foi efectuado com base em dados e informações obtidos num estágio curricular, realizado no Hospital Veterinário do Restelo, durante um período de seis meses, decorrente entre 3 de Setembro de 2007 e 29 de Fevereiro de 2008, sob orientação da Dra. Maria João Dinis da Fonseca.

Neste hospital são recebidos, rotineiramente, animais de várias espécies, onde predominam canídeos e felídeos, embora os animais exóticos surjam cada vez com mais frequência. Durante o período de estágio, houve participação activa em várias actividades da medicina de pequenos animais como consultas, cirurgias, procedimentos de urgência, cuidados de internamento, tratamentos e métodos complementares de diagnóstico tendo, portanto, contactado com várias áreas da patologia clínica dos animais de companhia. Foi também solicitada a elaboração de dois trabalhos com os temas “Linfoma renal em cães e gatos” e “PCR e imunocitoquímica, o que o Veterinário precisa saber?”, os quais foram uma mais valia para os conhecimentos adquiridos durante este período. Com o intuito de ilustrar as actividades realizadas durante o período de estágio, foram elaborados vários gráficos e tabelas, em anexo (Anexo I).

Ao longo destes seis meses, houve percepção do elevado número de canídeos aos quais era feito despiste de doenças infecciosas transmitidas por vectores. Esta constatação está relacionada com a elevada frequência de ocorrência destas patologias no nosso país, favorecendo assim o aumento da suspeição, e por outro lado, pelo facto destas se caracterizarem, muitas vezes, por quadros clínicos inespecíficos e semelhantes, obrigando ao recurso a técnicas de diagnóstico laboratoriais para um diagnóstico definitivo. O tema “Riquetsioses do grupo das febres exantemáticas em canídeos em Portugal” foi escolhido por esta razão e pelo facto de poucos estudos sobre estes agentes terem sido realizados em canídeos portugueses.

## I. Revisão Bibliográfica

### 1. Introdução

Os canídeos estão grandemente expostos ao parasitismo por parte de artrópodes tais como ixodídeos, pulgas, insectos, entre outros. Estes parasitas provocam danos directos no animal devido as suas acções mecânica (lesão dos tecidos), espoliadora, irritativa e inflamatória. Para além disto, podem também estar na origem de reacções alérgicas e os produtos resultantes do seu catabolismo ou morte, podem ter uma acção tóxica no hospedeiro. Por outro lado, estes artrópodes têm também uma acção indirecta, na medida em que são vectores de diversos agentes patogénicos. A tabela 1 reúne alguns dos agentes transmitidos por vectores com importância em canídeos.

**Tabela 1- Alguns agentes transmitidos por vectores com importância em canídeos**

<b>Vector</b>	<b>Agente</b>
<b>Piolhos</b> ( <i>Trichodectes canis</i> )	Céstodes: <i>Dipilidium caninum</i>
<b>Pulgas</b> ( <i>Ctenocephalides canis</i> , <i>C. felis</i> , <i>Pulex irritans</i> )	Céstodes: <i>Dipilidium caninum</i>
<b>Mosquitos</b> ( <i>Phlebotomus ariasi</i> e <i>P. perniciosus</i> , Culicídeos dos géneros <i>Anopheles</i> <i>Culex</i> e <i>Aedes</i> )	Protozoários: <i>Leishmania infantum</i> Filarias: <i>Dirofilaria immitis</i>
<b>Ixodídeos</b> ( <i>Rhipicephalus spp.</i> , <i>Dermacentor</i> <i>spp.</i> , <i>Ixodes spp.</i> )	Bactérias: <i>Borrelia spp.</i> , <i>Ehrlichia spp.</i> , <i>Anaplasma</i> <i>spp.</i> , <i>Rickettsia spp.</i> Protozoários: <i>Babesia spp.</i> , <i>Hepatozoon canis</i> Vírus: encefalite transmitida por carraças Filárias: <i>Dipetalonema grassii</i>

O mesmo animal pode ser parasitado por mais do que um vector e conseqüentemente ser infectado por mais do que um agente (co-infecção). Em zonas endémicas, podem ocorrer co-infecções de erliquiose, babesiose, riquetsiose e leishmaniose (Shaw, Day, Birtles & Breitschwerdt, 2001).

As doenças transmitidas por ixodídeos assumem importância crescente em canídeos, devido à expansão dos vectores a áreas urbanas e semi-urbanas por todo o mundo, ao movimento de cães infectados para áreas não-endémicas e ao desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico molecular (Shaw et al., 2001). Por estas razões, esta revisão vai centrar-se nestes agentes, mais particularmente nos organismos do género *Rickettsia*.

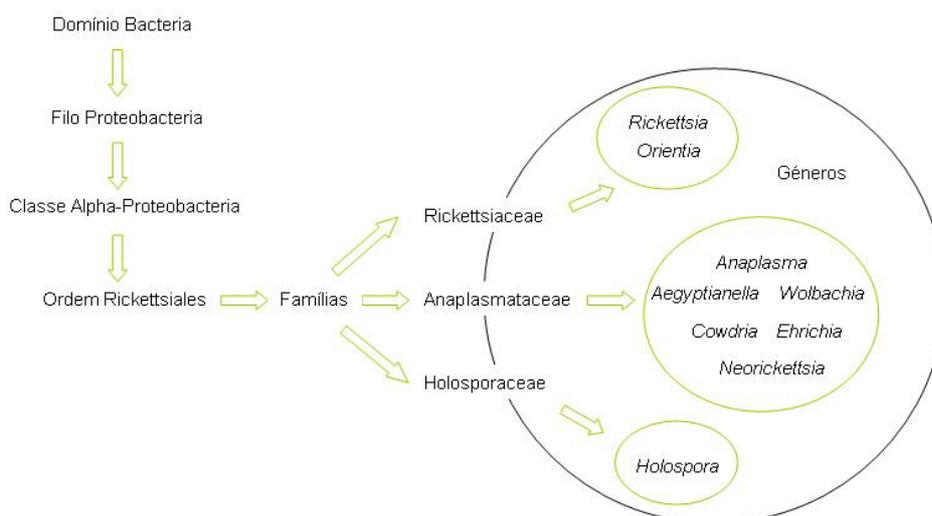
As riquetsias são bactérias intracelulares obrigatórias que têm como alvo preferencial as células endoteliais dos hospedeiros e provocam doenças (riquetsioses) que afectam o Homem e alguns animais domésticos. O seu ciclo de vida está associado a artrópodes vectores, como ixodídeos, que são os principais vectores de rickettsias do grupo das febres exantemáticas.

O género *Rickettsia* inclui dois grupos distintos: o grupo das febres exantemáticas e o grupo do tifo (Sousa, Nóbrega, Bacellar & Torgal, 2003).

As riquetsias do grupo das febres exantemáticas vão ser abordadas mais aprofundadamente ao longo desta revisão. Estas estão amplamente distribuídas, em focos endémicos, por várias regiões geográficas do Mundo, incluindo Portugal, e são importantes causas de morbilidade e mortalidade no Homem e nos animais domésticos (Kidd, 2006). Na última década, as mudanças climáticas têm influenciado a incidência e a distribuição geográfica destas doenças relacionado com as alterações no ciclo de vida dos vectores.

## 2. Taxonomia do Género *Rickettsia*

Figura 1- Taxonomia do Género *Rickettsia* (Euzéby, 2008)



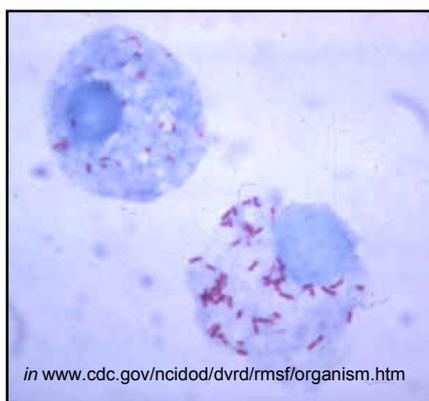
As riquetsias são organismos que pertencem ao Domínio Bacteria, Filo Proteobacteria, Classe Alpha-Proteobacteria, Ordem Rickettsiales, Família Rickettsiaceae que engloba os Géneros

*Rickettsia* e *Orientia* (Euzéby, 2008). O Género *Rickettsia* divide-se taxonomicamente em dois grupos distintos (Sousa et al., 2003): O grupo do tifo e o grupo das febres exantemáticas sendo que cada um destes grupos é constituído por diversas espécies de riquetsias que podem afectar o Homem e/ou os animais domésticos. Como exemplos de riquetsias do grupo das febres exantemáticas podem ser referidas *R. conorii*, *R. felis*, *R. slovaca*, *R. rickettsii* e *R. akari*. Ao grupo do tifo pertencem *R. typhi* e *R. prowazekii*.

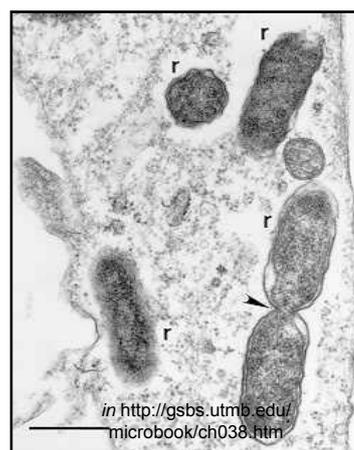
### 3. As riquetsias: morfologia, estrutura e composição química

Para compreender a patogenia das doenças que provocam, é essencial conhecer um pouco a morfologia das riquetsias.

Os membros do género *Rickettsia* são bactérias (cocobacilos) Gram negativas intracelulares obrigatórias. Estes organismos têm geralmente 0,8 a 2 µm de comprimento e 0,3 a 0,5 µm de diâmetro (La Scola & Raoult, 1997) e coram com a técnica Giemsa ou Gimenez (Raoult & Roux, 1997) (Figuras 2 e 3).



**Figura 2-** *R. rickettsii* em células de hemolinfa de ixodídeos (coloração Gimenez).



**Figura 3-** Imagem de microscopia electrónica de *R. conorii* (r) em cultura de células endoteliais humanas.  
Um dos organismos em divisão binária (seta)

Sendo bactérias Gram negativas, possuem parede celular com peptidoglicano e lipopolissacáridos (LPS) (Mc Dade, 1998). Os LPS são antigénios específicos das riquetsias do grupo das febres exantemáticas, por existirem em todas as riquetsias deste grupo e em pouca quantidade nas do grupo do tifo (Bacellar, 1996; Mc Dade, 1998). Têm papel na fixação do complemento e estão na origem das reacções imunitárias cruzadas que ocorrem entre as várias riquetsias e entre estas e outros microrganismos (Bacellar, 1996).

As riquetsias possuem, na sua membrana, proteínas de diferentes pesos moleculares, que foram denominadas de rOmp (*rickettsia outer membrane protein*) e constituem os principais antígenos usados na classificação das diferentes espécies de riquetsia.

Pelo processo de adaptação ao ambiente intracelular, estes organismos têm a capacidade de se movimentarem dentro das células infectadas através de filamentos de actina (Heinzen, Grieshaber, Kirk & Devin, 1999; Walker, Valbuena & Olano, 2003). As riquetsias do grupo das febres exantemáticas têm capacidade de passar de uma célula para a outra sem provocar destruição das mesmas, ao contrário das do grupo do tifo que se multiplicam na célula hospedeira até que esta rebente (Walker et al., 2003).

#### 4. Riquetsioses do grupo das febres exantemáticas no Mundo

A distribuição das riquetsias no Mundo está directamente relacionada com a distribuição dos seus vectores. A tabela 2 resume a distribuição das principais riquetsias pelos diferentes continentes (Parola, Paddock & Raoult, 2005; Raoult & Raoux, 1997; Sousa et al., 2003).

**Tabela 2- Espécies de *Rickettsia* descritas nos diferentes continentes**

<b>Continente</b>	<b>Espécies descritas</b>
Europa	<i>R. conorii</i> , <i>R. felis</i> , <i>R. aeschlimannii</i> , <i>R. sibirica</i> e <i>R. sibirica</i> estirpe mongolotimonae, <i>R. slovacica</i> , <i>R. akari</i> , Grupo <i>R. massiliae</i> , <i>R. helvetica</i> e <i>R. rhipicephali</i>
América	<i>R. rickettsii</i> , <i>R. bellii</i> , <i>R. montana</i> , <i>R. rhipicephali</i> , <i>R. akari</i> , <i>R. canada</i> , <i>R. parkeri</i> , <i>R. amblyomii</i> e <i>R. felis</i>
África	<i>R. conorii</i> , <i>R. rhipicephali</i> , Grupo <i>R. massiliae</i> , <i>R. felis</i> , <i>R. aeschlimannii</i> , <i>R. africae</i>
Ásia	<i>R. sibirica</i> , <i>R. sibirica</i> estirpe mongolotimonae, <i>R. conorii</i> , <i>R. akari</i> , <i>R. japonica</i>
Oceania	<i>R. australis</i> , <i>R. honei</i>

Algumas das riquetsias referidas já foram associadas a casos de doença em humanos, nomeadamente *R. sibirica* (agente do tifo siberiano), *R. sibirica* estirpe mongolotimonae (LAR – *Lymphangitis Associated Rickettsiosis*), *R. akari* (riquetsiose vesicular), *R. japonica* (febre exantemática Oriental), *R. slovacica* (TIBOLA - *Tick-borne lymphadenopathy* ou DEBONEL - *Dermacentor-borne-necrosis-erythema-lymphadenopathy*) e *R. africae* (febre da carraça africana) (Blanco & Oteo, 2006; Parola et al., 2005; Raoult & Raoux, 1997; Sousa et al., 2003). As duas riquetsias já descritas na Oceania também são patogénicas. *R. australis* transmite tifo

da carraça de Queensland e *R. honei* é agente de febre botonosa das Ilhas Flinders (Raoult & Raoux, 1997; Sousa et al., 2003).

*R. rickettsii*, é o principal agente de febres exantemáticas no continente americano (López, Abarca & Azocar, 2007), tendo já sido relatados casos de doença em países como Estados Unidos, Canadá, México, Colômbia, Brasil, Costa Rica e Panamá (Raoult & Roux, 1997), onde tem crescente importância em saúde pública (Galvão et al., 2005). Estudos de seroprevalência encontraram anticorpos anti-*R. rickettsii* em 5 a 15% dos canídeos nos E.U.A (Greene & Bretschwerdt, 2006) e em 4 a 31% dos canídeos no Brasil (Galvão et al., 2002; Horta et al., 2004). Não foi comprovada a existência desta espécie noutros continentes (López et al., 2007). Em relação aos canídeos, esta é a única riquetsia com poder patogénico comprovado e reconhecido no continente americano (Greene & Breitschwerdt, 2006).

A bactéria *R. conorii*, descrita pela primeira vez no princípio do século XIX, é considerada como agente endémico na bacia do Mediterrâneo, Rússia, Norte Africa, e Índia (Raoult & Roux, 1997). No continente africano, *R. conorii* já foi isolada na África Central, Somália, Quênia, Zimbábue e África do Sul apesar de ser prevalente no Norte deste continente. Existem diferentes estirpes de *Rickettsia conorii*: *R. conorii* estirpe Malish, *R. conorii* estirpe Israeli tick typhus; *R. conorii* estirpe Indian tick typhus e *R. conorii* estirpe Astrakahan (Massung, Nicholson, Eremeeva & Dasch, 2008; Zhu, Fournier, Eremeeva & Raoult, 2005). Dentro destes quatro grupos existem várias designações para a mesma estirpe, dependendo de onde ela foi isolada (Parola et al., 2005).

Os cães que vivem nas zonas endémicas são expostos a esta riquetsia e, estes animais infectados naturalmente, podem ser seropositivos durante meses. Estudos em cães espanhóis revelaram que alguns deles ainda possuíam anticorpos 750 dias após o primeiro resultado positivo (Tesouro, Bacellar, Sainz & Filipe, 1998). A tabela 3 resume os resultados de vários estudos de seroprevalência de *R. conorii* em canídeos realizados em países considerados endémicos.

**Tabela 3- Resumo de estudos de prevalência de *R. conorii* em canídeos de países endémicos**

<b>País</b>	<b>Seroprevalência de <i>R. conorii</i></b>
Portugal	85,6% <sup>1</sup> , 38,5% <sup>2</sup> , 85% <sup>3</sup>
Itália	15 a 35% <sup>4</sup>
Espanha	56,4% <sup>5</sup>
Israel	estirpe Morrocan 58% <sup>6</sup> estirpe Israeli Tick Typhus 28% <sup>6</sup>

1- Bacellar et al. (1995a); 2- Alexandre (2005); 3- Núncio et al. (1999); 4- Mannelli et al. (2003); 5- Solano-Gallego et al. (2006b); 6- Baneth et al. (1998)

O poder patogénico desta *Rickettsia* em canídeos ainda não está bem definido. No entanto, alguns estudos já associaram infecção com *R. conorii* a quadros clínicos nestes animais (Baneth, Breitschwerdt, Hegarty, Pappalardo & Ryan, 1998; Alexandre, 2005; Kidd, 2006).

Alguns estudos concluíram que a seroprevalência de *R. conorii* em cães e pessoas está associada (Herrero et al., 1992; Mannelli, Mandola, Pedri, Tripoli & Nebbia, 2003). No entanto, como os cães são mais parasitados por carraças, a seroprevalência de *R. conorii* nestes animais é superior à da população humana (Tesouro et al., 1998).

### **5. Riquetsioses do grupo das febres exantemáticas em Portugal**

Em Portugal, a sobrevivência e disseminação das riquetsias nos animais e no Homem pode ser explicada pela elevada prevalência de vectores ao longo de todo o ano (Bacellar, Dawson, Silveira & Filipe, 1995a). De facto, as condições climáticas e ambientais que o país oferece aos ixodídeos são consideradas excelentes.

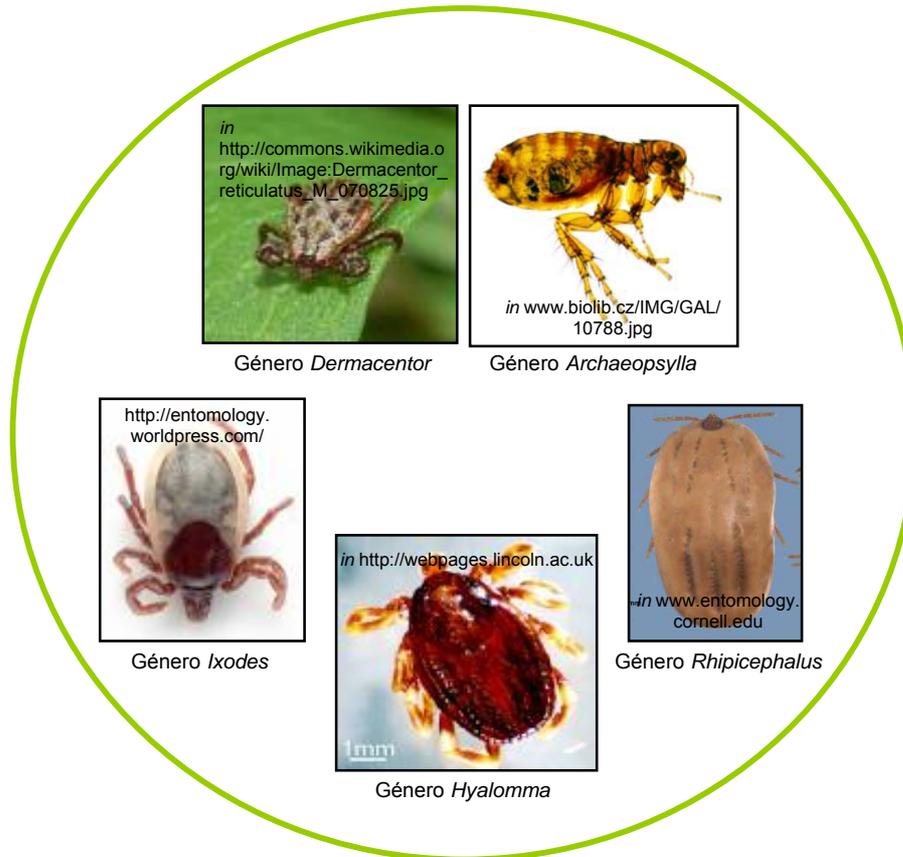
Em Portugal, já foram isoladas várias espécies de *Rickettsia* do grupo das febres exantemáticas a partir de vectores e/ou de humanos, tal como ilustram a tabela 4 e figura 4.

**Tabela 4- Riquetsias do grupo das febres exantemáticas já isoladas em Portugal**

<b>Agente</b>	<b>Vector</b>	<b>Capacidade patogénica conhecida ?</b>	<b>Identificada em doentes portugueses?</b>
<i>R. sibirica</i> <sup>1, 2, 3</sup>	<i>Rhipicephalus pusillus</i> e <i>Hyalomma spp.</i>	Sim	Sim
<i>R. rhipicephali</i> <sup>4</sup>	<i>R. sanguineus</i>	Não	Não
<i>R. slovacica</i> <sup>5, 6, 7, 8</sup>	<i>Dermacentor marginatus</i> e <i>D. reticulatus</i>	Sim	Não
<i>R. helvetica</i> <sup>9, 10</sup>	<i>Ixodes ricinus</i> e <i>I. ventralloi</i>	Sim	Não
Grupo <i>R. massilae</i> <sup>1, 11</sup>	<i>R. turanicus</i> e <i>R. sanguineus</i>	Sim	Não
<i>R. estirpe</i> PoTiRb169 <sup>1</sup>	<i>R. bursa</i>	Não	Não
<i>R. aeschlimannii</i> <sup>9, 12</sup>	<i>H. marginatum</i>	Sim	Não
<i>R. estirpe</i> RpA4 <sup>1, 6</sup>	<i>D. marginatus</i> e <i>D. reticulatus</i>	Não	Não
<i>R. conorii</i> estirpes Malish e Israeli Tick Tyhus <sup>3, 14</sup>	<i>R. sanguineus</i>	Sim	Sim
<i>R. felis</i> <sup>10; 15</sup>	<i>Archaeopsylla erinacei maura</i> e <i>Ctenophtalmus spp.</i>	Sim	Não

1-Sousa et al., 2006a; 2- Sousa et al., 2008; 3- Sousa et al., 2003; 4- Bacellar et al., 1995b; 5- Bacellar, et al., 1995c; 6- Santos-Silva et al., 2006; 7- Parola et al., 2005; 8- Selmi et al., 2008; 9- Silva et al., 2006; 10- Blanco & Oteo, 2006; 11- Vitale et al., 2006; 12- Bacellar, 1996; 13- Raoult et al., 2002; 14- Sousa et al., 2007; 15- Sousa et al., 2006b

**Figura 4- Alguns vectores de *Rickettsia* do grupo das febres exantemáticas em Portugal**



O poder patogénico de muitas destas riquétias já foi comprovado, com casos clínicos em diversos países. O primeiro caso de doença atribuído a *R. slovaca* foi relatado em 1997 e as alterações encontradas foram uma escara no couro cabeludo e aumento dos linfonodos cervicais (Parola et al., 2005). A doença ficou assim conhecida como TIBOLA (*Tick-borne lymphadenopathy*) (Parola et al., 2005) ou DEBONEL (*Dermacentor-borne-necrosis-erythema-lymphadenopathy*) (Blanco & Oteo, 2006). Em Itália, mais recentemente, foram relatados novos casos de patologia provocada por este agente com sinais clínicos semelhantes (Selmi, Bertolotti, Tomassone & Mannelli, 2008).

Em França, foi descrito um caso de riquetsiose provocado por *R. aeschlimannii* num doente que tinha regressado de Marrocos (Raoult, Fournier, Abboud & Caron, 2002). Segundo Blanco & Oteo (2006), os sintomas desta doença são semelhantes aos da febre botonosa, embora o curso de patogenia não seja tão grave.

*R. helvetica*, está associada a quadros patológicos menos graves que *R. conorii* e a doença que provoca não é caracterizada por *rash* cutâneo, ao contrário da febre botonosa (Blanco & Oteo, 2006).

*R. massilae* foi isolada a partir de um doente em Itália que apresentava sintomas como febre e *rash* (Vitale, Mansueto, Rolain & Raoult, 2006).

No que respeita a *R. felis*, todas as pulgas da espécie *Archaeopsylla erinacei maura* e do género *Ctenophtalmus* que foram colhidas de diferentes regiões e animais de Portugal estavam infectadas por este agente, o que sugere uma elevada taxa de infecção dos vectores no nosso país (Sousa et al., 2006b). O papel patogénico desta riquetsia foi demonstrado por PCR e serologia em pacientes franceses e alemães (Blanco & Oteo, 2006). Esta riquetsiose deve fazer parte dos diagnósticos diferenciais em pacientes com febre e/ou *rash* e com história de picada de pulga ou contacto com gatos (Blanco & Oteo, 2006).

Apesar de serem várias as espécies dos agentes das febres exantemáticas identificadas em Portugal, apenas *R. conorii* estirpes Malish e Israeli tick typhus e *R. sibirica* estirpe Mongolotimonae foram detectadas/isoladas em doentes portugueses (Sousa et al., 2003; Sousa et al., 2006a; Sousa et al., 2006b). *R. sibirica* foi associada a quadro clínico em dois doentes portugueses com febre, linfadenopatia e *rash* (Sousa et al., 2006a; Sousa et al., 2006b). As duas estirpes de *R. conorii*, contudo, são agentes da única riquetsiose com significado em termos de saúde pública no país, a febre botonosa (Sousa et al., 2003). Para além disto, *R. conorii* foi a única espécie de riquetsia detectada por PCR em canídeos doentes no nosso país (Alexandre, 2005). Por estas razões, este agente será alvo de uma abordagem mais aprofundada.

## **5.1. Febre Botonosa**

### **5.1.1. Epidemiologia**

A febre botonosa também conhecida como febre escaro-nodular, febre da carraça na linguagem popular (Bacellar, 1998) ou *Mediterranean Spotted Fever* na denominação anglo-saxónica, é uma zoonose transmitida por *Rhipicephalus sanguineus* (Amaro, Bacellar & França, 2003). Os agentes etiológicos responsáveis por esta patologia são duas estirpes do complexo *R. conorii*: *R. Conorii* estirpe Malish e *R. Conorii* estirpe Israeli Tick Typhus. Ambas foram isoladas a partir de amostras humanas, e do vector (Bacellar et al., 1999; Sousa et al., 2007). Esta é uma doença de declaração obrigatória desde 1950 e endémica em Portugal (Sousa & Bacellar, 2004). A sua taxa de incidência média durante o período de 1989 a 2003 foi de 8,9/10<sup>5</sup> habitantes e registou-se, desde 1996, um aumento do número de casos graves de doença (Sousa & Bacellar, 2004). No entanto, a sub-notificação dificulta a caracterização da afecção no país estimando-se que ocorram sete vezes mais casos por ano do que os que são declarados (Sousa & Bacellar, 2004).

Em humanos é considerada uma doença sazonal sendo que, em Portugal, 85% dos casos clínicos são relatados entre Julho e Setembro, com um máximo de casos declarados em Agosto (Sousa & Bacellar, 2004).

Em relação aos canídeos, a maioria das amostras para pesquisa de agentes transmitidos por vectores, no geral, é também submetida a diagnóstico entre Julho e Setembro (Â. Xufre coordenadora Laboratório DNAtech comunicação pessoal, Março 26, 2008). No entanto, dois estudos realizados em Portugal, um no Canil Municipal de Setúbal (Bacellar et al., 1995a) e outro numa população de canídeos do Algarve (Alexandre, 2005), concluíram que não existe sazonalidade na seroprevalência de febre botonosa em canídeos.

Devido ao aquecimento global, os ixodídeos encontram condições para sobreviver durante todo o ano, especialmente aqueles que estão bem adaptados ao ambiente familiar, completando os seus ciclos de vida de forma muito mais eficiente. Por isso, a febre botonosa não deve ser mais caracterizada como sendo uma doença sazonal, devendo também estar incluída nos diagnósticos diferenciais nos meses de Outono e Inverno (Sousa, Luz, Parreira, Santos-Silva & Bacellar, 2006c).

### **5.1.2. Estudos de seroprevalência e factores de risco em canídeos**

Em Portugal já foram realizados diversos estudos de seroprevalência de *R. conorii* em canídeos (Tabela 3). Num universo de 104 cães alojados no Canil Municipal de Setúbal e sem sinais de doença, 85,6% tinha anticorpos contra *R. conorii* (Bacellar et al., 1995a). Em 1999, um outro estudo realizado em diferentes populações de cães (militares, população rural e população urbana), concluiu que a prevalência de anticorpos contra *R. conorii* era de 38%, 36% e 11% respectivamente, sendo que a seroprevalência na totalidade da amostra foi de 85% (Núncio, Bacellar & Filipe, 1999). Alexandre (2005) encontrou seroprevalências de *R. conorii* mais baixas (38,5%) num estudo realizado em canídeos da região do Algarve.

Os valores de seroprevalência devem, no entanto, ser interpretados com alguma reserva, pois existem alguns aspectos que são passíveis de induzir em erro. Por um lado, *R. sanguineus* não é apenas vector de *R. conorii*, mas também de outros organismos do grupo das febres exantemáticas já isolados em Portugal (Tabela 4). Por outro lado, os canídeos podem ser parasitados por outros ixodídeos vectores de outras riquetsias do grupo das febres exantemáticas como por exemplo, membros do género *Dermacentor*. As riquetsias transmitidas por estas carraças, quer tenham capacidade patogénica conhecida quer não, induzem produção de anticorpos (Bacellar, Núncio, Alves & Filipe, 1995c). Apesar de serem dirigidos contra outros agentes, estes anticorpos podem fazer reacções imunitárias cruzadas com os anticorpos anti-*R. conorii* e todos eles são detectados, pela técnica de pesquisa de anticorpos,

como dirigidos contra *R. conorii*, pois a serologia não distingue a espécie de riquetsia infectante. Este fenómeno pode elevar erradamente a seroprevalência de *R. conorii*.

Foram também realizados vários estudos no sentido de associar seroprevalência contra *R. conorii* com alguns factores de risco como presença de ixodídeos, idade, sexo, aptidão, habitat e estação do ano. Em Espanha, Delgado e Cármenes (1995), concluíram que há uma maior seroprevalência deste agente em animais provenientes de zonas rurais utilizados em actividades de pastoreio e em animais parasitados por ixodídeos. Constataram também que a frequência de cães seropositivos é superior nos meses de Verão. Um estudo publicado em 2006 concluiu que cães machos são mais susceptíveis a possuir anticorpos contra *R. conorii* (Solano-Gallego, Llull, Osso, Hegarty & Breitschwerdt, 2006b). Melgrati et al. (citado por Alexandre 2005) não encontraram relação entre seropositividade para *R. conorii* com factores como comprimento e cor do pêlo, sexo e residência, mas verificaram que cães com idade superior a dois anos possuíam uma seroprevalência superior aos de idade inferior (44 vs 30%). Alexandre (2005) também concluiu que idade superior a dois anos é um factor de risco para seropositividade para *R. conorii* explicando esta dependência de variáveis pelo maior número de oportunidades de exposição ao vector, e conseqüentemente ao agente, à medida que a idade dos animais avança.

### 5.1.3. Vector: características e ciclo biológico

Com excepção da *R. akari* e da *R. felis*, que são transmitidas respectivamente por ácaros gamasídeos e pulgas, todas as outras espécies de *Rickettsia* do grupo das febres exantemáticas são transmitidas exclusivamente por ixodídeos (Sousa et al., 2003).

Existe uma certa especificidade entre a riquetsia infectante e o ixodídeo vector, embora a mesma riquetsia possa ter mais do que um vector. Pelo contrário, estudos (Macaluso, Sonenshine, Ceraul & Azad, 2002) apoiam que o mesmo vector não pode ser infectado por mais do que uma riquetsia pois existem mecanismos inibitórios entre elas. Ou seja, as riquetsias competem pelo microambiente dentro do ixodídeo e criam mecanismos que impedem a infecção por outras riquetsias. No entanto, já foram encontradas carraças infectadas com vários agentes e acredita-se que estes vectores com infecções múltiplas existem na natureza e que têm um papel vital na manutenção das riquetsias (Hechemy, Oteo, Raoult, Silverman & Blanco, 2006).

Como já foi referido, o vector de *R. conorii* em Portugal é uma carraça da família Ixodidae: *Rhipicephalus sanguineus*, vulgarmente designado por carraça castanha do cão (Figura 5).

**Figura 5- *Rhipicephalus sanguineus***



in [http://creatures.ifas.edu/urban/medical/brown\\_dog\\_tick.htm](http://creatures.ifas.edu/urban/medical/brown_dog_tick.htm)

Em cima: Esquerda: ninfa; Direita: larva

Em baixo: Adultos (Esquerda: fêmea; Direita: Macho)

Para além de vector, este ixodídeo pode também actuar como reservatório do agente, sendo responsável pela sua perpetuação na natureza (Dantas-Torres, 2008). A espécie *R. sanguineus* existe em quase todas as regiões do Mundo, com excepção das zonas circumpolares (Silva, Santos, Formosinho & Bacellar, 2006). Estes ixodídeos são encontrados em todo o país, porém as suas densidades populacionais são mais elevadas no Sul (Alexandre, 2005). As características e ciclo biológico deste parasita estão resumidos na tabela 5 e figura 6 (Espuny, 1999; Silva et. al, 2006).

**Tabela 5- Características biológicas de *Rhipicephalus sanguineus***

Características
Fases de vida livre e parasitária
Estádios de desenvolvimento: Ovo, Larva, Ninfa, Adulto
Ciclo de vida de 3 hospedeiros
Mono <sup>1</sup> ou Ditrópico <sup>2</sup>
Adultos comportamento exofílico <sup>3</sup>
Formas imaturas comportamento endofílico <sup>3</sup>
Hematófagos estritos <sup>4</sup>

1-Todas as fases evolutivas se alimentam no mesmo hospedeiro.

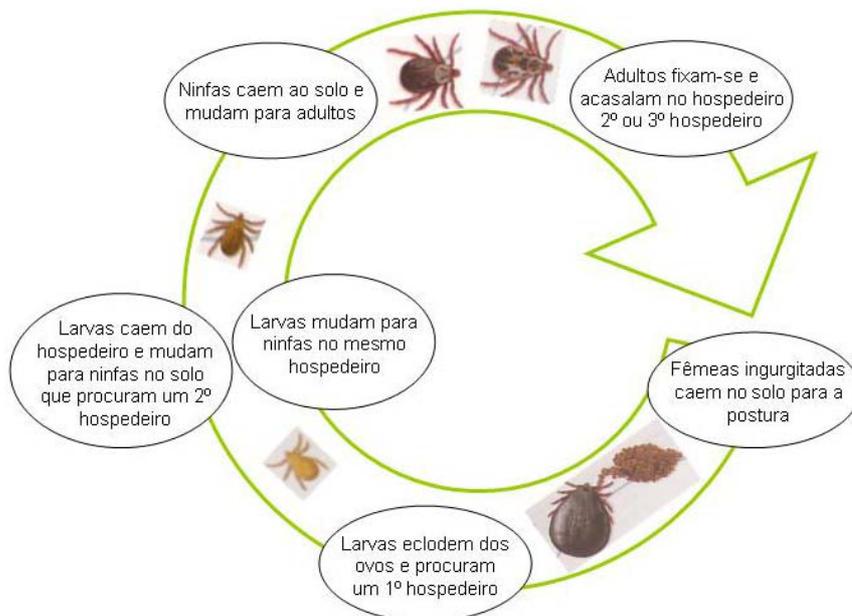
2- As formas imaturas alimentam-se de micromamíferos ou pequenos mamíferos silváticos e as adultas procuram hospedeiros de maior porte.

3- Dispersão relativamente ao local onde eclodiram. Comportamento endofílico: mantêm-se próximos da zona onde eclodiram e evoluem habitualmente no local onde os hospedeiros se refugiam. Estádios exofílicos: tendem a afastar-se mais.

4- Fêmeas fixam-se e alimentam-se de uma vez só; Machos alimentam-se de forma intermitente.

Apesar das características referidas, existem algumas populações destes ixodídeos que vivem em estreita dependência do seu hospedeiro preferencial (o cão) pelo que, nestes casos, o seu ciclo biológico é essencialmente monotrófico e endofílico e tanto as formas imaturas, como os adultos, alojam-se nos canis ou dentro das próprias habitações dos humanos (Silva et al., 2006).

**Figura 6- Ciclo biológico de *Rhipicephalus sanguineus***



Durante o seu ciclo de vida, as diferentes fases evolutivas de *R. sanguineus* podem passar vários dias fora do hospedeiro, podendo sobreviver mais de 568 dias no solo (Espuny, 1999). Este ciclo é condicionado por factores como temperatura, humidade relativa, fotoperíodo e a disponibilidade de hospedeiros vertebrados (Silva et al., 2006; Alexandre, 2005). Quando as condições ambientais são favoráveis, o ciclo de vida deste ixodídeo pode completar-se em 63 dias com posturas na ordem dos 5000 ovos (Espuny, 1999; Silva et al., 2006). Em condições de laboratório, estes ixodídeos, podem sobreviver e manter-se activos de 8°C a 40°C, desde que seja respeitada uma humidade relativa de 45%, pelo que este último é um parâmetro é considerado limitante na sobrevivência dos vectores (Sousa & Bacellar, 2004).

Em Portugal, o aumento das temperaturas durante os meses de Inverno e a diminuição da pluviosidade, favorecem a actividade de *R. sanguineus* durante todo o ano (Caeiro, 1999).

Apesar de se alimentarem preferencialmente em cães, estes ixodídeos podem parasitar outros animais domésticos, animais silváticos e também o Homem. Pensa-se que os estados imaturos, por serem menos específicos em relação ao hospedeiro, sejam os responsáveis pela transmissão da infecção a humanos, principalmente no Verão (Mannelli et al., 2003), altura em

que estão mais activos. Sendo assim, o parasitismo do Homem por este ixodídeo é fortuito e, consequentemente, este é um hospedeiro acidental no ciclo epidemiológico de *R. conorii* (Alexandre, 2005).

#### **5.1.4. Hospedeiros reservatório de *R. conorii***

Segundo Bacellar (1996), os potenciais hospedeiros reservatório de *R. conorii* podem ser divididos em três grupos:

- Animais silváticos como membros das famílias Muridae (*Apodemus sylvaticus* – rato do campo), Insectívora (*Erinaceus europaeus* – ouriço-cacheiro), Lagomorpha (*Oryctolagus cuniculus* - coelho);
- Espécies cinegéticas de grandes mamíferos como o javali (*Sus scrofa ferus*), o veado (*Cervus elaphus*) e o gamo (*Dama dama*);
- Animais domésticos;

Em relação aos animais domésticos, estudos serológicos já revelaram exposição de cães, gatos, ovinos, caprinos e bovinos a *R. conorii* (Alexandre, 2005).

Contudo, ainda não se conseguiu isolar *R. conorii* de hospedeiros vertebrados infectados de forma natural (Alexandre, 2005). Por isso o seu papel no ciclo de transmissão deste agente necessita de ser esclarecido (Manelli et al., 2003).

Estudos experimentais realizados em pequenos roedores confirmaram que estes, para além de serem sensíveis à infecção, desenvolvem riquetsiemia durante tempo suficiente para infectar os ectoparasitas durante a sua refeição de sangue (Bacellar, 1996). Pelo contrário, os canídeos não possuem as condições ideais para serem reservatório deste agente pois a sua riquetsiemia é transitória (Kelly et al., 1992; R. Sousa, comunicação pessoal, Março 6, 2008). Contudo, o papel dos cães na epidemiologia deste agente é de extrema importância na medida em que são os hospedeiros preferenciais do vector (Organização Mundial de Saúde, 2004).

#### **5.1.5. Formas de infecção dos vectores**

As carraças podem ficar infectadas com o agente durante a sua refeição de sangue em hospedeiros vertebrados de pequeno porte e riquetsiémicos, no entanto, pensa-se que a maior parte da transmissão ocorra pelas vias transtadial e transovárica. Ocorre infecção transovárica, quando os ovários e oócitos de uma fêmea adulta ficam infectados, o que permite a transmissão vertical entre gerações. A partir do momento em que um ovo de ixodídeo está infectado, as carraças mantêm-se infectadas durante a transição para estados evolutivos superiores, daí ocorrer transmissão transtadial. Quando as riquetsias são transmitidas de forma

eficiente, tanto pela via transtadial como transovárica, o ixodídeo serve de reservatório para a bactéria e a distribuição desta riquetsiose é idêntica à do seu vector (Parola & Raoult, 2001).

Após a infecção das carraças, ocorre replicação do agente no trato digestivo do vector. A partir daqui, as riquetsias espalham-se e multiplicam-se noutros tecidos da carraça incluindo glândulas salivares e ovários. Durante os períodos em que a carraça não se alimenta, e visto que estas podem sobreviver por longos períodos de tempo fora de um hospedeiro vertebrado (Baneth et al., 1998; Espuny, 1999), ocorrem alterações morfológicas nas riquetsias mas estas não morrem. Pelo contrário, quando são fornecidas condições ambientais mais favoráveis ou depois de uma refeição por parte do vector, a virulência inicial da bactéria é restituída (Parola et al., 2005). Este fenómeno é conhecido por reactivação (Parola et al., 2005).

Um estudo realizado em ixodídeos em Portugal (Alexandre, 2005) detectou, pela técnica de PCR, riquetsias do grupo das febres exantemáticas em 22,2% das carraças *R. sanguineus* colhidos no Sul do país. Contudo, este valor não corresponde na sua totalidade a *R. conorii* porque os *primers* utilizados amplificaram também ADN de riquetsias não patogénicas (Alexandre, 2005). Um estudo de Bacellar et. al (citado por Alexandre, 2005), resultado da colheita sistemática de ixodídeos entre 1991 e 2001, concluiu que apenas 1% dos espécimens estava infectado com *R. conorii*, enquanto que em 27% destes foram isoladas riquetsias consideradas não patogénicas. Segundo os autores, as riquetsias não patogénicas possuíam mecanismos que impediam a infecção dos vectores por riquetsias patogénicas, daí esta diferença de resultados. Estudos publicados noutros países encontraram valores semelhantes aos portugueses. Na Sicília, a percentagem de carraças desta espécie infectadas por *R. conorii* é de 19,7% enquanto que em Israel é 7,3% (Solano-Gallego et al., 2006b). Em Espanha, Márquez et al. (2008), só detectaram *R. conorii* num espécimen de *R. sanguineus* numa amostra de 132 ixodídeos desta espécie e 388 *R. turanicus*. Pelo contrário, *R. massilae* foi identificada em 48 ixodídeos dos géneros *Rhipicephalus* e *Ixodes* (Márquez et al., 2008).

Portanto, a percentagem de carraças infectadas é bastante inferior à de canídeos. Esta constatação pode ser explicada pelo facto de algumas riquetsias, como *R. conorii*, também serem patogénicas para os vectores, havendo uma elevada taxa de letalidade nos parasitas infectados (R. Sousa, comunicação pessoal, Março 6, 2008).

#### **5.1.6. Ciclos epidemiológicos**

Numa riquetsiose, geralmente, existe um foco primário que envolve os pequenos mamíferos que são parasitados pelos vectores (Bacellar, 1996). Num segundo foco, actuam as influências de animais domésticos e sinatrópicos, que vão ser a fonte de infecção para os humanos

(Bacellar, 1996). Assim, existem dois ciclos de transmissão de febre botonosa: um ciclo doméstico e um ciclo silvático (Bacellar, 1996).

O ciclo doméstico estabelece-se entre o cão e o Homem. Como já foi referido, a seroprevalência de riquetsioses em cães e humanos está relacionada. Os cães, por estarem em grande proximidade com os vectores, podem trazê-los para o ambiente humano e possibilitar a infecção destes últimos. Em muitas cidades da Europa, as populações de cães de companhia estão a crescer o que tem resultado no aumento da incidência de casos de febre botonosa nas cidades (Organização Mundial de Saúde, 2004). Nas zonas rurais, a proximidade do Homem com estes animais é grande e, portanto, a exposição ao vector também (Organização Mundial de Saúde, 2004). Segundo Espejo et al. (1993), 92% dos pacientes afectados por esta doença em Espanha possuem ou tiveram contacto com canídeos. Nos E.U.A., foram descritos casos de febre das Montanhas Rochosas que primeiro afectaram canídeos e depois o seu dono (Elchos & Goddard, 2003). Desta forma, os cães podem ser considerados como sentinelas da doença humana (Kidd, 2006).

O ciclo silvático é mantido por diversas espécies de animais como coelhos, lebres, roedores e diversas espécies cinégicas que já foram referidas anteriormente. Apesar de não serem indispensáveis no ciclo natural das riquetsias, estes animais têm um papel primordial na manutenção e dispersão dos vectores infectados (Manelli et al., 2003).

#### **5.1.7. Vias de infecção dos hospedeiros**

*R. conorii* é inoculada pela picada indolor de qualquer um dos estados evolutivos da carraça do cão, *Rhipicephalus sanguineus* (López et al., 2007), durante a sua refeição sanguínea. Muitas vezes, quer em animais, quer em humanos, não há história de paratismo por ixodídeos. Para que ocorra transmissão da infecção, o ixodídeo tem de se alimentar durante seis a vinte horas no hospedeiro (Bacellar, 1998). Este período também é necessário para que ocorra replicação das riquetsias nas glândulas salivares dos vectores durante a sua alimentação (Greene & Breitschwerdt, 2006). Apesar da infecção por picada do ixodídeo necessitar de contacto prolongado com o hospedeiro, o mesmo não acontece com o contacto de membranas mucosas com fezes ou hemolinfa das carraças, contacto com animais de laboratório infectados, culturas de células ou sangue de mamífero, que constituem formas de infecção mais rápidas (Greene & Breitschwerdt, 2006). Este tipo de transmissão mecânica pode ocorrer em humanos (Greene & Breitschwerdt, 2006).

O risco das carraças transmitirem riquetsias está relacionado com o número de carraças infectadas numa determinada região, com a afinidade ixodídeo-hospedeiro e com a abundância

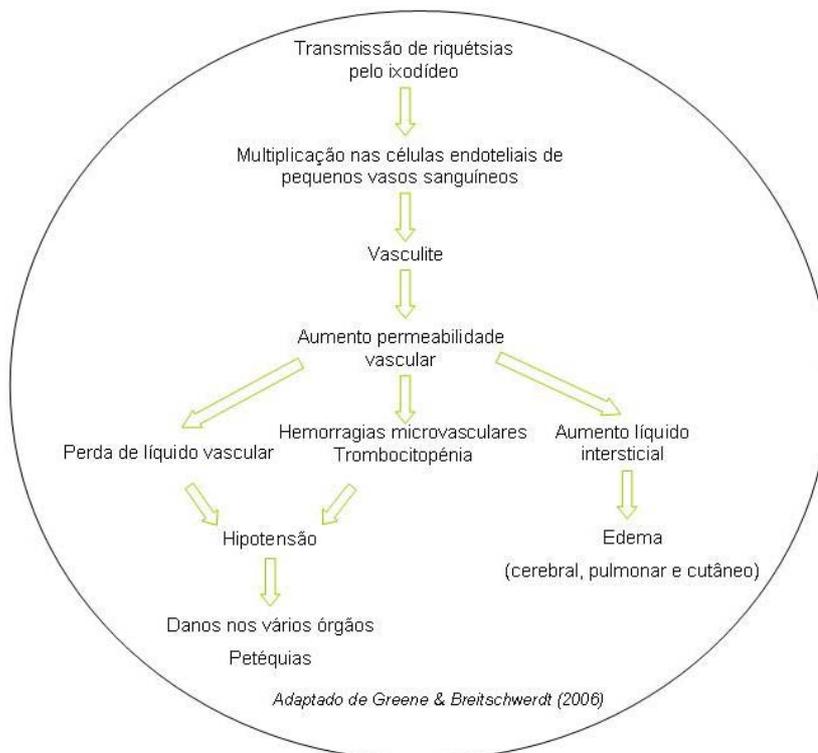
dos vectores em si (Raoult & Roux, 1997). Este último factor está dependente das condições climáticas e ecológicas (Raoult & Roux, 1997).

### 5.1.8. Patogenia

Considera-se que os mecanismos de patogenicidade das riquétsias, no geral, são semelhantes, pelo que vai ser apresentado um sumário generalizado de estudos realizados em diversas espécies destas bactérias (Figura 7).

Os agentes transmitidos por ixodídeos, genericamente, podem causar doença aguda ou crónica em hospedeiros susceptíveis (Baneth et al., 1998). Outros hospedeiros recuperam espontaneamente pela eliminação dos agentes ou assumem estado de portador, possuindo infecções assintomáticas ou subclínicas, que exarcebam com factores de *stress* ou doenças concomitantes (Shaw et al., 2001). Por isso, apesar do curso de patogenia referido em seguida, podem ser encontrados canídeos com infecções assintomáticas ou subclínicas infectados (de forma natural ou experimental) com riquétsias (como *R. rickettsii* ou *R. conorii*) (Kelly et al., 1992; Greene & Breitschwerdt, 2006; Solano-Gallego et al., 2006b).

**Figura 7- Patogenia de *Rickettsia* spp.**



Após a inoculação das riquétsias pelos vectores, estas disseminam-se pelo sistema circulatório e invadem e replicam-se nas células endoteliais de pequenas arteríolas e vénulas que constituem os principais alvos da infecção por *R. conorii* (Greene & Breitschwerdt, 2006; Kidd, 2006). A ligação a receptores das células alvo (que ainda não estão bem conhecidos) induz alterações no citosqueleto da célula (Walker et al., 2003). A célula responde a estas alterações trazendo para o seu interior a porção da membrana lesionada e neste processo, a riquétsia também é levada para dentro da célula (Mac Dade, 1998). Este é um mecanismo de fagocitose induzida em que, tanto as riquétsias, como as células endoteliais, participam no processo. Ainda antes de serem expostas às enzimas lisossomais, as riquétsias escapam dos fagossomas (possivelmente por mecanismos que envolvem a actividade da fosfolipase A2) e proliferam no citosol multiplicando-se por divisão binária (Valbuena, Feng & Walker, 2002; Walker et al., 2003). As riquétsias do grupo das febres exantemáticas podem movimentar-se de célula em célula e sem lhes causar ruptura, através da reorganização de filamentos de actina (Heinzen et al., 1999; Walker et al., 2003).

Os danos nas células endoteliais, iniciam um processo de vasculite generalizada que pode ser causada pela activação do sistema complemento, quimiotaxia celular e subsequente necrose vascular e extravasão de sangue (Greene & Breitschwerdt, 2006). Concomitantemente, ocorre activação do sistema de coagulação e do sistema fibrinolítico (Greene & Breitschwerdt, 2006). A vasculite culmina num aumento da permeabilidade vascular que leva a acumulação de fluidos intersticiais nos tecidos vizinhos, originando edema (que pode também ser cerebral ou pulmonar) e perda de volume vascular. Como consequência, pode ocorrer hipovolemia, que tem como resultado a diminuição da perfusão sanguínea a vários órgãos, com consequências associadas ao órgão em questão. Simultaneamente, ocorrem hemorragias microvasculares e surge trombocitopenia cuja principal causa aparenta ser imunomediada (Greene & Breitschwerdt, 2006). As petéquias que se observam na pele de doentes infectados por *R. conorii* são o resultado de todo este processo de vasculite (Alexandre, 2005).

#### **5.1.9. Resposta imunitária**

Qualquer que seja o curso da infecção (assintomática, subclínica, aguda, crónica), secundariamente à invasão das células endoteliais, ocorre uma resposta imunológica com consequente produção de anticorpos (Baneth et al., 1998). Portanto, podem ser encontrados anticorpos anti-riquétsias do grupo das febres exantemáticas em cães saudáveis (Greene & Breitschwerdt, 2006). Estes anticorpos podem ser uma consequência de infecções assintomáticas ou subclínicas ou o resultado de exposição a riquétsias não patogénicas (Greene & Breitschwerdt, 2006).

A resposta imunitária desenvolvida é predominantemente celular e desencadeada pelas próprias células endoteliais envolvendo produção de várias citocinas (quer pelas células endoteliais, quer não endoteliais), estimulação da resposta de fase aguda e activação de fagócitos e células NK (Valbuena et al., 2002). Igualmente, ocorre expressão de moléculas de adesão e quimocinas que vão activar o papel dos leucócitos (Valbuena et al., 2002). O mecanismo de eliminação das riquetsias por parte das células endoteliais envolve indução de apoptose mediada por citocinas e inicia-se por activação da morte intraendotelial destes organismos. O FNT $\alpha$  e o INF $\gamma$ , este último produzido pelas células NK no início da infecção, actuam sinergicamente para activar a sintase-2 de óxido nítrico que acabará por destruir as riquetsias intracelulares (Walker et al., 2003). Posteriormente, a remoção das células é feita por linfócitos T citotóxicos CD8.

A imunidade humoral é particularmente dirigida para epitopos das proteínas OmpA e OmpB (Walker et al., 2003) e pode também ter um papel importante na eliminação das riquetsias e na protecção contra reinfeção (Valbuena et al., 2002). Anticorpos administrados a ratinhos, quatro ou cinco dias após estabelecimento de infecção, reduziram significativamente os conteúdos infecciosos de riquetsias no baço, pulmões e fígado 24 a 48 horas depois, e prolongaram a sua vida em doze dias em média (Feng, Whitworth, Olano, Popov & Walker, 2004). Feng et al. (2004) concluíram que soros hiperimunes e alguns anticorpos monoclonais contra OmpA ou OmpB conferiram protecção completa contra riquetsias, ao contrário de anticorpos contra o LPS que revelaram ser não protectores.

A imunidade adquirida naturalmente tem um papel importante na protecção contra a doença clínica e, aparentemente, é de longa duração (Greene & Breitschwerdt, 2006; Kidd, 2006). Em cães infectados experimentalmente, o contacto imunogénico com *R. rickettsii*, induz uma resposta protectora de reinfeção até três anos (Greene & Breitschwerdt, 2006). A reinfeção com *R. rickettsii* não foi induzida em cães infectados experimentalmente e não foi documentada em cães ou humanos infectados naturalmente (Breitschwerdt et al., 1990). Em relação a *R. conorii* já foram detectados anticorpos contra este agente 750 dias depois do primeiro resultado positivo (Tesouro et al., 1998), o que revela que os anticorpos contra este agente também persistem durante muito tempo.

A compreensão dos mecanismos de imunidade contra as riquetsias e o seu papel na patogenia e eliminação das mesmas, iria permitir a descoberta de vacinas eficientes, assim como estratégias de intervenção para controlar infecções avançadas nas quais os antibióticos, por si, não conseguem evitar complicações secundárias, incluindo a morte (Valbuena et al., 2002).

#### 5.1.10. Quadro clínico

Apesar das seroprevalências de *R. conorii* registadas em canídeos portugueses e de outros países endémicos (Tabela 3), existem poucos estudos que identificaram *R. conorii* em cães doentes. Pelo contrário, muitos artigos publicados consideram que este agente não provoca doença nestes animais.

O período de incubação de *R. conorii* em canídeos foi determinado apenas por infecções experimentais, observando-se lesões entre os três e os sete dias pós-inoculação (Kelly et al., 1992). Neste mesmo estudo, concluiu-se que a riquetsiémia nos cães é detectável, de forma intermitente, entre o segundo e o décimo dia após infecção (Kelly et al., 1992).

Kelly et al. (1992) inocularam, experimentalmente, cães com uma estirpe de *R. conorii* do Zimbabwe. Para além de eritema local, dor e linfadenopatia regional não se verificaram outros sinais clínicos ou alterações hematológicas. Contudo, todos os animais desenvolveram anticorpos IgM e IgG contra *R. conorii*. Solano-Gallego et al. (2006b), não encontraram associação entre seroreactividade e doença clínica nestes animais.

As causas para a falta de associação de infecção por este agente e desenvolvimento de quadro clínico em canídeos, ainda não estão bem esclarecidas (Kidd, 2006). Os cães podem não ser tão susceptíveis à doença como as pessoas, talvez devido a adaptação do agente ao vector e ao cão (Kidd, 2006). Outra hipótese, é que seja necessário que os animais estejam imunocomprometidos ou exibam alterações metabólicas para apresentarem sinais clínicos (Kidd, 2006), por exemplo no caso de co-infecções com *L. infantum*. Pode também acontecer que as infecções por este agente sejam de carácter agudo, auto-limitantes e não específicas o que, combinado com a falta de suspeição por parte dos médicos veterinários atrasou a associação de infecção com *R. conorii* a sinais clínicos em cães (Solano-Gallego et al., 2006a). No entanto, alguns trabalhos concluíram que este agente pode provocar doença em canídeos (Tabela 6).

**Tabela 6- Estudos que associaram infecção natural por *R. conorii* com quadro clínico em canídeos**

<b>Estudo</b>	<b>Método de diagnóstico</b>	<b>Sinais clínicos</b>	<b>Alterações hematológicas</b>
Baneth et al. (1998)	Imunofluorescência Indirecta	Febre, letargia, linfadenomegália	-
Font et al. (citado por Alexandre, 2005)	Imunofluorescência Indirecta	Febre, anorexia, depressão, linfadenomegália, petéquias, equimoses	Leucocitose/leucopénia, anemia, trombocitopénia
Kidd (2006); Solano-Gallego et al. (2006a)	Imunofluorescência Indirecta e PCR	Febre, anorexia, letargia, taquicardia, linfonodos poplíteos aumentados, cifose, andamentos rígidos, dor articular, conjuntivite, blefarite	Neutrofilia, trombocitopénia, anemia, hipoproteinémia, hipoalbuminémia, aumento ALT, $\beta$ 1 e $\beta$ 2 globulinas e $\alpha$ -2 globulina e proteína C reactiva
Alexandre (2005); Alexandre (não publicado)	PCR	Febre, anorexia, petéquias	Trombocitopénia, leucopénia, anemia

Baneth et al. (1998) estudaram 40 canídeos com sintomas suspeitos de doença transmitida por ixodídeos, realizando detecção de anticorpos, pela técnica de Imunofluorescência Indirecta, contra vários agentes: *Babesia gibsoni*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii* estirpes Morrocan e Israeli Tick Typhus, *Borrelia burgdorferi* e *Bartonella vinsonii*. Em 20 destes canídeos, a pesquisa de anticorpos foi feita com base em duas amostras colhidas com duas semanas de intervalo, para averiguar se ocorreria seroconversão (aumento de quatro vezes ou mais do título de anticorpos) e, assim, afirmar a presença de uma infecção recente. Três destes animais seroconverteram para duas estirpes de *R. conorii* o que, segundo os autores, apoia a possibilidade deste agente causar sinais clínicos em canídeos. Um dos cães era um cachorro de três meses que apresentava febre, letargia e linfadenomegália. Após tratamento com doxiciclina, estes sintomas ficaram resolvidos.

Em 2006, foram publicados dois estudos (Kidd, 2006; Solano-Gallego, 2006a) sobre três cães Italianos com infecção aguda por *R. conorii* e sinais clínicos. Os três cães foram apresentados a consulta entre Maio e Setembro de 2005. Pertenciam à raça Yorkshire Terrier e tinham idades compreendidas entre os dois e os seis anos. Todos eles tinham história prévia de infestação por carraças. No exame físico, foram encontradas anomalias inespecíficas com alguns dias de duração e que poderiam ser compatíveis com doença transmitida por ixodídeos (Tabela 6) (Kidd, 2006). Nas análises bioquímicas verificou-se aumento de ALT (alanino-aminotransferase) e hipoproteinémia. A electroforese de proteínas revelou hipoalbuminémia e aumento ligeiro de  $\beta_1$  e  $\beta_2$ -globulinas e  $\alpha_2$ -globulina. Os três animais possuíam proteína C reactiva aumentada. Este é um marcador não específico de inflamação e que também se encontra aumentado em pacientes humanos com febre exantemática (Kidd, 2006).

Foram enviadas amostras de sangue para PCR e serologia (técnica de Imunofluorescência Indirecta) para pesquisa de vários agentes: *Ehrlichia canis*, género *Rickettsia*, *Leishmania infantum*, género *Babesia*, *Borrelia burgdorferi* e *Anaplasma phagocytophilum*. Os antígenos utilizados na técnica de Imunofluorescência Indirecta para pesquisa de *Babesia* e *Rickettsia* foram *Babesia canis*, *Rickettsia conorii* e *R. rickettsii*. Para ambas as técnicas, foram enviadas três amostras de cada animal, correspondendo a diferentes etapas do tratamento. Através do sequenciamento de fragmentos do gene *ompA* amplificados por PCR concluiu-se que estes correspondiam a estirpe Malish de *R. conorii* (Kidd, 2006). Nenhum dos outros agentes foi identificado por PCR (Kidd, 2006). Os resultados da serologia para *R. conorii* corroboram a hipótese de infecção activa, na medida em que houve um aumento do número de anticorpos em quatro vezes da primeira para a segunda titulação em dois dos cães e, no outro animal, o título de IgM inicial era muito elevado e, 65 dias depois já tinha diminuído (Kidd, 2006). No entanto, para além de detectar anticorpos contra este agente, a serologia teve resultados positivos contra outros organismos pesquisados.

Portanto, e apesar de *R. conorii* ter sido o único agente identificado por PCR, não se pode afastar a possibilidade de que co-infecção com *Ehrlichia canis*, *Babesia*, *Borrelia burgdorferi* e *Anaplasma phagocytophilum*, possa ter contribuído para os sinais clínicos apresentados, já que a serologia identificou anticorpos contra vários agentes (Kidd, 2006). De facto, em cães da zona mediterrânea, está documentada associação entre anticorpos contra *R. conorii*, *E. canis* e *A. phagocytophilum* (Solano-Gallego et al., 2006b) e também se sabe que a infecção com um agente pode alterar a susceptibilidade do hospedeiro para outros organismos (Thomas, Anguita, Barthold & Fikrig, 2001; Stoicov et al., 2004). A contrariar estes factos e a apoiar a relação de *R. conorii* com doença clínica em cães, está o facto de o PCR ter tido resultados positivos na primeira mas não nas restantes amostras, o que coincidiu com o resolver dos sinais clínicos, e o

facto do próprio laboratório ter posto de parte erros técnicos (como contaminação) que poderiam ter influenciado os resultados (Kidd, 2006).

Em Portugal, Alexandre (2005) amplificou ADN de *Rickettsia conorii* a partir do *buffy coat* obtido de canídeos com sintomas suspeitos de doença transmitida por ixodídeos. Mais tarde, conseguiu identificar a estirpe da riquetsia em questão: *R. conorii* estirpe Malish e *R. conorii* estirpe Israeli Tick Typhus (Alexandre, não publicado). Contudo, ainda não se conseguiu fazer isolamento deste agente em canídeos (Alexandre, 2005).

Sendo assim, existem já vários casos de cães com sintomas clínicos em que foi detectada *R. conorii* por métodos de biologia molecular. Por estas razões e, de acordo com os resultados de Alexandre (2005), a infecção por microrganismos do género *Rickettsia* deve ser considerada entre os diagnósticos diferenciais de quadros sintomatológicos que incluam febre, anorexia e petéquias, associados a anomalias laboratoriais como trombocitopénia, leucopénia e anemia.

Em humanos, ao contrário dos cães, o quadro clínico de febre botonosa está geralmente bem definido caracterizando-se, tradicionalmente, por febre, exantema e escara de inoculação (Sousa & Bacellar, 2004). A escara de inoculação surge em 30 a 70% dos casos e consiste numa úlcera com centro necrótico resultante da lesão traumática causada pela introdução do aparelho bucal do ixodídeo e pelas lesões celulares causadas pelas riquetsias (Sousa, et al. 2003, Bacellar, 1998). O período de incubação é de cerca de cinco a sete dias (Bacellar, 1996) e a riquetsiémia ocorre durante um período de tempo muito curto, pelo que o Homem é o elo terminal na cadeia de infecção (Alexandre, 2005). Desde 1996, registou-se um aumento do número de casos graves de doença e estes podem mesmo ser fatais (Sousa & Bacellar, 2004; Amaro et al., 2003). Em termos de alterações laboratoriais, estão descritas leucocitose com neutrofilia ou neutropénia, anemia normócítica moderada, trombocitopénia, aumento velocidade de sedimentação, diminuição actividade de protrombina, aumento das enzimas hepáticas e de algumas enzimas musculares, como creatinofosfocinase, aldolases e lactato desidrogenase, e alterações da função renal com elevação da creatinina, hiponatrémia e hipoclorémia (Poças, Bacellar & Filipe, 2002).

#### **5.1.11. Diagnósticos diferenciais**

Anteriormente, foram descritos alguns dos sinais e sintomas que são provocados por infecção por *R. conorii* em cães. No entanto, são quadros muito inespecíficos que obrigam a fazer diagnóstico diferencial com outras patologias. A generalidade das doenças transmitidas por ixodídeos, também é caracterizada por quadros clínicos inespecíficos e com uma grande variedade de sinais, pelo que deve ser feito diagnóstico diferencial com estas patologias, nomeadamente erliquiose monocítica canina e babesiose. A borreliose de Lyme deve ser

incluída nos diagnósticos diferenciais, em animais que apresentem sinais clínicos de poliartrite, como dor articular (Alexandre, 2005). Muitas vezes, a sintomatologia apresentada pode ser confundida com quadros clínicos de leishmaniose canina e por isso esta doença também deve ser incluída nos diagnósticos diferenciais. A trombocitopénia é a principal anomalia hematológica da erliquiose monocítica canina (Alexandre, 2005) e, como já foi referido, também pode caracterizar as alterações sanguíneas decorrentes de febre botonosa. Este achado laboratorial pode ser confundido com trombocitopénia imunomediada primária. No entanto, os canídeos com trombocitopénia imunomediada primária apresentam apenas quadros hemorrágicos, não surgindo febre ou linfadenopatia (Tilley & Smith, 2000). Em animais com hemorragias, deve ser descartada a hipótese de ingestão de anticoagulantes rodenticidas. Nestes casos vai haver alteração dos tempos de coagulação com aumento do tempo de coagulação activado, e tempos de protrombina e tromboplastina activadas, enquanto que em doenças transmitidas por ixodídeos o perfil de coagulação está normal sendo a hemorragia causada por trombocitopénia ou trombopatia (Alexandre, 2005).

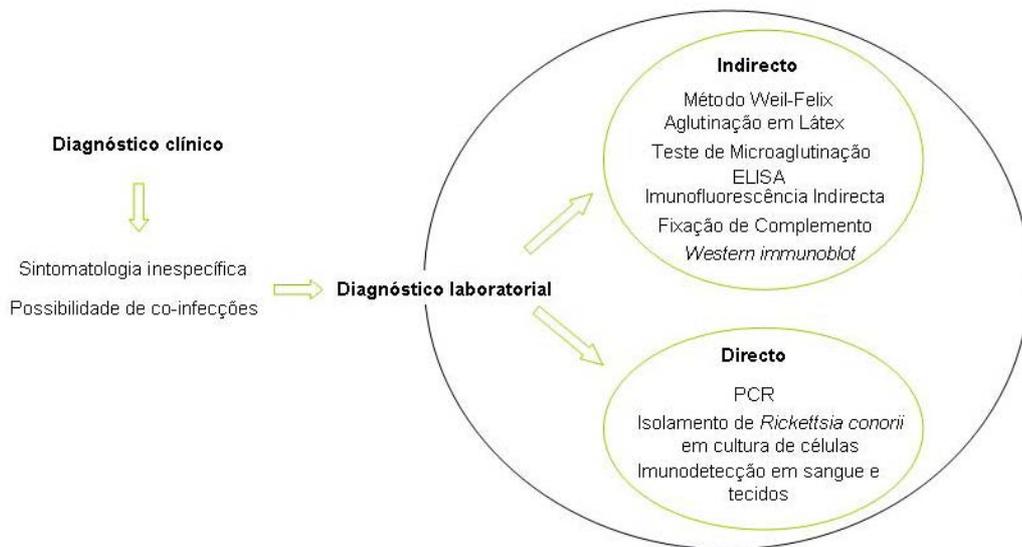
Para além das referidas, todas as doenças que possam provocar febre, anorexia, trombocitopénia, leucopénia e /ou anemia devem ser descartadas.

#### **5.1.12. Diagnóstico laboratorial**

Apesar de o exame clínico ser parte essencial do diagnóstico, a sintomatologia encontrada é inespecífica e, para além disto, existe possibilidade de co-infecção com outras doenças transmitidas por ixodídeos e outros vectores. Por estas razões, o diagnóstico laboratorial assume maior relevo que o diagnóstico clínico, para se obter um diagnóstico definitivo (Alexandre, 2005).

Devido à natureza intracelular destes microrganismos, os métodos tradicionais utilizados em bacteriologia não podem ser aplicados no diagnóstico (Parola et al., 2005). Existem, no entanto, vários métodos complementares de diagnóstico disponíveis para identificação de *Rickettsia spp.*, desde serologia a técnicas de biologia molecular (Figura 8). Os métodos mais eficientes no diagnóstico laboratorial de uma infecção aguda são os que detectam riquetsias directamente (La Scola & Raoult, 1997).

**Figura 8– Diagnóstico de *Rickettsia spp.***



#### **a) Diagnóstico indirecto**

A detecção de anticorpos (Ac) é a técnica mais usada para diagnóstico de riquetsioses na prática clínica. Existem vários métodos de detecção de anticorpos anti-riquétisia (Esquema 4) como o método Weil-Felix, a Imunofluorescência Indirecta, a Fixação de Complemento, o teste de Microaglutinação, a Aglutinação em Látex, o teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*), o *Western immunoblot*, entre outros, mas nem todos podem ser realizados por laboratórios de rotina. O método Weil-Felix, desenvolvido em 1916, é o mais antigo de todos. Baseia-se na reacção de aglutinação das células totais de antigénios do género *Proteus* quando postas em contacto com soro de doentes que contraíram uma riquetsiose (Bacellar, Miranda & Filipe, 1994). Os anticorpos que reagem com as riquétsias reagem igualmente com determinantes antigénicos de superfície de algumas espécies do género *Proteus* pelo que vão ser detectadas reacções cruzadas. Por ser um método de baixa sensibilidade e especificidade, caiu em desuso (Sousa et al., 2003). No entanto, ainda é utilizado em alguns países em desenvolvimento. Pelo contrário, a Imunofluorescência Indirecta, é a técnica de detecção de anticorpos recomendada pela Organização Mundial de Saúde (Galvão et al., 2005) pelo que será abordada mais aprofundadamente.

## - **Imunofluorescência Indirecta (IFI)**

Com este método, é possível a detecção de IgM, IgG ou ambas (La Scola & Raoult, 1997). A identificação e a titulação de anticorpos IgM específicos para as várias espécies de riquetsias fornecem indicação de uma infecção recente (La Scola & Raoult, 1997).

Idealmente, devem ser enviadas duas amostras, soro ou plasma, para titulação com um intervalo de três a quatro semanas, considerando-se que a infecção está activa quando o título de anticorpos aumenta pelo menos quatro vezes entre as duas amostras (La Scola & Raoult, 1997).

Pela serologia, um resultado positivo não implica doença clínica nem uma exposição recente ao agente (Kidd, 2006) pois, vários estudos, indicam que animais infectados possuem anticorpos durante meses (Tesouro et al., 1998; Breitschwerdt et al., 1990). Estes títulos persistentes podem representar exposições repetidas ao agente, exposição a outras riquetsias consideradas não patogénicas ou plasmócitos com longos tempos de vida (Kidd, 2006).

Por outro lado, um resultado de serologia negativo, não exclui a presença de doença porque pode não ter ocorrido ainda seroconversão (Greene & Breitschwerdt, 2006). Igualmente, baixos títulos de anticorpos ou títulos não detectáveis nas diluições utilizadas como limiar de positividade, podem originar falsos negativos (Galvão et al., 2005).

Outro aspecto que complica a interpretação dos resultados de serologia é a co-infecção com outros agentes que pode originar reacções de anticorpos cruzadas, como já foi mencionado. Para além disto, a espécie de riquetsia identificada, vai depender do antigénio que é utilizado nos métodos de serologia. Para comprovar este facto, em 1990 foram reportados casos de riquetsiose humana na Argentina atribuídos a *R. conorii*, por estudos serológicos (Venzal et al., 2004). No entanto, técnicas moleculares demonstraram que a espécie de *Rickettsia* em questão era *R. parkeri* (Venzal et al., 2004). A serologia apenas pode confirmar a presença de anticorpos contra o género *Rickettsia*, ou seja, que o animal foi exposto a uma riquetsia do grupo das febres exantemáticas, não permite discriminar a espécie de riquetsia envolvida.

Contudo, uma das vantagens desta técnica, como método de diagnóstico, é permitir o estudo evolutivo do título de anticorpos, com base em medições em intervalos regulares: entre três a seis meses, consoante o clínico e a disponibilidade do proprietário (Â. Xufre, comunicação pessoal, Março 26, 2008). Este título pode variar ao longo do tempo, fornecendo, assim, indicação da necessidade de realizar novo tratamento (Â. Xufre, comunicação pessoal, Março 26, 2008). Pelo contrário, o PCR convencional dá um resultado positivo ou negativo, não quantificando a amostra analisada.

Portanto, a detecção de anticorpos contra um determinado antígeno no soro de um cão, pode ser devido a uma exposição anterior que resolveu, a uma infecção subclínica ou assintomática que decorre no momento ou a uma infecção activa (Baneth et al., 1998). Por tudo isto e, segundo La Scola e Raoult (1997), esta técnica só deve ser considerada para estudos seroepidemiológicos em áreas onde a seroprevalência de riquetsioses esteja bem estabelecida.

#### **b) Diagnóstico directo**

As técnicas de diagnóstico directo apresentam vantagens sobre aquelas de diagnóstico indirecto por permitirem, na maioria das vezes, alcançar um diagnóstico definitivo e especificar a espécie de riquetsia envolvida, mesmo quando os anticorpos não são ainda detectáveis (Alexandre, 2005).

##### **- Detecção de ácidos nucleicos pela Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Segundo La Scola e Raoult (1997), esta é, provavelmente, a técnica de eleição na maioria dos laboratórios, para diagnóstico precoce, ainda antes de existirem anticorpos detectáveis por outras técnicas.

A técnica de PCR permite detectar ADN do agente em amostras de sangue, mesmo que este surja em pequeno número em circulação, e consegue obter resultados positivos em pacientes seronegativos, pelo que pode ser útil para diagnóstico da doença em fases agudas. Alguns PCR revelaram mesmo ser mais sensíveis que algumas técnicas de cultura de células (Fournier & Raoult, 2004).

Para além do sangue, que deve ser colhido para tubos com EDTA ou citrato de sódio, podem ser utilizados material de biópsias de pele, tecidos frescos ou conservados em parafina ou líquido cefalo-raquidiano (La Scola & Raoult, 1997; Raoult & Roux, 1997). Em humanos, a escara de inoculação é a lesão ideal para fazer biópsia e o melhor material para PCR (La Scola & Raoult, 1997; Raoult & Roux, 1997).

As técnicas actuais de PCR, para diagnóstico de riquetsioses em canídeos, fazem amplificação de segmentos dos genes que codificam proteínas tais como 17-kD, gltA (enzima citrato sintase), OmpA e OmpB (La Scola & Raoult, 1997).

Os resultados falsos negativos são um dos problemas da técnica de PCR e podem ser devidos a destruição do material genético pelas DNases ou RNases, pela inibição da reacção pelo ião Fe<sup>2+</sup> ou pela heparina (Galvão et al., 2005).

#### - Isolamento de *Rickettsia conorii* em cultura de células

O isolamento de riquetsias em cultura é a melhor forma de obter um diagnóstico definitivo sobre a espécie de riquetsia, embora não seja um método de diagnóstico rápido (Bacellar & Sousa, 2004). Em relação ao PCR, esta técnica tem a vantagem de poder ser utilizada noutra tipo de investigações para além da realização de um diagnóstico, como por exemplo em estudos com antibióticos (Â. Xufre, comunicação pessoal, Março 26, 2008).

Apesar disto, esta técnica só pode ser realizada em laboratórios de referência, com nível 3 de biosegurança, pois acarreta alguns perigos para os trabalhadores devido a possibilidade de infecção dos mesmos (Sousa et al., 2003).

Para isolamento, as amostras devem ser colhidas antes do início da antibioterapia, mantidas em refrigeração a 4°C e congeladas a -80°C ou processadas em 24 a 48 horas. (Galvão et al., 2005). As amostras incluem *buffy coat* de sangue heparinizado, sangue total heparinizado ou em EDTA, plasma, material de necropsia ou material de biópsia (Galvão et al., 2005; La Scola & Raoult, 1997).

Vários métodos foram utilizados, ao longo dos anos, para isolar este agente, como inoculação em animais de laboratório ou ovos embrionados, mas o método de eleição, hoje em dia, é a cultura de células por *shell-vial*.

Para cultura, podem ser utilizadas células Vero, L929 e outras (Bacellar & Sousa, 2004). Após a inoculação, é feita centrifugação, passo essencial pois aumenta a fixação e a penetração das riquetsias nas células, aumentando assim a sensibilidade da técnica (La Scola & Raoult, 1997). Posteriormente, são realizados outros procedimentos para verificar o crescimento do agente, variáveis consoante o laboratório (como IFI, coloração Giemsa ou Gimenez) (Kidd, 2006).

Depois de se obter um isolado, são realizadas as técnicas para identificação da espécie de riquetsia, com o auxílio de anticorpos monoclonais ou técnicas moleculares (Kidd, 2006).

#### - Imunodeteção em sangue e tecidos

A técnica de imunohistoquímica pode ser utilizada para demonstrar riquetsias em cortes histológicos ainda antes de ocorrer seroconversão (La Scola & Raoult, 1997).

As amostras podem ser analisadas a fresco ou após inclusão em parafina e, segundo La Scola e Raoult (1997), os materiais mais utilizados são biópsias de pele ou pústulas de inoculação. No entanto, em casos fatais de doença em animais ou humanos, a bactéria pode ser detectada em tecidos de vários órgãos como o fígado, pulmão, baço, coração, pele e meninges (La Scola & Raoult, 1997).

Usam-se anticorpos anti-riquétsia, mono ou policlonais. Dependendo do tipo de anticorpo usado para detecção, podem ocorrer reacções cruzadas entre as várias riquétsias do mesmo grupo. O uso de anticorpos monoclonais permite identificar a espécie de *Rickettsia* infectante (Raoult & Roux, 1997).

Esta técnica tem uma especificidade de 100% e sensibilidade entre 53% e 75% (La Scola & Raoult, 1997).

Foram desenvolvidos métodos para detecção imunológica de *R. conorii* em células endoteliais circulantes, a partir de sangue ou tecidos de pacientes infectados, que permitem obter resultados em três horas após a colheita de amostras (La Scola & Raoult, 1997). Este é assim, considerado por La Scola e Raoult (1997), o exame mais rápido para diagnóstico antes da seroconversão. Permite visualizar riquétsias mortas e ter resultados mesmo em amostras a partir das quais não se podem realizar culturas e pode ser realizado em qualquer laboratório, ao contrário da cultura de células, que necessita de condições especiais de segurança (La Scola & Raoult, 1996). Contudo, um resultado positivo é indicativo de febre botonosa mas um resultado negativo não exclui o diagnóstico (La Scola & Raoult, 1996). Este método tem uma sensibilidade de 50% e está limitado pela quantidade e qualidade das células endoteliais circulantes no momento da prova que, muitas vezes, surgem degeneradas (La Scola & Raoult, 1997). O número de células endoteliais circulantes está directamente relacionado com a gravidade da doença (La Scola & Raoult, 1997).

### **c) Isolamento e detecção de riquétsias a partir dos artrópodes vectores**

O teste da hemolinfa, é utilizado quando se pretende avaliar a presença de riquétsias em ixodídeos e deve ser realizado com espécimens vivos (La Scola & Raoult, 1997). Consiste em seccionar um membro da carraça e colher um pouco de hemolinfa. Esta hemolinfa é depois colocada numa lâmina que é corada pelo método Gimenez ou submetida a métodos de imunodeteção.

A técnica *shell vial* e os métodos de PCR também podem ser usados para identificação de riquétsias em ixodídeos (La Scola & Raoult, 1997).

### **5.1.13. Tratamento específico e de suporte**

Apesar de, nesta revisão, terem sido referidos casos de detecção de ADN de riquétsia, por PCR, em cães com sintomatologia clínica, ainda não existe informação sobre o tratamento de febre botonosa em canídeos. Por estas razões, optou-se por fazer extrapolação da terapêutica usada na febre das Montanhas Rochosas para a febre botonosa, na medida em que ambas as

doenças são causadas por riquetsias do grupo das febres exantemáticas, tendo fisiopatologias semelhantes e, possivelmente, tratamento idêntico.

Existem vários antibióticos com eficácia conhecida contra riquetsias (Tabela 7) (Breitschwerdt et al., 1991; Breitschwerdt et al., 1999 Couto, 2003; Greene & Breitschwerdt, 2006) .

**Tabela 7- Grupos de antibióticos com eficácia conhecida contra riquetsias em animais**

<b>Antibiótico</b>
Tetraciclina (Doxiciclina)
Fluoroquinolonas (Enrofloxacina, Trovafoxacina)
Macrólidos (Azitromicina (?))
Cloranfenicol

Breitschwerdt et al. (1999) compararam a eficácia de três antibióticos usados no tratamento de infecções experimentais por *R. rickettsii* em cães (doxiciclina, trovafoxacina e azitromicina) e concluíram que as tetraciclina e as quinolonas apresentam um desempenho similar no tratamento de riquetsioses, devendo ser utilizadas como moléculas de primeira escolha. Neste estudo, a doxiciclina, uma tetraciclina lipossolúvel, conseguiu eliminar as riquetsias em circulação mais precocemente que os outros antibióticos, enquanto que tanto a doxiciclina como a trovafoxacina, se mostraram igualmente eficientes na resolução ou prevenção da perda de líquido vascular. A resolução rápida da lesão vascular deveria reduzir a morbidade e mortalidade associadas a infecção por *R. rickettsii*, assim como o aparecimento de sequelas após o tratamento (Breitschwerdt et al., 1999). A azitromicina, um macrólido, não se mostrou tão eficaz como as outras moléculas mas, segundo os autores, este facto pode dever-se apenas à dose que foi utilizada neste estudo experimental.

Outro antibiótico de eficácia conhecida contra microrganismos do género *Rickettsia* é o cloranfenicol que, num outro estudo (Breitschwerdt et al., 1991), comprovou ser tão eficaz como a fluorquinolona enrofloxacina e as tetraciclina.

Duas fontes bibliográficas consultadas (Couto, 2003; Greene & Breitschwerdt, 2006) também referem o uso de tetraciclina, doxiciclina, enrofloxacina ou cloranfenicol no tratamento de febre das Montanhas Rochosas (Tabela 8). Estes são os fármacos anti-riquetsia mais usados (Couto, 2003) e doxiciclina é o tratamento de eleição contra *R. rickettsii* em cães e pessoas e *R. conorii* em pessoas (Kidd, 2006).

**Tabela 8- Antibióticos utilizados no tratamento de febre das Montanhas Rochosas**

Antibiótico	Greene & Breitschwerdt (2006)				Couto (2003)			
	Dose	Via	Frequência	Duração	Dose	Via	Frequência	Duração
Tetraciclina	22-30 mg/Kg	PO EV	8 em 8 horas	7 dias	22 mg/Kg	PO	8 em 8 horas	14 a 21 dias
Doxiciclina (derivado tetraciclinas)	10-20 mg/Kg	PO EV	12 em 12 horas		5-10 mg/Kg	PO	12 em 12 horas	
Enrofloxacina (fluoroquinolona)	3 mg/Kg	PO SC	12 em 12 horas		3 mg/Kg	PO SC	12 em 12 horas	7 dias
Cloranfenicol	15-30 mg/Kg	PO EV SC IM	8 em 8 horas		22-25 mg/Kg	PO	8 em 8 horas	14 dias

PO- via oral; EV- via endovenosa; SC- via subcutânea; IM- via intramuscular

No que respeita a *R. conorii*, o único tratamento referido em estudos publicados foi o realizado aos três cães de raça Yorkshire em Itália (Solano-Gallego et al., 2006a) e o utilizado no cachorro no estudo de Baneth et al. (1998).

A dois dos Yorkshires foi administrada doxiciclina na dose de 10 mg/Kg, por via oral, uma vez ao dia, durante um mês. Os sinais clínicos começaram a resolver dois dias depois do início da antibioterapia. O outro Yorkshire foi tratado com ceftriaxona na dose de 30mg/Kg, via endovenosa, duas vezes ao dia, durante cinco dias. Os sinais clínicos desapareceram ao fim de quatro dias. No entanto, este antibiótico (ceftriaxona) não tem eficácia conhecida contra riquetsias (Parola et al., 2005), pelo que é provável que a eliminação do agente por parte do sistema imunitário tenha tido um papel importante na resolução do quadro clínico (Kelly et al., 1992). Do estudo de Baneth et al. (1998) sabe-se que o cachorro foi tratado com doxiciclina e que recuperou, embora a dose e duração do tratamento não sejam mencionados.

No entanto, e como já foi referido anteriormente, não existem dados concretos sobre tratamento de febre botonosa em canídeos. Na prática clínica, só raramente o tratamento é feito a pensar

apenas em *Rickettsia conorii*, devido a existência de muitas co-infecções e às limitações já referidas do método de IFI, a técnica mais utilizada para diagnóstico destas patologias. Como consequência, o mais frequente é realizar uma terapêutica igualmente eficaz para o tratamento de riquetsiose e erliquiose caninas. Neste sentido, a terapêutica aplicada e frequentemente de primeira escolha é doxiciclina 10 mg/Kg, via oral, cada 24 horas ou 5 mg/Kg, via oral, cada 12 horas durante 28 dias (Visconti & Díez, 2001; Neer & Harrus, 2006). No entanto, outros antibióticos podem ser usados no tratamento de erliquiose canina (Visconti & Díez, 2001; Neer & Harrus, 2006).

No tratamento de riquetsioses, a resposta a antibioterapia é rápida surgindo entre 24 a 48 horas (Kidd, 2006). A administração parenteral dos antibióticos deve ser opção em pacientes que estão a vomitar (Greene & Breitschwerdt, 2006).

Os antibióticos mencionados, apesar de eficazes, têm efeitos adversos pelo que a sua utilização deve ser avaliada caso a caso. As tetraciclina (incluindo a doxiciclina) formam complexos estáveis com o cálcio dos tecidos onde há formação óssea o que pode causar inibição do crescimento (Visconti & Díez, 2001). A administração destes antibióticos a cachorros ou a cadelas gestantes provoca coloração amarela dos dentes deciduos que também pode atingir a dentição definitiva (Prescott, 2000b). Também pode ocorrer hipoplasia do esmalte (Visconti & Díez, 2001). Por estas razões, estes princípios activos não são recomendados em animais com menos de um ano e em fêmeas gestantes (Visconti & Díez, 2001). Outros efeitos secundários destes antibióticos são as alterações gastro-intestinais que provocam como vômitos após administração oral e distúrbios da flora intestinal (Prescott, 2000b).

Ao contrário das restantes tetraciclina, a doxiciclina pode ser usada em pacientes com insuficiência renal pois a sua excreção não é feita por esta via (Prescott, 2000b; Tilley & Smith, 2000). Para além disto, a doxiciclina é mais eficaz que os outros fármacos do mesmo grupo pois tem maior capacidade de penetração nas células (Prescott, 2000b).

As fluorquinolonas, apesar da sua eficácia, não devem ser usadas em cães com menos de oito meses de idade e no caso de raças grandes/gigantes não devem ser administradas antes dos 12 meses devido à possibilidade de causarem artropatia (Walker, 2000). Estes antibióticos estão também associados a alterações gastro-intestinais (náusea, vômitos, diarreia) (Walker, 2000).

O principal efeito tóxico do cloranfenicol é a aplasia medular que provoca, cuja probabilidade de ocorrência, aumenta com a dose utilizada e a duração do tratamento (Prescott, 2000a). No entanto, se forem usadas as doses de manutenção e a duração da terapêutica for inferior a dez dias, é pouco provável que estes efeitos tóxicos aconteçam, a não ser que o animal tenha as funções hepática (principal meio de metabolização deste fármaco) ou renal alteradas (Prescott, 2000a). Para além disto, os cães não são tão susceptíveis a esta toxicidade como os gatos

(Prescott, 2000a). Por estas razões, a administração oral de cloranfenicol em canídeos é segura (Prescott, 2000a). Para além de estar associado a aplasia medular, já foram relatados casos de anafilaxia, vómitos e diarreia em cães e gatos tratados com doses terapêuticas de cloranfenicol (Prescott, 2000a).

Para além da antibioterapia, tal como noutras doenças transmitidas por ixodídeos, pode ser realizado tratamento de suporte, consoante as necessidades, nomeadamente em situações de choque, alterações de coagulação ou alterações metabólicas. No entanto, a fluidoterapia endovenosa deve ser administrada com precaução pois, como já foi referido, existe aumento de permeabilidade vascular nestes animais havendo perigo de provocar edema cerebral ou pulmonar (Greene & Breitschwerdt, 2006). O uso de glucocorticoides em doses anti-inflamatórias ou imunossupressoras em associação com a antibioterapia não potencializa a gravidade dos sinais clínicos em canídeos infectados experimentalmente com *R. rickettsii* (Breitschwerdt, Davidson, Hegarty, Papich & Grindem, 1997). Pelo contrário, estes trazem benefícios e são vulgarmente utilizados como complemento da antibioterapia quando os sintomas dos animais estão relacionados com uma resposta imunitária exagerada como dor articular, uveíte, entre outros.

A eficácia do tratamento está relacionada com a rapidez com que é executado pelo que diagnóstico e início de tratamento tardios estão associados a aumento da morbidade e mortalidade em pessoas e cães com riquetsiose (Kidd, 2006).

#### **5.1.14. Profilaxia e controlo**

Uma vez que a febre escaro-nodular é uma zoonose cujos vectores e reservatórios circulam livres na natureza, a sua erradicação é praticamente impossível (Sousa et al., 2003). A vigilância epidemiológica, através da notificação, é essencial para o conhecimento da evolução do número de casos de doença, permitindo a adopção de medidas preventivas e de controlo pelas autoridades de saúde quando se justifique (Sousa et al., 2003).

Ainda não existe uma vacina eficaz contra riquetsias no geral, apesar de já terem sido feitas várias tentativas (Díaz-Montero, Feng, Crocquet-Valdes & Walker, 2001). Muitos aspectos da resposta imunitária contra estes agentes estão ainda por conhecer mas sabe-se que a resposta mediada por células tem um papel preponderante. Portanto, uma vacina eficaz seria aquela que possuísse elementos imunoestimuladores que activassem este tipo de resposta imunológica (Díaz-Montero et al., 2001).

Sendo assim, a prevenção destas doenças, nomeadamente de febre botonosa, deve ser dirigida no sentido de evitar o parasitismo pelos vectores (Bacellar, 1998). Sabendo que estes parasitas possuem fases de vida livre e parasitária e que *R. sanguineus* está adaptado a

concluir o seu ciclo de vida próximo dos canídeos, o controlo das suas populações deve ter sempre em conta o animal e o ambiente, numa tentativa de eliminar os seus biótopos. Existem vários grupos químicos de acaricidas eficazes na eliminação destes ectoparasitas (Tabela 9) (Taylor, 2001; Beugnet, 2004).

**Tabela 9- Principais grupos de acaricidas eficazes na eliminação de ixodídeos**

<b>Grupos de acaricidas</b>	<b>Exemplos</b>
Formadiminas	Amitraz
Piretrinas e Piretróides	Deltametrina, Flumetrina, Cipermetrina
Fenil-pirazóis	Fipronil
Organofosforados	Diazinão
Carbamatos	Propoxur, Cabaril
Lactonas macrocíclicas (avermectinas/milbemicinas)	Milbemicina oxima, Selamectina, Moxidectina

Os princípios activos apresentados anteriormente têm acção neurotóxica (Beugnet, 2004). Contudo, actualmente, empregam-se cada vez mais na prevenção de parasitismo por ixodídeos em animais de companhia, inibidores de crescimento ou desenvolvimento dos artrópodes (*insect growth regulators*) e o (s)-metopreno, um análogo da hormona juvenil, é o princípio activo deste grupo com maior utilização (Taylor 2001; Beugnet, 2004).

Para aplicação no animal, estes acaricidas podem ter várias apresentações como coleiras, champôs, *sprays*, ou produtos *spot-on*. Devido a facilidade de aplicação e ao seu efeito residual, as formulações *spot-on* e as coleiras (polímeros plásticos onde a matriz é impregnada pelo acaricida), são utilizadas com maior frequência (Beugnet, 2004; Taylor, 2001). A regularidade de aplicação destes produtos depende do grau de infestação e do efeito residual do acaricida, devendo ser sempre seguidas as instruções do fabricante (Dantas-Torres, 2008). No entanto, sempre que necessário, podem ser adoptados esquemas de tratamento alternativos (Dantas-Torres, 2008).

O tempo que decorre desde a aplicação do acaricida até a eliminação de grandes infestações não é bem conhecido (Dantas-Torres, 2008).

Em termos de estudos de eficácia, a associação imidoclopride e permetrina revelou uma capacidade curativa de 74,9% e uma capacidade de prevenção do parasitismo acima dos 90%, oferecendo protecção durante cinco semanas (Epe, Coati & Stanneck, 2003). A administração tópica de selamectina (semanal ou de duas em duas semanas) demonstrou uma eficácia contra *R. sanguineus* acima dos 89% (Jernigan et al., 2000).

Em relação ao ambiente, pode proceder-se a aplicação dos acaricidas em fumigações (carbaril, permetrinas, piretrinas, entre outros), sendo também de extrema importância a correcta manutenção das instalações dos animais.

O uso indiscriminado dos acaricidas, contribui para a selecção de espécies de ixodídeos resistentes pelo que já foram relatadas resistências a determinados produtos (Dantas-Torres, 2008). Em Espanha, Estrada-Peña (2005) encontrou resistência baixa a moderada ao propoxur, elevada resistência a deltametrina e nenhuma resistência ao amitraz, em 15 populações de *R. sanguineus*.

Sendo assim, o controlo de *R. sanguineus* e de ixodídeos no geral, deve ser realizado com base no conhecimento da ecologia local destes parasitas e a utilização dos acaricidas deve ser criteriosa para evitar a criação de resistências (Dantas-Torres, 2008).

## II. Objectivos

Os ixodídeos, como vectores de uma grande variedade de agentes patogénicos, são responsáveis pela infecção do Homem e dos animais com estes agentes. Os cães, em contacto com o exterior, estão altamente expostos a estes parasitas e, por conseguinte, aos agentes patogénicos que estes albergam. É conhecido que muitos destes organismos causam doença clínica em canídeos. No entanto, existem dúvidas sobre a capacidade de *R. conorii* provocar doença nestes animais. Com este intuito, foi realizado um estudo retrospectivo com base em casos clínicos do Hospital Veterinário do Restelo. Sendo este um estudo retrospectivo que também inclui datas fora do período de estágio (de Maio de 2007 a Setembro de 2007), nem todos estes casos foram assistidos pela estagiária e, nestas situações, houve conhecimento dos mesmos pelo acesso a base de dados do hospital.

Os objectivos principais deste estudo foram:

- Estabelecer a seroprevalência de *R. conorii* na amostra em estudo;
- Fornecer evidências serológicas de quadros clínicos causados por *R. conorii* na amostra de canídeos e o tratamento aplicado nestes casos;
- Comparar a seroprevalência de *R. conorii* na amostra em estudo com a obtida para outros agentes transmitidos por vectores na mesma amostra.

Secundariamente pretendeu-se:

- Comparar a presença de anticorpos em machos e fêmeas;
- Avaliar a existência de sazonalidade de resultados de serologia positivos para *R. conorii*;
- Estudar a prevalência de agentes transmitidos por ixodídeos na amostra de cães de rua;

- Associar história de parasitismo por ixodídeos com resultados de Imunofluorescência Indirecta positivos para agentes transmitidos por estes vectores.

### III. Material e métodos

#### 1. Material

A amostra de canídeos em estudo, apresentou-se à consulta no Hospital Veterinário do Restelo, entre os meses de Maio de 2007 (mês em que o hospital começou a trabalhar com o Laboratório DNAtech que colaborou na realização deste estudo) e Fevereiro de 2008 (fim do período de estágio). Foram incluídos, neste estudo, animais com suspeita de doença transmitida por ixodídeos e aos quais foram pesquisados anticorpos anti-*Rickettsia*. Estes cães possuíam, pelo menos, um dos sinais/sintomas ou componentes da história pregressa abaixo enumerados, que constituíram os critérios de inclusão:

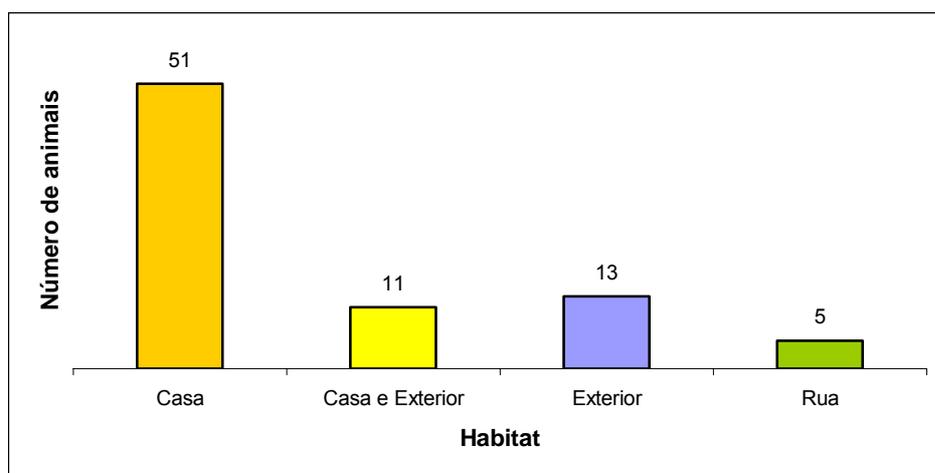
- Alterações de coagulação (epistáxis, hematomas, petéquias);
- Alterações gastro-intestinais (diarreia, vómitos);
- Alterações inespecíficas (piréxia, anorexia, perda de peso, cansaço).
- Alterações neurológicas/ musculoesqueléticas (convulsões, ataxia);
- Alterações oculares (uveíte);
- Cães vadios adoptados;
- Dor de origem inespecífica;
- Esplenomegália;
- Linfadenomegália;
- História de parasitismo por ixodídeos;

Obteve-se, assim, uma amostra de 91 canídeos, provenientes de quatro distritos do país (Lisboa (n=88), Leiria (n=1), Santarém (n=1) e Setúbal (n=1)). A amostra era constituída por 31 fêmeas e 60 machos, com idades compreendidas entre os 4 meses e os 15 anos (média de 7 anos). As idades mais representadas foram os 8 e 9 anos com 13 animais cada. Destes animais, 27 eram de raça indeterminada e 64 pertenciam a uma raça definida. A raça Caniche, com 6 animais, e as raças Yorkshire Terrier e Labrador Retriever, com 5 animais cada, foram as mais representadas.

Da amostra em estudo, 16 canídeos tinham história de parasitismo por ixodídeos.

O habitat destes animais foi referido pelos donos, e agrupado nas quatro categorias expressas no gráfico 1. Em 11 animais, contudo, esta informação não estava disponível.

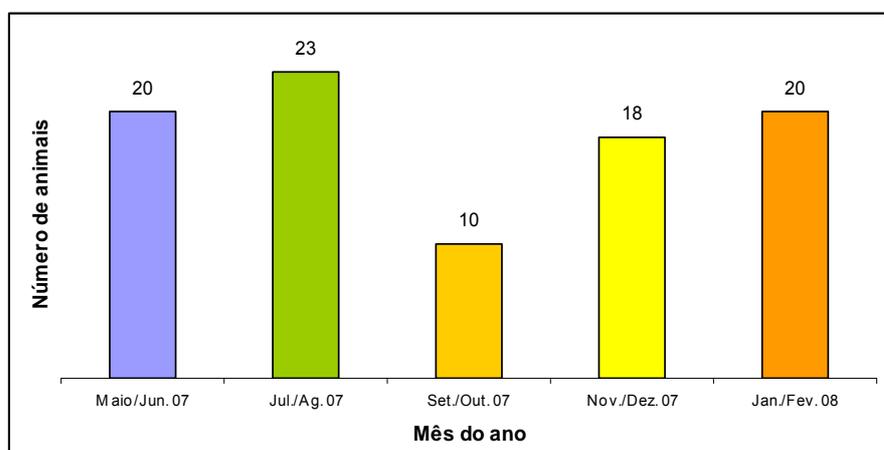
**Gráfico 1- Habitat da amostra de canídeos em estudo**



Foi considerado como habitat o local onde os animais passavam a maioria do seu tempo, admitindo, portanto, que os animais com habitat “casa” possam ter contacto directo com o exterior.

O gráfico 2, refere o número de canídeos em que foi realizada pesquisa de anticorpos contra *R. conorii* nos vários meses em estudo.

**Gráfico 2- Mês do ano em que foi realizada a pesquisa de anticorpos anti-*R. conorii***



Na generalidade dos casos, as histórias clínicas destes animais foram escritas de modo muito sucinto e, muitas vezes, os médicos veterinários apenas referiram o que consideraram ser os principais componentes da história progressa e as alterações de exame físico que consideraram relevantes. Este facto prejudicou a colheita dos dados usados para a realização deste estudo.

## 2. Métodos

Aos 91 animais, foram colhidas amostras de sangue periférico, para tubos secos, para serem submetidas à técnica de Imunofluorescência Indirecta (IFI) para detecção e titulação de anticorpos contra de *R. conorii*. Em 90 cães foi também realizada a pesquisa de anticorpos anti-*Ehrlichia canis*. Em alguns deles foi ainda realizada a mesma técnica de diagnóstico para detecção de anticorpos contra *Babesia canis* (n=26) e *Leishmania infantum* (n=56), de acordo o quadro clínico apresentado.

Técnicas hematológicas como hemograma, análises bioquímicas ou outros procedimentos de hematologia foram também realizados, consoante as necessidades de cada caso.

### **2.1. Técnica de Imunofluorescência Indirecta para detecção de anticorpos anti-*R. conorii* em soros de canídeos**

Após a colheita, as amostras foram submetidas a centrifugação e, os soros obtidos, foram enviados, em refrigeração, para o Laboratório DNAtch que realizou a técnica de IFI.

O protocolo do teste de IFI utilizado é definido pelo fabricante do kit de detecção (VIRCELL) (Anexo II). O kit contém lâminas preparadas com antigénios de cultura de *R. conorii* estirpe Moroccan crescidos em células Vero. A técnica utilizada detecta anticorpos tipo IgG e segundo, estudos do fabricante, possui sensibilidade e especificidade de 100%.

Cada um dos soros foi diluído com PBS de forma a serem conseguidas duas diluições: 1:40 e 1:80. A partir destas diluições foi realizada a prova em questão, consoante o seguinte método:

1. Foram colocados 20 µl de cada diluição nos vários poços da lâmina;
2. As lâminas foram incubadas em câmara húmida a 37°C durante 30 minutos;
3. O excesso de soro foi depois arrastado das lâminas com uma primeira lavagem rápida em PBS, seguindo-se de uma submersão entre 10 a 15 minutos em PBS e de uma lavagem ligeira com água destilada;
4. Depois de secas ao ar, foram colocados 20 µl de soro anti-IgG de cão conjugado com fluoresceína e as lâminas novamente incubadas e lavadas como descrito em 2 e 3;
5. As lâminas foram outra vez secas, juntou-se uma gota de meio de montagem a cada poço e cobriu-se com lamela;
6. Em cada lâmina, dois poços foram utilizados para soros controlo positivos e negativos.

No final, as lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência Olympus BX60 com uma ampliação de 400x.

Os resultados positivos manifestam-se pela visualização de estruturas de morfologia cocobacilar, as riquetsias, com fluorescência cor verde-maçã. Numa reacção negativa, esta fluorescência não é detectada e é observada uma cor vermelha devido a utilização de um

corante (Azul de Evans) que é adicionado juntamente com o conjugado. O título dos soros foi atribuído pela máxima diluição em que foram observadas reacções positivas e os resultados enviados como positivos a 1:80 e/ou 1:40 ou negativos.

Existem, no entanto, alguns casos em que se observam microrganismos de cor vermelha mas com uma fluorescência muito ténue e que são considerados como apresentando fluorescência basal. Este fenómeno pode ocorrer por inespecificidade da técnica, por reacções cruzadas com anticorpos específicos de outros agentes ou por se estar perante um período onde ainda não foram produzidos anticorpos necessários à obtenção de um título positivo. Por isso, estes casos devem ser interpretados isoladamente, de acordo com o agente que se está a pesquisar, com o título de anticorpos e com os sinais clínicos que o animal apresenta. Neste contexto, é importante uma correcta interpretação dos resultados obtidos pelo que, deverá ocorrer entre o médico veterinário e o laboratório, um cruzamento de informações de forma a obter o diagnóstico mais acertado. Regra geral, se um animal apresentar fluorescência basal na pesquisa de qualquer agente, na ausência de quadro clínico compatível com o mesmo, deverá ser considerado suspeito e ficar sob vigia (na eventualidade de surgirem alguns sintomas) e a análise deve ser repetida no espaço de um mês e meio, no mesmo laboratório (A. Xufre, comunicação pessoal, Abril 14, 2008). Deste modo, pode haver comparação entre os resultados obtidos e avaliação da evolução do título de anticorpos.

Para controlo interno do laboratório DNAtch, 15% das amostras recebidas no mesmo dia são repetidas aleatoriamente, qualquer que seja o agente pesquisado por IFI.

## **2.2. Técnica de Imunofluorescência Indirecta para detecção de anticorpos contra os restantes agentes pesquisados**

Como já foi referido, foram também pesquisados, embora não em todos os animais, anticorpos contra outros agentes: *B. canis*, *E. canis* e *L. infantum*. O método de IFI utilizado nestes casos foi semelhante ao descrito para *R. conorii*, variando apenas o antigénio da lâmina e as diluições efectuadas, para cada um dos agentes.

## 2.3. Exames hematológicos

Devido as alterações hematológicas que podem ser provocadas por *R. conorii*, a avaliação de alguns parâmetros sanguíneos, tem elevado interesse neste estudo. As técnicas de hematologia foram realizadas de acordo com as necessidades de cada caso clínico, pelo que não foram utilizadas em todos os animais.

### 2.3.1. Hemograma

Para a realização desta técnica, o sangue foi colhido numa veia periférica para tubo com heparina e processado imediatamente em contador de células automáticas (MS4+ ou Idexx VetLab Station) existente no Hospital Veterinário do Restelo. Foram avaliados vários parâmetros de diferentes linhas celulares e os valores de referência utilizados para ambas as máquinas foram determinados pelos fabricantes (Tabela 10).

**Tabela 10- Parâmetros de hemograma avaliados e valores de referência para cada um dos contadores de células utilizado**

Parâmetro Hematológico	Contador de células automático Idexx VetLab Station	Contador de células automático MS4+	
Nº total de leucócitos	5,50 x 10 <sup>9</sup> /L - 16,90 x 10 <sup>9</sup> /L	6,00 m/mm <sup>3</sup> - 17,00 m/mm <sup>3</sup>	
Contagem diferencial de	Linfócitos	0,50 x 10 <sup>9</sup> /L - 4,90 x 10 <sup>9</sup> /L	1,00 m/mm <sup>3</sup> - 4,60 m/mm <sup>3</sup>
	Monócitos	0,30 x 10 <sup>9</sup> /L - 2,00x 10 <sup>9</sup> /L	0,15 m/mm <sup>3</sup> - 1,35 m/mm <sup>3</sup>
	Neutrófilos	2,00 x 10 <sup>9</sup> /L - 12,00 x 10 <sup>9</sup> /L	3,00 m/mm <sup>3</sup> - 11,50 m/mm <sup>3</sup>
	Eosinófilos	0,10 x 10 <sup>9</sup> /L - 1,49 x 10 <sup>9</sup> /L	-
	Basófilos	0,00 x 10 <sup>9</sup> /L - 0,10 x 10 <sup>9</sup> /L	-
	Hematócrito	37,00% - 55,00%	35,00% - 55,00%
Nº total de eritrócitos	5,50 x 10 <sup>12</sup> /L - 8,5 x 10 <sup>12</sup> /L	5,5 M/mm <sup>3</sup> - 8,5 m/mm <sup>3</sup>	
Volume corpuscular médio	60,00 fL - 77,00 fL	58,00 fL - 73,00 fL	
Concentração de hemoglobina	12,00 g/dL - 18,00 g/dL	10,00 g/dL - 18,00g/dL	
Hemoglobina corpuscular média	18,50 pg - 30,00 pg	19,5 pg - 24,5 pg	
Concentração de hemoglobina corpuscular média	30,00 g/dL - 37,50 g/dL	28,00 g/dL - 40,00 g/dL	
Nº total de plaquetas	175 K/μL - 500 K/μL	120 m/mm <sup>3</sup> - 600 m/mm <sup>3</sup>	

### 2.3.2. Parâmetros bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos foram avaliados com recurso à técnica de química seca, realizada na máquina Spotchem EZ SP-4430, pelo uso de tiras de reagentes Spotchem II. A tabela 11 resume os diferentes parâmetros avaliados, assim como os respectivos valores de referência também determinados pelos fabricantes.

**Tabela 11- Parâmetros bioquímicos avaliados e valores de referência para cada um deles**

Parâmetros bioquímicos	Valores de referência
Ureia	<16 mg/dL
Creatinina	<2 mg/dL
Glucose	40-150 mg/dL
ALP	<147 UI/L
ALT	<120 UI/L
Proteínas totais	6 a 8 mg/dL

### 2.3.3. Exame microscópico de esfregaço sanguíneo

O exame microscópico de esfregaço sanguíneo foi utilizado, como meio complementar de diagnóstico, em alguns dos casos clínicos incluídos neste estudo. Esta técnica é muitas vezes requerida, pelos clínicos do hospital em questão, para confirmar trombocitopénias dadas pelos contadores de células automáticas, para realizar contagem diferencial de leucócitos e para avaliar o tipo de anemia quanto à resposta medular (avaliando as características das células sanguíneas e realizando uma contagem de reticulócitos). Para além disto, permite observar agentes hemáticos como *Babesia* e *Ehrlichia* (nomeadamente *Ehrlichia platys*, agora designada por *Anaplasma platys*, já a pesquisa deste agente pela técnica de Imunofluorescência Indirecta pode dar reacções cruzadas com outras espécies de *Ehrlichia*). A coloração utilizada é do tipo Romanowsky (coloração Giemsa).

A confirmação de trombocitopénia é realizada segundo Harvey (2001). De acordo com este autor, numa ampliação de 1000 vezes, o número de plaquetas deve variar entre 10 a 30 por campo. Desta forma, valores de plaquetas por campo, inferiores aos referidos são indicativos de trombocitopénia. Nestes casos, deve ser realizada uma contagem e o número de plaquetas por  $\mu\text{L}$  de sangue pode ser estimado multiplicando o número médio de plaquetas encontrado por campo (na ampliação de 1000 vezes) por 15000 a 20000 (Harvey, 2001).

## 2.4. Cálculo da seroprevalência na amostra dos vários agentes pesquisados

Após a interpretação dos resultados de IFI, a seroprevalência foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Seroprevalência} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de cães seropositivos}}{\text{n}^\circ \text{ total de soros}}$$

## 2.5. Métodos estatísticos

Neste estudo, foram utilizados métodos estatísticos descritivos pelo recurso ao *software* Microsoft Excel 2003.

# IV. Resultados

## 1. Resultados da titulação de anticorpos contra os vários agentes

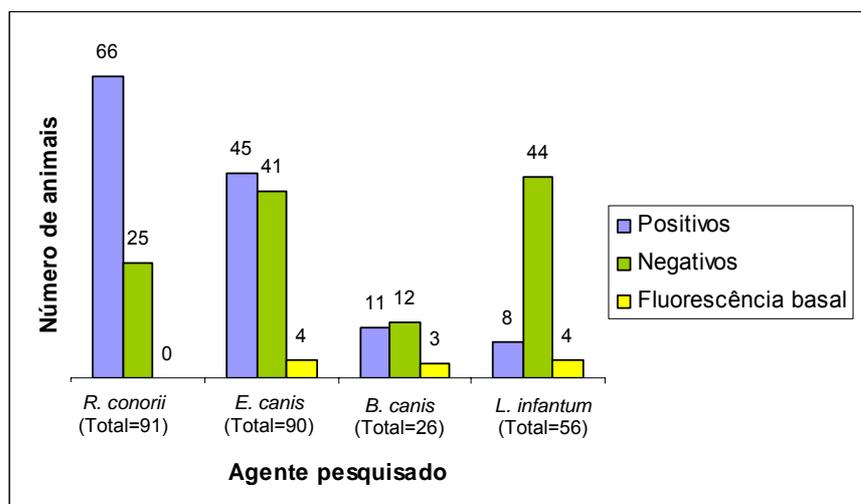
Após a realização da técnica de Imunofluorescência Indirecta e observação das lâminas ao microscópio de fluorescência, podem ser obtidos, para cada uma das diluições efectuadas (1:40 e 1:80), resultados positivos (onde os micorganismos fixados apresentam cor verde-maçã fluorescente), resultados negativos (onde se visualiza uma cor vermelha devido ao corante Azul de Evans utilizado) ou com fluorescência basal (suspeitos).

Dos 91 animais estudados, apenas 13 (14,3%) não tinham anticorpos contra qualquer um dos três agentes transmitidos por ixodídeos, embora um deles fosse positivo para leishmaniose. Isto significa que 85,7% dos canídeos da amostra possuía anticorpos contra pelo menos um dos agentes transmitidos por ixodídeos pesquisados.

Só num animal foram detectados anticorpos contra os quatro agentes (*L. infantum*, *R. conorii*, *E. canis* e *B. canis*) e cinco canídeos mostraram seroreactividade contra *R. conorii*, *E. canis* e *B. canis*.

O gráfico 3 revela os resultados obtidos para cada um dos agentes transmitidos por vectores pesquisados.

**Gráfico 3- Resultados de IFI obtidos para cada um dos agente pesquisados**

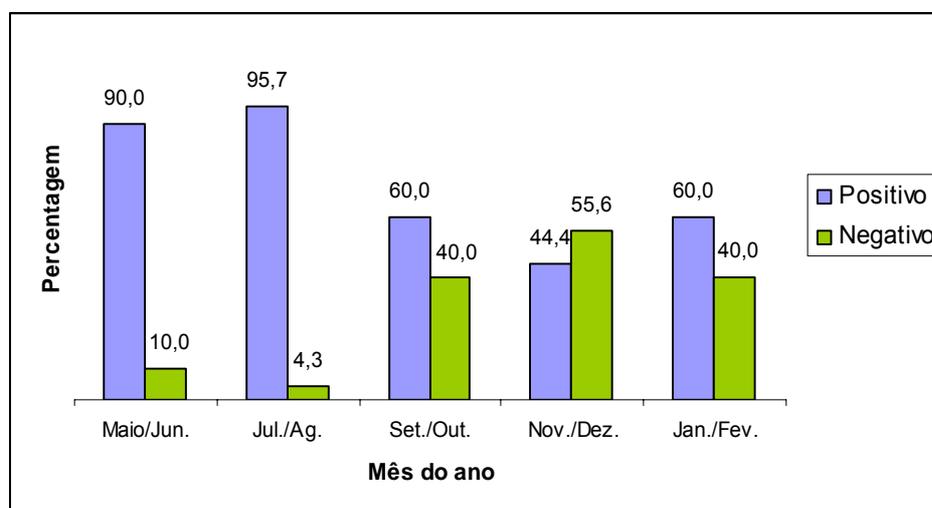


## 2. Resultados da titulação de anticorpos contra *R. conorii*

A seroprevalência de *R. conorii* na amostra em estudo foi de 73%, sendo portanto superior à encontrada para *E. canis* (50%), *B. canis* (42%) e *L. infantum* (18%).

Verificou-se que 67,7% das fêmeas incluídas na amostra e 75% dos machos possuíam anticorpos contra *R. conorii*. No que respeita a análise dos resultados nos diferentes meses em estudo, constatou-se que Maio/Junho e Julho/Agosto foram os meses com maior percentagem de resultados positivos. Nos restantes meses, não houve uma diferença tão significativa entre o valor de resultados positivos e negativos (Gráfico 4).

**Gráfico 4- Resultados da titulação de anticorpos anti-*R. conorii* nos vários meses em estudo**

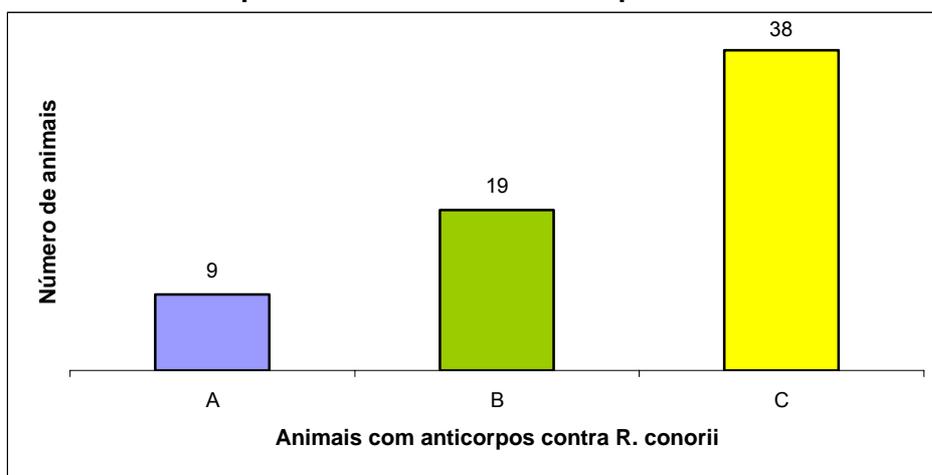


Em relação ao habitat, verificou-se que a seroprevalência de *R. conorii* na amostra de canídeos de rua (80%) e de cães que habitavam no exterior (84,6%), foi superior à da amostra de cães cujo o principal habitat era “casa” (72,5%) ou “casa e exterior” (63,6%).

Nesta amostra, apenas dois animais com anticorpos contra *R. conorii* tinham idade inferior a dois anos.

Os 66 animais que possuíam anticorpos contra *R. conorii* foram divididos em três grupos (Gráfico 5).

**Gráfico 5- Grupos de animais com anticorpos contra *R. conorii***



A- Resultado de IFI positivo para *R. conorii* mas suspeito contra um dos outros agentes

B- Resultado de IFI positivo apenas para *R. conorii*

C- Resultado de IFI positivo para outros agentes além de *R. conorii*

## **2.1. Estudo do grupo de animais positivos para *R. conorii* mas suspeitos para outros agentes**

Em nove animais com resultados positivos de Imunofluorescência Indirecta contra *R. conorii*, foram obtidos resultados com fluorescência basal (suspeitos) contra alguns dos outros agentes (Gráfico 5 (A)): dois com resultados suspeitos para *L. infantum*, três suspeitos para *B. canis* e quatro para *E. canis*. Na medida em que não podem ser incluídos num dos outros dois grupos, estes animais foram alvo de uma abordagem mais aprofundada, numa tentativa de interpretar os seus resultados de IFI.

### **- Resultados suspeitos para *L. infantum*:**

Dois animais que revelaram anticorpos contra *E. canis* e contra *R. conorii* obtiveram um resultado suspeito para *L. infantum*. Idealmente e para uma interpretação fidedigna dos

resultados, como já foi dito, devia ter sido repetida a pesquisa de *L. infantum* nestes animais um mês e meio depois, mas não foi. No entanto, em termos clínicos, estes cães não apresentavam alterações características de leishmaniose, pelo que, é possível que tenham ocorrido reacções cruzadas de anticorpos, já que estes foram detectados contra os dois outros agentes.

– **Resultados suspeitos para *B. canis*:**

Neste estudo, três animais positivos para *R. conorii* tiveram resultados suspeitos para *B. canis*. Um deles revelou anticorpos contra *E. canis* e *R. conorii* e história de parasitismo recente por ixodídeos. Neste caso, é possível que os anticorpos tenham sido detectados cedo no curso clínico da doença e que ainda não tivesse havido resposta imunitária contra *Babesia*.

Outro cão teve resultados positivos para *R. conorii* em ambas as diluições e fluorescência basal para *B. canis*, no entanto, recuperou completamente dos sinais clínicos que apresentava (uveíte) apenas com tratamento específico para a riquetsiose. Por isso, provavelmente, a fluorescência detectada poderá ter sido devida a reacções cruzadas.

Em relação ao terceiro animal referido, a informação disponível não permite excluir co-infecção com *B. canis*. Os tempos de coagulação para este animal encontravam-se muito aumentados por isso os sinais clínicos poderiam ter sido causados por intoxicação por antagonistas da vitamina K, mas não é possível excluir, na totalidade, a contribuição da infecção por *R. conorii* e *B. canis* para o quadro clínico.

– **Resultados suspeitos para *E. canis*:**

Dos canídeos que constituíam o grupo de animais com resultados suspeitos, quatro possuíam fluorescência basal para *E. canis* e anticorpos contra *R. conorii*, numa ou ambas as diluições.

A dois destes animais, foram diagnosticadas neoplasias que, para além de poderem causar os sinais clínicos apresentados, poderiam aumentar a susceptibilidade para a agudização de infecções antigas. Por estas razões, nestes casos, as causas de fluorescência basal podem ser inespecificidade da técnica ou reacções cruzadas.

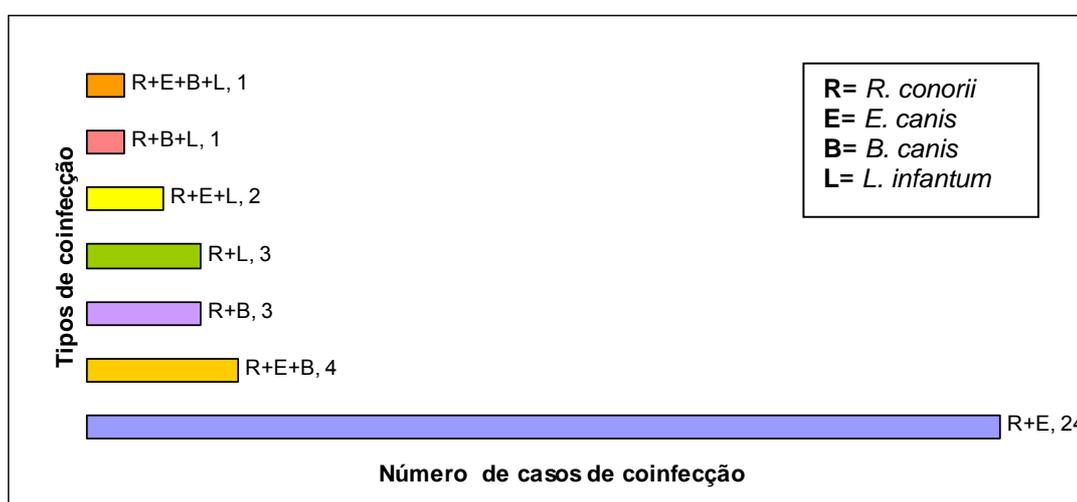
Um outro animal foi adoptado da rua e apresentado à consulta para avaliação geral. Não apresentava sintomas mas, por precaução, foi realizada pesquisa e titulação de anticorpos anti-*R. conorii*, anti-*E. canis* e anti-*B. canis*, tendo tido resultados positivos para *R. conorii* apenas na diluição 1:40, negativos para *B. canis* e fluorescência basal para *E. canis*. Estes valores sugerem uma infecção antiga por *Rickettsia* e fluorescência basal por inespecificidade da técnica.

Em relação ao quarto animal, a informação disponível não permite fazer uma interpretação correcta dos resultados da técnica de IFI, visto que este faleceu sem terem sido eliminadas todas as outras possíveis causas para os sintomas que apresentava.

## 2.2. Estudo do grupo de animais com anticorpos contra outros agentes além de *R. conorii*

Nos 38 casos em que foram detectados anticorpos contra mais do que um agente (Gráfico 5 (C)), pode estar-se perante a infecção do mesmo animal por vários organismos, que em conjunto, podem contribuir para o quadro clínico apresentado. Este é o fenómeno de co-infecção que, como já foi referido anteriormente, ocorre frequentemente, pois o mesmo ixodídeo pode estar infectado por vários agentes e transmiti-los ao mesmo animal durante a sua refeição de sangue. O gráfico 6 resume os diferentes tipos de co-infecção encontrados nos animais com anticorpos contra *R. conorii*.

**Gráfico 6- Tipos de co-infecção encontrados na amostra em estudo**



## 2.3. Estudo do grupo de animais apenas com anticorpos contra *R. conorii*

Os canídeos que constituíam o grupo de animais em que apenas foram detectados anticorpos contra *R. conorii* (Gráfico 5 (B)) tinham no mínimo três anos.

Os casos clínicos destes 19 animais, foram analisados mais aprofundadamente, no sentido de associar a presença de anticorpos com sinais clínicos porque, como já foi referido, a detecção destes anticorpos em canídeos não implica doença ou infecção recente. Por estas razões, devem ser excluídas outras causas possíveis para os sintomas apresentados, quando existam, e fazer uma interpretação dos resultados de IFI, caso a caso. Sendo assim:

- Em seis destes animais os sintomas identificados foram considerados como causados por *R. conorii*;

- Em três foram diagnosticadas outras patologias que poderiam estar por trás do quadro clínico;
- Em nove não foi possível excluir a contribuição da infecção pelo agente em estudo para os sinais clínicos apresentados mas, a informação disponível, também não permitiu que este agente fosse considerado como única causa de patologia;
- Um canídeo não apresentava qualquer sintoma e a titulação foi positiva para *R. conorii* em ambas as diluições.

No exame físico dos seis animais em que foi feita associação entre resultado de IFI positivo para *R. conorii* e existência de sinais clínicos, detectou-se piréxia (existente em dois canídeos), uveíte (em dois canídeos) e outras alterações como dor de origem inespecífica, rigidez muscular, hematomas e petéquias. Um dos animais, apenas apresentava esplenomegália à palpação. Em quatro destes animais, foram realizadas análises hematológicas. Anemia e trombocitopenia (confirmadas por esfregaço sanguíneo) foram as alterações de hemograma verificadas em dois animais. Em termos bioquímicos, apenas um animal revelou alterações apresentando hipoproteinemia. Nos restantes animais, os parâmetros sanguíneos encontravam-se dentro dos valores normais. Destes seis animais, apenas num os donos referiram história anterior de parasitismo por ixodídeos. Em termos de título, todos eles tinham anticorpos detectáveis em ambas as diluições (1:40 e 1:80).

Nos nove animais em que o papel da *Rickettsia* como entidade de patologia exclusiva não pode ser concluído, as alterações ao exame físico eram semelhantes as apresentadas anteriormente: alterações oculares, de coagulação e alterações musculo-esqueléticas havendo, no entanto, alguns casos de alterações neurológicas como tetraparésia e perda de força que só poderiam ser esclarecidos após realização de outras técnicas complementares de diagnóstico que não foram efectuadas. As alterações de hemograma verificadas nestes animais também se resumem a anemia e trombocitopenia. No entanto, em termos bioquímicos, para além de hipoproteinemia, em alguns casos estava também presente azotemia e aumento das enzimas hepáticas. Destes animais, seis tinham anticorpos detectáveis em ambas as diluições e em apenas três o título foi 1:40.

### **3. Tratamento aplicado nos canídeos em estudo apenas infectados com *R. conorii***

Em todos os animais cujos sintomas poderiam ser causados por *R. conorii*, e que continuaram a ser seguidos no Hospital Veterinário do Restelo após diagnóstico, foi realizada terapêutica. Doxíciclina foi o antibiótico de escolha na dose de 5 mg/Kg, via oral, duas vezes ao dia ou 10 mg/Kg, por via oral, uma vez ao dia. A duração da terapêutica variou, consoante o caso, entre 21 e 28 dias.

A mesma terapêutica também foi usada em quatro animais com sinais clínicos mas que tiveram resultados de Imunofluorescência Indirecta negativos para todos os agentes pesquisados. Estes canídeos recuperaram dos sinais clínicos apresentados inicialmente.

#### **4. Estudo da prevalência de agentes transmitidos por ixodídeos na amostra de cães de rua em estudo**

Neste estudo, foram analisados cinco cães vadios adoptados por novos donos, que foram levados a consulta para avaliação do seu estado geral. Apresentando anomalias de exame físico ou apenas por prevenção, a todos eles foi colhido sangue para pesquisa de *R. conorii* e *E. canis*. Em quatro foram pesquisados anticorpos anti-*L. infantum* e apenas a um foi pesquisado *B. canis*.

Um destes animais, revelou resultados negativos para todos os organismos testados. Os restantes possuíam anticorpos dirigidos contra *R. conorii* e contra um dos outros agentes transmitidos por ixodídeos.

#### **5. Associação entre parasitismo por ixodídeos e presença de anticorpos contra os agentes transmitidos por estes vectores**

Na anamnese, foi referida história de parasitismo por ixodídeos, em 16 dos animais em estudo. Em todos eles foram pesquisados, anticorpos anti-*E. canis* e anti-*R. conorii* e em 7 foi também pesquisada infecção por *B. canis*.

Apenas dois destes animais não estavam infectados por qualquer um dos organismos pesquisados.

Foram detectados anticorpos contra *R. conorii* em treze (81,3%) destes cães.

### **V. Discussão dos resultados**

Este foi um estudo retrospectivo baseado em casos clínicos seguidos no Hospital Veterinário do Restelo. Neste sentido, o principal objectivo dos médicos veterinários, prendia-se com a resolução dos sinais clínicos que os animais apresentavam, fazendo muitas vezes frente a situações de controlo de custos. Por estas razões, nem sempre foram realizados os mesmos exames complementares de diagnóstico em todos os animais, e também não foram enviadas duas amostras de sangue para detecção de anticorpos, com intervalo de três a quatro semanas, de forma a averiguar se ocorreria seroconversão e, assim, poder afirmar se se está perante uma infecção activa/recente ou antiga, como recomenda a bibliografia. Por outro lado,

este é um hospital de referência que recebe muitos casos vindos de outros colegas e que, após diagnóstico, voltam a ser seguidos nos mesmos. Este facto, contribuiu para a inconclusão e falta de informação sobre muitos dos casos referidos. Todos estes factores concorrem, de uma ou de outra forma, para que o estudo realizado tenha muitas limitações.

Contudo, foi possível chegar a alguns resultados semelhantes a outra bibliografia publicada. Dos 91 animais que constituíram a amostra, apenas em 13 não foram detectados anticorpos contra qualquer um dos agentes transmitidos por ixodídeos pesquisados. Estes foram números semelhantes aos encontrados por Bacellar et al. (1995a) que, ao analisarem uma amostra de 104 animais, verificaram que somente 12, não possuíam anticorpos contra *R. conorii*, *E. canis*, *C. burnetii* e *R. typhi*. Estes valores comprovam a grande de frequência de infecções transmitidas por ixodídeos em canídeos.

O facto de neste estudo terem sido pesquisados diferentes agentes, consoante o quadro clínico apresentado, comprova o que foi afirmado na revisão bibliográfica. Muitas vezes, as doenças transmitidas por vectores têm sintomas semelhantes e, em alguns casos, todas elas podem ser incluídas como parte dos diagnósticos diferenciais. Para além disto, existe a possibilidade de o mesmo animal ser infectado por diversos agentes, o que também foi demonstrado neste estudo. Apenas um animal do total da amostra mostrou ter seroreactividade contra os quatro agentes pesquisados e cinco possuíam anticorpos contra *R. conorii*, *E. canis* e *B. canis*. Dos 66 animais seroreactivos para *R. conorii*, 38 possuíam também anticorpos contra outros agentes e a co-infecção detectada mais comumente foi de *R. conorii* e *E. canis*, num total de 24 animais, embora estes também tenham sido os agentes mais pesquisados. Bacellar et al. (1995a) também encontraram vários animais positivos para estes dois agentes.

Pelo facto de existirem quadros clínicos semelhantes e possibilidade de co-infecção de vários agentes, o diagnóstico clínico deve ser complementado com técnicas de diagnóstico laboratorial.

A seroprevalência de *R. conorii* nesta amostra foi de 73%, apenas um pouco inferior aos valores de 85,6% e 85% detectados por Bacellar et al. (1995a) e Nuncio et al. (1999), respectivamente. Este resultado, no entanto, foi bastante superior à seroprevalência de 38,5% encontrada por Alexandre (2005). A semelhança entre os valores encontrados no presente estudo e os de Bacellar et al. (1995a) e Nuncio et al. (1999), pode ser explicada pelo facto de não existir muita diferença no limiar de positividade utilizado (1:40 neste estudo e 1:64 nos outros). Por outro lado, o limiar de positividade de 1:128 utilizado por Alexandre (2005) pode explicar, segundo o autor, a menor percentagem de animais da sua amostra com anticorpos contra *R. conorii*. Nesta amostra, a seroprevalência de *R. conorii*, foi superior à encontrada para *E. canis*, *L. infantum* e *B. canis*, o que está de acordo com o estudo de Solano-Gallego et al. (2006b). A prevalência de anticorpos contra *R. conorii* também foi superior à de *E. canis* no estudo de Alexandre (2005).

Contudo, as elevadas seroprevalências encontradas neste estudo podem não ser reais pois, como já foi referido, existem outras riquetsias transmitidas por ixodídeos que podem originar reacções cruzadas de anticorpos com *R. conorii*. Como a técnica de IFI não consegue distinguir a espécie de riquetsia infectante, apenas o grupo, só as técnicas de biologia molecular, poderiam elucidar da prevalência real de *R. conorii* nesta amostra. No entanto, estas são limitações inerentes a qualquer estudo de seroprevalência.

A percentagem de canídeos machos com anticorpos detectados contra *R. conorii* (75%) foi superior à de canídeos fêmeas (67,7%) apesar de a diferença de valores ter sido pouco significativa. Solano-Gallego et al. (2006b) também chegaram a esta conclusão.

Foram obtidas diferentes seroprevalências de *R. conorii* na amostra em vários períodos do ano. Os meses Maio/Junho e Julho/Agosto tiveram uma maior percentagem de resultados positivos, comparativamente com os restantes meses, o que revelou sazonalidade da infecção nesta amostra. Isto poderá ser explicado pelo facto de o vector estar mais activo nos meses de Verão. Delgado e Carmenes (1995) também detectaram maior frequência de animais positivos nos meses de Verão. Pelo contrário, Alexandre (2005) não encontrou associação entre o período do ano e a seropositividade para *R. conorii*. Bacellar et al. (1995a) também não encontraram diferenças entre o grupo de amostras Outono/Inverno e Primavera/Verão.

Dos 16 animais que só apresentavam anticorpos contra *R. conorii*, apenas em 6 foi possível atribuir o quadro clínico a infecção por este agente. Nestes canídeos, foram detectados vários sinais e sintomas como piréxia, uveíte, petéquias e hematomas, dor de origem inespecífica, rigidez muscular e esplenomegália. Anemia, trombocitopenia e hipoproteinémia foram as alterações hematológicas verificadas. A maioria destas alterações foi já descrita por outros autores (Kidd, 2006; Alexandre, 2005; Font et al. (citado por Alexandre, 2005)). Contudo, não se pode afirmar com toda a certeza que não existem outro tipo de sintomas provocados por *R. conorii*, devido aos nove animais em que era necessário outro tipo de exames para responsabilizar apenas o agente em questão pelo quadro clínico apresentado.

Os animais que apenas apresentaram anticorpos contra *R. conorii* tinham no mínimo 3 anos, o que está de acordo com o estudo de Alexandre (2005) que concluiu que, idade superior a dois anos é um factor de risco para a infecção, na medida em que o número de exposições ao agente aumenta com a idade.

Neste estudo, o título de anticorpos foi utilizado, em conjunto com a avaliação do quadro clínico, para realizar uma interpretação mais correcta dos resultados de IFI. Tendo em conta que, os anticorpos podem persistir durante meses em animais que tiveram contacto com *R. conorii*, a variação do seu título pode elucidar sobre a forma como o animal está a responder à infecção. Sendo assim, títulos de anticorpos mais baixos (1:40) podem ocorrer em animais com infecções antigas, enquanto que resultados positivos na diluição de 1:80 podem significar infecções

recentes (A. Xufre, comunicação pessoal, Abril 14, 2008). Todos os animais em que houve associação serológica de doença com infecção por *R. conorii* tinham anticorpos detectados em ambas as diluições. Pode ser então assumido que estas eram infecções recentes ou agudização de infecções antigas. No entanto, por vezes, a interpretação do título de anticorpos pode não ser muito fidedigna, nomeadamente em animais com doenças imunossupressoras, na medida em que não conseguem montar uma resposta imunitária eficaz. Por isso, nestes casos, podemos estar perante uma infecção recente e os anticorpos serem detectados apenas na diluição de 1:40.

A constatação de que os animais de rua e de exterior possuem maior seroreactividade já era esperada, na medida em que estes canídeos têm contacto mais próximo com os vectores. De facto, só um dos cães de rua não possuía anticorpos contra pelo menos um dos agentes transmitidos por ixodídeos que foram pesquisados. Pelo contrário, os valores obtidos para os animais com habitat “casa” e com habitat “casa e exterior”, são ambíguos. Seria de esperar que os animais com contacto mais intenso com o exterior possuíssem maior seroprevalência de *R. conorii*, mas isso não se sucedeu. Esta contradição pode ser explicada pois, apesar de os donos terem referido que os animais habitavam em casa, o seu contacto com o exterior e, conseqüentemente, com os vectores, não pode ser anulado, podendo ocorrer nos seus passeios regulares. Por outro lado, os animais com habitat “casa e exterior”, podem não ser tão controlados pelos donos o que faz com que pequenas alterações que neles ocorram, possam não ser notadas tão facilmente, ao contrário dos animais que vivem sempre em casa em contacto com os proprietários. Sendo assim, os valores de seroprevalência encontrados nos animais de diferentes habitats deste estudo podem não ser fidedignos.

Os resultados de prevalência obtidos para os animais em que foi identificado parasitismo por ixodídeos demonstram que, apesar de parasitismo por carraças não ser um achado consistente da história pregressa, quando este facto é mencionado, é muito provável que o animal tenha sido infectado por um dos agentes transmitidos por estes vectores.

À semelhança de outros estudos (Baneth et al., 1998; Solano-Gallego et al., 2006b), doxiciclina foi o princípio activo escolhido como terapêutica específica para os animais doentes por *R. conorii*, embora existam outros antibióticos com eficácia conhecida contra este agente. Todos estes canídeos responderam bem à terapêutica administrada ocorrendo remissão dos sinais clínicos apresentados. O facto de quatro animais em que não foram detectados anticorpos contra qualquer um dos agentes transmitidos por ixodídeos, terem sido na mesma submetidos a tratamento, vem apoiar o que foi dito na revisão bibliográfica acerca das limitações da técnica de IFI, que por variadas razões, inerentes à técnica ou à capacidade imunitária do animal, pode emitir resultados falso-negativos.

## VI. Conclusão

As doenças transmitidas por ixodídeos assumem cada vez maior importância tanto em animais, como em humanos. Este facto deve-se, em parte, às alterações climáticas, que proporcionam condições para a sobrevivência dos vectores, diminuindo a mortalidade dos mesmos nos meses de Inverno. Por outro lado, a movimentação dos canídeos permite-lhes estabelecer contacto, quer com os hospedeiros silváticos, quer com os hospedeiros humanos, sendo assim um potencial elo de ligação entre os dois ciclos doméstico e silvático, contribuindo desta forma para a manutenção da doença.

A detecção de anticorpos pela técnica de Imunofluorescência Indirecta, método recomendado pela Organização Mundial de Saúde, é a forma de diagnóstico mais frequentemente utilizada na prática clínica. No entanto, por ter várias limitações, os resultados obtidos por IFI devem ser interpretados com o maior rigor possível, sempre em associação com os sinais clínicos e indo sempre mais além do que um simples resultado positivo ou negativo, tal como ficou patente neste estudo. Neste sentido, a opção por técnicas de biologia molecular, pode ajudar a ultrapassar as limitações das técnicas de diagnóstico indirecto, apesar de não existir nenhuma forma de diagnóstico perfeita.

Nesta amostra, foi possível encontrar elevadas seroprevalências de *R. conorii*, o que revela a abundância de infecções por este organismo, e relacioná-las com quadro clínico em canídeos. No entanto, o facto de também existirem, nesta amostra, animais seroreactivos que não apresentavam sinais clínicos, sugere que nem todos os canídeos têm a mesma susceptibilidade ao agente. Talvez em animais imunodeprimidos ou com outras patologias subjacentes, *R. conorii* encontre as condições ideais para se multiplicar e causar sintomas.

Este estudo, com todas as limitações que lhe estão inerentes, foi mais um contributo para o facto de que *R. conorii*, para além dos inúmeros casos de doença que provoca em humanos, pode também causar quadros clínicos em canídeos.

Embora existam várias publicações sobre *Rickettsia* do grupo das febres exantemáticas em Portugal, estas incidem maioritariamente na população humana e poucas se referem à população canina. Contudo, existe uma elevada seroprevalência de *R. conorii* em canídeos do país. Para além disto, já vários estudos (portugueses e estrangeiros) associaram presença de quadro clínico nestes animais com infecção pelo agente e já foram relatados casos de riquetsiose humana que precederam doença em canídeos. Analisando todos estes factores e, tendo em conta que cães podem ser sentinelas da doença no Homem, e que o número de casos de riquetsiose humana tem aumentado, é urgente colmatar a falta de informação sobre esta doença em canídeos. Neste sentido, talvez fosse interessante realizar um estudo em

Portugal que correlacionasse a existência de anticorpos em canídeos e na população humana, tentando clarificar qual o papel do cão como sentinela. Paralelamente, talvez a notificação dos casos de riquetsiose em canídeos contribuísse para a vigilância dos casos na população humana. Com estas medidas, poder-se-ia caracterizar e antever a evolução da doença no país, já que a sua erradicação é praticamente impossível.

Por outro lado, talvez também fosse interessante realizar um estudo prospectivo numa população de cães saudáveis, fazendo titulação de anticorpos faseada no tempo e assim perceber a evolução do título, em conjunto com a evolução do quadro clínico. Com base num trabalho deste género, seria mais fácil para o médico veterinário decidir como proceder perante um cão saudável com anticorpos contra *R. conorii*, nomeadamente acerca da necessidade de realizar tratamento ou qual o melhor momento para voltar realizar uma titulação de anticorpos contra o agente em questão.

Ao serem realizados mais estudos sobre esta doença em Portugal, será possível um melhor esclarecimento da população portuguesa, sensibilizando-a, assim, para uma prevenção adequada do parasitismo, a melhor arma à disposição contra o vector.

## VII. Referências bibliográficas

- Alexandre, N.M.L. (2005) *Estudo clínico e epidemiológico da febre botonosa, ehrlichiose canina e borreliose de Lyme numa população de canídeos domésticos do Algarve*. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Altenkamp, R. (2007) *Dermacentor reticulatus*. Acedido em Maio 4, 2008, disponível em: [http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Dermacentor\\_reticulatus\\_M\\_070825.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Dermacentor_reticulatus_M_070825.jpg)
- Anderson, R.R & Harrington, L.C. Tick biology for the owner. Acedido em Maio 4, 2008, disponível em: <http://www.entomology.cornell.edu/MedEnt/TickBioFS.html>
- Amaro, M., Bacellar, F. & França, A. (2003) Report of eight cases of fatal and severe Mediterranean Spotted Fever in Portugal. *Annals New York Academy of Sciences*, 990, 331-343.
- Bacellar, F., Miranda, A. & Filipe, A.R. (1994) Diagnóstico da febre escaro-nodular: teste de Weil-Felix e prova de imunofluorescência indirecta. *Separata da revista portuguesa de doenças infecciosas*, 17(3), 179-182.
- Bacellar F., Dawson, J.E., Silveira, C.A & Filipe, R.A. (1995a) Antibodies against Rickettsiaceae in dogs of Setúbal, Portugal. *Centr. Eur. J. publ. hlth*, 3(2), 100-102.
- Bacellar, F., Regnery, R.L., Nuncio, M.S. & Filipe, A.R. (1995b) Genotypic evaluation of rickettsial isolates recovered from various species of ticks in Portugal. *Epidemiol. Infect.*, 114, 169-178.
- Bacellar, F., Nuncio, M.S., Alves, M.J. & Filipe, A.R. (1995c) *Rickettsia slovaca*: un agente del grupo de las fiebres exantemáticas, en Portugal. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 13, 218-223.
- Bacellar, F.C. (1996) *Rickettsias isoladas em Portugal – contribuição para a identificação e classificação das estirpes*. Dissertação de Doutoramento em Biologia. Évora: Universidade de Évora.
- Bacellar, F. (1998) Rickettsias e Rickettsioses na Europa. In G. Nobre (Ed.) *Arquivos do Instituto Bacteriológico Câmara Pestana* (pp. 121-133). Lisboa.
- Bacellar, F., Beati, L., França, A., Poças, J., Regnery, R. & Filipe, A.R. (1999) Israeli spotted fever rickettsia (*Rickettsia conorii* complex) associated with human diseases in Portugal. *Emerg. Infec. Dis.* 5(6), 835-836.
- Bacellar, F. & Sousa, R. (2004) A importância do isolamento por cultivo celular e identificação de *Rickettsias* através de técnicas de biologia molecular para o conhecimento das rickettsioses. *Revista Brasileira Parasitologia*, 13(1), 190-192.
- Baneth, G., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Pappalardo, B. & Ryan, J. (1998) A survey of tick-borne bacteria and protozoa in naturally exposed dogs from Israel. *Veterinary Parasitology*, 74, 133-142.

- Blanco, J.R. & Oteo, J.A. (2006) Rickettsioses in Europe. *Annals New York Academy of Sciences*, 1078, 26-33.
- Beugnet, F. (2004) Antiparasitaires externes chez les carnivores domestiques. *EMC-Vétérinaire*, 1, 138-153.
- Breitschwerdt, E.B., Levy, M.G., Davidson, M.G., Walker, D.H., Burgdofer, W., Curtis, B.C. & Babineu, C.A. (1990) Kinetics of IgM and IgG responses to experimental and acquired *Rickettsia rickettsii* infection in dogs. *American Journal Veterinary Research*, 51(8), 1312-1316.
- Breitschwerdt, E.B., Davidson, M.G., Aucoin, D.P., Levy, M.G., Szabados, N.S., Hegarty, B.C., Kuehne, A.L. & James, R.L. (1991) Efficacy of chloramphenicol, enrofloxacin, and tetracycline for treatment of experimental rocky mountain spotted fever in dogs. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35(1), 2375-2381.
- Breitschwerdt, E.B., Davidson, M.G., Hegarty, B.C., Papich, M.G. & Grindem, C.B. (1997) Prednisolone at anti-inflammatory or immunosuppressive dosages in conjunction with doxycycline does not potentiate the severity of *Rickettsia rickettsii* infection in dogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(1), 141-147.
- Breitschwerdt, E.B., Papich, M.G., Hegarty, B.C., Gilger, B., Hancock, S.I. & Davidson, M.G. (1999) Efficacy of doxycycline, azithromycin, or trovafloxacin for treatment of experimental rocky mountain spotted fever in dogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(4), 813-821.
- Caeiro, V. (1999) General review of tick species present in Portugal. *Parassitologia*, 41(1), 11-15.
- Centers for disease control and prevention (2005) Rocky Mountain Spotted Fever. Acedido em Maio 4, 2008, disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rmsf/organism.htm>
- Couto, G.C. (2003) Polysystemic Rickettsial Diseases. In E.M. Fathman & T. Merchant (Eds.), *Small Animal Internal Medicine*. (3<sup>rd</sup> ed.) (pp 1265-1272). St. Louis: Mosby.
- Dantas-Torres, F. (2008) The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*, 152, 173-185.
- Delgado, S. & Cármenes, P. (1995) Canine seroprevalence of *Rickettsia conorii* infection (Mediterranean spotted fever) in Castilla y León (northwest Spain) [abstract]. *European Journal of Epidemiology*, 11(5), 597-600.
- Díaz-Montero, C.M., Feng, H.-M., Crocquet-Valdes, P.A. & Walker, D.H. (2001) Identification of protective components of two major outer membrane proteins of spotted fever group rickettsiae. *American Journal Tropical. Medicine Hygiene* 65(4), 371-378.
- Elchos, B. & Goddard, J. (2003) Implications of rocky mountain spotted fever in two dogs and their owner. *Journal American Veterinary Medical Association*, 223(10), 1450-1452.
- Epe, C., Coati, N. & Stanneck, D. (2003) Efficacy of the compound preparation imidacloprid 10% (w/v) / permethrin 50% (w/v) spot-on against ticks (*I. ricinus*, *R. sanguineus*) and fleas (*C. felis*) on dogs. *Parasitology Research*, 90, 122-124.

- Espejo, E., Alegre, M.D., Font, B., Font, A., Segura, F. & Bella, F. (1993) Antibodies to *Rickettsia conorii* in dogs: seasonal differences. *European Journal of Epidemiology*, 9(3), 344-346.
- Espuny, J.C (1999). Parasitosis por ixodidos y argasidos. In M.C. Campillo & F.A.R. Vázquez (Eds.), *Parasitología Veterinaria*. (pp 711-719). Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U..
- Estrada-Peña, A. (2005) Etude de la résistance de la tique brune du chien, *Rhipicephalus sanguineus* aux acaricides. *Revue Méd. Vét.*, 156(2) 67-69.
- Euzéby, J.P. (2008). List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Acedido em Abril 15, 2008, disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/>
- Feng, H., Whitworth, T., Olano, J.P., Popov, V.L. & Walker, D.H. (2004) Fc-dependent polyclonal antibodies to outer membrane proteins A e B, but not to lipopolysaccharide, protect SCID mice against fatal *Rickettsia conorii* infection. *Infection and Immunity*, 72(4), 2222-2228.
- Fournier, P.E. & Raoult, D. (2004) Suicide PCR on skin biopsy specimens for diagnosis of rickettsioses. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3428-3434.
- Galvão, M.A.M., Lamounier, J.A., Bonomo, E., Tropa, M.S., Rezende, E.G., Calic, S.B., Chamone, C.B., Machado, M.C., Otoni, M.E.A, Leite, R.C., Caram, C., Mafra, C.L. & Walker, D.H. (2002). Emerging and reemerging rickettsiosis in an endemic area of Minas Gerais State, Brazil. *Cadernos Saúde Pública*, 18, 1593-7.
- Galvão, M.A.M., Silva, L.J., Nascimento, E.M.M., Calic, S.B., Sousa, R. & Bacellar, F. (2005) Riquetsioses no Brasil e Portugal: ocorrência, distribuição e diagnóstico; *Revista Saúde Pública*, 39(5), 850-856.
- Greene, C.E. & Breitschwerdt, E.B. (2006) Rocky Mountain Spotted Fever, Murine Typhuslike Disease, Rickettsialpox, Typhus, and Q Fever. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat*. (3<sup>rd</sup> ed.) (pp 232-245). Philadelphia: Saunders.
- Harvey, J.W. (2001) Examination of blood samples. In J.W. Harvey (Ed.) *Atlas of veterinary hematology – blood and bone marrow of domestic animals*. (pp 3-20). Philadelphia: Saunders
- Hechemy, K.E., Oteo, J.A., Raoult, D., Silverman, D.J. & Blanco, J.R. (2006) A century of rickettsiology: emerging, reemerging, and molecular diagnostic aspects and emerging veterinary rickettsioses - an overview. *Annals New York Academy of Sciences*, 1078, 1-14.
- Heinzen, R.A., Grieshaber, S.S., Kirk, L.S.V. & Devin, C.J. (1999) Dynamics of actin-based movement by *Rickettsia rickettsia* in Vero cells. *Infection and Immunity*, 67(8), 4201-4207.
- Herrero, C., Pelaz, C., Alvar, J., Molina, R., Vázquez, J., Anda, P., Casal, J. & Martin-Bourgon, C. (1992) Evidence of the presence of spotted fever group rickettsiae in dogs and ticks of the Central Provinces of Spain. *European Journal of Epidemiology*, 8(4), 575-579.
- Horta, M.C., Labruma, M.B., Sangioni, L.A., Vianna, M.C.B., Gennari, S.M. & Galvão, M.A. (2004) Prevalence of antibodies to spotted fever group *Rickettsiae* in humans and domestic animals in a brazilian spotted fever endemic area in the State of Sao Paulo,

- Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and other spotted fever group *Rickettsia*. *Am J Trop Med Hyg*, 71, 93-97.
- Jernigan, A.D., McTier, T.L., Chieffo, C., Thomas, C.A., Krautmann, M.J., Hair, J.A., Young, D.R., Wang, C. & Rowan, T.G. (2000) Efficacy of selamectin against experimentally induced tick (*Rhipicephalus sanguineus* and *Dermacentor variabilis*) infestations on dogs. *Veterinary Parasitology*, 91, 359-375.
- Karwarth, A. (2007) Tick anatomy. Acedido em Maio 4, 2008, disponível em: <http://entomology.files.wordpress.com/2007/06/tick.jpg>
- Kelly, P.J., Matthewman, L.A., Mason, P.R., Courtney, S., Katsande, C. & Rukwava, J. (1992) Experimental infection of dogs with a Zimbabwean strain of *Rickettsia conorii*. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95, 322-326.
- Kidd, L.B. (2006) *Molecular characterization of rickettsial diseases in dogs*. Ph.D. in immunology. College of Veterinary Medicine - North Carolina State University.
- La Scola, B. & Raoult, D. (1996) Diagnosis of Mediterranean Spotted Fever by cultivation of *Rickettsia conorii* from blood and skin samples using the centrifugation-shell vial technique and by detection of *R. conorii* in circulating endothelial cells: a 6-year follow-up. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(11), 2722-2727.
- La Scola, B. & Raoult, D. (1997) Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11), 2715-2727.
- López, J., Abarca K.V. & Azócar A.T. (2007) Evidencia clínica y serológica de rickettsiosis canina en Chile. *Rev. Chil. Infect.*, 24(3), 189-193.
- Macaluso, K.R., Sonenshine, D.E., Ceraul, S.M. & Azad, A.F. (2002) Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second rickettsia [abstract]. *Journal Med. Entomol.*, 39(6), 809-813.
- Mannelli, A., Mandola, M.L., Pedri, P., Tripoli, M. & Nebbia, P. (2003) Associations between dogs that were serologically positive for *Rickettsia conorii* relative to the residences of two human cases of Mediterranean spotted fever in Piemonte (Italy). *Preventive Veterinary Medicine*, 60, 13-26.
- Márquez, F.J., Rodríguez-Liébana, J.J., Soriguer, R.C., Muniaín, M.A., Bernabeu-Wittel, M., Caruz, A. & Contreras-Chova, F. (2008) Spotted fever group *Rickettsia* in brown dog ticks *Rhipicephalus sanguineus* in southwestern Spain. *Parasitology Research*, 103, 119-122.
- Massung, R.F., Nicholson, W.L., Eremeeva, M.E. & Dasch, G.A. (2008) On *Rickettsia* nomenclature. *Emerging Infectious Diseases*, 14(3), 511.
- McDade, J.E. (1998) Rickettsial diseases. In W.J. Hausler Jr. & M. Sussman (Eds.) *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections* (9<sup>th</sup> ed.). (pp. 995-1011). London: Arnold.
- Motycka, V. (2008) Siphonaptera fleas. Acedido em Maio 4, 2008, disponível em: <http://www.biolib.cz/IMG/GAL/10788.jpg>

- Neer, T.M & Harrus, S. (2006) Canine monocytotropic ehrlichiosis and neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* infections) In C.E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat*. (3<sup>rd</sup> ed.) (pp 203-216). Philadelphia: Saunders.
- Newman, J. (2001) Life stages of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. Acedido em Maio 4, 2008, disponível em: [http://creatures.ifas.edu/urban/medical/brown\\_dog\\_tick.htm](http://creatures.ifas.edu/urban/medical/brown_dog_tick.htm)
- Núncio, M.S., Bacellar, F. & Filipe, A. (1999) Antibodies against *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia conorii* in dogs from Portugal. *Zent. Bl. Bakteriol*, 289, 711-716.
- Organização Mundial de Saúde (2004) The vector-borne human infections of Europe, their distribution and burden. Acedido em Maio 4, 2008, disponível em: <http://www.euro.who.int/E82481.pdf>
- Parola, P. & Raoult, D. (2001) Tick and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clinical Infectious Diseases*, 32(6), 897-928.
- Parola, P., Paddock, C.D. & Raoult, D. (2005) Tick-Borne Rickettsioses around the World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 719-756.
- Poças, J., Bacellar, F. & Filipe, A. (2002) Clínica e diagnóstico laboratorial da febre escarodular. *Medicina Interna*, 9(1), 52-56.
- Prescott, J.F. (2000a) Chloramphenicol, thiamphenicol, and florfenicol. In J.F. Prescott, J.D. Baggot & R.D. Walker (Eds.), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. (3<sup>rd</sup> ed.). (pp 263-274). Iowa: Blackwell Scientific Publications.
- Prescott, J.F. (2000b) Tetracyclines. In J.F. Prescott, J.D. Baggot & R.D. Walker (Eds.), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. (3<sup>rd</sup> ed.). (pp 275-289). Iowa: Blackwell Scientific Publications.
- Raoult, D. & Roux, V. (1997) Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 10, 694-719.
- Raoult, D., Fournier, P.E., Abboud, P. & Caron, F. (2002) First documented human *Rickettsia aeschlimannii* infection. *Emerging Infectious Diseases*, 8(7), 748-749.
- Ruedisueli, F.L. & Manship, B. Tick identification key – Hyalomma. Acedido em Maio 4, 2008, disponível em: <http://webpages.lincoln.ac.uk>
- Santos-Silva, M., Sousa, R., Santos, A.S., Lopes, D., Queijo, E., Doreta, A., Vitorino, L. & Bacellar, F. (2006) Ticks and tick-borne rickettsiae surveillance in Montensinho Natural Park, Portugal. *Annals New York Academy of Sciences*, 1078, 137-142.
- Shaw, S.E., Day, M.J., Birtles, R.J. & Breitschwerdt, E.B. (2001) Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends in Parasitology*, 17(2), 74-80.
- Selmi, M., Bertolotti, L., Tomassone, L & Mannelli, A. (2008) *Rickettsia slovaca* in *Dermacentor marginatus* and tick-borne lymphadenopathy, Tuscany, Italy. *Emerging Infectious Diseases*, 14(5), 817-820.

- Silva, M.M., Santos, A.S., Formosinho, P. & Bacellar, F. (2006) Carraças associadas a patologias infecciosas em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 19, 39-48.
- Solano-Gallego, L., Kidd, L., Trotta, M., Di Marco, M., Caldin, M., Furlanello, T. & Breitschwerdt, E. (2006a) Febrile illness associated with *Rickettsia conorii* infection in dogs from Sicily. *Emerging Infectious Diseases*, 12(12), 1985-1988.
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Osso, M., Hetagarty, B. & Breitschwerdt, E. (2006b) A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Veterinary Research*, 37, 231-244.
- Sousa, R., Nóbrega, S.D., Bacellar, F. & Torgal, J. (2003) Sobre a realidade da Febre Escaro-Nodular em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 16, 429-436.
- Sousa, R. & Bacellar, F. (2004) Morbi-mortalidade por *Rickettsia conorii* em Portugal. *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária*, 13(1), 180-184.
- Sousa, R., Barata, C., Vitorino, L., Santos-Silva, M., Carrapato, C., Torgal, J., Walker, D. & Bacellar, F. (2006a) *Rickettsia sibirica* isolation from a patient and detection in ticks, Portugal. *Emerging infectious diseases*, 12(7), 1103-1108.
- Sousa, R., Fournier, P.E., Santos-Silva, M., Amaro, F., Bacellar, F. & Raoult, D. (2006b) Molecular detection of *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi* and two genotypes closely related to *Bartonella elizabethae*. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* 75(4), 727-731.
- Sousa, R., Luz, T., Parreira, P., Santos-Silva, M. & Bacellar, F. (2006c) Boutonneuse fever and climate variability. *Annals New York Academy of Sciences*, 1078, 162-169.
- Sousa, R., Santos-Silva M., Santos, A.S., Barros, S.C., Torgal, J., Walker, D.H. & Bacellar, F. (2007) *Rickettsia conorii* Israeli Tick Tiphus strain isolated from *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Portugal. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 7(3), 444-447.
- Sousa, R., Duque, L., Poças, J., Torgal, J., Bacellar, F., Olano, J.P. & Walker, D.H. (2008) Portuguese patient infected with *Rickettsia sibirica*. *Emerging infectious diseases*, 14(3), 529-531.
- Stoicov, C., Whary, M., Rogers, A.B., Lee, F.S., Klucsevsek, K., Li, H., Cai, X., Saffari, R., Ge, Z., Khan, I.A., Combe, C., Luster, A., Fox, J.G. & Houghton, J. (2004) Coinfection modulates inflammatory response and clinical outcome of *Helicobacter felis* and *Toxoplasma gondii* infections. *The Journal of Immunology*, 173(5), 3329-3336
- Taylor, M.A. (2001) Recent Developments in Ectoparasiticides. *The Veterinary Journal*, 161, 253-268.
- Tesouro, M.A., Bacellar, F., Sainz, A. & Filipe, A. (1998). Persistence of antibodies to *Rickettsia conorii* in dogs. *Annals of New York Academy of Sciences*, 849, 441-443.
- Thomas, V., Anguita, J., Barthold, S.W. & Fikrig, E. (2001) Coinfection with *Borrelia burgdorferi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis alters murine immune responses, pathogen burden, and severity of Lyme arthritis. *Infection and Immunity*, 69(5), 3359-3371.

- Tilley, L.P. & Smith Jr., F.W.K. (2000) Rocky Mountain Spotted Fever. In D.B. Troy & M.J. Hauber (Eds.) *The 5-minute veterinary consult canine and feline*. (3<sup>rd</sup> ed.) (pp 1152-1153). Philadelphia: Lippincott Williams & Williams.
- Valbuena, G., Feng, H. M. & Walker, D. H. (2002) Mechanisms of immunity against rickettsiae. New perspectives and opportunities offered by unusual intracellular parasites. *Microbes and Infection*, 4, 625-633.
- Venzal, J.M., Portillo, A., Estrada-Peña, A., Castro, O., Cabrera, P.A. & Oteo, J.A. (2004) *Rickettsia parkeri* in *Amblyoma triste* from Uruguay. *Emerging Infectious Diseases*, 10(8), 1493-1495.
- Visconti, G.S. & Díez, M.A.T. (2001) Ehrlichiosis. *Canis et Felis*, 51, 1-65.
- Vitale, G., Mansueto, S., Rolain, J.-M. & Raoult, D. (2006) *Rickettsia massilae* human detection. *Emerging Infectious Diseases*, 12(1), 174-175.
- Walker, D.H., Valbuena, G.A. & Olano, J.P. (2003) Pathogenic mechanisms of disease caused by *Rickettsia*. *Annals New York Academy of Sciences*, 990, 1-11.
- Walker, D.H. Rickettsiae general concepts. Acedido em Maio 4, 2008, disponível em: <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch038.htm>
- Walker, R.D. (2000) Fluoroquinolones. In J.F. Prescott, J.D. Baggot & R.D. Walker (Eds.), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. (3<sup>rd</sup> ed.). (pp 315-338). Iowa: Blackwell Scientific Publications.
- Zhu, Y., Fournier, P.-E., Ereemeeva, M. & Raoult, D. (2005) Proposal do create subspecies of *Rickettsia conorii* based on multi-locus sequence typing and an emended description of *Rickettsia conorii*. *BMC Microbiology*, 5(11).

## VIII. Anexos

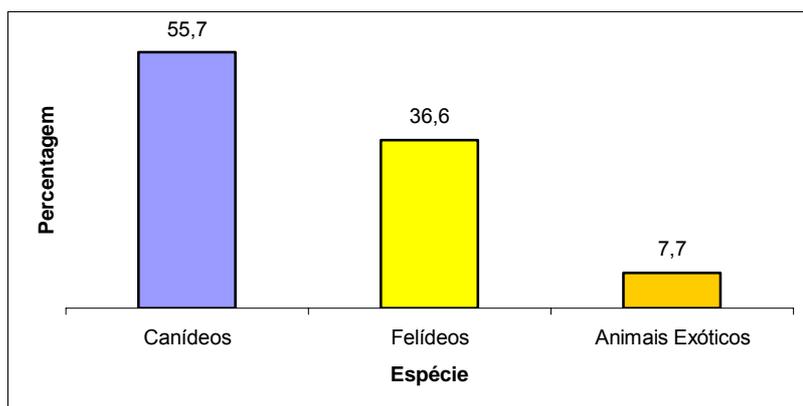
### Anexo I- Resumo das tarefas realizadas durante o estágio curricular

Os gráficos e tabelas que se seguem pretendem ilustrar as actividades realizadas no período de estágio.

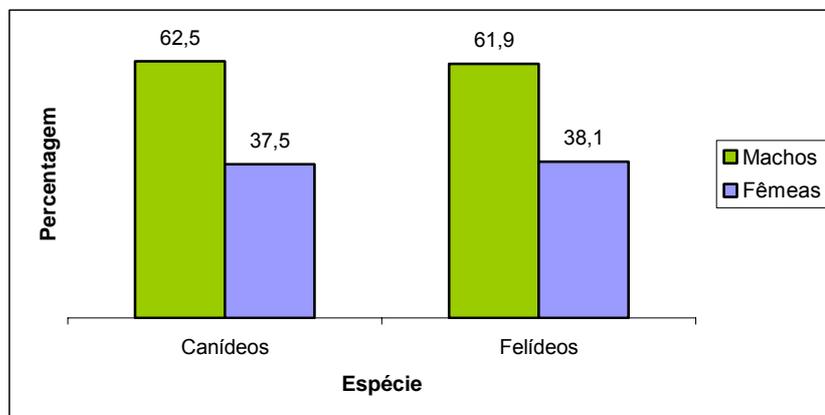
#### 1. Caracterização da população de animais assistida

Das várias espécies de animais assistidas em consulta e em internamento, os canídeos tiveram o maior destaque (Gráfico 7), predominando os animais do sexo masculino em canídeos e felídeos (Gráfico 8). Foram também prestados cuidados a vários animais exóticos como roedores, aves, lagomorfos e répteis (Gráfico 9).

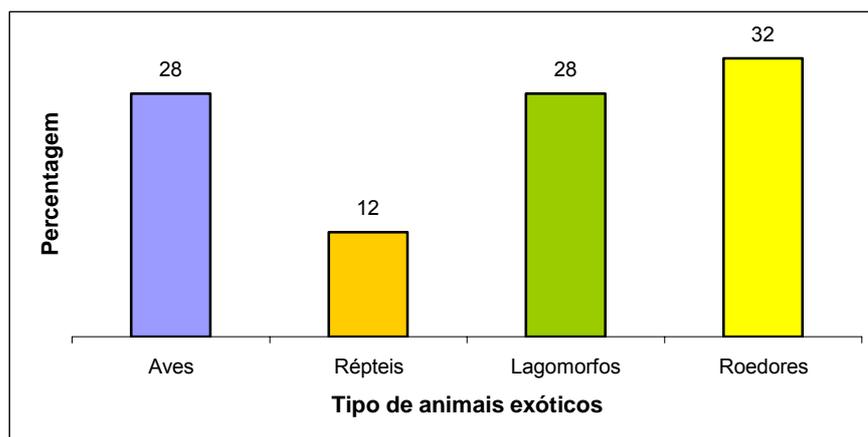
**Gráfico 7- Proporção das várias espécies de pacientes assistidos em consulta e internamento**



**Gráfico 8- Proporção de machos e fêmeas de canídeos e felídeos assistidos em consulta e internamento**



**Gráfico 9- Tipo de animais exóticos observados em consulta e internamento**



## 2. Actividades desenvolvidas

Durante o estágio, houve oportunidade de participar de forma activa em várias actividades da clínica de pequenos animais como internamento, cirurgia, consultas, entre outros. No internamento, houve um seguimento próximo dos casos clínicos e a estagiária pode realizar diversas tarefas como tratamentos e meios complementares de diagnóstico, discutir as diversas hipóteses de tratamento, entre outros. Nas consultas, houve oportunidade de recolher histórias progressas, de realizar exames físicos, listas de diagnósticos diferenciais e meios complementares de diagnóstico, quando necessário. Os motivos que trouxeram os animais à consulta foram variados (Tabela 12), predominando as alterações patológicas.

Dentro da patologia clínica, as alterações gastrointestinais foram as mais frequentes, seguindo-se a patologia cardio-respiratória e do aparelho urinário (Tabela 13).

**Tabela 12- Tipo de consultas assistidas**

<b>Consultas</b>	<b>Percentagem</b>
Patologia Clínica	59%
Tratamentos	21%
Imunoprofilaxia	7%
Reavaliações	6%
Urgências	6%
Check-up Geriátrico	1%

**Tabela 13- Proporção das várias áreas da patologia médica**

<b>Áreas da patologia médica</b>	<b>Percentagem</b>
Gastroenterologia	15,1%
Hematologia/Doenças Infecciosas	12,5%
Patologia Cardio-Torácica	11,3%
Urologia	11,3%
Ortopedia	9,4%
Endocrinologia	7,5%
Patologia Reprodutiva	7,5%
Dermatologia	6,0%
Oftalmologia	5,7%
Otologia	5,7%
Oncologia	4,2%
Neurologia	3,8%
Estomatologia	2,3%
Neonatologia	1,1%

No que respeita a oncologia, houve a possibilidade de assistir e auxiliar nas diferentes etapas de diagnóstico, tratamento e acompanhamento dos casos. O linfoma, nas suas várias formas, foi a neoplasia mais comum, principalmente nos felídeos (Tabela 14).

**Tabela 14- Tipos de neoplasias observadas em consulta**

<b>Tipo de neoplasia</b>	<b>Percentagem</b>
Linfoma	45,5%
Tumores do aparelho reprodutor feminino	27,3%
Tumores cutâneos	18,2%
Sarcoma Sticker	9,1%

Muitos dos animais internados e outros que vinham para consulta, necessitavam que lhes fosse realizado algum tipo de tratamento. Neste âmbito, a administração de medicamentos por via parenteral e a elaboração de pensos, principalmente no seguimento de cirurgias, foram as actividades mais desenvolvidas (Tabela 15).

**Tabela 15- Tipos de tratamento realizados em consulta e internamento**

<b>Tipo de tratamento</b>	<b>Percentagem</b>
Injecções	35,7
Pensos	26,8
Fluidoterapia em consulta	17,9
Remoção de pontos ou agrafos	13,4
Algaliações	7,1
Quimioterapia	5,4
Transfusões sangue	5,4
Enemas	3,6

O hospital Veterinário do Restelo, estando aberto 24 horas, recebe vários casos de urgência ao longo do dia e noite (Tabela 16). As urgências cardio-respiratórias e as intoxicações/reacções anafiláticas foram os principais motivos das consultas de urgência assistidas.

**Tabela 16- Tipos de urgências assistidas**

<b>Tipo de urgência</b>	<b>Percentagem</b>
Intoxicações/Reacções anafiláticas	26,9
Urgências cardio-respiratórias	26,9
Atropelamentos	19,2
Quedas de altura	15,4
Convulsões	11,5

No que confere aos animais exóticos, também houve possibilidade de contactar com diferentes tipos de patologia nas consultas, no internamento e nas cirurgias. Neste universo, grande parte dos quadros clínicos apresentados advêm de problemas de manejo como má alimentação, fraco enriquecimento do ambiente e más condições de alojamento destes animais. A estes factos, se devem alguns casos de patologia respiratória, gastro-intestinal e queimaduras observados (Tabela 17).

**Tabela 17- Tipos de patologia de animais exóticos**

<b>Tipo de Patologia</b>	<b>Percentagem</b>
Patologia Gastrointestinal	31,8%
Patologia Respiratória	22,7%
Síndrome Vestibular	22,7%
Oncologia	9,1%
Queimaduras	4,5%
Patologia Comportamental	4,5%
Patologia Reprodutiva	4,5%

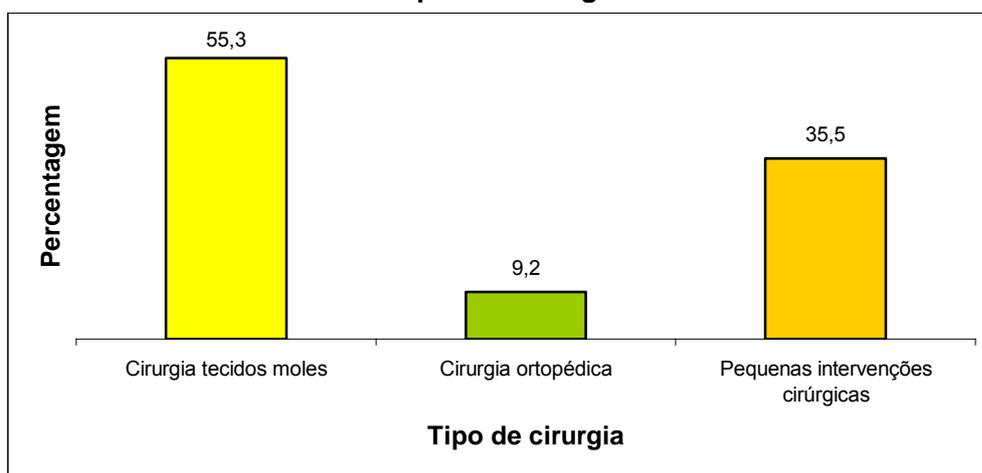
A tabela 18 ilustra os meios complementares de diagnóstico que foram utilizados durante o estágio curricular, por suspeita de algum tipo de alteração ou apenas para uma avaliação pré-anestésica ou *check-up*. Muitos destes meios de diagnóstico como colheita de sangue para análises sanguíneas e radiografias foram realizados pela estagiária.

**Tabela 18- Proporção dos métodos complementares de diagnóstico utilizados**

Métodos complementares de diagnóstico	Percentagem
Análises Sanguíneas	30,3%
Radiologia	26,5%
Ecografia Abdominal	15,2%
Citologia	3,8%
Ecocardiografia	3,8%
Exame Electrocardiográfico	3,8%
Testes Rápidos de Diagnóstico	3,8%
Urianálise	3,8%
Medição Pressão Arterial	3,0%
Punção de Medula Óssea	1,9%
Raspagem de Pele	1,9%
Electroretinografia	1,1%
Endoscopia	1,1%

Houve também oportunidade de assistir e auxiliar em várias cirurgias predominando, neste campo, a cirurgia de tecidos moles (Gráfico 8). As intervenções cirúrgicas electivas, nomeadamente castrações e ovário-histerectomias, foram as mais comumente observadas (Tabela 19).

**Gráfico 10- Tipos de cirurgia assistidos**



**Tabela 19- Tipos de cirurgias de tecidos moles assistidas**

<b>Tipo de cirurgia</b>	<b>Percentagem</b>
Aparelho reprodutor feminino	30,2%
Aparelho reprodutor masculino	20,9%
Aparelho digestivo	16,3%
Oftalmologia	16,3%
Extirpação de neoplasia	9,3%
Aparelho urinário	4,7%
Outras	2,3%

Frequentemente, houve necessidade de realizar pequenas intervenções cirúrgicas (Tabela 20), onde predominaram a realização de suturas, nomeadamente em cães mordidos. Nestes casos, a estagiária pode ter também um papel activo, auxiliando em muitas destas intervenções.

**Tabela 20- Pequenas intervenções cirúrgicas**

<b>Tipo de pequenas intervenções cirúrgicas</b>	<b>Percentagem</b>
Suturas	54,1%
Remoção de cavilhas	16,2%
Toracocentese	13,5%
Biópsia	5,4%
Outros	10,8%

## Anexo II – Protocolo de detecção de *R. conorii* por Imunofluorescência Indirecta do Laboratório DNAtch



**VIRCELL**  
microbiologists

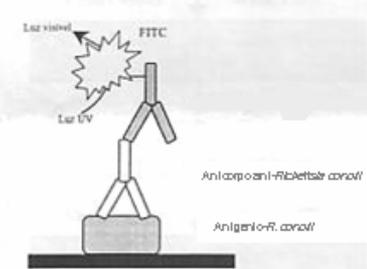
**RICKETTSIA CONORII IFA SLIDE**

**INTRODUÇÃO:**

*Rickettsia conorii* produz a febre escaro-nodular mediterrânea, doença endêmica nesta área geográfica e que se caracteriza pela aparição de febre, exantema e de mancha negra ou de inoculação no lugar da picada da carraça. A técnica mais utilizada pela sua simplicidade, precocidade e ausência de reações cruzadas é a IFA. Esta técnica pode pôr em evidência anticorpos tipo IgM e IgG.

**FUNDAMENTO DO MÉTODO:**

O método de imunofluorescência indirecta é baseado na reacção dos anticorpos da amostra com os antigenos que revestem os poços da lâmina. Os anticorpos específicos presentes na amostra reagem com os antigenos e as imunoglobulinas não ligadas aos antigenos são eliminadas no processo de lavagem. Num passo posterior, o complexo antígeno-anticorpo é revelado mediante globulina anti-humana marcada com fluoresceína, podendo ser observado através de um microscópio de fluorescência.



**CARACTERÍSTICAS:**

A lâmina tem um número atribuído para uma mais fácil utilização com o kit por IFA da Vircell correspondente.

**CONTEÚDO DO KIT:**

**1** VIRCELL. RICKETTSIA CONORII SLIDE: 10 lâminas de 10 poços com *R. conorii*, cepa Moroccan (ATCC VR-141), crescida em células Vero, tratada com formaldeído e fixada com acetona. Suspensa no saco vitelino (yolk sac) a 0.5% para melhorar a adesão do antígeno e para impedir a agregação das bactérias.

**Conservar entre 2 e 8°C e verificar o prazo de validade.**

Material necessário mas não fornecido com o kit:  
Pipetas de precisão adequadas.  
Incubador com termostato.  
Água destilada.  
Lamelas de 24x60 mm.  
Microscópio de fluorescência e filtros apropriados segundo as recomendações do fabricante.  
Câmara húmida.  
Kit por IFA da Vircell com a especificidade correspondente.

**CONSERVAÇÃO:**

Conservar entre 2 e 8°C. Não utilizar depois da data de validade. Lâminas mantêm-se estáveis até ao fim do mês indicado na data de validade, sempre que se mantenham fechadas e conservadas entre 2 e 8°C.

**CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE DOS COMPONENTES DEPOIS DE ABERTOS:**

Utilizar imediatamente as lâminas após a abertura do respectivo invólucro.

**ESTABILIDADE E USO DOS REAGENTES:**

Usar em condições assépticas para evitar contaminações microbianas.

VIRCELL, S.L. não se responsabiliza pela utilização inadequada dos reagentes contidos no kit.

**RECOMENDAÇÕES E PRECAUÇÕES:**

1. Este kit é só para diagnóstico *in vitro* e está destinado ao uso por pessoal técnico qualificado.
2. Utilizar apenas com os kits por IFA da Vircell correspondentes.
3. Utilizar pontas de pipeta diferentes e limpas para cada uma das fases do teste. Utilizar exclusivamente material limpo e, de preferência, descartável.
4. Não utilizar os reagentes em caso de deterioração da embalagem.
5. Não pipetar com a boca.
6. Os poços contêm antigenos de *R. conorii* inactivos, no entanto, devem manipular-se com precaução. Nenhum método actual pode garantir por completo a ausência destes ou outros agentes infecciosos. Todo o material deve ser manipulado e descartado como potencialmente infeccioso. Observe a legislação em matéria de resíduos clínicos.
7. Use unicamente os protocolos descritos neste prospecto. Se os tempos e temperaturas de incubação utilizados no teste não forem os especificados, podem obter-se resultados errados.
8. A contaminação cruzada em soros de distintos pacientes numa lâmina pode causar resultados equívocos. Tome as precauções necessárias para evitá-la.
9. A óptica do microscópio, a manutenção e o tipo de fonte de luz podem afectar a qualidade da fluorescência.
10. Não deixar à temperatura ambiente mais tempo do que o absolutamente necessário.
11. Cada lâmina deve ser utilizada uma só vez. Não deve ser fraccionado, nem se devem reutilizar os poços não utilizados.
12. O kit contém elementos de vidro que, em caso de se partirem, poderão provocar lesões físicas. Manipular com precaução.

**COLHEITA DA AMOSTRA:**

O sangue deve ser extraído em condições assépticas através de técnicas de venipuntura por pessoal com experiência. É recomendado o uso de técnicas estéreis ou assépticas para evitar a contaminação da amostra. Os soros deverão ser mantidos refrigerados entre 2 e 8°C caso se preveja o seu processamento nos 7 dias subsequentes à colheita. Todavia, caso se preveja um prolongamento do processamento, deverão congelar-se os soros a -20°C, evitando congelamentos e descongelamentos desnecessários já que estas poderiam provocar uma diminuição do título das imunoglobulinas, especialmente de IgM. Não utilizar soros hiperlipémicos ou contaminados. Os soros que apresentem partículas podem ser clarificados por centrifugação.

**PROCEDIMENTO DO TESTE:**

As lâminas devem ser utilizadas com os reagentes do kit por IFA da Vircell com a especificidade correspondente. Os números indicados no procedimento do teste são os números atribuídos no kit por IFA da Vircell correspondente.

1.-Deixar que os reagentes alcancem a temperatura ambiente. Permitir que as lâminas alcancem a temperatura ambiente antes de os abrir.

**PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO***  
Fabricante: VIRCELL, S.L. Pza. Dominguez Ortiz 1. Polígono Industrial Dos de Octubre.18320 Santa Fe \*GRANADA\* ESPANHA\* Tel.+34.958.441264\* Fax+34.958.510712  
<http://www.vircell.com>

- 2.-Realizar uma diluição 1/40 e 1/80 dos soros, para isso pipetar 10 µl de soro em 390 µl de PBS [2], rotulá-la como diluição 1/40. Diluir 50 µl desta diluição com 50 µl de PBS (diluição 1/80). Os soros controle [3] e [4] não devem ser diluídos.
- 3.-Pipetar 20 µl da diluição 1/40 e 1/80 em dois poços da lâmina [1]. Fazer o mesmo com os controles positivo [3] e negativo [4].
- 4.-Incubar em câmara húmida durante 30 minutos a 37°C.
- 5.-Lavar brevemente os porta-objectos [1] com PBS [2] (evitar verter directamente o PBS sobre os recipientes). Submergir o porta-objectos durante 10 minutos em PBS. Proceder a uma ligeira lavagem com água destilada.
- 6.-Deixar que as lâminas [1] sequem.
- 7.-Pipetar 20 µl de anti-IgG de cão [5G] em cada poço. (Não requer diluição).
- 8.-Repetir os passos 4, 5 e 6.
- 9.-Juntar uma pequena gota de meio de montagem [6] a cada poço e cobri-lo com a lamela.
- 10.-Examinar ao microscópio de fluorescência a 400x o mais rapidamente possível. Se não for assim, manter a 2-8°C no escuro durante um máximo de 24 horas, até à observação.
- 11.- Em caso de obter positividade a estas diluições de screening, estudar de novo os soros utilizando diluições até 1/640

#### CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO:

Cada lote é submetido a um controle de qualidade interno antes da sua saída. Os resultados do controle final de cada lote estão disponíveis.

#### VALIDAÇÃO DA ANÁLISE:

O protocolo de validação é o indicado no kit por IFA da Vircell correspondente:

Em cada teste devem ser incluídos os controles positivo e negativo. A sua utilização permite a validação da prova e do kit. O padrão de fluorescência que deve observar-se será:

Controle positivo: Fluorescência de morfologia coco-bacilar, cor verde maçã.

Controle negativo: Ausência de fluorescência.

#### INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS:

O título do soro será dado pela máxima diluição em que se observe uma reacção positiva.

Uma reacção positiva será aquela na qual se observe fluorescência de morfologia coco-bacilar, cor verde maçã.

Uma reacção negativa será aquela na qual se observe ausência de fluorescência.

Padrões de fluorescência diferentes aos definidos no protocolo de validação não devem ser interpretados como positivos.

Os anticorpos IgG e IgM comportam-se de maneira diferente durante as primo-infecções e as re-infecções. Numa primo-infecção, as IgG e IgM aparecem em quase todos os casos (a IgM aparece antes que a IgG). Numa re-infecção não aparecem anticorpos de tipo IgM em todos os casos, sendo a detecção de IgG o único modo de realizar o diagnóstico. Em muitas doenças podem existir títulos altos de IgG durante toda a vida do paciente, enquanto que a IgM, em geral, só se mantém em soro durante 2 ou 3 meses depois da doença, e por tanto, são um marcador efectivo de infecção recente.

A aparição de anticorpos utilizando IFA é muito precoce, pode detectar-se a partir do sétimo dia da presença dos sintomas. Geralmente considera-se positivo um título igual ou superior a 1/40.

#### LIMITAÇÕES DO MÉTODO:

1.-Este método foi concebido para ser utilizado em soro de cão. As lâminas devem ser utilizadas com os kits por IFA da Vircell com a especificidade correspondente. A Vircell não aceita responsabilidades pelos resultados obtidos em caso de utilização com reagentes de outras proveniências.

2.-A utilização deste kit exige uma leitura cuidadosa e compreensão do folheto informativo. É necessário seguir estritamente o protocolo para se obterem resultados fiáveis, em particular uma pipetagem correcta das amostras e reagentes, lavagens e tempos de incubação.

3.-Os resultados das amostras deverão ser valorizados em conjunto com a sintomatologia clínica e com outros procedimentos de diagnóstico.

4.-O teste não indica o lugar da infecção. Não pretende substituir a técnica de isolamento.

5.-A ausência de um aumento significativo no nível de anticorpos não exclui a possibilidade de infecção.

6.-As amostras colhidas numa fase precoce no decurso de uma infecção podem não apresentar níveis de IgG detectáveis. Nestes casos, recomenda-se a realização de um teste para determinação de IgM ou a obtenção de uma segunda amostra decorridos 14 a 21 dias, que deverá ser testada em paralelo com a amostra original, com o objectivo de determinar uma seroconversão.

7.-Os resultados obtidos na detecção de IgG em recém-nascidos deverão ser interpretados com precaução, dado que as IgGs maternas são transferidas passivamente da mãe para o feto antes do nascimento. A determinação de IgM constitui o melhor indicador de infecção em cães com menos de 6 meses de idade.

8.-Os resultados da determinação de anticorpos de uma única amostra não devem ser utilizados para o estabelecimento do diagnóstico de uma infecção recente. Deverão ser colhidas duas amostras (fase aguda e convalescente), de modo a serem testadas em paralelo e determinar se se trata de uma seroconversão ou de aumento significativo do nível de anticorpos.

9.-Alguns soros podem conter anticorpos que reajam com os antígenos do ovo, dando origem a fluorescência para o saco vitelino presente em algumas das provas de imunofluorescência. Nestes casos, estes soros não poderão ser avaliados por esta técnica.

#### DESEMPENHO

As performances detalhadas foram obtidas com o kit por IFA da Vircell correspondente:

#### SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE:

Testaram-se 153 amostras de soro com RICKETTSIA CONORII IFA IgG em comparação com um kit de imunofluorescência indirecta de outra casa comercial, obtendo-se os seguintes resultados:

	Nº AMOSTRAS	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE
IgG	153	100.0%	100.0%

Os soros que não apresentaram reacção específica foram excluídos dos cálculos finais.

#### PRECISÃO INTRA-ENSAIO:

Titularam-se 3 soros, 2 positivos e 1 negativo, pipetados individualmente em grupos de 5 num único ensaio realizado pelo mesmo operador em condições de trabalho idênticas.

Em nenhum caso foram observadas oscilações superiores a 1 título.

#### PRECISÃO INTER-ENSAIO:

Titularam-se 3 soros, 2 positivos e 1 negativo, pipetados individualmente em 5 condições diferentes nas quais variaram o operador ou o dia de realização dos testes.

Em nenhum caso foram observadas oscilações superiores a 1 título.

#### REACÇÕES CRUZADA E INTERFERÊNCIAS:

Procedeu-se à análise de 12 amostras caracterizadas positivas em relação com outras bactérias do grupo sintrónico (*Brucella*, *Salmonella*), outras bactérias taxinomicamente próximas (*Coxiella burnetii*) e anticorpos antinucleares.

As amostras testadas deram resultados negativos, demonstrando as reacções específicas dos ensaios sem reacções cruzadas ou interferências ocasionadas pelos agentes descritos.

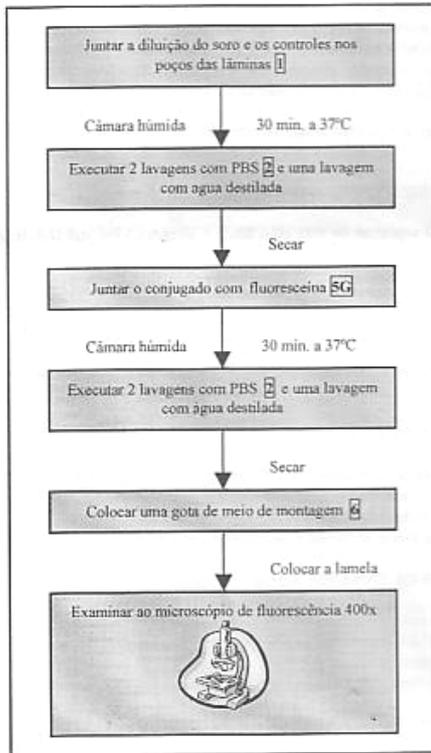
#### PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*

Fabricante: VIRCELL, S.L. Pza. Dominguez Ortiz 1. Polígono Industrial Dos de Octubre 18320 Santa Fe \*GRANADA\* ESPANHA • Tel.+34.958.441264 • Fax+34.958.510712  
<http://www.vircell.com>

**SÍMBOLOS USADOS NO PRODUTO:**

	Produto para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Prazo de validade
	Conservar entre 2-8°C
	Contém o suficiente para <X> análises
	Lote
	Referência (catálogo)
	Consultar instruções de utilização
	<X> poços

**RESUMO DO PROCEDIMENTO DE TRABALHO**



**BIBLIOGRAFIA:**

1. De Micco, C., D. Raoult, and M. Toga. 1986. Diagnosis of Mediterranean spotted fever by using an immunofluorescence technique. *J Infect Dis* 153:136-8.
2. Fenollar, F. and D. Raoult. 1999. Diagnosis of rickettsial diseases using samples dried on blotting paper. *Clin Diagn Lab Immunol* 6:483-8.
3. Herrero-Herrero, J. I., D. H. Walker, and R. Ruiz-Beltran. 1992. Use of western blot to analyze the reactivity of sera from patients with Mediterranean spotted fever. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11:939-42.
4. La Scola, B. and D. Raoult. 1997. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol* 35:2715-27.
5. Manor, E., J. Ighbarieh, B. Sarov, I. Kassis, and R. Regnery. 1992. Human and tick spotted fever group *Rickettsia* isolates from Israel: a genotypic analysis. *J Clin Microbiol* 30:2653-6.
6. Marquez, F. J., M. A. Muniaín, J. M. Perez, and J. Pachon. 2002. Presence of *Rickettsia felis* in the Cat Flea from Southwestern Europe. *Emerg Infect Dis* 8:89-91.
7. McGill, S. L., R. L. Regnery, and K. L. Karem. 1998. Characterization of human immunoglobulin (Ig) isotype and IgG subclass response to *Bartonella henselae* infection. *Infect Immun* 66:5915-20.
8. Novakovic, S., M. Morovic, and B. Dzelalija. 1991. Comparison of serologic methods for the diagnosis of Mediterranean spotted fever. *Acta Virol* 35:587-92.

Para consultas, contactar com:  
[technicalservice@vircell.com](mailto:technicalservice@vircell.com)

**EDIÇÃO: Outubro-05**