

## Resumo

O autor apresenta os resultados de um rastreio serológico de febre botonosa, ehrlichiose monocítica canina e borreliose de Lyme efectuado sobre uma amostra parcial de 100 canídeos, pontualmente em cada uma das estações do ano, perfazendo uma amostra total de 400 canídeos de uma população de canídeos medicalizados da região do Algarve-Portugal. A prova utilizada foi a da imunofluorescência indirecta (IFI) e os resultados revelaram uma seroprevalência total de  $38,5\% \pm 0,48$  para febre botonosa,  $5,25\% \pm 0,604$  para ehrlichiose monocítica canina e de  $2,25\% \pm 0,043$  para borreliose de Lyme. Os factores de risco foram definidos através do teste de qui-quadrado e caracterizados pelo cálculo do "Odds ratio". A idade superior a dois anos ( $p < 0,05$ ) foi considerado o principal factor de risco para a seropositividade de febre botonosa. Para a ehrlichiose monocítica canina, a aptidão caça, a residência em áreas rurais e o passeio em zonas de baldio foram considerados factores de risco ( $p < 0,05$ ) para a seropositividade. Apesar da baixa seroprevalência para borreliose de Lyme, os canídeos de aptidão caça foram considerados em risco ( $p < 0,05$ ) de seropositividade para *Borrelia burgdorferi s.l.*

Foram recolhidos 188 ixodídeos para posterior identificação das espécies e pesquisa de "Rickettsia Like Organisms" na hemolinfa através do teste dos hemócitos. *Rhipicephalus sanguineus* foi a única espécie identificada entre a população de ixodídeos colhida. Os ixodídeos foram também estudados por "PCR" estimando-se uma prevalência de infecção de  $22,2\% \pm 0,832$  para *Rickettsia conorii*, de  $2,2\% \pm 0,062$  para *Ehrlichia canis* e de 0% para *Borrelia burgdorferi s.l.*

Foram também estudados 55 canídeos presentes à consulta com quadro clínico compatível com qualquer uma das três doenças. Entre os sinais clínicos observados com maior frequência foram a hipertermia (84%), hipertrofia dos linfonodos (60%), perda de peso (20%) e petéquias (15%). A anemia (71%), a leucopenia (47%) e a trombocitopenia (96%) foram as anomalias hematológicas mais frequentes. Tentou-se, sem sucesso, isolar *R. conorii* pela técnica de "shell vial" em 55 canídeos e paralelamente foi amplificado ADN a partir do "buffy coat" com positividade de 25,4% para *E. canis* e de 16,3% para *Rickettsia spp.*

PALAVRAS CHAVE- febre botonosa, ehrlichiose monocítica canina, borreliose de Lyme, Rhipicephalus sanguineus, IFI, seroprevalência, factores de risco, PCR, Ehrlichia canis, Rickettsia conorii, Borrelia burgdorferi s.l., canídeos, Algarve.

## Abstract

The author presents the results of an serological survey for boutounneuse fever, canine monocytic ehrlichiosis and Lyme borreliosis conducted in each of the seasons year over a partial sample of 100 dogs making a total sample of 400 dogs from a medicalized dog population in the Algarve region-Portugal. An indirect fluorescent-antibody test (IFA) has been used and the results revealed a total seroprevalence of  $38,5\% \pm 0,48$  for boutounneuse fever, of  $5,25\% \pm 0,604$  for canine monocytic ehrlichiosis and of  $2,25\% \pm 0,043$  for Lyme borreliosis. Several risk factors were defined by the qui-square test and characterized by the Odds ratio. Age over two years was the main risk factor for the presence of antibodies for boutounneuse fever. For the canine monocytic ehrlichiosis, hunting dogs, dogs that lived in rural areas and that ones that walked regularly in wooded areas were considered risk factors for the presence of antibodies against *E. canis*. In spite of the low seroprevalence for Lyme borreliosis, the hunting dogs were in risk for the presence of antibodies against *Borrelia burgdorferi s.l.*

188 ticks were collected from dogs for further identification and screening by the haemocyte test for rickettsia-like organisms (RLO). *Rhipicephalus sanguineus* was the was the only species identified in the collected tick population. The ticks were also studied by PCR, an infection prevalence of  $22,2\% \pm 0,832$  was estimated for *Rickettsia conorii*, of  $2,2\% \pm 0,0626$  for *Ehrlichia canis* and of  $0\%$  of for *Borrelia burgdorferi s.l.*

55 dogs presented to the clinic, with clinical signs suggesting one of the three diseases were described. The clinical signs seen more frequently were hipertemia (84%), linfonode hypertrophy (60%), weight lost (20%) and petequial hemorrhage (15%). Anaemia (71%), leucopenia(47%) and thrombocytopenia (96%) were the more common laboratory findings. It was tried without success to isolate *R. conorii* by the shell vial technique at the same time, DNA. was amplified from the buffy coat sucessfully for *E. canis* in 25,4% and for *Rickettsia spp* 16,3%.

Key words: boutounneuse fever, canine monocytic ehrlichiosis, lyme borreliosis, Rhipicephalus sanguineus, IFA, seroprevalence, risk factors, PCR Rickettsia conorii, Ehrlichia canis, Borrelia burgdorferi s.l., Dogs, Algarve.

## **Agradecimentos**

À Dr<sup>a</sup> Sofia Núncio por ter aceite orientar esta dissertação, pela sua amizade e inextinguível paciência, por ter disponibilizado as instalações e o equipamento do CEVDI, pela experiência e conhecimentos transmitidos durante a realização deste trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Fátima Bacellar pela sua simpatia contagiante, pela sua colaboração assídua e competente e pela sua ajuda nas várias fases de realização desta dissertação.

À Prof. Dr. Fernando Boinas por ter aceite co-orientar esta dissertação, pela sua colaboração rigorosa em diversas fases da realização desta dissertação.

À Dr<sup>a</sup> Ana Sofia Santos pela colaboração em diversas fases da realização do trabalho e pelas várias trocas de impressões.

À Dr<sup>a</sup> Isabel pela preciosa colaboração especialmente durante a realização das técnicas de biologia molecular.

À Dr<sup>a</sup> Rita de Sousa, pela sua ajuda em diversas fases do trabalho.

A toda pessoa auxiliar do CEVDI pela excelente colaboração prestada na parte experimental do trabalho e preciosos ensinamentos.

Ao Dr. Pedro Rêgo por ter disponibilizado as instalações, equipamentos e registos do Hospital Veterinário do Algarve.

Aos Colegas Nuno Revez, Maria João Revez, Ana Reis, Pedro Grade, Tiago Carrapiço, Bruno Silva, Cristina Alves, Marco Simões e Raúl Benzinho pela inextinguível ajuda e colaboração na colheita de amostras sem os quais não seria possível concretizar este trabalho.

Ao Dr. Gonçalo Jacinto do Departamento de Matemática da Universidade de Évora, pela colaboração na revisão do tratamento estatístico dos dados desta dissertação.

À Dr<sup>a</sup>. Sandra Branco do Departamento de Sanidade Animal e Vegetal da Universidade de Évora, pela colaboração na realização das análises histopatológicas.

A todos os meus amigos pela sua amizade e por sempre me apoiarem ao longo de todos estes anos.

A todos que directamente ou indirectamente participaram na realização deste trabalho.

E por último aos meus pais e restante família por tudo.

Lisboa, Fevereiro de 2005

Nuno Alexandre

# Índice Geral

<b>I-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Febre botonosa.....	1
1.2 ehrlichiose monocítica canina e humana.....	2
1.3 borreliose canina e humana.....	2
<b>2. EPIDEMIOLOGIA.....</b>	<b>3</b>
2.1 Reservatórios, artrópodes vectores e ciclos epidemiológicos da febre botonosa.....	3
2.2. Reservatórios, artrópodes vectores e ciclos epidemiológicos da ehrlichiose monocítica canina.....	7
2.3 Reservatórios, artrópodes vectores e ciclos epidemiológicos da borreliose de Lyme.....	9
2.4 A situação epidemiológica actual em Portugal e no Mundo, referentes as três doenças em estudo.....	13
2.5 Perspectivas futuras da evolução da situação epidemiológica em Portugal e no Mundo.....	16
<b>3. PATOGENIA E IMUNOLOGIA.....</b>	<b>17</b>
3.1 Vias de infecção e fisiopatologia.....	17
3.1.1 Vias de infecção, períodos de incubação e fisiopatologia da infecção por <i>Rickettsia conorii</i> .....	17
3.1.2 Vias de infecção, períodos de incubação e fisiopatologia da infecção por <i>Ehrlichia canis</i> .....	19
3.1.3 Vias de infecção, períodos de incubação e fisiopatologia da infecção por <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.....	23
3.2 Quadros clínicos.....	25
3.2.1 Quadros clínicos da febre botonosa.....	25
3.2.2 Quadros clínicos de ehrlichiose monocítica canina.....	26
3.2.3 Quadros clínicos de borreliose de Lyme.....	28
3.3 Patologia clínica.....	29
3.3.1 Patologia clínica da febre botonosa.....	29
3.3.2 Patologia clínica da ehrlichiose monocítica canina.....	30
3.3.3 Patologia clínica da borreliose de Lyme.....	33
3.4 Diagnósticos diferenciais.....	34
3.4.1 Diagnósticos diferenciais de febre botonosa.....	34
3.4.2 Diagnósticos diferenciais de ehrlichiose monocítica canina.....	34
3.4.3 Diagnósticos diferenciais de borreliose de Lyme.....	36
<b>4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....</b>	<b>36</b>
4.1 Diagnóstico directo.....	36
4.1.1 Diagnóstico directo de <i>Rickettsia conorii</i> .....	37
4.1.1.1 Isolamento de <i>Rickettsia conorii</i> em cultura de células.....	37
4.1.1.2 Detecção de ácidos nucleicos.....	37
4.1.2 Diagnóstico directo de <i>Ehrlichia canis</i> .....	38
4.1.2.1 O exame directo em esfregaço sanguíneo.....	38
4.1.2.2 Isolamento em cultura de células.....	39
4.1.2.3 Detecção de antígeno de <i>Ehrlichia canis</i> em plasma.....	39
4.1.2.4 Técnicas de biologia molecular.....	40
4.1.3 Diagnóstico directo de <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.....	40
4.1.3.1 Isolamento e visualização de borrelíias.....	40
4.1.3.2 Detecção de ácidos nucleicos.....	41
4.2 Diagnóstico indirecto.....	42
4.2.1 Diagnóstico indirecto de <i>Rickettsia conorii</i> .....	42
4.2.1.1 Imunofluorescência indirecta (IFI).....	42
4.2.1.2 Técnica de “Immunoblot” ou “Western immunoblot”.....	42
4.2.1.3 Imunodetecção de <i>R. conorii</i> em sangue e tecidos.....	43
4.2.2 Diagnóstico indirecto de <i>Ehrlichia canis</i> .....	44
4.2.2.1 Imunofluorescência indirecta.....	44

4.2.2.2 “ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay” .....	45
4.2.2.3 Técnica de “immunoblot” ou “Western immunoblot” .....	46
4.2.3 Diagnóstico indirecto ou serológico de <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. ....	47
4.2.3.1 Imunofluorescência indirecta (IFI).....	48
4.2.3.2 “ELISA – Enzyme Linked immunosorbent Assay” .....	49
4.2.3.3 Detecção de anticorpos no líquido céfalo-raquidiano (LCR) .....	49
4.2.3.4 Técnica de “immunoblot” ou “Western immunoblot” .....	50
<b>5. TERAPÊUTICA ESPECÍFICA E DE SUPORTE .....</b>	<b>51</b>
5.1 Terapêutica específica e de suporte da febre botonosa.....	51
5.2 Terapêutica específica e de suporte de ehrlichiose monocítica canina.....	52
5.3 Terapêutica específica e de suporte da borreliose de Lyme. ....	54
<b>6. PROFILAXIA.....</b>	<b>55</b>
<b>II - OBJECTIVOS .....</b>	<b>59</b>
<b>III - MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>62</b>
<b>1- DELIMITAÇÃO DA ÁREA GEOGRÁFICA EM ESTUDO. ....</b>	<b>62</b>
<b>2. MATERIAL .....</b>	<b>63</b>
2.1 Ixodídeos .....	63
2.2 Canídeos .....	63
<b>3-MÉTODOS .....</b>	<b>64</b>
3.1 Colheita e identificação dos ixodídeos.....	64
3.2 Teste dos hemócitos.....	64
3.3 “PCR” para a detecção de ácidos nucleicos de <i>R. conorii</i> , <i>B. burgdorferi</i> e <i>E. canis</i> nos ixodídeos.....	64
3.3.1 Extracção de ADN dos ixodídeos. ....	64
3.3.2 Amplificação dos segmentos de ADN de <i>R. conorii</i> , <i>E. canis</i> e <i>B. burgdorferi</i> s.l. por “PCR”.....	65
3.4 Imunofluorescência indirecta em soros de canídeos.....	70
3.5 Isolamento dos agentes infecciosos em estudo. ....	72
3.6 “PCR” para a detecção de ADN dos agentes infecciosos em sangue de canídeo..	73
3.6.1 Extracção de ADN em “buffy coat” .....	73
3.6.2 Amplificação dos segmentos de ADN de <i>R. conorii</i> .....	73
3.6.3 Amplificação dos segmentos de ADN de <i>E. canis</i> .....	74
3.6.4 Purificação e sequenciação dos amplicons .....	74
3.7. Exames hematológicos.....	75
3.7.1 Técnicas de concentração leucocitária e visualização de agentes infecciosos em esfregaço. ....	75
3.7.2 Hemograma. ....	75
3.9 Métodos estatísticos .....	76
<b>4. DIAGRAMA DE EXECUÇÃO .....</b>	<b>78</b>
<b>IV RESULTADOS.....</b>	<b>79</b>
<b>1. IXODÍDEOS .....</b>	<b>79</b>
1.1 Resultados do teste dos hemócitos. ....	80
1.2 Prevalências de infecção dos ixodídeos estudados por PCR.....	80
<b>2. CANÍDEOS .....</b>	<b>81</b>
2.1 Estudo epidemiológico.....	81
2.1.1 Resultados das seroprevalências.....	81
2.1.2 Caracterização da amostra.....	83
2.1.2 Associações encontradas entre os animais seropositivos e as diferentes variáveis, para cada um dos trimestres e na totalidade da amostra.....	85
2.1.4. Resultados do “Odds ratio”. ....	94
2.1.5. Demonstração de sazonalidade na variação de seroprevalências.....	97
2.2 Estudo clínico .....	98
2.2.1 Caracterização dos canídeos incluídos no estudo clínico. ....	98
2.2.2 Quadros clínicos observados.....	100
2.2.3 PCR.....	102

2.2.4	Comparação dos resultados de PCR com IFI. ....	103
2.2.5	Sequenciação dos produtos de “PCR”. ....	103
2.2.6	Isolamento de agentes infecciosos .....	104
2.2.7	Hemograma .....	104
2.2.8	Visualização de agentes infecciosos em esfregaço sanguíneo. ....	106
2.2.9	Imunofluorescência indirecta (IFI) .....	108
2.2.10	Terapêutica específica. ....	109
2.2.11	Outros procedimentos .....	110
<b>V-DISSCUSSÃO DE RESULTADOS. ....</b>		<b>112</b>
<b>VI-CONCLUSÕES.....</b>		<b>126</b>
<b>VII-BIBLIOGRAFIA .....</b>		<b>128</b>
<b>VIII-ANEXOS.....</b>		<b>143</b>

## Índice de tabelas e figuras

Tabela 1- Quadro resumo dos intervenientes nos ciclos epidemiológicos dos vários agentes infecciosos. ....	12
Tabela 2- Quadro resumo das alterações de patologia clínica em canídeos infectados por <i>R. conorii</i> , <i>E. canis</i> e <i>Borrelia burgdorferi s.l.</i> .....	34
Tabela 3. Descrição do programa utilizado no termociclador para amplificar ADN de <i>R. conorii</i> . ....	66
Tabela 4. Descrição do programa utilizado no termociclador para amplificar ADN de <i>E.canis</i> . ....	67
Tabela 5. Descrição do programa utilizado no termociclador para amplificar ADN de <i>B. burgdorferi s.l.</i> .....	68
Tabela 6. Sequência das bases dos oligonucleotídeos sintéticos (“primers”) utilizados para a multiplicação do ADN de <i>R. conorii</i> , <i>E. canis</i> e <i>B. burgdorferi s.l.</i> .....	69
Tabela 7 – Programa da amplificação de sequenciação.....	74
Tabela 8 – Distribuição dos ixodídeos colhidos durante as quatro estações.....	79
Figura 1 – Evolução das capturas dos diferentes estadios de ixodídeos, ao longo das quatro estações. ....	79
Figura 2 – Evolução da captura de ixodídeos em canídeos, durante as quatro estações. ....	80
Tabela 9 – Resultados do teste dos hemócitos utilizado no estudo dos ixodídeos....	80
Tabela 10 – Prevalências de infeccção em ixodídeos estudados por “PCR”.....	81
Tabela 11 – Distribuição sazonal das seroprevalências das três doenças, durante as quatro estações. ....	81
Figura 3 – Distribuição sazonal das seroprevalências das três doenças, durante as quatro estações do ano.....	82
Figura 4 – Distribuição das seroprevalências totais para cada uma das três doenças. ....	83
Tabela 12 – Caracterização da amostra do 1º trimestre. ....	83
Tabela 13 – Caracterização da amostra do 2º trimestre. ....	84
Tabela 14 – Caracterização da amostra do 3º trimestre. ....	84
Tabela 15– Caracterização da amostra do 4º trimestre. ....	85
Tabela 16 – Factores de risco testados para a dependência de variáveis.....	85
Tabela 17 – Demonstração de dependência de factores e a seropositividade para os agentes infecciosos no 1º trimestre. ....	87
Tabela 18 – Demonstração de dependência de factores e a seropositividade para os agentes infecciosos no 2º trimestre. ....	88
Tabela 19 – Demonstração de dependência de factores e a seropositividade para os agentes infecciosos no 3º trimestre. ....	90
Tabela 20 – Demonstração de dependência de factores e a seropositividade para os agentes infecciosos no 4º trimestre. ....	91
Tabela 21 - Demonstração de dependência de factores e a seropositividade para os agentes infecciosos para a totalidade da amostra.....	93
Tabela 22–Resultados do “Odds ratio” para os factores de risco para a febre botonosa.....	94
Tabela 23–Resultados do “Odds ratio” para os factores de risco para a ehrlichiose monocítica canina. ....	95
Tabela 24–Resultados do “Odds ratio” para os factores de risco para a borreliose de Lyme. ....	97
Tabela 25 – Valores do teste estatístico qui-quadrado para a sazonalidade.....	98
Tabela 26 - Caracterização dos canídeos incluídos no estudo clínico. ....	98
Tabela 26 - Distribuição dos canídeos incluídos no estudo clínico por concelho de residência.....	99
Figura 5 – Distribuição dos canídeos incluídos no estudo clínico por concelho de residência.....	99

<b>Tabela 28 – Distribuição dos diferentes sinais clínicos enquanto estímulos iatrotrópicos.</b> .....	100
<b>Figura 6 – Distribuição dos diferentes sinais clínicos enquanto estímulos iatrotópicos.</b> .....	100
<b>Tabela 29-Distribuição da informação recolhida na história pregressa.</b> .....	101
<b>Tabela 30 - Distribuição dos achados do exame clínico.</b> .....	101
<b>Figura 7 - Distribuição dos achados do exame clínico.</b> .....	102
<b>Tabela 31 – Distribuição dos animais estudados por PCR.</b> .....	102
<b>Figura 8 – Distribuição dos animais estudados por PCR.</b> .....	103
<b>Tabela 32 – Comparação dos resultados obtidos por PCR com os obtidos por IFI. .</b> 103	
<b>Tabela 33 - Resultados da sequenciação dos amplicons de ADN, utilizando os “primers” descritos.</b> .....	104
<b>Tabela 34- Estatística descritiva dos vários parâmetros de hemograma estudados.</b> 104	
<b>Tabela 35–Distribuição das principais anomalias hematológicas reveladas por hemograma.</b> .....	105
<b>Figura 9 – Distribuição das principais anomalias hematológicas.</b> .....	106
<b>Tabela 36– Distribuição das principais anomalias do leucograma.</b> .....	106
<b>Figura 10 – Distribuição das principais anomalias do leucograma.</b> .....	106
<b>Tabela 37 – Distribuição da observação dos vários parasitas sanguíneos.</b> .....	107
<b>Figura 11 – Distribuição da observação dos vários parasitas sanguíneos.</b> .....	107
<b>Tabela 38 – Distribuição dos resultados por IFI.</b> .....	108
<b>Figura 12 – Distribuição dos resultados de serologia por IFI em animais presentes à consulta.</b> .....	108
<b>Figura 13 – Distribuição dos vários protocolos terapêuticos utilizados no estudo clínico.</b> .....	109
<b>Figura 14 – Resposta a terapêutica específica.</b> .....	109
<b>Tabela 39-Distribuição das alterações de perfil bioquímico</b> .....	110
<b>Tabela 40-Alterações histológicas dos órgão colhidos em necrópsia.</b> .....	110

## Lista de abreviaturas

ADN	Ácido Desóxiribonucleico
ALKP	Fosfatase Alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
BID	Duas vezes ao dia
BUN	“Blood Urea Nitrogen”
BSKII	Meio de Barbour-Stoenner-Kelly modificado
CEVDI	Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas
°C	Grau centígrado
df	Graus de liberdade
dl	Decilitro
ELISA	“Enzyme-linked immunosorbent assay”
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
ESCMID	“European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases”
EUCALB	“European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis”
fl	Fentolitro
g	Grama
Hz	Hertz
IFI	Técnica de imunofluorescência indirecta
IFN	Interferão
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
ISI	Índice de síntese intratecal
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LPS	Lipopolissacáridos
KDa	Kilodalton
Kg	Quilograma
mAmp	Milíampere
MAP	“Major antigen protein”
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
SC	Sub-cutâneo
Omp	“Outer membrane protein”
OR	“Odds ratio”
Osp	“Outer surface protein”
pb	Pares de bases

PBS	Tampão fosfato salino
PCR	“Polimerase chain reaction”
p/v	Peso/volume
pg	Picograma
PO	<i>Per os</i>
“Primer”	Oligonucleotídeo iniciador
rRNA	“Ribossomal ribonucleic acid”
RLO	“Rickettsia like-organisms”
r.p.m.	Rotações por minuto
µl	Microlitro
SID	Uma vez ao dia
SDS-PAGE	“Sodium dodecyl sulphate-polyacrilamide gel electrophoresis”
s.l.	<i>Sensu lato</i>
s.s	<i>Sensu stricto</i>
Th	“T helper”
TNF	“Tumor necrosis factor”
V	Volts

# **I-Revisão bibliográfica**

## **1. Introdução**

As doenças em estudo apresentadas nesta dissertação, são a febre botonosa, a erlichiose monocítica canina e a borreliose de Lyme têm comum serem doenças bacterianas transmitidas por ixodídeos vectores e classificadas como antropozoonoses, desempenhando o cão um papel fulcral como espécie sentinela e como veículo de vectores para o ambiente doméstico.

### **1.1 Febre botonosa.**

A febre botonosa (FB) também conhecida pela denominação portuguesa de febre escaro-nodular ou anglo-saxónica de “mediterranean spotted fever” teve os primeiros casos clínicos descritos em Portugal por Delfim Pinheiro em 1917. É a zoonose com maior número de casos anuais declarados em Portugal, cerca de 1000 casos humanos, em média desde 1950, ano em que foi introduzida a declaração obrigatória desta doença (Sousa *et al*, 2003). Na região Mediterrânica o interesse por esta entidade clínica foi estimulado pelo aumento de casos clínicos nas década de 80 (Raoult *et al*, 1984) e em particular pelo aumento da taxa de letalidade que no nosso país aumentou de 1,5% em 1995 para 2,58% em 1999 (Sousa, 2001). Em Portugal, a incidência foi estimada em 20 000 casos anuais (Tavares *et al*, 1985). O ressurgimento desta doença na população humana, segundo alguns autores parece estar associado aos factores climáticos: uma Primavera quente originaria um maior número de casos na população humana no Verão seguinte (Espejo-Arenas *et al*, 1986; Raoult *et al*, 1992). Outros sugerem que um melhor diagnóstico ou um maior contacto com a natureza, seriam responsáveis pelo aumento da incidência (Segura *et al*, 1989; Dupont *et al*, 1993). Apesar de a febre botonosa não ser considerada uma entidade clínica no cão doméstico a realização de numerosos rastreios serológicos demonstraram a exposição deste animal doméstico ao agente etiológico desta doença (Bacellar *et al*, 1995a).

A febre botonosa é causada por um coco-bacilo Gram negativo, bactéria intracelular obrigatório pertencente á ordem Rickettsiales, Família Rickettsiaceae, espécie *Rickettsia conorii*, pertencente ao grupo das febres exantemáticas. Com o surgimento de quadros clínicos atípicos de febre botonosa em Israel e na região de Astrakhan-Rússia, conseguiram-se isolar estirpes que foram diferenciadas genotipicamente sendo agrupadas no complexo *R. conorii* (Roux e Raoult, 1995). Em Portugal, considera-se a existência de dois genótipos de *R. conorii* em circulação, *Malish* e *Israeli tick typhus* (Bacellar *et al*, 2003).

## 1.2 ehrlichiose monocítica canina e humana

*Ehrlichia canis* foi identificada, pela primeira vez em 1935, no Instituto Pasteur da Argélia, por Donatien e Lestoquard como agente de doença em canídeos. Os canídeos infestados por ixodídeos desenvolviam um processo febril agudo que cursava com anemia e os esfregaços sanguíneos destes cães apresentavam microrganismos no interior de monócitos, que supuseram ser uma espécie de rickettsia (Donatien e Lestoquard, 1935). No entanto, este agente voltou a ser objecto de estudo ao ser implicado em numerosas mortes na população canina presente junto do exército americano no Vietnã no final dos anos sessenta (Huxsoll *et al*, 1969; Huxsoll *et al*, 1970). A doença recebeu vários designações na altura, sendo a mais usada a de pancitopenia tropical canina. A investigação neste campo seguiu o seu curso até que em 1986, ano em que se detectou nos EUA uma doença humana causada por *Ehrlichia chaffeensis*, um microrganismo intimamente relacionado com *E. canis* (Maeda *et al*, 1987). Esta descoberta deu um novo impulso na investigação das doenças causadas por espécies do género *Ehrlichia*.

O agente da ehrlichiose monocítica canina é a bactéria *Ehrlichia canis*, um coco Gram negativo, intracelular obrigatório que pertence à ordem Rickettsiales e Família Anaplasmataceae, é. Este microrganismo é genotipicamente próximo de *Ehrlichia chafeensis* e *Ehrlichia ewingii*. A ehrlichiose monocítica canina é especialmente prevalente em canídeos das regiões sub-tropicais e tropicais embora seja ocasionalmente descrita em canídeos do norte e centro da Europa que se tenham deslocado a regiões endémicas (ex: bacia do Mediterrâneo). Até a data, foram isoladas e caracterizadas geneticamente quatro estirpes de *E. canis*: a estirpe Flórida, a estirpe Oklahoma, a estirpe Israelita e a estirpe Venezuelana, que apesar de origens geográficas distintas estão estreitamente relacionadas de acordo com a sequenciação do gene 16S rRNA (Keysary *et al*, 1996; Unver *et al*, 2001) Como agente de doença em humanos até ao presente, foi descrito apenas um caso onde *E. canis* foi isolada a partir do sangue de um indivíduo adulto saudável residente na Venezuela, que mantinha no seu dia a dia, um contacto profissional estreito com cães infectados por este agente (Perez *et al*, 1996; Unver *et al*, 2001).

## 1.3 borreliose canina e humana

A borreliose de Lyme, foi descrita pela primeira vez nos EUA por Steere *et al* (1977), ao investigar um surto de artrite na população de Old Lyme, Connecticut, associaram esta patologia á picada de ixodídeo. No entanto, só em 1984, se isolou a partir de ixodídeos a primeira estirpe de *Borrelia burgdorferi* s.l. que deve o seu nome ao investigador William Burgdorfer que a observou pela primeira vez (Johnson *et al*, 1984). Em Portugal, o primeiro caso clínico em humanos, foi descrito em Évora, por David de Moraes *et al* (1989). Entre

1990 e 2000 foram estudados pelo Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas–CEVDI, 8 586 soros de doentes com suspeita clínica de borreliose de Lyme, registando-se em média 46 novos casos positivos por ano sendo a prevalência média da população estudada de 5,8% (Núncio, 2001). Por outro lado a população de canídeos domésticos apresenta igualmente seroprevalências baixas no nosso país quando comparado com países do norte e centro da Europa, facto talvez explicado pelas altas taxas de parasitação destes animais por ixodídeos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* que não são vectores dos microrganismos do complexo *Borrelia burgdorferi* s.l. (Bacellar, 1996; Núncio, 2001).

As borrelíias implicadas na borreliose de Lyme, em humanos e canídeos, são eubactérias, de forma espiralada, Gram-negativas e microaerófilas; pertencentes à Ordem Spirochetales, Família Spirochaetaceae, Género *Borrelia*. Vários trabalhos sobre a sistemática de *Borrelia burgdorferi* s.l. demonstraram uma relativa homogeneidade das estirpes deste agente isoladas nos EUA e uma grande variabilidade observada entre as estirpes europeias do ponto de vista de perfil proteico e das reacções antigénicas com os anticorpos mono e policlonais (Wilske *et al*, 1988; Barbour, 1992b). Baranton *et al* (1992), demonstraram com base em critérios genéticos e fenotípicos a criação do conceito de genoespécie, demonstrando que na Europa o complexo *B. burgdorferi* s.l., engloba três genoespécies *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* e *B. afzelii*.

## **2. Epidemiologia**

### **2.1 Reservatórios, artrópodes vectores e ciclos epidemiológicos da febre botonosa**

Até à data ainda não se isolou *Rickettsia conorii* de hospedeiros vertebrados infectados de forma natural porém julga-se serem importantes como suporte trófico para os ixodídeos vectores. O seu papel no ciclo de transmissão de *R. conorii* necessita de ser clarificado existindo apenas evidências serológicas de prováveis hospedeiros vertebrados reservatórios (Mannelli *et al*, 2003). Entre os seus potenciais reservatórios encontram-se espécies silváticas das famílias Muridae (*Apodemus sylvaticus*), Insectivora (*Erinaceus erinaceus*), Lagomorpha (*Oryctolagus cuniculus*) e espécies cinegéticas de grande porte como o javali (*Sus scrofa ferus*), o veado (*Cervus elaphus*) e o gamo (*Dama dama*) (Rehacek e Tarasevich, 1988). Nos animais domésticos existem provas serológicas que indicam a exposição a *R. conorii* de cães, gatos, ovinos, caprinos e bovinos. Kelly *et al* (1992) provaram que o cão era susceptível à infecção por *R. conorii* apesar desta decorrer inaparente (Durand, 1930; Kelly *et al*, 1992). Adicionalmente, Norment e Burgdorfer (1984), investigaram o papel do cão como hospedeiro reservatório concluindo que este animal doméstico é incompetente na transmissão de rickettsias do grupo das febres exantemáticas.

Na área do Mediterrâneo, mar Negro e Índia, o ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus*, é o principal vector e reservatório de *R. conorii* (Raoult *et al*, 1997). Esta espécie, designada vulgarmente na bacia do Mediterrâneo, por carraça do cão é o vector mais importante sob o ponto vista epidemiológico da febre botonosa. A distribuição geográfica da febre botonosa como acontece na grande maioria das doenças transmitidas por vectores, está associada à distribuição do ixodídeo vector. *R. sanguineus*, é o ixodídeo mais comum nos carnívoros domésticos na Europa meridional e norte de África onde esta antropozoonose é considerada endémica (Bacellar, 1996; Papazahariadou *et al*, 2003).

*R. sanguineus* é um artrópode hematófago estrito, com um ciclo de vida trifásico, que inclui os estádios de larva, ninfa e adulto. Apesar de ser considerado um ixodídeo de três hospedeiros, no cão já foi observado um ciclo de dois hospedeiros, em que a mudança de larva para ninfa se faz no hospedeiro (Uspensky *et al*, 2002). A temperatura, a humidade relativa e o tempo de insolação são os factores climáticos que condicionam fortemente o ciclo de vida de *R. sanguineus* (Caeiro, 1992).

Na área do Mediterrâneo, esta espécie de ixodídeo consegue completar pelo menos dois ciclos de vida em apenas um ano, contudo o tempo necessário para completar um ciclo de vida depende da disponibilidade de hospedeiros vertebrados e das condições climáticas. Em condições ideais de disponibilidade de hospedeiros o ciclo de vida foi estimado em 100 dias, a temperaturas médias de 24°C (Uspensky *et al*, 2002). Em Portugal, esta espécie de ixodídeo foi encontrada em todos os distritos do país porém, as densidades deste ixodídeo são mais elevadas no sul do país, onde as condições climáticas são favoráveis ao desenvolvimento de dois a três ciclos de vida anuais (Caeiro, 1992). No sul do país existem condições climáticas que se aproximam das ideais para *R. sanguineus* que são designadamente: temperaturas mínimas anuais acima dos 10°C–14°C, temperaturas médias máximas acima dos 20°C (durante 8 a 9 meses) e humidade relativa entre 60 e 75% (Caeiro, 1992). O potencial de contacto com esta espécie de ixodídeo na área mediterrânica, existe sazonalmente entre Fevereiro e Outubro (Gilot *et al*, 1990). As formas adultas são mais activas durante a Primavera enquanto os estádios imaturos podem ser encontrados entre o Verão e início do Outono (Gilot *et al*, 1990).

Os adultos de *R. sanguineus* demonstram uma grande afinidade para o cão doméstico mas as fases imaturas são consideradas menos específicas para o hospedeiro, e provavelmente responsáveis (nomeadamente as ninfas) pela transmissão da infecção ao homem, particularmente durante os meses de Verão (Mannelli *et al*, 2003). Dependendo do seu estado evolutivo, *R. sanguineus* pode parasitar uma grande variedade de hospedeiros; as fases de larva e ninfa parasitam animais de pequena e média dimensão (leporídeo,

murídeos, etc.) enquanto os estádios adultos parasitam animais de maior porte (canídeos, bóvidos, etc), (Estrada-Peña, 1994). Porém, o cão é o principal hospedeiro de *R. sanguineus*, podendo completar neste animal todo o seu ciclo de vida (Gilot *et al*, 1984). A parasitação do homem por este ixodídeo é furtiva e conseqüentemente este é um hospedeiro acidental no ciclo epidemiológico de *R. conorii*. Além de que a rickettsémia no homem tem um período de tempo muito curto, sendo um elo terminal na cadeia de infecção.

O ixodídeo vector adquire a bactéria essencialmente através de dois processos. As rickettsias podem ser transmitidas aos ixodídeos quando estes ingerem sangue num hospedeiro vertebrado infectado e rickettsiémico (Rheacek, 1989). Por outro lado as rickettsias também podem ser mantidas transovariamente e transtadialmente sendo que a eficiência da transmissão transovárica pode atingir 100% em condições de laboratório (Rheacek, 1989). Como a postura de *R. sanguineus* pode variar entre 1 400 e 5 000 ovos e associando a elevada eficiência de transmissão das rickettsias, podemos assim avaliar da capacidade de dispersão desta doença a partir de um único vector infectado (Estrada-Peña, 1994).

A febre botonosa caracteriza-se por uma sazonalidade marcada. Em Portugal e França, a maioria dos casos (85% e 77% respectivamente) é reportada entre julho e setembro, o que coincide com o pico de máxima actividade das ninfas (Gilot *et al*, 1990; Bacellar *et al*, 2003) que pela sua pequena dimensão passam despercebidas (Gilot *et al*, 1990). Apenas 10% dos casos humanos de febre botonosa, referem parasitismo por ixodídeos e 90% de *R. sanguineus* recuperados de humanos são formas imaturas, o que suporta a hipótese da transmissão de *R. conorii* ao homem predominantemente pelas formas imaturas de *R. sanguineus* (Gilot *et al*, 1990). Em relação aos canídeos, existe um estudo serológico que indica a inexistência sazonalidade na variação da taxa de seroprevalências o que se deve sobretudo à persistência de anticorpos por períodos que podem atingir os 750 dias (Tesouro *et al*, 1993).

A espécie *R. sanguineus* é provavelmente o ixodídeo mais amplamente disperso em todo o mundo (Estrada-Peña, 1994). Em áreas tropicais e sub-tropicais pode-se encontrar este ixodídeo em actividade todo o ano enquanto nas áreas de clima Mediterrânico, a sua presença estende-se desde o princípio da Primavera até ao Outono descrevendo-se uma maior actividade dos exemplares de *R. sanguineus* durante a Primavera, com uma ligeira queda na população durante o Verão, observando-se posteriormente uma segunda subida na população durante o Outono (Hoskins, 1991; Caeiro, 1992).

Assim na febre botonosa distinguem-se dois ciclos de transmissão: um ciclo doméstico e um ciclo silvático. O ciclo doméstico estabelece-se entre o cão e o homem. Foi demonstrado que a presença de canídeos na proximidade ou no interior das habitações, não só aumenta a densidade dos vários estádios de *R. sanguineus* nas imediações das habitações bem como acelera o ciclo de vida do ixodídeo pela constante disponibilidade de hospedeiros (Uspensky *et al*, 2002). O transporte de ixodídeos vectores pelos canídeos para o interior das habitações é responsável pelo estabelecimento de populações de *R. sanguineus* no interior das mesmas, em áreas urbanas, por vezes distantes das zonas consideradas endémicas para a febre botonosa. A comprovar esta evidência, destaca-se a descrição de três casos humanos de febre botonosa diagnosticados na Holanda, transmitidos através de *R. sanguineus*, transportados pelos canídeos, após umas férias na região Mediterrânica (Ruys *et al*, 1994). O contacto ou a posse de cão é um factor de risco para a infecção de *R. conorii* no homem, facto confirmado em 92% dos pacientes afectados por febre botonosa em Espanha (Espejo *et al*, 1993, Mannelli *et al*, 2003). Um estudo epidemiológico realizado no norte de Itália, demonstrou uma associação entre seroprevalências mais elevadas de FB em canídeos e a localização geográfica de casos humanos da mesma doença, o que evidencia não só a importância do cão no ciclo de transmissão bem como o seu valor enquanto bioindicador de risco e espécie sentinela, para a ocorrência de focos da FB em humanos (Manelli *et al*, 2003). O mesmo estudo revelou que densidades elevadas da população canina em ambientes rurais e semi-rurais favorecem a ocorrência de focos emergentes de FB em humanos (Manelli *et al*, 2003). Esta associação poderá ser explicada pela maior frequência de parasitismo no cão, pelo ixodídeo vector em zonas rurais (69%) por oposição a zonas urbanas (26%), contribuindo assim o cão nas áreas rurais, para uma maior exposição do homem ao vector (Gilot *et al*, 1991).

O ciclo silvático desta doença é descrito entre lagomorfos silváticos (coelhos e lebres), diversas espécies de roedores e diversas espécies cinegéticas que incluem grandes mamíferos tais como o veado, o gamo, o javali (Rehacek e Tarasevich, 1988). Existem também evidências serológicas do contacto de canídeos silváticos com *R. conorii*, desconhecendo-se se o papel destes hospedeiros se resume apenas ao suporte trófico do ixodídeo vector (Waner *et al*, 1999). Todos estes intervenientes do ciclo silvático, foram apenas caracterizados do ponto vista serológico, sendo prováveis reservatórios de *R. conorii*, para além de desempenharem um papel primordial na manutenção e dispersão nas populações de *R. sanguineus* (Bacellar, 1996).

## 2.2. Reservatórios, artrópodes vectores e ciclos epidemiológicos da ehrlichiose monocítica canina.

*Ehrlichia canis*, como a maioria dos microrganismos deste género, apresenta uma grande especificidade de hospedeiro. Os hospedeiros vertebrados para *E. canis* limitam-se aos membros da Família Canidae. O coiote (*Canis latrans*), a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), a raposa cinzenta (*Urocyon cinereoargenteus*), o chacal de dorso prateado (*Canis aureus*), o chacal de dorso negro (*Canis mesomelas*), o lobo (*Canis lupus*) e o cão (*Canis familiaris*) são considerados hospedeiros reservatórios (Sainz-Rodriguez, 1996). Nos canídeos selvagens, a infecção por *E. canis* apresenta um quadro clínico mais benigno do que no cão doméstico (Sainz-Rodriguez, 1996).

Em humanos, existe apenas um caso descrito de infecção por *E. canis* (Perez *et al*, 1996; Unver *et al*, 2001). Em outros primatas (*Macacus inuus*) foi tentada a infecção experimental sem sucesso (Van Heerden e Goosen, 1981). Breitschwerdt *et al* (2002), confirmaram a infecção por um microrganismo semelhante a *E. canis* em 3 gatos, na América do Norte. Todos estes animais apresentavam um quadro clínico compatível com infecção crónica por *E. canis*. No entanto apesar de serologicamente (através de IFI) negativos, foram amplificados segmentos de ADN do referido agente (Breitschwerdt *et al*, 2002). Após a amplificação, os amplicons foram clonados e sequenciados tendo sido identificados como *E. canis* que apesar de pode causar doença clínica no gato, falta conhecer a sua importância deste agente como causa de doença nos felinos domésticos assim como a participação dos felinos nos ciclos epidemiológicos de transmissão.

A ehrlichiose monocítica canina é uma doença transmitida exclusivamente por ixodídeos estando envolvido na transmissão de *E. canis*, o ixodídeo *R. sanguineus* (Groves *et al*, 1975) . No entanto, foi conseguida a transmissão experimental de *E. canis* ao cão, utilizando o ixodídeo *Dermacentor variabilis* (Johnson *et al*, 1998) sendo desconhecida a importância deste vector nos ciclos de transmissão natural de *E. canis* aos canídeos (Johnson *et al*, 1998).

*R. sanguineus* só apresenta uma transmissão transestadial de *E. canis* não ocorrendo transmissão transovárica deste agente. Por esta razão este ixodídeo não se considera um verdadeiro reservatório de *E. canis*. Os ixodídeos adquirem *E. canis* aquando da sua alimentação no estágio de larva ou ninfa, em canídeos que apresentem ehrlichias em circulação transmitindo posteriormente a infecção a todos os estádios de desenvolvimento. Na transmissão de *E. canis* ao hospedeiro, os machos e as fêmeas do vector são igualmente transmissores eficazes do agente (Groves *et al*, 1975). No que concerne à transmissão de *E. canis* ao ixodídeo pelo hospedeiro, esta ocorre mais facilmente durante

as primeiras duas a três semanas de infecção, já que nesta fase de infecção os leucócitos infectados são mais prevalentes no sangue periférico do cão. Os cães podem permanecer infectados sub-clínicamente durante largos períodos de tempo, permanecendo o agente infeccioso também por igual período em circulação periférica. Esta evidência explica a razão pela qual se considera o cão e não o ixodídeo como reservatório natural de *E. canis* (Groves *et al*, 1975; Rikihisa, 1991). Os adultos de *R. sanguineus* podem sobreviver até 568 dias e transmitir a infecção a cães susceptíveis até 155 dias pós-infecção (Neer, 1998). Esta capacidade vectorial permite que *R. sanguineus* infecte cães susceptíveis na Primavera seguinte (Neer, 1998).

Os canídeos residentes em regiões endémicas ou aqueles que viajam para essas regiões são candidatos a contraírem ehrlichiose monocítica canina, estando a distribuição desta doença estritamente relacionada com a distribuição do vector *R. sanguineus*. Ainda que a ehrlichiose canina possa existir durante todo o ano (Harrus *et al*, 1999). A maioria dos casos agudos de infecção por *E. canis* ocorre entre Abril e Novembro no hemisfério norte, o que coincide com o período de maior actividade do vector *R. sanguineus*. Dados recolhidos dos registos clínicos do Hospital Veterinário Universitário da “Hebrew University of Jerusalem” demonstram que 80% dos casos admitidos de ehrlichiose monocítica canina ocorrem durante a Primavera/Verão (Harrus *et al*, 1997a).

A ehrlichiose monocítica canina tal como a febre botonosa, para além das áreas rurais ou suburbanas pode provavelmente ser transmitida em áreas fortemente urbanizadas se existirem biótopos adequados à manutenção de populações de *R. sanguineus* (Silveira, 1992). Estudos efectuados na região de Marselha por Gilot *et al* (1992), sobre a cartografia ecológica das populações de *R. sanguineus* em áreas urbanas, demonstraram a existência de vários tipos de habitats favoráveis, em particular as vivendas com jardins que constituiriam os melhores biótopos para *R. sanguineus*, suportando a possibilidade da transmissão de *E. canis* em ambiente urbano. Em Portugal, existe uma distribuição bastante extensa do *R. sanguineus* como comprovam os estudos realizados por Bacellar *et al* (1991), estimando a percentagem desta espécie de ixodídeo em cerca de 60% do total dos ixodídeos recolhidos no sul do país. Esta elevada percentagem poderá ter um importante significado epidemiológico na disseminação da ehrlichiose monocítica canina e verifica-se também que os cães, mesmo os de zonas urbanas, infestam-se em grande quantidade a partir dos meses de Março e Abril (Bacellar *et al*, 1991).

Regra geral, os ixodídeos e as doenças por eles transmitidas tinham tradicionalmente uma área geográfica bem delimitada por factores climáticos e pela presença de hospedeiros reservatórios domésticos e silváticos. Contudo, com a crescente

mobilidade dos canídeos domésticos e as alterações climáticas, as áreas geográficas de ocorrência de ehrlichiose monocítica canina alargaram-se recentemente a países fora da área considerada endémica (Shaw *et al*, 2001). De 1995 a 1998, 36 % dos casos desta doença, descritos na Alemanha aconteceram em canídeos que tinham viajado por curtos períodos para países da área Mediterrânica (Gothe, 1999). Paralelamente, os limites desta área alargaram-se porque os ixodídeos vectores estão a encontrar nichos em outras localizações sobretudo devido às mudanças climáticas. Entre 1995–1998 infestações por *Rhipicephalus sanguineus* e infecções por *E. canis* foram documentadas em cães que nunca tinham estado fora da Alemanha (Gothe, 1999).

### **2.3 Reservatórios, artrópodes vectores e ciclos epidemiológicos da borreliose de Lyme.**

A borreliose de Lyme é uma doença transmitida por ixodídeos a hospedeiros reservatórios vertebrados. Devido ao elevado número de espécies de mamíferos, aves e répteis que os ixodídeos vectores podem parasitar é difícil identificar toda a gama de hospedeiros reservatórios de *B. burgdorferi s.l.* Estão identificadas 40 espécies de mamíferos e de aves como reservatórios de *B. burgdorferi s.l.* (Gern *et al*, 1998). Com efeito, nem todos os hospedeiros, mesmo que se encontrem infectados, são capazes de transmitir a infecção aos ixodídeos que neles se alimentam. Nesta situação, os hospedeiros não são considerados reservatórios funcionando apenas como suporte alimentar dos ixodídeos, contribuindo apenas para a manutenção de uma elevada densidade populacional dos vectores em determinada localização geográfica. Considera-se um reservatório competente para *B. burgdorferi s.l.* aquele que mantém uma concentração elevada de espiroquetas na corrente sanguínea durante um período prolongado de tempo, permitindo a infecção dos vectores que neles se alimentam (EUCALB, 2004). As diferentes sensibilidades das genoespécies do complexo *B. burgdorferi s.l.* à destruição mediada pelo complemento tem implicações ecológicas já que determina a competência do reservatório. Foi observado que os diferentes isolados de *Borrelia spp* diferem na sua capacidade de activar o complemento e de resistir à destruição pela actividade bactericida do soro dos diferentes hospedeiros reservatórios (Kurtenbach *et al*, 1998). O padrão de sensibilidade ao complemento das diferentes genoespécies de borrelíias coincide com o estado de reservatório de muitas das espécies de vertebrados. Estudos indicam que *B. garinii* e *B. valaisiana* são principalmente transmitidas aos ixodídeos por aves enquanto *B. afzelii* são transmitidas preferencialmente por roedores. Testes *in vitro* de sensibilidade ao complemento de canídeo demonstraram que das três estirpes testadas (B31, *B. burgdorferi sensu stricto*; pKo, *B. afzelii*; e A87S, *B. garinii*), duas (B31 e pKo) são resistentes ao complemento do cão (Hovius *et al*, 2000).

Na Europa, os reservatórios mais eficazes para borrelíias, são os micromamíferos, sobretudo da espécie *Apodemus sylvaticus*, *Clethrionomys glareolus*, *Apodemus flavicollis* a *Apodemus agrarius* (Gray *et al*, 1992). Em relação aos animais domésticos, foi comprovado experimentalmente que o cão, é capaz de infectar estádios imaturos do vector, sendo considerado um reservatório competente (Mather *et al*, 1994). Desta forma, os canídeos infectados com *B. burgdorferi s.l.*, quando expostos a estádios imaturos do vector podem potencialmente introduzir ixodídeos infectados em áreas não tradicionalmente consideradas como biótopos do vector, como serão por exemplo os jardins e quintais das habitações (Mather *et al*, 1994). Nos EUA, o reservatório considerado mais competente deste agente etiológico é o roedor *Peromyscus leucopus* (Appel, 2002).

O papel das diversas espécies de aves reservatórios de *B. burgdorferi s.l.*, não se limita à sua capacidade de actuar como reservatórios, mas estende-se também à capacidade de poder transportar e introduzir vectores e as diversas genoespécies de *Borrelia burgdorferi s.l.* por eles veiculadas para outras localizações geográficas distantes (Núncio, 2001). Os répteis parecem não ser reservatórios, uma vez que limitam a espiroquetémia e diminuem a taxa de infectividade nas formas infectadas de ixodídeos que neles se alimentam (Núncio, 2001).

Os principais vectores da *B. burgdorferi s.l.* são as várias espécies de ixodídeos do complexo *Ixodes ricinus*. Vários artrópodes hematófagos, incluindo outras espécies de ixodídeos, pulgas e de mosquitos encontram-se por vezes infectados de forma natural por *B. burgdorferi s.l.* No entanto, a sua competência enquanto vectores é incerta e a sua importância na transmissão deste agente é portanto provavelmente insignificante (Greene *et al*, 1998; Appel, 2002). Na Europa e na Euroásia os principais vectores são respectivamente *I. ricinus* e *I. persulcatus*. No Nordeste dos EUA a espécie *Ixodes scapularis* é o principal vector enquanto na região oeste dos EUA, a espécie *I. pacificus* é o principal vector de *B. burgdorferi s.l.* Todas as espécies do complexo *Ixodes ricinus*, apresentam biologia e morfologia muito semelhantes bem como uma distribuição geográfica e uma densidade populacional associada à prevalência da borreliose de Lyme. Do ponto vista biológico, estas espécies são de evolução trifásica (ciclo de três hospedeiros), exofílica e politrópica (parasitam uma grande variedade de hospedeiros). As larvas e ninfas alimentam-se em pequenos roedores e os adultos e em mamíferos de maior porte. A duração do ciclo de vida das espécies do género *Ixodes* é de aproximadamente dois a três anos; as fêmeas fazem a ovipostura na Primavera e as larvas eclodem 1 mês mais tarde. Os diversos estádios apresentam diferentes padrões de actividade; as larvas são mais activas no final do Verão infectando-se na primeira alimentação que fazem nos pequenos roedores; as ninfas

apresentam maior actividade em Junho, sendo este estágio o principal responsável pela transmissão da infecção ao cão e ao homem (Mather *et al*, 1994; Greene *et al*, 1998). A actividade máxima dos ixodídeos adultos acontece no início da Primavera e Outono (Greene *et al*, 1998). Apesar do maior risco zoonótico das ninfas, as formas adultas apresentam taxas de infecção superiores aquele estágio (10-25% e 10-50% respectivamente), provavelmente devido à maior longevidade e maior número de oportunidades de exposição (Greene *et al*, 1998). A transmissão transovárica de borrelíias por *Ixodes spp.* é relativamente rara estando apenas documentada em *I. pacificus*. Os biótopos preferidos pelo vector são usualmente bosques e zonas onde a cobertura vegetal é densa (Gray *et al*, 1992). A humidade relativa do ar e do solo abaixo dos 80% é o principal factor climático que limita a sua distribuição (Almeida, 1996).

Na Europa a maioria dos casos humanos manifesta-se no Verão após o período de actividade das ninfas, sendo a sazonalidade mais marcada nas fases iniciais da doença (EUCALB, 2004). Em relação aos canídeos, o período de maior incidência clínica coincide com o período de actividade dos diversos estádios dos ixodídeos vectores (i.e. da Primavera ao Outono), competentes para a transmissão da infecção (Levy *et al*, 1993).

Existem vários ciclos epidemiológicos de manutenção da borreliose de Lyme. O ciclo silvático que se mantém nas áreas densamente florestadas, entre os hospedeiros reservatórios, na sua maioria roedores e os mamíferos de grande porte (ex: nos EUA, o veado de cauda branca, é o principal suporte alimentar dos vectores). A infecção do homem e do cão resulta do contacto com os biótopos dos ixodídeos vectores considerados hospedeiros acidentais do ciclo silvático (Greene *et al*, 1998). Apesar da borreliose de Lyme, estar naturalmente associada às florestas, esta pode ser adquirida nos parques e jardins das áreas urbanas, estabelecendo-se assim um ciclo doméstico/urbano de transmissão. O estabelecimento deste ciclo resulta do transporte dos ixodídeos vectores por canídeos das zonas florestadas consideradas endémicas para ambientes peri-domésticos nomeadamente jardins privados, jardins públicos e parques urbanos desenvolvendo-se e mantendo-se aí uma população de ixodídeos vectores que poderão alimentar-se e amplificar a infecção nas várias espécies de roedores que habitam nesses biótopos (Estrada-Peña, 2004).

Apesar de alguns autores, colocarem a hipótese dos donos de cães, apresentarem um maior risco de infecção por *B. burgdorferi s.l.* (Mather *et al*, 1994), não existem evidências concretas da transmissão directa da infecção do cão ao homem. Um rastreio serológico realizado na Holanda, demonstrou não haver correlação entre a posse de cão e a seropositividade para borreliose de Lyme (Goosens *et al*, 2001). Existe apenas um caso descrito de gonartrite numa criança de um ano e meio de idade com alto título de anticorpos

para *B. burgdorferi s.l.*, que nunca tinha estado na floresta ou contactado com animais domésticos com excepção de um cão (Zajadacz *et al*, 2002). Os autores que descreveram este caso sugeriram que a transmissão mais provável foi feita pelo referido canídeo, faltando evidências directas que comprovem esta hipótese (Zajadacz *et al*, 2002). No entanto, Goosens *et al* (2001), evidenciam a importância do cão enquanto bioindicador do risco de infecção por *B. burgdorferi s.l.*, em particular pelo curto período de manutenção da seropositividade quando comparado com o homem (a seropositividade mantém-se durante anos). Foram encontrados valores semelhantes de seroprevalência entre cães de caça e caçadores, o que acentua a relação epidemiológica próxima que existe entre as duas populações (Goosens *et al*, 2001).

A evolução e o estabelecimento de novos focos de borreliose de Lyme pode ocorrer rapidamente devido à existência de condições climáticas e geo-ecológicas favoráveis na Europa central e do norte (Goosens *et al*, 2001). A utilidade dos cães de caça surge pelo seu papel de espécie sentinela que frequenta com regularidade o biótopo do vector, monitorizando não só o aparecimento de novos focos de borreliose de Lyme mas também avaliando alterações que possam surgir nos focos conhecidos desta doença (Goosens *et al*, 2001).

**Tabela 1- Quadro resumo dos intervenientes nos ciclos epidemiológicos dos vários agentes infecciosos.**

Doença	Agente	Vector	Reservatório	Distribuição
febre botonosa	<i>Rickettsia conorii</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Membros das famílias Muridae Insectivora Lagomorpha e potencialmente algumas espécies cinegéticas	Bacia do Mediterrâneo, mar Negro, região de Astrakhan-Rússia e Índia
ehrlichiose monocítica canina	<i>Ehrlichia canis</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Membros da família <i>canidae</i>	Mundial, mas especialmente prevalente em áreas tropicais e sub-tropicais

**Tabela 1 (continuação)- Quadro resumo dos intervenientes nos ciclos epidemiológicos dos vários agentes infecciosos.**

<b>Doença</b>	<b>Agente</b>	<b>Vector</b>	<b>Reservatório</b>	<b>Distribuição</b>
borreliose de lyme	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. <i>B. garinii</i> <i>B. afzeli</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Na Europa, micromamíferos das espécies : <i>Apodemus sylvaticus</i> , <i>Clethrionomys glareolus</i> , <i>Apodemus flavicollis</i> <i>Apodemus agrarius</i>	Europa, Ásia e América do Norte

#### **2.4 A situação epidemiológica actual em Portugal e no Mundo, referentes as três doenças em estudo.**

Nos estudos sobre a FB, têm sido realizados numerosos rastreios serológicos na população de canídeos domésticos da Europa mediterrânica e norte de África, nas duas últimas décadas. Em Portugal, foram executados rastreios serológicos em canídeos essencialmente provenientes de canis e zonas rurais. Bacellar *et al* (1995), realizaram IFI em soros provenientes de 104 cães do canil de Setúbal e determinaram uma seroprevalência de 85,6% para *R. conorii*. Núncio *et al* (1999), colheram amostras de soro em 55 canídeos divididos em três grupos de acordo com a sua proveniência: militares, rural e urbana e determinaram uma seroprevalência para *R. conorii* que variou entre os 30% e os 80% (Núncio, 1999).

Na província de Castilla e León no Nordeste de Espanha, foi realizado um estudo seroepidemiológico em 308 cães onde se determinou uma seroprevalência total de 23,4% para *R. conorii*. Foram também avaliados potenciais factores de risco (presença de ixodídeos, idade, sexo, aptidão, habitat e estação do ano) (Delgado *et al*, 1995). Entre as conclusões deste estudo, destaca-se também a evidência de uma seroprevalência superior em animais provenientes de zonas rurais, utilizados em actividades de pastorícia, em animais infestados por ixodídeos e um aumento de frequência de seropositivos nos meses de Verão coincidente com o período de maior actividade do vector *R. sanguineus* (Delgado

*et al*, 1995). Ainda em Espanha, Rojo-Vasques (1997) realizou um estudo de seroprevalência na província de León, mais concretamente na área rural de San Andrés del Rabaniedo, onde foram rastreados 84 canídeos. Todos os canídeos incluídos neste rastreio, tinham como principal aptidão a pastorícia ou a caça. Dos 84 canídeos, 14,28% foram considerados seropositivos para *R. conorii* por IFI (“cut-off” de 1:40).

Melgrati *et al* (1999), realizaram na região Norte de Itália um rastreio serológico de 459 cães, dos quais 39% eram positivos para *R. conorii* (Melgrati *et al*, 1999). Não houve associação estatística com a seropositividade e os supostos factores de risco como sexo, residência, a cor da pelagem e o comprimento do pêlo (Melgrati *et al*, 1999). Contudo, em relação à idade, foi demonstrado estatisticamente que os canídeos com idade superior a dois anos apresentavam uma seroprevalência superior em relação aos de idade inferior (44% Vs 30%) (Melgrati *et al*, 1999).

Em Israel, realizaram-se rastreios serológicos sobretudo em áreas onde ocorreram focos de FB. Este rastreios puseram em evidência o cão enquanto espécie sentinela para avaliar a possibilidade de ocorrência de FB no homem. A seroprevalência *R. conorii* encontrada nesta população de canídeos foi de 82-84%, verificou-se adicionalmente o que supera em 2,8 vezes os valores da população canídea de Israel em geral (Keysary *et al*, 1988).

Através destes rastreios serológicos coloca-se em evidência, o potencial de espécie de sentinela que o cão apresenta. Contudo teremos que interpretar estes valores de seroprevalência com alguma reserva, se tivermos em conta que a espécie *R. sanguineus* não é apenas vector de *R. conorii* mas também outras espécies de rickettsias não patogénicas que se incluem no grupo das febres exantemáticas, de entre estas destaca-se as espécies *R. massilae* e Bar 29 já isoladas na Península Ibérica a partir de ixodídeos do complexo *R. sanguineus* (Bacellar *et al*, 1995a; Beati *et al*, 1996). Estas espécies apresentam-se antigenicamente semelhantes a *R. conorii*, o que poderá produzir reacções serológicas cruzadas por IFI, sobrestimando as seroprevalências em canídeos para FB. De referir também a alta taxa de parasitação (24,2%) de *R. sanguineus* em Portugal, por microrganismos semelhantes a rickettsias o que cosubstancia a possibilidade de exposição dos canídeos a outras rickettsias patogénicas e não-patogénicas pertencentes ao grupo das febres exantemáticas (Bacellar, 1996). Mais recentemente, Bacellar *et al* (2002) apresentaram os resultados de um estudo que resultou da colheita sistemática *R. sanguineus* em canídeos domésticos entre 1991-2001. Neste estudo, *R. conorii* de estirpe *malish* foi isolada em apenas 1% dos ixodídeos colhidos enquanto as rickettsias não patogénicas foram isoladas em 27% dos casos, o que poderia sugerir segundo os autores

uma acção profiláctica por parte das rickettsias não patogénicas impedindo a colonização da população de ixodídeos por rickettsias patogénicas (Bacellar *et al*, 2002).

Existem registos de que a ehrlichiose monocítica canina apresenta uma distribuição mundial (Ásia, África, Europa, América do Norte e do Sul), sendo contudo mais prevalente em regiões tropicais e sub-tropicais (Harrus *et al*, 1997a). Até ao momento ainda não foi documentado nenhum caso na Nova-Zelândia e só muito recentemente (em 2001) se descreveu o primeiro caso de ehrlichiose monocítica canina na Austrália (Irwin, 2001).

Em África, rastreios serológico (por IFI) para *E. canis*, evidenciaram-se seroprevalências de 68% na Tunísia, de 53% Senegal, de 28% no Chad, de 33% no Egipto, de 43% no Zimbábue e de 42% na África do Sul (Brouqui *et al*, 1991; Matthewman *et al*, 1993; Matthewman *et al*, 1994, Botros *et al*, 1995). Em Israel, os rastreios serológicos demonstraram uma seroprevalência de 30% em canídeos domésticos (Baneth *et al*, 1995).

Na Europa, os rastreios serológicos realizados indicam que as seroprevalências mais elevadas se encontram nos países mediterrânicos. Bacellar *et al* (1995) registaram uma seroprevalência de 54,5%, em cães vadios, capturados na região de Setúbal-Portugal. Na região de Emilia-Romagna, em Itália, 72,1% dos 154 canídeos vadios capturados e mantidos no canil municipal, apresentavam títulos de anticorpos para *E. canis* (Trotz-Williams e Trees, 2002). Em Espanha, 66,36% dos canídeos de caça residentes num canil de caça localizado em Madrid, eram positivos para *E. canis* por IFI. Rastreios serológicos realizados em cães polícia, concretamente num canil de Madrid demonstraram apenas uma seroprevalência de 2,3% em 131 canídeos rastreados (Sainz *et al*, 1995). Em 2077 cães militares aparentemente saudáveis, pertencentes ao exército dos EUA, a prevalência de seropositivos foi de 11% (Harrus *et al*, 1997a).

Até a data têm sido executados numerosos trabalhos sobre a seroprevalência da borreliose de Lyme canina. A detecção de anticorpos anti-borrélia tem sido documentada na maioria dos países europeus através de rastreios serológicos realizados em diversas populações de canídeos domésticos. Os países do centro e norte da Europa apresentam seroprevalências superiores aos do sul da Europa, facto intimamente relacionado com a distribuição e densidade das populações de *I. ricinus*. Na Eslováquia, a seroprevalência demonstrada em cães de caça foi de 40% enquanto em cães de companhia e de trabalho a seroprevalência foi respectivamente de 11,80% e 29,40% (Stefancikova *et al*, 1998). Em outros países do centro e norte da Europa, nomeadamente na República Checa, na Croácia e na Alemanha, as seroprevalências em canídeos foram respectivamente de 53,7%, 40% e 35,5% (Sykora *et al*, 1990; Weber *et al*, 1991; Poljak *et al*, 2000). Goossens *et al* (2001)

realizaram rastreio serológico em canídeos de caça e de companhia, a seropositividade demonstrada por ELISA foi de 18% e 17% (Goossens *et al*, 2001). No sul da Europa os diversos rastreios serológicos realizados em Itália, Espanha e Portugal expressaram uma menor seropositividade, que foi respectivamente de 0%, 11,6%, 21% e 9% (Mannelli *et al*, 1999; Delgado *et al*, 1995; Merino *et al*, 2000; Nuncio, 2001).

Nos EUA, 85% dos casos humanos de borreliose de Lyme, têm sido notificados nos Estados da costa leste, do Massachusetts à Virginia (Greene *et al*, 1998). Paralelamente na população canídea foram efectuados vários estudos de serovigilância em vários dos Estados considerados endémicos para a borreliose de Lyme, evidenciando valores de seroprevalência que se situam entre os 25% e os 90% (Fritz *et al*, 2003). Dos vários rastreios serológicos realizados destacam-se aqueles realizados nas populações caninas nos estados endémicos da costa leste que revelaram seroprevalências superiores a 49%, confirmando que os canídeos domésticos poderão ser bioindicadores fiáveis da borreliose de Lyme (Burgess, 1986; Falco *et al*, 1993; Magnarelli *et al*, 1997; Guerra *et al*, 2000; Hinrichsen *et al*, 2001).

As diferenças na seropositividade associadas à aptidão dos canídeos tem sido documentadas (Stefancikova *et al*, 1998; Merino *et al*, 2000), mas não foram associadas ao sexo e à estação do ano (Delgado *et al*, 1995). A actividade ao ar livre, é o principal factor de risco que influencia a percentagem de seropositivos para borreliose de Lyme em qualquer das espécies animais (Bhide *et al*, 2004). As diferenças na seroprevalência entre os grupos de canídeos, devem-se sobretudo a diferentes graus de exposição aos ixodídeos vectores que decorrem da sua aptidão. Merino *et al* (2000) demonstraram que os canídeos com pêlo cerdoso apresentaram uma maior seroprevalência se comparados com outros cães e que os canídeos que vivem a altitudes mais elevadas (superiores 800 metros) expressaram uma menor seroprevalência se comparados com os que vivem em baixas altitudes.

## **2.5 Perspectivas futuras da evolução da situação epidemiológica em Portugal e no Mundo.**

As doenças infecciosas transmitidas por ixodídeos aos canídeos, em foco nesta dissertação tornaram-se um objecto de estudo em regiões onde tradicionalmente eram consideradas não-endémicas. Este facto é importante não só em saúde animal mas também em saúde pública, devido à possível função reservatório do cão e ao potencial zoonótico das doenças transmitidas por ixodídeos. A expansão destas doenças a novas localizações geográficas deriva sobretudo do aumento da mobilidade regional e internacional do cão,

proporcionando-se um maior contacto destes animais com ambientes rurais comuns aos reservatórios silváticos, e podendo ser o cão um elo de ligação entre o ciclo silvático e o ciclo doméstico de manutenção da doença (Shaw *et al*, 2001). Estes factores associados às alterações climáticas que tendem para um aquecimento global, criam riscos reais para a saúde animal e humana. A introdução de técnicas de biologia molecular como o “PCR” no diagnóstico laboratorial de rotina, permite uma mais rápida detecção de agentes infecciosos transmitidos por ixodídeos em amostras biológicas e a sua utilização em rastreios epidemiológicos para determinação de prevalências (Shaw *et al*, 2001). Actualmente existe uma necessidade urgente de conhecimento da situação, no que se refere a prevalência destas doenças no cão e nos ixodídeos das regiões tradicionalmente não endémicas (Shaw *et al*, 2001). Uma vez adquirido este conhecimento inicial poder-se-á monitorizar-se tendências futuras de crescimento nos vários intervenientes do ciclo epidemiológico (Shaw *et al*, 2001).

### **3. Patogenia e imunologia.**

A compreensão dos mecanismos da resposta imunitária envolvidos na patogenia das infecções dos agentes transmitidos por ixodídeos é fundamental para um melhor entendimento dos sinais clínicos observados e até para uma melhor adequação da terapêutica de suporte.

#### **3.1 Vias de infecção e fisiopatologia.**

*R. conorii*, *E. canis* e *B. burgdorferi s.l.* são agentes infecciosos transmitidos por vectores, em que excepcionalmente pode ocorrer transmissão mecânica. Após a transmissão destas bactérias, desenrolam-se mecanismos mediados pela resposta imunitária que são responsáveis pelo aparecimento dos vários sinais clínicos, anomalias hematológicas e bioquímicas.

##### **3.1.1 Vias de infecção, períodos de incubação e fisiopatologia da infecção por *Rickettsia conorii***

A transmissão de *R. conorii* ocorre através da picada de ixodídeo infectado, enquanto este efectua a sua refeição sanguínea. Estudos efectuados com *R. conorii*, mostraram que para haver transmissão efectiva do agente infeccioso é necessário que o ixodídeo parasite 6-20 horas (Raoult e Walker, 1990). Durante este período, as rickettsias que se encontram nas glândulas salivares são transmitidas por via sanguínea (Gilot *et al*, 1990). No homem para além da transmissão pela picada do ixodídeo pode também ocorrer

a transmissão mecânica através do contacto de mucosas com macerados de ixodídeos infectados, como por exemplo na tentativa de recolha da carraça (Raoult e Walker, 1990).

O período de incubação em canídeos foi apenas determinado em infecções experimentais, observando-se lesões entre os 3 dias pós-inoculação (dpi) e os 7 dpi (Kelly *et al*, 1992). No mesmo cenário experimental foi demonstrado que o cão doméstico mantém uma rickettsiemia detectável entre os 2 e 10 dias dpi (Kelly *et al*, 1992). No homem, o período de incubação varia entre os 5 e 7 dias dpi (Saraiva *et al*, 1989).

Apesar de existirem poucos relatos da patogenicidade das infecções de *R. conorii* em canídeos, é importante o conhecimento da patogenia da infecção para melhor compreender o quadro clínico quer no homem quer no cão. As células endoteliais são o principal alvo da infecção por rickettsias, causando uma vasculite generalizada, característica desta patologia (Walker *et al*, 2003). O tipo de resposta à infecção por estes microrganismos intracelulares obrigatórios é feita prioritariamente pela imunidade celular dependente dos linfócitos T. A redução e a eliminação das rickettsias das células endoteliais resulta da indução de apoptose e posterior remoção das células pelos linfócitos T citotóxicos CD8. O mecanismo da indução da apoptose inicia-se por uma activação da morte intra-endotelial das rickettsias mediada por citocinas. Em ratinhos IFN- $\gamma$ , o TNF- $\alpha$  actuam sinergisticamente para activar a sintetase-2 de óxido nítrico que acabará por destruir as rickettsias intracelulares. As células NK—"Natural Killer" contribuem também para a imunidade celular com a produção de IFN- $\gamma$  no início da infecção. A imunidade humoral é particularmente dirigida para epitopos como OmpA e OmpB (Walker *et al*, 2003). Em humanos, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  desencadeiam a actividade intra-celular rickettsicida em várias combinações através de diferentes mecanismos que inclui o óxido nítrico, radicais livres de oxigénio e a limitação da disponibilidade de triptofano através da degradação pela indoleamina-2,3-dioxigenase (Walker *et al*, 2003).

Os mecanismos de lesão celular desencadeados pelas rickettsias, são evidenciados pela vasculite produzida pela infecção por *Rickettsia rickettsi*. Os radicais livres de oxigénio (RLO) produzidos pelas células endoteliais activadas pelas diversas citocinas, degradam as membranas celulares pela peroxidação lípida (Walker *et al*, 2003). Em células endoteliais cultivadas e infectadas *in vitro* foi demonstrada a lesão celular causada por stress oxidativo. Nestas células observou-se uma depleção de componentes celulares como o glutatião e de enzimas como a glucose-6-fosfato desidrogenase e glutatião peroxidase que são defesas naturais contra as lesões induzidas por RLO, verificou-se um aumento dos níveis de catalase o que conduziu a uma elevação intra-celular de peróxido de hidrogénio (Walker *et al*, 2003).

Como resultado da morte de numerosas células endoteliais contíguas dos capilares verifica-se um aumento da permeabilidade vascular o que resulta na acumulação de líquidos, nos tecidos vizinhos originando edema e perda de volume vascular, o que conduz à hipovolémia (Walker *et al*, 2003). As petéquias características que se observam na pele de doentes infectados por *Rickettsia conorii* resultam também da vasculite generalizada. As formas graves de febre botonosa surgem em 6% dos casos humanos, apresentam manifestações de coagulação intravascular disseminada, necrose tecidual extensa, insuficiência multiorgânica, sinais de afecção neurológica, trombozes ao nível do sistema venoso profundo como resultado de uma vasculite extensa e generalizada (Raoult *et al*, 1997). As formas graves tem sido associadas a factores inerentes ao doente como idade acima de 65 anos, diabetes, insuficiência hepática crónica, alcoolismo crónico e deficiência na enzima glucose-6-fosfato desidrogenase que, ao nível celular, resultam numa diminuição dos mecanismos de contenção dos RLO, que desempenham um papel fundamental na patogénia desta infecção (Regev-Yochay *et al*, 2000; Sousa, 2001).

### **3.1.2 Vias de infecção, períodos de incubação e fisiopatologia da infecção por *Ehrlichia canis*.**

O cão infecta-se pela picada do ixodídeo enquanto este se alimenta do seu sangue (Neer, 1998). O tempo mínimo necessário de alimentação para que ocorra transmissão de infecção ainda não foi estabelecido para *E. canis* (Neer, 1998). Trabalhos recentes utilizando animais de laboratório, sugerem que os componentes da saliva e das secreções intestinais introduzidos durante a alimentação alteram a actividade imunitária da pele circundante e dos linfonodos regionais (Ferreira e Silva, 1999). Foram encontradas proteínas com alta afinidade para imunoglobulinas e histamina na saliva de algumas espécies de ixodídeos. Existem evidências de que infestações por *R. sanguineus* causam uma mudança de um perfil normal de citocinas produzido por linfócitos Th1, associado à resistência a doenças transmitidas por carraças, para um perfil de citocinas aberrante, produzido por linfócitos Th2 (Ferreira e Silva, 1999). Estas alterações imunomodulatórias locais e sistémicas facilitam a transmissão de *E. canis* pelo ixodídeo (Ferreira e Silva, 1999). Transfusões de sangue de cães dadores infectados podem também transmitir este microrganismo (Neer, 1998).

Em condições experimentais o período de incubação ( $\pi$ ) da ehrlichiose monocítica canina é de 9 a 14 dias, podendo variar entre 8 a 20 dias infecção natural (Ewing e Buckner, 1965; Hibler *et al*, 1986). O  $\pi$  parece depender do estágio de desenvolvimento do vector verificando-se que quando a transmissão é feita pelo ixodídeo adulto, o  $\pi$  apresenta

valores entre 12-16 dias (Groves *et al*, 1975), enquanto a transmissão se faz através de ninfas, o pi varia entre 17 a 21 dias (Groves *et al*, 1975).

Após a fixação do ixodídeo, os monócitos ocorrem a este local atraídos por factores de quimiotaxia e são infectados por *E. canis* presente nas secreções das glândulas salivares do ixodídeo (Harrus *et al*, 1998). Os monócitos infectados entram na circulação sanguínea e linfática e invadem vários tecidos dispersos pelo organismo (Harrus *et al*, 1998). A persistência destes microrganismos nos vários tecidos e órgãos resulta em alterações histológicas típicas de plasmocitose e acumulação perivascular generalizada de linfócitos e plasmócitos (Harrus *et al*, 1998). As ehrlichias parecem sobreviver nos macrófagos produzindo proteínas que previnem a fusão dos fagossomas com os respectivos lisossomas (Harrus *et al*, 1998).

Existem cada vez mais factos que suportam o papel dos mecanismos imunitários na patogenia e nos consequentes sinais clínicos, anomalias hematológicas e bioquímicas. Entre estas evidências destacam-se a hiperglobulinémia não correlacionada com os títulos de anticorpos específicos de *E. canis*, testes de Coombs e de autoaglutinação positivos em animais afectados clinicamente e a indução da produção de anticorpos anti-plaquetas (AAP) canídeos infectados experimentalmente (Waner *et al*, 1995; Harrus *et al*, 1999, Harrus *et al*, 2001).

A trombocitopenia é a anomalia hematológica mais frequente em canídeos infectados experimental e naturalmente por *E. canis*, é atribuída a diversos mecanismos em diferentes fases da doença (Harrus *et al*, 1999). Os mecanismos envolvidos na trombocitopenia presente na fase aguda da doença devem-se ao consumo de plaquetas por alterações inflamatórias do endotélio vascular (vasculite), ao aumento da sequestração das plaquetas pelo baço e à destruição ou disfunção imunomediada de plaquetas resultando em diminuição do tempo de vida útil das plaquetas (Harrus *et al*, 1999). Adicionalmente, foi descrito e isolado um factor de inibição de migração das plaquetas (Harrus *et al*, 1999). Este factor desempenha um papel na sequestração e estase das plaquetas, diminuindo a sua contagem a nível de sangue periférico (Harrus *et al*, 1999).

Estudos experimentais utilizando radioisótopos demonstraram que o tempo de vida das plaquetas foi reduzido 2 a 4 dias após a infecção por *E. canis* dos valores normais de 9 dias para 4 dias, (Waner *et al*, 1995). A demonstração de que existem AAP no soro de cães infectados experimentalmente com *E. canis*, confirma a suspeita de uma destruição imunomediada das plaquetas e clarifica a patogenia da trombocitopenia na fase aguda desta infecção (Waner *et al*, 1995; Harrus *et al* 1996a). No referido estudo, a detecção de AAP

ocorreu aos 7 dias dpi em um cão de um grupo de seis, detectando-se a presença de AAP em todos cães do grupo aos 17 dias dpi (Waner *et al*, 1995). O estímulo que leva a produção destes anticorpos é desconhecido foram propostas várias teorias para explicar este estímulo. Uma delas sugere que os linfócitos B apresentando receptores naturais para auto-anticorpos podem entrar em proliferação por contacto com antigénios de *E. canis* que são antigénicamente semelhantes a antigénios "Self". A teoria alternativa propõe que os AAP se desenvolvem secundariamente ao contacto com componentes plaquetários revelados pela destruição não imunológica de plaquetas e pela libertação massiva de proteínas estruturais plaquetárias (Harrus *et al*, 1998). O consumo de complemento durante a fase trombocitopénica da ehrlichiose aguda cosubstancia os mecanismos imunopatológicos envolvidos na patogenia da trombocitopenia. Paralelamente ao desenvolvimento da trombocitopenia durante a fase aguda da infecção, observa-se um aumento no volume médio das plaquetas, o que reflecte uma trombopoiese (Harrus *et al*, 1998). Na fase crónica da infecção, a trombocitopenia é explicada pela diminuição da produção de plaquetas pela medula óssea devido a hipoplasia ou aplasia que se observa nesta fase de infecção (Harrus *et al*, 1998). Nesta fase observa-se pancitopenia pela razão explicada anteriormente.

A capacidade de adesão das plaquetas encontra-se reduzida em cães infectados de forma aguda por *E. canis* (Harrus *et al*, 1996b). A interacção de AAP com as glicoproteínas da membrana das plaquetas foi proposta como a causa desta disfunção plaquetária (Harrus *et al*, 1996b). A presença de concentrações máximas de AAP (17 a 24 dias dpi experimental), na mesma altura em que ocorre esta disfunção plaquetária, suporta esta teoria (Harrus *et al*, 1996b).

Em cães infectados por *E. canis*, os sinais hemorrágicos são frequentes, embora a gravidade destes sinais, nem sempre seja explicável nem correlacionável com a contagem plaquetária (Harrus *et al*, 1998). Por vezes observam-se contagens plaquetárias muito baixas, sem sinais hemorrágicos; em oposição podem-se observar quadros hemorrágicos em cães, com contagens plaquetárias normais (Woody e Hoskins, 1991; Harrus *et al*, 1997a). A observação de episódios hemorrágicos em cães infectados por *E. canis*, com contagem plaquetária superior a 40 000/mm<sup>3</sup> implica que exista vasculite ou disfunção plaquetária (Codner *et al*, 1985). Em ambos os grupos, os tempos de coagulação activada, tempos de protrombina, tempo parcial de tromboplastina e os níveis de produtos de degradação da fibrina são normais (Woody e Hoskins, 1991). Todas estas evidências acumuladas sugerem que os sinais hemorrágicos de ehrlichiose não se devem apenas às baixas contagens de plaquetas mas também resultam de disfunção plaquetária (Codner *et al*, 1985).

Na ehrlichiose monocítica canina, não se observa uma predisposição em relação à idade, à raça e ao sexo, contudo os cães de raça Pastor Alemão parecem mais susceptíveis à infecção por *E. canis*, manifestando-se a doença nestes canídeos por quadros clínicos mais severos e com pior prognóstico (Harrus *et al*, 1999). Estão também documentadas infecções mais graves em animais jovens (Harrus *et al*, 1999). As diferenças com a susceptibilidade estão relacionadas na capacidade de estabelecer uma resposta imune celular e/ou humoral adequada (Harrus *et al*, 1999). A resposta imune do tipo celular componente mais importante na resposta imune que confere protecção à infecção por *E. canis* contra está deprimida em Pastores Alemães quando comparada com cães de raça Beagle (Harrus *et al*, 1999). Em infecções experimentais, a persistência de altos títulos de anticorpos após o tratamento e a eliminação do microrganismo, não é eficaz na protecção quando os mesmos canídeos são re-infectados com estirpes homólogas de *E. canis* (Harrus *et al*, 1999). A resposta imune humoral desempenha um papel importante na patogenia da infecção por *E. canis* através da hipergamaglobulinemia, que resulta de uma resposta humoral exagerada e aberrante a uma estimulação antigénica prolongada (Harrus *et al*, 2001). A hipergamaglobulinemia nesta situação, não é devida a produção de anticorpos contra *E. canis* mas resulta essencialmente da produção de anticorpos não específicos (Woody e Hoskins, 1991; Harrus *et al*, 1997a). Deste aumento de gamaglobulinas resultam situações patológicas como o síndrome de hiperviscosidade que tem influência na disfunção plaquetária e é responsável pelos sinais neurológicos e oftalmológicos observados nesta infecção (Shaw *et al*, 2001).

O papel da resposta imunitária humoral aberrante, na patogenia da infecção por *E. canis* é documentado por Harrus *et al* (2001), que relacionaram a presença de títulos elevados de IgG em canídeos infectados naturalmente e experimentalmente com a presença de imunocomplexos circulantes responsáveis pelo desenvolvimento de patologias como glomerulonefrite e uveíte em animais infectados por *E. canis*. A administração de imunossuppressores, como a ciclofosfamida em associação com soro anti-linfócito, a canídeos infectados experimentalmente, alterou as manifestações clínicas e hematológicas desta infecção (Harrus *et al*, 1998).

O baço é um órgão com um papel central na patogenia da infecção por *E. canis* como foi provado por Harrus *et al* (1998). Os cães esplenectomizados apresentam um quadro clínico mais suave do que num grupo controlo. O hematócrito, a concentração de hemoglobina e a contagem de eritrócitos e de plaquetas foram significativamente superiores durante toda a duração do estudo, no grupo esplenectomizado. Não houve diferença nos títulos de IgG e no momento do aparecimento de IgG entre os dois grupos. A remoção do baço, órgão dominante na síntese de opsoninas, complemento, citocinas e factor de

inibição de migração de plaquetas e um dos principais órgãos do sistema mononuclear fagocitário resultou numa diminuição da destruição de plaquetas e sequestração do microrganismo na fase sub-clínica e crónica (Harrus *et al*, 1998).

Após a fase aguda da doença, a infecção por *E. canis* pode persistir depois de uma recuperação clínica espontânea, ou de uma terapêutica ineficaz, entrando, os animais na fase sub-clínica da ehrlichiose monocítica canina. Durante esta fase observam-se apenas ligeiras anomalias hematológicas (Waner *et al*, 1997). Um estado de premunicação ou imunidade protectora existe em cães infectados sub-clinicamente ou em cães com infecção clínica após uma terapêutica de curta duração com oxitetraciclina (Waner *et al*, 1997). É possível a eliminação espontânea do microrganismo do cão, durante a fase sub-clínica da doença (Waner *et al*, 1997). A imunidade protectora na ehrlichiose canina, será provavelmente mantida sobretudo pela resposta imunitária celular em substituição da resposta imune humoral.

Na actualidade, a investigação tem-se debruçado principalmente sobre a patogenia das fase agudas e sub-agudas da infecção por *E. canis* assim pouco é conhecido sobre a patogenia da fase crónica desta infecção, nomeadamente das condições que levam ao seu desenvolvimento e da patogenia da hipoplasia/aplasia medular.

### **3.1.3 Vias de infecção, períodos de incubação e fisiopatologia da infecção por *Borrelia burgdorferi s.l.***

A transmissão da espiroqueta requer que o ixodídeo se alimente durante 48 horas, período em que o microrganismo se multiplica e atravessa o epitélio intestinal para a hemolinfa disseminando-se posteriormente para as glândulas salivares e infectando o canídeo através da inoculação de saliva do ixodídeo (Greene *et al*, 1998). Sood *et al* (1997), documentaram uma subida significativa na taxa de transmissão deste microrganismo quando a duração da alimentação é igual ou superior a 72 horas, 20% em oposição a 1,1% quando a alimentação é dura menos de 72 horas. A inoculação por via oral é um meio extremamente ineficiente de transmissão deste microrganismo (Grauer *et al*, 1988; Barthold, 1991; Moody e Barthold, 1991). Foi comprovada experimentalmente a infecção intra-uterina am canídeos, após inoculação intradérmica com *B. burgdorferi s.l.* (Burgess, 1992a). O período de incubação varia entre 2 a 5 meses (Straubinger *et al*, 1998).

Após a transmissão pelo ixodídeo, o microrganismo prolifera na pele no local onde foi inoculado pelo vector. A partir desta localização as borrelíias replicam-se e migram através dos tecidos. Em várias semanas atingem diferentes tecidos incluindo, as

articulações mais próximas do local de inoculação (IVIS, 2004). Apesar da resposta imunológica do hospedeiro aos múltiplos antígenos de *B. burgdorferi s.l.* e da eventual administração correcta e atempada de antibióticos, estes agentes podem estabelecer uma infecção persistente (Núncio, 2001). Estudos experimentais, sugerem que as espiroquetas existem extracelularmente e que de alguma forma conseguem iludir o sistema mononuclear fagocitário. Existe apenas um mecanismo conhecido, pelo qual este microrganismo consegue escapar ao sistema imunitário e que consiste na variação das proteínas de superfície que são codificadas por regiões variáveis do genoma (IVIS, 2004).

Este microrganismo, existe em número muito reduzido nos vários tecidos. Daí resulta o enigma do mecanismo fisiopatológico que leva a que este número reduzido produza uma ampla gama de sinais clínicos (IVIS, 2004). Julga-se que os vários quadros clínicos resultam da própria resposta inflamatória do hospedeiro. Os mecanismos envolvidos na patogénia são imunomediados. Foram detectadas reacções cruzadas entre anticorpos anti-borrelia e diferentes estruturas tais como a mielina, proteínas neuroaxonais, proteínas da membrana sinovial, hepatócitos e músculo cardíaco (IVIS, 2004). Da interacção entre a estrutura do microrganismo e os macrófagos resulta a síntese de citocinas que amplificam e perpetuam a acção do microrganismo. As citocinas mais implicadas nesta infecção são a interleucina 1 (IL-1), a interleucina 6 (IL-6), a interleucina 8 (IL-8) e o factor de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), (Straubinger *et al*, 1997).

Da parede celular de *B. burgdorferi s.l.* foi isolado um lipopolissacárido com propriedades semelhantes à endotoxina, que estimula a síntese de IL-1 pelos macrófagos (Straubinger *et al*, 1998). Esta citocina é um dos principais imunoreguladores, estimulando a produção de prostaglandinas e colagenases e sendo responsável pelas manifestações inflamatórias, pela febre e pela libertação de neutrófilos da medula óssea que ocorrem durante a evolução da doença (Straubinger *et al*, 1998). Crê-se que a libertação de IL-6, que será induzida pelas proteínas de superfície OspA e OspB do microrganismo, em conjunto com o TNF- $\alpha$  funcionam como moduladores da resposta inflamatória, recrutando para o lugar da infecção células mononucleares, linfócitos e granulócitos (Straubinger *et al*, 1998). Nas membranas sinoviais de canídeos infectados por *B. burgdorferi s.l.*, detectou-se um aumento da actividade de IL-8, um potente factor quimiotáctico, que recruta neutrófilos para o interior da cavidade articular (Greene *et al*, 1998; Straubinger *et al*, 1998). Este poderá ser um mecanismo importante na produção da poliartrite supurada característica desta infecção. Na mesma altura em que são produzidas estes factores pró-inflamatórios, alguns factores tampão como IL-10 aumenta a sua actividade e inibe a produção e libertação de factores pró-inflamatórios e, desta forma, limita a extensão da inflamação e poderá ser a razão para a natureza intermitente da poliartrite da borreliose de Lyme (Straubinger *et al*, 1998).

Em humanos, o “background” genético desempenha um papel importante na patogénia desta doença tendo-se demonstrado uma associação estreita entre o sistema de histocompatibilidade (HLA) e a borreliose de Lyme, mais concretamente os antígenos HLA DR2 e HLA DR4 enquanto para os canídeos ainda não foi estabelecida esta associação (Littman, 2003).

## **3.2 Quadros clínicos**

### **3.2.1 Quadros clínicos da febre botonosa.**

Até ao momento, foram documentadas e caracterizadas clinicamente, de forma esporádica infecções naturais em canídeos por *R. conorii*. Alexander *et al* (1939), isolaram aquilo que aparentava ser *R. conorii* a partir do sangue de um cão de raça Fox terrier que apresentava febre, anorexia, vômito, diarreia e prostração. Clerc e Lecombe, observaram febre, linfadenopatia, anemia e leucopenia num cão serologicamente positivo para *R. conorii* (Kelly *et al*, 1992). Font *et al* (1992), descreveram uma série de 7 casos em canídeos que apresentavam um quadro clínico caracterizado por febre, anorexia, depressão, linfadenomegália, petéquias e equimoses. Hematologicamente observou-se leucopenia ou leucocitose, anemia e trombocitopenia. Os canídeos incluídos nesta descrição tinham história de exposição a ixodídeos, eram serologicamente positivos para *R. conorii* e negativos para *E. canis* e *B. burgdorferi* s.l. (Font *et al*, 1992). Nenhuma destas descrições demonstrou de forma directa e inequívoca o envolvimento de *R. conorii* nos quadros clínicos descritos e o diagnóstico laboratorial foi serológico sendo por isso, também de considerar reacções serológicas cruzadas (Kelly *et al*, 1992).

Kelly *et al* (1992) infectaram experimentalmente 12 canídeos jovens com uma estirpe de *R. conorii* proveniente do Zimbabué. Os resultados obtidos demonstraram que a inoculação de cães com *R. conorii* resultaram numa infecção assintomática associada a seroconversão e rickettsiemia intermitente que persistiu de 2 a 10 dias pós-inoculação. Neste estudo experimental, não foram observadas anomalias hematológicas ou bioquímicas e os únicos sinais clínicos observados foram a dor, eritema, edema no local de inoculação e linfadenopatia regional (Kelly *et al*, 1992).

### 3.2.2 Quadros clínicos de ehrlichiose monocítica canina

Os vários sinais clínicos associados a infecção por *E. canis* são influenciados pela estirpe infectante, dose infectante, pela imunocompetência do sistema imunitário e até pela raça do canídeo, sendo documentados quadros clínicos mais severos em Pastores Alemães do que nas demais raças (Cohn, 2003).

A infecção clínica por *E. canis* tem sido descrita em três estádios ou fases, aguda, sub-clínica e crónica. Após um período de incubação de 1 a 3 semanas, os cães entram na fase aguda da infecção e podem apresentar letargia, anorexia, ligeira perda de peso, hipertermia, linfadenomegália e esplenomegália (em 20 e 25% dos casos) (Kelly, 2000; Cohn, 2003). Na fase aguda de infecção 40% dos canídeos apresenta-se infestado por ixodídeos no momento do diagnóstico clínico (Greene *et al*, 1985). A maior parte dos canídeos sobrevive à fase aguda da infecção, elimina o microrganismo (provavelmente através da imunidade celular) e recupera em 4 semanas ou entra na fase sub-clínica, não demonstrando sinais clínicos mas permanecendo infectados por *E. canis* (Waner *et al*, 1997). A fase sub-clínica pode ser curta, durando apenas 4 meses como o demonstrado em canídeos infectados experimentalmente ou persistindo até 10 anos em cães infectados naturalmente (Waner *et al*, 1997).

Em alguns cães em fase sub-clínica de infecção, desenvolve-se uma fase crónica da doença caracterizada por um quadro clínico de doença com prognóstico reservado. As condições que levam ao desenvolvimento da fase crónica ainda não são conhecidas. A passagem da fase sub-clínica para a fase crónica pode estar relacionada com a raça, estado imunitário, stress, terapêutica imunossupressora, co-infecções com outros agentes infecciosos, estirpe de *E. canis* ou re-infecções persistentes (Harrus *et al*, 1999). O risco de desenvolvimento da forma crónica da doença em casos sub-clínicos não deve ser ignorado (Harrus *et al*, 1999). O diagnóstico e o tratamento dos canídeos em fase sub-clínica é recomendado, com o objectivo prevenir a evolução para a fase crónica da doença.

Nesta fase os cães exibem perda de peso ou até mesmo caquexia, hipertermia, prostração, mucosas pálidas, hemorragias e edemas periféricos particularmente do escroto e membros pélvicos (Kelly, 2000). Sinais atribuíveis a diáteses hemorrágicas incluindo epistáxis, hematúria, melena, petéquias ou hemorragias equimóticas, hifema e hemorragias na retina ocorrem em 25% a 60% dos casos (Cohn, 2003). Nestes casos a morte surge por hemorragia extensa e choque hipovolémico ou devido a infecções bacterianas secundárias (Kelly, 2000). Outros sinais clínicos de infecção crónica por *E. canis*, relacionam-se com a persistência do microrganismo e com a consequente formação de anticorpos. Algumas das

mais severas manifestações clínicas associadas com a ehrlichiose crónica, resultam de glomerulonefrites com síndrome nefrótica, e de síndrome de hiperviscosidade. Estes dois síndromes resultam da resposta humoral ineficaz e exuberante presentes na fase crónica da doença (Cohn, 2003). Também foram descritos recentemente uma série de casos de dermatofitose generalizada provavelmente relacionados com a imunodepressão decorrentes da fase crónica da doença (Cerundolo, 2004).

Também podem ocorrer sinais neuromusculares, oculares e reprodutivos em cães infectados por *E. canis*. Este sinais incluem polimiosites, paresis, sinais de meningo-encefalite, deficits de nervos cranianos, convulsões, abortos e infertilidade, uveíte anterior, hifema, lesões focais de corioretinite e deslocamento da retina (Kelly, 2000). A claudicação causada por poliartrite é um sinal clínico que pode surgir em infecções por *E. canis*; é de referir no entanto que as espécies de *Ehrlichia* ditas granulocíticas (*E. ewingii* e *Anaplasma phagocytophilum*) têm sido mais frequentemente associadas a poliartrites do que as demais espécies de *Ehrlichia* (Neer *et al*, 2002).

A presença de sintomatologia respiratória pode-se desenvolver devido a existência de processos inflamatórios ou hemorrágicos nos interstícios alveolares (Codner *et al*, 1985). Sinais respiratórios como a tosse, o corrimento oculo-nasal, a intolerância ao exercício, a dispneia, a cianose e o aumento da intensidade dos sons respiratórios, podem ocorrer na infecção por *E. canis* (Codner *et al*, 1985). Radiologicamente estes animais podem apresentar radiopacidades intersticiais difusas no pulmão (Codner *et al*, 1985). Nos EUA, em canídeos infectados naturalmente, nos quais a fase de infecção não foi determinada, os sinais clínicos observados com maior frequência foram: depressão (67%), perda de peso (59%), epistáxis (46%), febre (40%), e linfadenomegália (30%) (Woody e Hoskins, 1991).

As infecções simultâneas por múltiplos agentes infecciosos transmitidos por ixodídeos e outros artrópodes têm sido bem documentadas em relatos de casos ou em estudos epidemiológicos retrospectivos (Suksawat *et al*, 2001; Cohn, 2003; Mylonakis *et al*, 2004). Esta associação de microrganismos é possível porque *R. sanguineus* é um vector potencial de vários agentes infecciosos. Por exemplo *R. sanguineus* transmite para além de *E. canis*, as espécies *E. ewingii*, *Babesia canis*, *B. gibsoni*, *Hepatozoon canis* e *Rickettsia spp* (Suksawat *et al*, 2001; Cohn, 2003). A co-infecção por múltiplos agentes dificulta o diagnóstico e o tratamento (Cohn, 2003). A presença de vários microrganismos no mesmo hospedeiro pode explicar variações nos quadros clínicos, patogenicidade e resposta a terapêutica (Suksawat *et al*, 2001).

### 3.2.3 Quadros clínicos de borreliose de Lyme.

A doença clínica ocorre 2 a 5 meses após a exposição ao agente, sendo a gravidade e predisposição para o desenvolvimento dos sinais clínicos inversamente proporcional à idade do animal e ao estado imunitário (Greene *et al*, 1998). As manifestações clínicas de borreliose de Lyme em canídeos são raras, apenas 5% dos canídeos apresenta sinais de doença permanecendo a esmagadora maioria portadores assintomáticos após a exposição ao agente. Pelo contrário, 90% dos humanos expostos a *Borrelia burgdorferi s.l.* apresenta sinais de doença (Littman, 2004).

O quadro clínico mais comum em canídeos envolve claudicação aguda ou intermitente, efusão e dor articular em uma ou mais articulações, febre, anorexia e por vezes linfadenopatia local (Littman, 2003). A poliartrite é o síndrome mais bem descrito da borreliose de Lyme em canídeos e surge em episódios de 4-6 dias que tendem a repetir-se várias vezes em intervalos de 2 a 4 semanas e surgem associados aos sinais sistémicos acima descritos (Appel, 2002; Littman, 2004). Apesar do seu carácter temporário, as alterações degenerativas das articulações são progressivas. As articulações geralmente afectadas são o tarso, o carpo ou ambas (Littman, 2004). A dor articular pode estar presente mesmo na ausência de efusão articular sendo a claudicação muito evidente (Littman, 2004). As formas crónicas de poliartrite não erosivas são frequentes em infecções mais prolongadas e podem persistir mesmo após antibioterapia adequada (Greene *et al*, 1998). Nas formas crónicas de poliartrite, existe normalmente história de claudicação ligeira intermitente associada a uma temperatura corporal normal ou ligeiramente elevada, anorexia parcial e letargia (Levy *et al*, 1993).

Em canídeos, os sinais neurológicos foram apenas reportados em dois casos de borreliose de Lyme, nos quais foram demonstradas concentrações elevadas de anticorpos intratecais (Azuma *et al*, 1993). Apenas um caso de bloqueio átrio-ventricular e miocardite foi comprovadamente causado por *Borrelia burgdorferi s.l.* (Levy e Nury, 1988). Outra forma de borreliose de Lyme em canídeos assemelha-se à meningite causado por este agente em humanos. Como sinais clínicos desta forma de doença, regista-se dor intensa na região cervical e crânio combinada com relutância em mover-se, depressão, anorexia e febre (Appel, 2002). A resposta à antibioterapia adequada é esperada nestes casos (Appel, 2002).

O eritema crónico migrante é uma sinal dermatológico quase patognomónico de borreliose de Lyme em humanos. Nos canídeos, o único sinal dermatológico descrito até ao momento consiste numa pequena lesão eritematosa desenvolvida no local de fixação do ixodídeo e que desaparece ao fim de uma semana (Greene *et al*, 1998).

Foi descrita em canídeos serologicamente positivos e residentes em áreas endêmicas foi descrita uma nefropatia severa com perda de proteína e insuficiência renal (Littman, 2003). A incidência deste síndrome é desconhecida e actualmente ainda não existe um modelo animal para o seu estudo (Littman, 2003). Histologicamente, demonstrou-se a presença de uma glomerulo-nefrite imunomediada, necrose tubular difusa com regeneração e uma nefrite intersticial linfo-plasmocítica (Littman, 2003). Adicionalmente, em cortes histológicos foi demonstrada a presença de espiroquetas através de colorações especiais e em um caso foi possível isolar e cultivar *Borrelia burgdorferi s.l* a partir da urina de um canídeo (Levy *et al*, 1993; Littman 2003). Clinicamente, os canídeos afectados são mais jovens do que os cães que apresentam outras nefropatias e pertencem na sua maioria à raça Labrador, Golden Retriever e Shetland Sheepdog (Littman 2003). A duração deste quadro clínico varia entre 24 horas e 8 semanas e o canídeo apresenta-se com vômito agudo, anorexia, letargia, febre, desidratação e edemas periféricos, nos meses de verão e outono (Levy, 2001; Littman, 2003). Muitos destes canídeos tem hipertensão arterial e se tratados com fluidoterapia agressiva podem-se agravar os edemas periféricos e até surgir edema pulmonar (Littman, 2003). A grande maioria destes quadros clínicos evolui rapidamente para a morte em 1 a 2 semanas, caracterizando-se por uma mortalidade elevada. Estando apenas descritos três casos de canídeos que sobreviveram alguns meses com nefropatia de Lyme (NL) (Littman, 2003). Cerca de 30% dos canídeos com NL, tinham uma história de claudicação intermitente, 3 a 6 semanas antes do surgimento da NL que respondeu clinicamente à antibioterapia usada para o tratamento da poliartrite de Lyme (Littman, 2003). Quase 30% dos casos de NL eram vacinados para borreliose de Lyme (Littman, 2003). Os sinais neurológicos (convulsões e nistagmus) associados à NL surgem em 15% dos casos e são provavelmente causados por eventos trombo-embólicos, hipertensão arterial, vasculite ou encefalopatia urémica (Littman, 2003), (Littman, 2004).

No entanto, apesar de todas estas evidências altamente sugestivas de uma associação de *B. burgdorferi s.l* com esta nefropatia ainda não foi estabelecida uma relação causa-efeito para esta forma de borreliose de Lyme (Levy *et al*, 1993).

### **3.3 Patologia clínica**

#### **3.3.1 Patologia clínica da febre botonosa**

Em todas as inoculações efectuadas em canídeos, com *R. conorii*, todos os parâmetros do hemograma e perfil bioquímico se encontravam dentro dos limites considerados normais (Kelly *et al*, 1992). Font *et al* (1992) descreveram uma série de 7 casos em canídeos que apresentavam um quadro clínico caracterizado por febre, anorexia, depressão,

linfadenomegália, petéquias e equimoses que atribuíram a infecção por *R. conorii*, baseando-se apenas em resultados positivos por IFI (Font *et al*, 1992). Observaram-se também leucopenia ou leucocitose, anemia e trombocitopenia (Font *et al*, 1992).

Em oposição, os casos humanos de febre botonosa apresentam alterações laboratoriais que vão desde discretas leucocitoses com neutrofilia, ou neutropenia, anemia normocítica moderada e trombocitopenia a aumentos da velocidade de sedimentação e descida da actividade da protrombina (Poças *et al*, 2002). Nos valores bioquímicos verifica-se, em geral, um aumento das enzimas hepáticas e de algumas enzimas musculares como creatinofosfocinase (CPK), aldolases e a outras menos específicas como a lactatodesidrogenase (LDH) (Poças *et al*, 2002). Pode também haver alterações da função renal com aumento da creatinina, situações de hiponatrémia e hipoclorémia (Poças *et al*, 2002).

### **3.3.2 Patologia clínica da ehrlichiose monocítica canina**

Na fase aguda da infecção por *E. canis*, a anomalia hematológica mais comum é a trombocitopenia (contagens de plaquetas entre 20 – 100 x 10<sup>3</sup>/μl), associada a um aumento do volume plaquetário médio, sugerindo uma trombopoiese activa (Waner *et al*, 1997). Esta alteração surge em 82 % dos canídeos infectados naturalmente, não obstante existem casos de ehrlichiose monocítica canina sem trombocitopenia (Sainz-Rodriguez, 1996; Vicent-johnson, 2004). A trombocitopenia como anomalia hematológica mais consistente da ehrlichiose monocítica canina poderá ser quantificada e desta forma ser associada a diferentes sinais clínicos. As petéquias ou equimoses surgem mais frequentemente quando a contagem de plaquetas desce para números inferiores a 40 000/μl (Codner *et al*, 1986). Podem ocorrer, sinais como epistáxis, hematúria ou hemorragia gastro-intestinal quando a contagem de plaquetas diminui para 20 000/μl (Codner *et al*, 1986). No entanto, alguns canídeos podem apresentar contagens de plaquetas inferiores a 10 000/μl sem sinais hemorrágicos (Codner *et al*, 1986). Porém também podem ocorrer sinais hemorrágicos como epistáxis e petéquias, associados a uma contagem plaquetária superior a 40 000/μl o que indica uma falta de integridade vascular (vasculite) e/ou um defeito na função plaquetária (Codner *et al*, 1986). Outras alterações hematológicas descritas menos frequentemente incluem a anemia e a leucopenia moderada a que se segue a leucocitose (Hibler *et al*, 1986). A anemia durante a fase aguda será regenerativa devido ao aumento da destruição dos eritrócitos por mecanismos imunológicos. 27% dos canídeos que apresenta anemia regenerativa na fase aguda da infecção, é positivo para o teste de Coombs. Da união inespecífica das imunoglobulinas aos eritrócitos ou de processo auto-imune específico pela existência de anticorpos frente a superfície eritrocitária, poderá ser responsável pelo

despoletar de um quadro anemia hemolítica aguda presente em alguns cães com ehrlichiose aguda (Greene et al, 1985;Breitschwerdt, 1995). Nesta fase da infecção, a medula óssea apresenta hiperplasia das linhas megacariocítica e mieloide, (Hibler et al, 1986).

Durante a fase sub-clínica, a trombocitopenia ligeira é a anomalia hematológica mais frequente e ,em muitos casos, o volume plaquetário médio está aumentado (Harrus et al, 1997). Nos canídeos em fase sub-clínica de infecção, a neutropenia absoluta foi descrita em 30% dos casos, a linfocitose absoluta em 40% dos casos e a trombocitopenia em 50% dos casos (Codner et al, 1986). Em canídeos, infectados experimentalmente, em fase sub-clínica registou-se trombocitopenia em 6 de 9 cães inoculados. Em 78% destes canídeos registou-se uma redução na contagem de leucócitos e observou-se também em 71% dos casos uma redução significativa na contagem de neutrófilos, no entanto não se verificou leucopenia ou neutropenia (Waner et al, 1997). Durante este estudo experimental nenhum dos canídeos ficou anémico, no entanto alguns deles apresentaram valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e contagem de hemócitos abaixo dos valores pré-infecção (Waner et al, 1997). A medula óssea apresenta hiperplasia das linhas megacariocítica e mieloide, nesta fase da infecção (Hibler et al, 1986).

Na forma crónica de infecção, a pancitopenia é uma anomalia hematológica que resulta da hipoplasia ou aplasia de todas as linhas celulares precursoras da medula óssea. A pancitopenia surge em 18% dos casos e é mais comum nas formas crónicas severas e em canídeos de raça Pastor Alemão (Neer, 1998). Durante a fase crónica a leucopenia é severa, sendo frequente haver contagens de leucócitos inferiores a 3 000 leucócitos/ $\mu$ l a trombocitopenia surge com contagens inferiores a 30 000/ $\mu$ l (Neer, 1998). Foi descrito também linfocitose granular que pode ser confundida com leucemia linfocítica bem diferenciada (Weiser et al, 1991; Neer et al, 2002). A anemia descrita na forma crónica é não-regenerativa devido a perda crónica de sangue e existência de hipoplasia ou aplasia medular. Na fase inicial da infecção crónica pode observar-se hiperplasia da medula óssea mas, à medida que a doença progride, a medula óssea torna-se hipoplástica, afectando todas as linhas celulares provocando a pancitopenia típica (Kuehn e Gaunt, 1985).

A hipoalbuminemia, a hiperproteinémia e a hiperglobulinemia são as alterações bioquímicas predominantes em cães infectados por *E. canis* (Harrus et al, 1999). A hipoalbuminemia pode decorrer da perda de albumina para fluídos inflamatórios extravasculares como consequência do aumento da permeabilidade vascular por vasculite ou por perda de sangue, diminuição da produção de proteína por doença hepática ou por perda de proteína por via urinária nas glomerulonefrites imunomediadas que ocorrem nesta

infecção. A síntese de albumina é regulada pela pressão oncótica e a diminuição da sua síntese pode surgir como mecanismo compensador do estado de hiperglobulinemia, mantendo desta forma a pressão oncótica e prevenindo um aumento na viscosidade do sangue. A hipergamaglobulinemia na ehrlichiose monocítica canina é geralmente policlonal. A gamopatia monoclonal raramente ocorre e pode resultar numa síndrome de hiperviscosidade com manifestações clínicas associadas (Harrus *et al*, 1999). A concentração de gamaglobulinas aumenta durante a fase aguda e persiste durante a fase sub-clínica e crónica (Harrus *et al*, 1999). Harrus *et al* (1996), estudaram as alterações nas proteínas do soro em canídeos infectados de forma aguda e crónica e concluíram que as globulinas  $\alpha$ -2,  $\beta$ -2 e  $\gamma$  se encontravam aumentadas enquanto as  $\alpha$ -1 se encontravam diminuídas em canídeos infectados de forma aguda (Harrus *et al*, 1996). Os mesmos autores concluíram que os canídeos com infecção crónica e pancitopénicos apresentam hiperglobulinemia,  $\gamma$ -globulina elevadas e  $\alpha$ -1 diminuídas, as restantes globulinas encontram-se dentro de valores normais (Harrus *et al*, 1996). O mesmo estudo pôs em evidência, as diferenças entre o grupo de canídeos pancitopénicos e não-pancitopénicos. Quando comparados, o primeiro grupo revelou concentrações mais baixas de proteínas totais, globulinas e gamaglobulina do que o segundo grupo. As baixas concentrações de gamaglobulinas associadas à pancitopenia demonstram um comprometimento do estado imunitário na fase crónica de infecção, devendo ser esperada um maior frequência de infecções secundárias (Harrus *et al*, 1996).

Na fase sub-clínica surgem também alterações no proteínograma. Waner *et al* (1997) estudaram-nas em 9 cães inoculados experimentalmente. No referido estudo a hiperproteínemia sérica estava presente em 33% dos canídeos, a hipoalbuminemia em 22%, a hipergamaglobulinemia em 68%, a elevação das globulinas  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2 e  $\beta$ -1 em 22% e 44% dos casos respectivamente e diminuição de globulinas  $\beta$ -2 em 55% dos canídeos inoculados experimentalmente (Waner *et al*, 1996)

Os parâmetros laboratoriais indicadores da função hepática e renal podem apresentar valores normais em canídeos com ehrlichiose monocítica (Breitschwerdt, 1995). Contudo, pode o aumento da actividade da alanina aminotransferase (ALT) e da fosfatase alcalina pode verificar-se em 43% e 41% dos casos de ehrlichiose aguda (Neer, 1998). Adicionalmente, pode observar-se também hiperbilirrubinemia (Troy e Forrester, 1990). O aumento da ureia e creatinina acima dos valores de referência podem ter uma origem pré-renal (como por ex. a desidratação) ou renal, podendo ocorrer uremia associada a casos de glomerulonefrite imunomediada (Breitschwerdt *et al*, 1987).

Outros achados de patologia clínica incluem proteínúria, hematúria, ratio proteína/creatinina superior a 1,0 e tempo de hemorragia prolongado (mesmo em cães que apresentem contagens de plaquetas normais, o que evidencia trombopatias) (Hibler *et al*, 1986). Os tempos de tromboplastina parcial activada, os tempos de protrombina e os produtos de degradação do fibrinogénio estão dentro dos limites normais, excepto se existir um quadro de coagulação intravascular disseminada (Kuehn e Gaunt, 1985).

O líquido céfalo-raquidiano dos canídeos que apresentam sintomatologia neurológica, mostra níveis elevados de proteínas e pleiocitose mononuclear com grande número de linfócitos e plasmócitos (Neer, 1998). O líquido sinovial, em casos de poliartrite por *E. canis*, pode apresentar uma coloração amarelada com um aumento de concentração de proteínas e do número de células com predomínio de neutrófilos (75%) em associação com macrófagos e linfócitos. Em raras ocasiões é possível visualizar mórulas tanto no líquido sinovial como no líquido céfalo-raquidiano (Greene *et al*, 1985).

Entre as anomalias laboratoriais mais comuns observadas em canídeos infectados incluíam-se: a trombocitopenia (86% dos casos), a anemia não-regenerativa (43%), a hipoalbuminemia (43%), a hiperglobulinemia (39%), a hiperproteinemia (33%), a leucopenia (31%), a leucocitose (20%), a pancitopenia (17%) e a anemia regenerativa (15%) (Woody e Hoskins, 1991). A elevação das enzimas hepáticas foi observada em 35% dos casos, mas o uso anterior de corticoesteroides pode ser responsável por esta elevação (Woody e Hoskins, 1991).

### **3.3.3 Patologia clínica da borreliose de Lyme**

Os achados de patologia clínica na borreliose variam com o quadro clínico predominante. Os canídeos que apresentam artrite de Lyme, têm normalmente um hemograma, perfil bioquímico e urianálise sem quaisquer alterações, contudo, os níveis de creatina quinase podem estar ligeiramente aumentados em alguns cães, durante os episódios de claudicação (Appel, 2002). O líquido sinovial, LCR e urina podem apresentar alterações inflamatórias. Entre as alterações do líquido sinovial em canídeos afectados por artrite de Lyme destaca-se um aumento da contagem celular de 5 000 para 100 000 células/ $\mu$ l com predomínio de neutrófilos (>95 %), um aumento da concentração de proteína e macroscopicamente observa-se turvidez do mesmo líquido (Greene *et al*, 1998). O LCR em pacientes com neuroborreliose, evidencia uma pleiocitose linfocítica com um ligeiro aumento na concentração da proteína. Alterações consistentes nos mesmos parâmetros não tem sido encontradas, em canídeos suspeitos de neuroborreliose (Greene *et al*, 1998).

Na nefrite de Lyme, os animais afectados apresentam alterações em diversos parâmetros (Littman, 2004). A urianálise pode revelar proteínúria, cilindros e possivelmente hemoglobínúria/hematúria. Nos casos em que exista envolvimento tubular pode existir glucosúria e/ou baixa densidade urinária (Littman, 2004). Os achados do perfil bioquímico incluem hipoalbuminemia, hipercolesterolemia, possível azotemia, hiperfosfatemia, hipercalemia, hiperglobulinemia e/ou hiperbilirrubinemia (Littman, 2004). O hemograma mostra anemia não-regenerativa, trombocitopenia e leucograma de stress (Littman, 2004). Nos canídeos que apresentem um estado de hipercoagulabilidade associado a nefrite de Lyme, o nível de anti-trombina III pode estar aumentado (Littman, 2004).

**Tabela 2- Quadro resumo das alterações de patologia clínica em canídeos infectados por *R. conorii*, *E. canis* e *Borrelia burgdorferi* s.l.**

<b>Doença</b>	<b>hemograma</b>	<b>Bioquímica</b>	<b>Urianálise</b>
Febre botonosa	Sem alterações.	Sem alterações.	Sem alterações.
ehrlichiose monocítica canina	Trombocitopenia, leucopenia e anemia.	Hipoalbuminemia, Hiperglobulinemia e elevação das enzimas hepáticas.	Proteínúria e hematúria.
Borreliose de Lyme	Sem alterações excepto na nefrite de Lyme em que pode surgir anemia não-regenerativa.	Sem alterações excepto na nefrite de Lyme, em que pode surgir azotemia, hiperfosfatemia e hipoalbuminemia.	Sem alterações, excepto na nefrite de Lyme onde ocorre proteínúria, hematúria e baixa densidade urinária.

### **3.4 Diagnósticos diferenciais.**

#### **3.4.1 Diagnósticos diferenciais de febre botonosa.**

A febre botonosa não foi reconhecida até ao momento como uma entidade patológica no cão, daí que não se inclua esta doença nos vários diagnósticos diferenciais de doenças transmitidas por ixodídeos aos canídeos (Kelly *et al*, 1992).

#### **3.4.2 Diagnósticos diferenciais de ehrlichiose monocítica canina.**

A sintomatologia clínica da ehrlichiose monocítica canina é muito variada e inespecífica pelo que pode ser confundida com um grande número de patologias. No diagnóstico da fase crónica da infecção por *E. canis* deve-se incluir no diagnósticos diferencial, o mieloma múltiplo, linfoma, leucemia linfocítica crónica e lupus eritematoso sistémico (Woody e Hoskins, 1991). Num cão, com um quadro crónico de perda de peso, esplenomegália, linfadenopatia generalizada, pancitopenia, plasmocitose na medula óssea e gammopatia monoclonal o único modo de diferenciar a ehrlichiose monocítica canina de mieloma múltiplo é obter uma serologia positiva para *E. canis*. A serologia positiva para *E. canis* é também a única forma de diferenciar ehrlichiose crónica da leucemia linfocítica crónica num animal com perda de peso, linfadenopatia, hepatoesplenomegália, linfocitose e gammopatia monoclonal (Breischwerdt *et al*, 1987).

A trombocitopénia, como já foi referido anteriormente é a principal anomalia hematológica da ehrlichiose monocítica canina, podendo por isso confundir-se com a trombocitopénia imunomediada. No entanto, os canídeos com trombocitopenia imunomediada apresentam apenas quadros hemorrágicos, não surgindo sinais sistémicos como febre e anorexia geralmente associadas à fase aguda da infecção por *E. canis* (Couto, 2003a).

Doenças como a babesiose canina, a hepatozoonose e a hemabartonelose, por partilharem o mesmo vector e pela semelhança dos quadros clínicos associados, devem ser incluídas nos diagnósticos diferenciais (Elias e Homans, 1988). A trombocitopénia infecciosa cíclica causada por *A. platys* e transmitida pelo vector *R. sanguineus*, já foi descrita na área do Mediterrâneo e apresenta um quadro clínico similar à fase aguda da infecção por *E. canis*, devendo também ser incluída nos diagnósticos diferenciais (Harrus *et al*, 1997b). Nos casos com sintomatologia hemorrágica nomeadamente epistáxis, linfadenopatia e hiperproteïnemia com hipergamaglobulinémia, na nossa área geográfica, deve-se também excluir a presença de leishmaniose canina (Tesouro *et al*, 1993).

As anomalias da coagulação que ocorrem em animais que ingeriram anti-coagulantes rodenticidas podem causar quadros hemorrágicos que se podem confundir com a fase crónica da infecção por *E. canis*. Nestes animais devido à inibição da síntese da vitamina K<sub>1</sub>, ocorre uma redução na actividade dos factores II, VII, IX e X; como consequência o perfil de coagulação pode apresentar um aumento no tempo de coagulação activado, tempos de protrombina e tromboplastina activadas (Vicent-Johnson, 2004). Pelo contrário, o quadro hemorrágico que surge na ehrlichiose crónica resulta de trombocitopenia e trombotopia sendo o perfil de coagulação normal (Vicent-Johnson, 2004).

Nos canídeos infectados por *E. canis* que apresentarem sinais clínicos de poliartrite (efusão e dor articular em várias articulações) devemos considerar entre os diagnósticos diferenciais a borreliose de Lyme, infecção por *E. ewingii* e/ou *Anaplasma phagocytophilum*, bem como poliartrites imunomediadas não erosivas (Vicent-Johnson, 2004). A ehrlichiose monocítica canina pode induzir proteínúria e/ou glomerulonefrite e deve ser incluída na lista de causas de glomerulonefrite (Vicent-Johnson, 2004).

### **3.4.3 Diagnósticos diferenciais de borreliose de Lyme**

Nos diagnósticos diferenciais de borreliose de Lyme temos que considerar outras doenças infecciosas transmitidas por ixodídeos bem como doenças auto-imunes que podem mimetizar os sinais clínicos incluídos nos vários quadros acima descritos (Littman, 2004).

Infecções por *E. canis*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Bartonella* spp. podem causar poliartrites que se assemelham à artrite de Lyme. Poliartrites imunomediadas não-erosivas idiopáticas ou reactivas (ocorrem secundariamente à administração de sulfamidas-trimetropim), artrite reumatoide e lupus eritematoso sistémico devem ser diagnósticos a incluir na lista de diferenciais da artrite de Lyme (Littman, 2004).

Em relação á nefropatia de Lyme existem numerosas nefropatias com perda de proteína que mimetizam este quadro clínico. De entre estas nefropatias destacam-se gomerulonefrites imuno-mediadas primárias ou secundárias a infecções de entre outras por *Leishmania infantum*, *Hepatozoon*, *Brucella*, nefropatias hereditárias, glomeruloesclerose e amiloidose renal (Littman, 2004)

## **4. Diagnóstico laboratorial**

Devido à inespecificidade dos quadros clínicos dos agentes transmitidos por ixodídeos e à possibilidade de co-infecção por múltiplos agentes etiológicos. O diagnóstico laboratorial assume um maior relevo em relação ao diagnóstico clínico, na tentativa de se chegar a um diagnóstico definitivo.

### **4.1 Diagnóstico directo**

As técnicas de diagnóstico directo apresentam vantagens sobre aquelas de diagnóstico indirecto, nomeadamente por permitirem na maioria das vezes um diagnóstico definitivo, devido ao elevado valor predictivo positivo que se obtém dos resultados destas técnicas.

#### **4.1.1 Diagnóstico directo de *Rickettsia conorii***

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

Apenas os laboratórios de investigação que possuíam um nível 3 de biosegurança e pessoal com experiência em cultivo de rickettsias eram capazes de efectuar o isolamento a partir de amostras biológicas. As diferentes doenças causadas por rickettsias podem apresentar quadros clínicos indistinguíveis, daí que o isolamento de estirpes seguido da sua caracterização molecular é crucial para a confirmação, diagnóstico e a identificação de novos agentes etiológicos. O isolamento de rickettsias pode ser tentado a partir de várias amostras : “buffy coat” de sangue heparinizado ou com EDTA, sangue total desfibrinado, coágulo sanguíneo, plasma, tecidos obtidos em necrópsia, biópsia de pele e amostras de ixodídeos (La Scola e Raoult, 1997).

A cultura de células, descrita há mais de 60 anos, é o método de diagnóstico mais generalizado para o isolamento de *R. conorii*. Mais recentemente, a técnica de “shell vial”, desenvolvida a partir de um método comercial para cultura de citomegalovirus para a detecção precoce de antigénio, foi adaptado para o isolamento de *R. conorii*, com a detecção do microrganismo a ser possível em 48–72 horas (La Scola e Raoult, 1997). A inoculação deve ser feita em dois tipos de linhas celulares Vero ou L929, que permitem melhores resultados (La Scola e Raoult, 1997). A centrifugação após a inoculação é um passo crítico para aumentar a sensibilidade desta técnica, porque aumenta a fixação e a penetração das rickettsias nas células (La Scola e Raoult, 1997). A colheita das amostras antes da administração de antibióticos e a inoculação das amostras em “shell vials”, realizada no próprio dia da colheita, aumentam a taxa de sucesso desta colheita (La Scola e Raoult, 1997).

##### **4.1.1.2 Detecção de ácidos nucleicos**

A amplificação de ADN de *R. conorii* através de “PCR” faz-se a partir de amostras obtidas de biópsias de pele e “buffy coat”, que são normalmente as mais usadas . Outras amostras biológicas como o coágulo de sangue, o sangue total e o soro tem sido usadas com sucesso em vários estudos na detecção de ADN de *R. conorii*, *R. rickettsii*, *R. typhi* e *R. prowazekii*. No entanto, o ADN de *R. conorii* ainda não foi amplificado com sucesso a partir de soro (La Scola e Raoult, 1997).

É recomendado que a colheita de sangue seja feita para tubos contendo EDTA ou citrato de sódio (La Scola e Raoult, 1997). O ADN também pode ser extraído e amplificado

usando “PCR”, a partir de biópsias da escara de inoculação–“tache noire” obtidas de pacientes humanos, LCR e tecidos conservados em parafina (La Scola e Raoult, 1997).

As técnicas actuais de “PCR” aplicadas à amplificação de ADN de *R. conorii*, utilizam duas amplificações: inicialmente é usado um par de “primers” que deriva de duas regiões do gene que codifica a enzima citrato sintetase, sendo sequenciado a partir de *R. prowazekii*; na segunda amplificação, o par de “primers” utilizado, foi desenhado a partir de regiões que codificam a proteína antigénica rompA de 190 KDa, sequenciada de *R. rickettsii* (Regnery *et al*, 1991; Satoh *et al*, 2002).

#### **4.1.2 Diagnóstico directo de *Ehrlichia canis***

Apesar da presença no canídeo de determinados sintomas e da trombocitopénia poder indiciar uma infecção por *E. canis*, devemos sempre que possível recorrer ao diagnóstico directo para chegarmos a um diagnóstico definitivo. O diagnóstico directo de *E. canis* compreende quatro técnicas de diagnóstico:

##### **4.1.2.1 O exame directo em esfregaço sanguíneo**

A presença de *E. canis* pode ser posta em evidência pela observação de inclusões intra-citoplasmáticas em células sanguíneas mononucleadas, durante a fase aguda da doença e sobretudo, quando os animais apresentam um estado febril (Elias, 1991). As inclusões supra-citadas designam-se de mórulas e detectam-se no citoplasma de monócitos e linfócitos do sangue circulante (Elias, 1991). As mórulas apresentam em média 4 µm de diâmetro e representam um agregado de bactérias isoladas dentro de um vacúolo produzido pela célula hospedeira (Davoust *et al*, 1999). Pela coloração de “May-Grünwald-Giemsa” estas inclusões surgem coradas de violeta e bem diferenciadas do núcleo da célula (Davoust *et al*, 1999). Estas formas de *E. canis* surgem em pequeno número e de modo transitório pelo que, na maior parte dos esfregaços, não se visualizam (Sainz-Rodriguez, 1996). A probabilidade de observarmos mórulas aumenta se realizarmos previamente uma técnica de leucoconcentração (Davoust *et al*, 1999) e observarmos um esfregaço da fracção enriquecida em leucócitos-“buffy coat” daí resultante. Por outro lado, se realizarmos um esfregaço de sangue periférico após um pequeno corte na orelha, aumentamos igualmente as nossas de probabilidades de um diagnóstico definitivo, sendo também de assinalar uma maior presença de células infectadas na cauda do esfregaço sanguíneo (Hibler *et al*, 1986; Troy e Forrester, 1990).

As referidas inclusões, podem também ser observadas em aspirados e esfregaços de aposição de medula óssea, linfonodo, baço e pulmão (Sainz-Rodriguez, 1996). Vários estudos produziram resultados variáveis quanto à sensibilidade de observação de mórulas em esfregaço sanguíneo, aspirados e esfregaços de órgãos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário. A sensibilidade de detecção em esfregaço de “buffy coat” varia entre 0% (Silveira, 1992), 1% (Sainz-Rodriguez, 1996), 4% (Elias, 1991) e os 66% (Mylonakis *et al*, 2003). Apesar de ser utilizada mais raramente, a biópsia pulmonar pode ser usada como meio de diagnóstico de ehrlichiose, dado que os monócitos infectados são mais abundantes no parênquima pulmonar porque estes aderem ao endotélio dos capilares pulmonares (Davoust *et al*, 1999). Esta forma de diagnóstico citológico baseia-se na observação do esfregaço de aposição após a colheita de um pequeno pedaço de pulmão obtido de forma transcutânea (Davoust *et al*, 1999).

#### **4.1.1.2 Isolamento em cultura de células.**

A cultura de células é uma técnica de diagnóstico, utilizada preferencialmente para fins experimentais, sendo necessários no mínimo 14 dias para o isolamento de *E. canis* (Davoust *et al*, 1999). A inoculação do “buffy coat” dos animais suspeitos em cultura de células, pode permitir o isolamento de *E. canis* mesmo nos casos em que não se observa mórulas deste microrganismos em esfregaços de sangue. O isolamento faz-se recorrendo a inoculação dos monócitos infectados em cultura de células da linha celular DH 82. No caso dos animais positivos, 50% das células DH 82 estarão infectadas 10 dias pós-inoculação e 80% após 14 dias (Davoust *et al*, 1999).

#### **4.1.2.3 Detecção de antígeno de *Ehrlichia canis* em plasma.**

Para além da cultura, a presença efectiva de *E. canis* pode ser demonstrada pela detecção de antígeno no plasma através de um teste “ELISA sandwich“. Até ao presente momento, esta técnica de diagnóstico laboratorial tem sido usada apenas para fins experimentais (Warner *et al*, 1996). Entre as várias razões que impediram a sua introdução no diagnóstico de rotina destaca-se o facto da antigenémia, que surge na fase aguda da doença, ser de duração variável (varia entre 1 e 10 dias) e de surgir depois da manifestação dos sinais clínicos e hematológicos característicos da doença, tornando o uso da detecção de antígeno um teste menos válido no diagnóstico laboratorial de rotina desta doença (Warner *et al*, 1996).

#### 4.1.2.4 Técnicas de biologia molecular

A “polymerase chain reaction-PCR” tem sido utilizada com sucesso para a amplificação de ADN de *E. canis* de cães infectados, durante a fase aguda de infecção mesmo que esta exista em quantidades ínfimas na amostra biológica (Davoust *et al*, 1999). Este ensaio pode ser utilizado na detecção de ADN de *E. canis* em sangue bem como noutros tecidos, tais como pulmão e baço, permitindo o diagnóstico de ehrlichiose sobre um fragmento de tecido fresco ou congelado (Davoust *et al*, 1999). Recentemente foram adoptadas técnicas de “PCR” combinado com hibridação de ADN e “Nested PCR” com o objectivo de melhorar a sensibilidade desta técnica (Mathew *et al*, 2000). Em 2000 foi desenvolvida uma nova modalidade de “PCR” que usa “primers” biotinilados. A inovação deste ensaio baseia-se na revelação dos produtos do “PCR” por uma reacção imunocromogénica, podendo assim ser convertido num método quantitativo usando densitometria para medir a intensidade das bandas reveladas em malha de nylon. Esta nova modalidade de “PCR” permite a detecção de ADN de *E. canis* desde, 7 dias pós – infecção e calcula-se que seja 10 a 100 vezes mais sensível do que o “PCR” convencional (Mathew *et al*, 2000). Quanto à precocidade da detecção, o “Nested PCR” permitiu a detecção de ADN de *E. canis* no “buffy coat” de cães infectados experimentalmente aos 4 dias pós – infecção (Wen *et al*, 1997). Outra das vantagens desta técnica de biologia molecular é a capacidade de distinção de animais tratados mas com infecção persistente dos animais com títulos de anticorpos elevados e persistentes mas que eliminaram o microrganismo. Esta técnica de diagnóstico tem um custo elevado o que limita a sua utilização de rotina (Neer, 1998).

#### 4.1.3 Diagnóstico directo de *Borrelia burgdorferi s.l.*

##### 4.1.3.1 Isolamento e visualização de borrelías

O isolamento e cultura de *B. burgdorferi s.l.* é difícil devido ao seu crescimento lento e ao número reduzido de bactérias presente na amostra biológica (Littman, 2003). *B. burgdorferi s.l.* pode ser cultivada *in vitro* em meio BSKII (Barbour, Stoenner e Kelly) após dias ou semanas de incubação (Aguero-Rosenfeld, 2003). O facto das borrelías terem uma taxa de crescimento lento (uma a quatro semanas) aliado à difícil execução do método e à baixa taxa de sucesso (dependente do tipo e qualidade da amostra biológica), faz com que o isolamento não seja utilizada como técnica de diagnóstico de rotina (Aguero-Rosenfeld, 2003). A dificuldade do isolamento reside essencialmente do curto período de espiroquetémia e/ou da baixa concentração de borrelías nos tecidos. No entanto, já foi possível isolar em humanos borrelías de biópsia de pele, sangue, líquido céfalo-raquidiano,

líquido sinovial e biópsia de endocárdio (Núncio, 2001). Tendo os melhores resultados sido obtidos a partir de biópsia de pele (Núncio, 2001). Nos canídeos, apesar da amostra sanguínea conter um baixo número de microrganismos durante a fase de disseminação precoce ou tardia, já foram documentados casos de isolamento de borrelíias a partir de amostras colhidas em cães assintomáticos (Levy *et al*, 1993).

A observação directa de borrelíias em tecidos provenientes de biópsia, em esfregaços sanguíneos em outros fluidos biológicos não é fácil e requer a utilização de microscopia de fundo escuro e/ou métodos de coloração específica (como ex: a imunofluorescência ou colorações com prata). Em humanos, os melhores resultados têm sido obtidos a partir de biópsias de pele obtidas de eritema migrante (Aguero-Rosenfeld, 2003). No que se refere as amostras colhidas em necrópsia, o músculo e os tecidos que apresentam elevado conteúdo fibroso e matriz extracelular, como fâscias, pericárdio, peritoneu, meninges, cápsula articular e adrenais produzem resultados mais consistentes no que se refere à cultura (Aguero-Rosenfeld, 2003).

#### **4.1.3.2 Detecção de ácidos nucleicos**

A sua aplicação ao diagnóstico de infecções por *B. burgdorferi s.l.* é ainda experimental, permitindo detectar e amplificar sequências específicas de nucleótidos em tecidos de vertebrados e em ixodídeos. Actualmente existem métodos de PCR cada vez mais sensíveis, tais como “PCR Nested” que permitem uma elevada sensibilidade se comparados com o isolamento e cultura do agente (Skotarzack, 2002). Estas metodologias permitem não só a identificação das borrelíias até a espécie bem como a sua detecção mesmo quando o número de agentes na amostra é muito baixo.

Embora seja um método com vantagens óbvias, ainda apresenta alguns problemas. Um resultado positivo por “PCR” só indica a presença de ADN do agente e não prova que exista uma infecção activa. A presença de inibidores da polimerase na amostra pode produzir falsos negativos. Em humanos, já foi detectado ADN de *B. burgdorferi s.l.* em biópsias de pele, urina, soro, líquido sinovial e líquido sinovial (Núncio, 2001). Em canídeos, o “PCR” como método de diagnóstico de rotina ainda não está estabelecida. Experimentalmente nesta espécie, já foi possível detectar ADN de *B. burgdorferi s.l.* em biópsias de pele, biópsias de membrana sinovial e na urina (Skotarzack e Wodecka, 2003).

## **4.2 Diagnóstico indirecto**

Técnicas de diagnóstico laboratorial, como a imunofluorescência indirecta, a ELISA são utilizadas essencialmente no diagnóstico serológico devendo contudo ser associadas a técnicas de confirmação como o “Western immunoblot” entre outras, devido ao seu baixo valor predictivo positivo. Adicionalmente, todos os resultados dos testes serológicos devem ser interpretados à luz

### **4.2.1 Diagnóstico indirecto de *Rickettsia conorii***

#### **4.2.1.1 Imunofluorescência indirecta (IFI)**

A imunofluorescência indirecta é a técnica de primeira escolha para o diagnóstico serológico de febre botonosa. Este teste serológico permite a detecção e a titulação de IgG e IgM ou ambos. A identificação e a titulação de anticorpos IgM específicos para as várias espécies de rickettsias dá-nos uma indicação forte de uma infecção recente. Em infecções causadas por *R. conorii*, é usual a persistência a longo prazo de anticorpos titulados por IFI (La Scola e Raoult, 1997). A reforçar este facto foi demonstrado que na infecção natural de canídeos por *R. conorii*, os títulos positivos persistem durante pelo menos 750 dias após, o primeiro resultado positivo (Tesouro *et al*, 1998). Nestas circunstâncias é recomendada a titulação de duas amostras colhidas com intervalo de 3 a 4 semanas, considerando-se que um aumento de 4 vezes do título entre as duas amostras evidencia uma infecção activa. As reacções serológicas cruzadas ocorrem sobretudo entre as diferentes espécies de rickettsias pertencentes ao grupo das febre exantemáticas sendo relativamente raras as reacções cruzadas com as rickettsias do grupo do tifo (La Scola e Raoult, 1997) .

#### **4.2.1.2 Técnica de “Immunoblot” ou “Western immunoblot”**

A técnica de “Immunoblot” também designada como “western immunoblot” que utiliza antigénios separados por electroforese de acordo com o peso molecular sobre SDS-PAGE, Adicionalmente, devido à sua elevada especificidade é utilizada confirmação de diagnósticos serológicos obtidos por testes convencionais como IFI. Sendo também, especialmente útil para diferenciar resultados falsos-positivos, criados por reacções serológicas cruzadas, observadas entre biogrupos (grupo das febres exantemáticas e grupo do tifo) e entre espécies,aparentam direccionar-se para Lipopolissacáridos (LPS) e ocorrem frequentemente com IgM, apesar de se observarem também IgG contra LPS e outros antigénios proteicos (La Scola e Raoult, 1997). O “Immunoblot” permite o estudo simultâneo de soros para mais de 45 antigénios e foi adaptado para o diagnóstico de febre botonosa em humanos com o objectivo de caracterizar as reacções serológicas positivas (La Scola e

Raoult, 1997). Em canídeos, este teste não tem sido utilizado no diagnóstico laboratorial devido ao seu custo e à dificuldade de interpretação, restringindo-se o seu uso a estudos sero-epidemiológicos.

#### **4.2.1.3 Imunodeteção de *R. conorii* em sangue e tecidos**

As técnicas de imunofluorescência ou de imunoperoxidase, permitem a confirmação da infecção por rickettsias directamente a partir da amostra, antes da seroconversão, ou em necrópsia. Esta técnica de imunodeteção tem sido largamente usada na deteção de antígenos de *R. rickettsii*, *R. conorii* e *R. typhi* com elevado sucesso (La Scola e Raoult, 1997). As amostras podem ser testadas em fresco ou após fixação em formalina e inclusão em parafina. As amostras provenientes de biópsias de pele de petéquias ou de pústula de inoculação são as mais usadas para a realização desta técnica (La Scola e Raoult, 1997).

Em casos fatais de doença em animais ou em pacientes humanos, a bactéria pode ser detectada em tecidos de vários órgãos como o fígado, o pulmão, o baço, o coração, as meninges e a pele. A técnica de imunofluorescência directa tem sido substituída pela técnica de imunoperoxidase que apresenta uma maior sensibilidade e especificidade. Outra das vantagens deste técnica sobre a imunofluorescência, passa pela melhor definição das imagens microscópicas das células que envolvem as rickettsias detectadas, para além de não necessita de microscópio de fluorescência para a sua execução (La Scola e Raoult, 1997). Estas técnicas, têm uma especificidade de 100% e uma sensibilidade compreendida entre 53% e 75% (La Scola e Raoult, 1997).

Drancourt *et al* (1992) descreveram uma técnica aplicada ao diagnóstico laboratorial de febre botonosa, que consiste na deteção imunológica de *R. conorii* em células endoteliais circulantes (CEC), isoladas a partir do sangue total utilizando esferas imunomagnetizadas revestidas com anticorpos monoclonais específicos de CEC. Após processamento da amostra em várias etapas, e efectuado um esfregaço as bactérias são reveladas por imunofluorescência usando um anti-soro de coelho para *R. conorii*. A sensibilidade deste método é de 50% e não parece ser influenciada pela antibioterapia nem pela presença de anticorpos específicos como acontece com o isolamento em cultura de células (Drancourt *et al*, 1992). Pode-se utilizar no prognóstico, o número de CEC infectadas reveladas por esta técnica, por este aumentar com a gravidade da infecção (Drancourt *et al*, 1992).

## 4.2.2 Diagnóstico indirecto de *Ehrlichia canis*

### 4.2.2.1 Imunofluorescência indirecta

Devido a inespecificidade dos sinais clínicos, às dificuldades para se encontrar *E. canis* em esfregaço sanguíneo e ao custo elevado de execução de “PCR”, o diagnóstico laboratorial de rotina de ehrlichiose monocítica canina baseia-se nos resultados de diferentes técnicas serológicas. De todas estas, a mais utilizada em Medicina Humana e Veterinária é a imunofluorescência indirecta (IFI) que emprega como antigénios, células provenientes de culturas infectadas (Sainz-Rodriguez, 1996). A técnica de IFI é considerada a técnica de referência para a detecção e titulação de anticorpos para *E. canis*. Pois apresenta uma elevada sensibilidade e especificidade (Sainz-Rodriguez, 1996; Waner *et al*, 2001).

Este teste detecta anticorpos no soro desde os 7 dias pós – infecção (PI) (Neer, 1998; Davoust *et al*, 1999). Durante os primeiros 7 dias PI, os anticorpos consistem em IgA e IgM e aos 20 dias a maior parte dos anticorpos são IgG, sendo o título máximo destas imunoglobulinas atingido aos 80 dias depois da infecção (Neer, 1998; Davoust *et al*, 1999). Devido à persistência de títulos elevados após terapêutica e/ou potencial recuperação, um título positivo não significa necessariamente que os sinais clínicos que o animal apresenta são apenas causados por *E. canis* (Neer, 1998). É também frequente, a detecção em áreas endémicas de animais serologicamente positivos por IFI e com ausência de sinais clínicos (Neer, 1998). Tem sido documentado, a queda abrupta dos títulos de IFI nomeadamente em cães pancitopénicos no estado terminal da fase crónica da ehrlichiose canina monocítica (Sainz – Rodriguez, 1996; Waner *et al*, 2001).

Os sinais clínicos da doença em animais com infecção aguda surgem normalmente antes da seroconversão, sendo recomendado que em casos em que a suspeita de ehrlichiose é forte se deva realizar uma nova IFI, em amostras colhidas 2 a 3 semanas depois, para avaliar a seroconversão (Neer, 2002). Considera-se existir seroconversão se houver um aumento de quatro diluições entre as duas amostras (Davoust *et al*, 1999; Neer, 2002).

Existem divergências entre laboratórios quanto ao limiar de positividade para IFI, usado para diferenciar um resultado positivo de um resultado negativo. A interpretação adoptada considera-se que o teste de IFI é :

- seronegativo se o título por IFA for inferior a 1/20;
- fracamente seropositivo se o título de anticorpos se situar entre 1/20 e 1/80;

- moderadamente seropositivo se o título estiver compreendido entre 1/160 e 1/320;
- fortemente seropositivo se o título for superior ou igual a 1/640 (Davoust *et al*, 1999).

O uso da técnica de IFI não permite a diferenciação das várias espécies infectantes de *Ehrlichia spp.* particularmente nas espécies que pertencem ao mesmo genogrupo podendo verificar-se reacções serológicas cruzadas entre as várias espécies dos géneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*. As proteínas imunodominantes de *E. canis* causam reacções cruzadas com os antígenos de 30 KDa da superfície de *E. chaffeensis* (Waner *et al*, 2001). Foi demonstrado que estes antígenos são proteínas designadas de “outer membrane proteins (OMP)” codificadas por uma família multigénica polimórfica. As proteínas codificadas por este grupo de genes em *E. canis* apresentam um peso molecular variável entre 30,5 – 31, 5 KDa e uma sequência de aminoácidos muito similar à OMP-1 da *E. chaffeensis* e a “Major antigen protein 1” (MAP-1) de *Cowdria ruminantium* (Waner *et al*, 2001). Contudo, estas tem sido encontradas apenas em baixos títulos, o que pode representar reacções não específicas ou reacções dirigidas a antígenos altamente conservados entre os dois géneros (Waner *et al*, 2001). Em infecções experimentais por *E. canis*, não foi possível provocar qualquer reacção serológica cruzada por IFI, contra *A. phagocytophilum* durante a fase aguda da infecção, mas todos os cães se tornaram seropositivos para *A. phagocytophilum* aos 150 dias PI (Waner *et al*, 2001). Em relação a outras espécies, como *A. platys*, nunca foi descrita a presença de reacções serológicas cruzadas por IFI de *E. canis* (Waner *et al*, 2001).

#### 4.2.2.2 “ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay”

A técnica de “ELISA” pode ser utilizado para detectar anticorpos IgG anti – *E. canis* ou para a detecção de antígeno se utilizarmos um “ELISA – sandwich”. A técnica de ELISA em fase sólida utiliza um suporte de plástico que é sensibilizado com antígenos purificados sobre os quais se fixam os anticorpos específicos. A revelação é realizada com a ajuda de um conjugado anti-cão marcado por uma substância cromogénica específica da enzima do conjugado sendo a intensidade da coloração proporcional à concentração de anticorpos na amostra biológica. Actualmente esta técnica utiliza como antígeno a proteína recombinante rMAP2– “recombinant major antigenic protein 2” (Harrus *et al*, 2002).

Existem também disponíveis no mercado testes “dot – ELISA” que utilizam o antígeno na forma de células infectadas por *E. canis* ou de proteínas recombinantes específicas fixadas numa membrana. Estes testes têm a vantagem de poderem ser utilizados pelo Médico-Veterinário na própria clínica, efectuando-se a leitura em poucos

minutos. Apesar destes testes serem na maioria qualitativos, existem também quantitativos como “Immunocomb® dot-ELISA” (Biogal, Israel), que apresenta uma escala de cores graduada que permite avaliar se o resultado está abaixo do título 1/80 de acordo com IFI (Harrus *et al*, 2002). Os resultados positivos são indicados por uma mudança de cor na janela onde se localiza o indicador de anticorpos de *E. canis*.

Harrus *et al* (2002) compararam vários teste de ELISA com os resultados obtidos por IFI. Entre outros objectivos pretendeu-se avaliar a correlação de resultados por ELISA com IFI, bem como a sensibilidade e a especificidade de cada um deles. Houve uma concordância de resultados de 81% entre IFI e “rMAP2 – ELISA”, de 94% entre IFI e “Immunocomb®” e de 91% entre IFI e “Snap® 3Dx (IDEXX Laboratories Inc., USA) (Harrus *et al*, 2002). A sensibilidade e a especificidade destes três testes foram respectivamente de 0, 71 e 0,85 para “rMAP2 – ELISA”, de 86% e 98% para “Immunocomb®” e de 71% e 100% para “Snap® 3Dx “(Harrus *et al*, 2002). Qualquer um destes três testes mostrou ser altamente específico na detecção de anticorpos para *E. canis*. A sensibilidade mostrou ser baixa para títulos de IFI inferiores a 1/320 e elevada para títulos superiores. A repetição dos testes serológicos uma ou duas semanas após os primeiros resultados poderá contribuir para ultrapassar o problema da baixa sensibilidade nos títulos inferiores a 1/320 (Harrus *et al*, 2002). A utilização de proteínas recombinantes que sejam específicas da espécie *E. canis* tem sido implementada com o objectivo de se evitarem reacções serológicas cruzadas. Actualmente no “Snap 3Dx” utiliza-se a p30 e a p31, duas proteínas recombinantes imunodominantes. A rP43 é outra das proteínas recombinantes utilizadas em estudos experimentais de “dot-ELISA”, e os resultados parecem indicar que este teste é mais sensível que IFI (McBride *et al*, 2001).

#### **4.2.2.3 Técnica de “immunoblot” ou “Western immunoblot”**

O “Immunoblot” ou “western immunoblot” tem sido utilizado para caracterizar e distinguir reacções serológicas entre os diferentes microrganismos do género *Ehrlichia spp.* e *Anaplasma spp.* Os “immunoblots” para *E. canis* apresentam um determinado número de antigénio reactivos, reagindo as imunoglobulinas de um canídeo infectado com as proteínas do microrganismo em 10 bandas com pesos moleculares que variam entre 21 e 160 KDa (Ristic e Holland, 1993). Esta técnica detecta anticorpos contra *E. canis*, entre os 2 e os 8 dias PI e é especialmente útil na distinção de infecções entre *E. canis* e *E. ewingii*, devido à existência de reacções serológicas cruzadas por IFI entre estes dois agentes e à inexistência de um teste de IFI para este último microrganismo (Neer, 1998).

#### 4.2.3 Diagnóstico indirecto ou serológico de *Borrelia burgdorferi* s.l.

O diagnóstico serológico é sem dúvida aquele a que se recorre com maior frequência para o diagnóstico laboratorial de borreliose de Lyme devido à dificuldade de cultivo deste agente bem como à falta de disponibilidade e ao custo das técnicas de biologia molecular.

Na América do Norte, o diagnóstico clínico de borreliose de Lyme canina baseia-se na presença ou ausência dos seguintes critérios clínicos (Skotarzack, 2002):

- presença de sinais clínicos típicos
- exclusão dos vários diagnósticos diferenciais
- resposta rápida e explícita ao antibiótico
- prova de contacto com ixodídeos vectores ou presença em área endémica
- título positivo de anticorpos no soro.

Este último critério representa um importante indicador de diagnóstico. Devemos ter presente que mesmo a presença de anticorpos específicos não distingue uma infecção activa de uma exposição ao agente. A maior parte dos cães (86%) examinados para IgG por IFI não mostra sinais clínicos típicos de borreliose de Lyme (Skotarzack e Wodecka, 2003). Parte deste facto pode ser explicado por reacções serológicas cruzadas entre os antigénios de *B. burgdorferi* e bactérias relacionadas, como aquelas que pertencem aos géneros *Treponema spp.*, *Leptospira spp* e *Bradysepsis spp* (Skotarzack e Wodecka, 2003).

As diversas provas serológicas disponibilizadas pelos vários laboratórios permitem detectar anticorpos específicos contra *B. burgdorferi* s.l. no soro, LCR e líquido sinovial. Existem várias provas serológicas que utilizam diferentes antigénios, métodos e critérios de interpretação dos resultados originando diferenças a nível de sensibilidade e especificidade. Soros emparelhados enviados para 10 diferentes laboratórios produziram apenas 53% de concordância de resultados (Greene *et al*, 1998). Numa tentativa de uniformizar técnicas laboratoriais e critérios de interpretação de resultados, o EUCALB, recomenda a realização do diagnóstico laboratorial em duas fases: IFI ou ELISA como técnicas rastreio para a detecção de soros suspeitos ou positivos seguida da confirmação por “immunoblot” (EUCALB, 2004). A introdução de antigénios recombinantes em testes ELISA, contribuiu adicionalmente para um aumento de especificidade sem comprometer a sensibilidade da técnica (Núncio, 2001).

#### 4.2.3.1 Imunofluorescência indirecta (IFI)

A IFI foi a primeira técnica a ser utilizada no diagnóstico de borreliose de Lyme, permitindo titular os anticorpos contra *B. burgdorferi* s.l. São detectados títulos positivos de anticorpos, em cães a partir das 4–6 semanas pós-infecção (IVIS, 2004). Em cães infectados e não sujeitos a terapêutica, os títulos de anticorpos continuam a subir atingindo níveis máximos aos 90-120 dias pós-infecção, mantendo-se na ausência de re-exposição durante pelo menos 22 meses (IVIS, 2004). A testagem para IgM juntamente com IgG é considerada desnecessária uma vez que o cão não demonstra sinais clínicos antes da subida de IgG (Littman, 2003). Alguns autores, pelo contrário, afirmam que a medição simultânea de IgG e IgM na mesma amostra irá produzir teoricamente informação mais precisa (Littman, 2003). Após inoculações experimentais, verificou-se que os títulos de IgM aumentam e permanecem elevados durante dois meses, o que foi também observado em infecções naturais quer no cão quer no homem, em que os títulos de IgM permanecem elevados durante muitos meses e portanto que um título positivo de IgM, não é suficiente para distinguir uma exposição de uma infecção foi recente (Greene *et al*, 1998). Esta técnica não é isenta de reacções cruzadas, especialmente para epítomos de *Leptospira spp* (Magnarelli *et al*, 1987). Estas reacções cruzadas foram observadas também em cães com doença periodontal e provável espiroquetose oral nos quais se observaram títulos de IFI para *B. burgdorferi* s.l. mais elevados do que os cães clinicamente saudáveis da mesma população (Schillhorn van Veen *et al*, 1993). Devido a estas seroreactividades cruzadas, a sensibilidade diminui em relação a outras técnicas de diagnóstico. No entanto, as seroreactividades verdadeiras produzem frequentemente títulos mais elevados se comparados com as reacções cruzadas já descritas (Greene *et al*, 1998).

Em geral, dados reunidos em vários laboratórios sugerem que títulos de IgG por IFI, superiores a 1/64 ou 1/128 indicam que existe um nível significativo de seroreactividade podendo em animais recém expostos, os títulos ser muito superiores (Greene *et al*, 1998). Os títulos de anticorpos parecem diminuir quando se institui antibioterapia, mas verifica-se o seu aumento, 6 meses após o fim da terapêutica, provavelmente associados à proliferação de borrelíias sobreviventes (Greene *et al*, 1998).

Nos cães vacinados, demonstrou-se a presença de seroreactividade por muitos meses. Apesar dos anticorpos vacinais neutralizantes diminuírem com o tempo, os títulos de anticorpos revelados por IFI permanecem elevados durante períodos extensos interferindo com as provas serológicas (Greene *et al*, 1998).

#### 4.2.3.2 “ELISA – Enzyme Linked immunosorbent Assay”

A ELISA é prova de detecção de anticorpos específicos contra *B. burgdorferi s.l.* mais utilizada. A prova de ELISA permite quer a utilização de antigénio total (sonicado ou solubilizado) ou de fracções antigénicas. Esta prova serológica permite a leitura automatizada dos resultados, excluindo interpretações subjectivas e permitindo a análise de um grande número de amostras. As desvantagens desta técnica são semelhantes às da IFI. A falta de padronização desta técnica e a possibilidade de ocorrência de falsos-positivos por seroreactividades cruzadas, pelas razões já descritas, são os principais entraves à sua utilização.

Surgiu recentemente no mercado, um teste ELISA, que pode ser utilizado por Médicos-Veterinários nas próprias clínicas. Este teste utiliza como antigénio um denominado péptido recombinante C6, que pertence a região imunodominante RI6 (região invariável 6) contido no antigénio de superfície “VlsE (Variable major protein-like sequence, expressed)” tem uma sensibilidade de 94%-100% e uma especificidade superior a 99% (Liang *et al*, 2000; Littman, 2003). O “VlsE” é um antigénio de superfície que se conserva entre as várias genoespécies patogénicas, permitindo por exemplo na Europa o diagnóstico de infecções por *B. garinii* ou *B. afzelii* (Liang *et al*, 2000). Este antigénio, não se expressa em organismos cultivados *in vitro* encontrando-se apenas em borrelíias presentes em vectores ou animais com infecção natural (Liang *et al*, 2000). Os canídeos sujeitos experimentalmente a infecção mostraram um resultado positivo, entre as 3 e 5 semanas pós-infecção, mantendo-se positivos durante pelo menos 69 semanas, ou seja, antes de surgirem quaisquer sinais clínicos (Liang *et al*, 2000). Nenhum dos cães vacinados com bacterina ou com a vacina de sub-unidade OspA mostraram resultados positivos com este teste (Liang *et al*, 2000). Devido à possibilidade de poder diferenciar anticorpos vacinais de uma exposição natural, o mais dispendioso e trabalhoso “Western immunoblot” pode ser evitado. Apesar de ser um teste qualitativo, pode-se enviar o soro para um laboratório de referência para quantificar os anticorpos para o péptido C6 (Liang *et al*, 2000).

#### 4.2.3.3 Detecção de anticorpos no líquido céfalo-raquidiano (LCR)

Tem sido propostos, outros testes para auxiliar o diagnóstico de borreliose de Lyme. A detecção de produção intratecal de anticorpos para *B. burgdorferi s.l.* comprova a existência de neuroborreliose. Em pacientes humanos para diagnosticar neuroborreliose pode-se comparar os títulos de anticorpos, no líquido céfalo-raquidiano (LCR) com os do soro tem sido feito (Núncio, 2001). Para confirmar que a positividade não é consequência de uma ruptura da barreira hematocefálica, com a consequente passagem de imunoglobulinas

do soro para o LCR é frequente recorrer-se ao índice de síntese intratecal (ISI) (Núncio, 2001) :

$$\text{ISI} = \frac{\text{Concentração de ac no LCR}}{\text{Concentração de ac no soro}} \times \frac{\text{Concentração de albumina no soro}}{\text{Concentração de albumina no LCR}}$$

Se o valor de ISI é igual ou superior a dois, significa que a barreira hematoencefálica não se rompeu, pelo que os anticorpos detectados são intratecais o que indica que *B. burgdorferi s.l.* invadiu o sistema nervoso central.

Em alternativa a este índice, alguns autores preferem comparar os anticorpos com a concentração de outras proteínas que não existem normalmente no LCR ou mesmo dosear as IgG totais nos dois líquidos ou então compará-las com IgG específicas para outros agentes tais como o vírus da esgana ou *Toxoplasma gondii* (Greene *et al*, 1998).

#### 4.2.3.4 Técnica de “immunoblot” ou “Western immunoblot”

Esta prova é utilizada como teste de confirmação no diagnóstico serológico de borreliose de Lyme. A confirmação de um resultado positivo por IFI ou ELISA deve ser o próximo passo para melhorar a especificidade dos teste serológicos sem perda de sensibilidade (Greene *et al*, 1998). Esta técnica é muito útil em estudos sero-epidemiológicos e permite ligar cada uma das espécies de *B. burgdorferi s.l.* a formas características de evolução da doença. A preparação das tiras de nitrocelulose é delicada, mas a técnica é simples e consiste na separação dos antigénios de acordo com o peso molecular, através da aplicação de uma carga eléctrica (electroforese) e da sua transferência para membranas de nitrocelulose ou para outro tipo de membrana. As etapas seguintes são semelhantes a uma prova de ELISA.

O padrão de reactividade dos anticorpos após uma infecção natural difere de um padrão produzido por vacinação. O “immunoblot” permite também avaliar a significância clínica dos títulos de IFI quando existe reactividade contra outras bactérias como acontece com *Leptospira spp.* Após a exposição natural a *B. burgdorferi s.l.*, desenvolvem-se anticorpos para proteínas com 41KDa, 39KDa e 22 KDa, que representam respectivamente a flagelina, p39 e OspC (Greene *et al*, 1998). A seroreactividade para OspA e OspB (respectivamente com 31 e 34 KDa) surge em cães vacinados ou inoculados por via parentérica, mas faltam ou aparecem muito tardiamente em cães infectados naturalmente (Greene *et al*, 1998). Em cães vacinados com a vacina de sub-unidade OspA observamos apenas uma banda de reactividade para proteínas com 31 KDa (Greene *et al*, 1998).

Os maiores problemas associados a esta técnica são devidas à variabilidade antigénica das estirpes utilizadas na preparação das proteínas o que pode dificultar a leitura de resultados. A utilização crescente de antigénios recombinantes poderá contribuir para a resolução deste problema. O seu custo elevado é outro entrave a sua presente utilização com maior regularidade no diagnóstico laboratorial.

## **5. Terapêutica específica e de suporte**

### **5.1 Terapêutica específica e de suporte da febre botonosa.**

Até à data, nunca foi documentada uma infecção natural por *R. conorii* em canídeo que apresentasse um quadro clínico bem definido. Pelo contrário, a infecção por *R. rickettsii*, causa uma infecção em canídeos, caracterizada por um quadro clínico bastante grave com uma taxa de mortalidade associada de 2,5% a 5% (Greene *et al*, 1998). As infecções por este agente distribuem-se pela América do Norte e do Sul, nunca tendo sido descritas infecções por *R. rickettsii* na Europa. Na falta de informação sobre a terapêutica da febre botonosa em canídeos, optou-se por apresentar uma revisão da terapêutica da febre das Montanhas Rochosas em canídeos, uma vez que as doenças são semelhantes pois ambas são causadas por rickettsias do grupo das febres exantemáticas com fisiopatologias de infecção idênticas e provavelmente com terapêutica similar.

Breitschwerdt *et al* (1999), comparam a eficácia clínica dos três principais grupos de antibióticos (tetraciclina, quinolonas e macrólidos) no tratamento de infecções experimentais por *R. rickettsii* em canídeos e concluíram que as tetraciclina e as quinolonas apresentam um desempenho igual no tratamento de rickettsioses, devendo ser usados como antibióticos de primeira escolha no tratamento desta doença (Breitschwerdt *et al*, 1999).

Os antibióticos do grupo das tetraciclina são os antibióticos de primeira escolha para o tratamento de infecções por rickettsias, designadamente as tetraciclina lipo-solúveis como a doxiciclina e a minociclina demonstraram eficácia clínica elevada para o tratamento de rickettsioses se administradas durante um período mínimo de 7 dias (Greene *et al*, 1998). O cloranfenicol é igualmente eficaz no tratamento de infecções por microrganismos do género *Rickettsia* e é indicado em cachorros com menos de 5 meses de idade para evitar a descoloração dentária causada pelas tetraciclina (Greene *et al*, 1998). As fluorquinolonas como a enrofloxacina são igualmente eficazes mas o seu uso deve ser restrito a animais com mais de 6 meses de idade (Greene *et al*, 1998). Os macrólidos já foram usados, em

cenários experimentais para o tratamento de rickettsioses, no entanto concluiu-se que os macrólidos, nomeadamente a azitromicina, não devem ser aplicados na terapêutica desta rickettsiose (Breitschwerdt *et al*, 1999). Apesar destes factos, um macrólido como a josamicina, tem sido usado com sucesso para o tratamento de mulheres grávidas quando afectadas por febre botonosa (Raoult *et al*, 1988).

## **5.2 Terapêutica específica e de suporte de ehrlichiose monocítica canina.**

Tal como acontece para os microrganismos do género *Rickettsia*, os antibióticos do grupo das tetraciclina são os antibióticos de primeira escolha na terapêutica de ehrlichiose. A excelente absorção por via oral e a administração pouco frequente tornam a doxiciclina e a minociclina, antibióticos de uso generalizado no tratamento da ehrlichiose canina sendo preferidos presentemente em relação à tetraciclina e a oxitetraciclina (Sainz-Rodriguez, 1996). Para além das tetraciclina, outros princípios activos como o cloranfenicol, o dipropionato de imidocarb e a amicarbalida tem sido usados com sucesso no tratamento desta doença (Neer *et al*, 2002).

Vários protocolos foram recomendados para o tratamento da ehrlichiose canina. O mais utilizado e recomendado pelo grupo de estudo de doenças infecciosas do Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária, consiste na administração por via oral de doxiciclina na dose de 10mg/Kg, cada 24 horas, durante 28 dias (Neer *et al*, 2002). Geralmente, com este protocolo ocorre, uma nítida melhoria nas 24 a 48 horas após o início da terapêutica, sobretudo em cães nas fases aguda ou crónica suave da doença (Neer *et al*, 2002). O cloranfenicol é recomendado apenas para cachorros com menos de 5 meses de idade, para evitar a descoloração que ocorre nos dentes com o uso das tetraciclina. Se não existirem melhorias significativas nos sinais clínicos e nas anomalias hematológicas após 1 a 2 semanas do início da terapêutica específica, o diagnóstico clínico de ehrlichiose monocítica canina deverá ser revisto (Vincent-Johnson, 2004). A ausência de melhorias significativas pode indiciar co-infecção com outro microrganismo ou a presença de doença não infecciosa (Vincent-Johnson, 2004). A duração do tratamento usando doxiciclina, tem gerado grande controvérsia. O “PCR” como técnica de monitorização, se utilizado 2 semanas após descontinuar o tratamento, tem provado ser útil na distinção de animais tratados com sucesso dos animais persistentemente infectados (Neer *et al*, 2002). Se o “PCR” efectuado a partir do sangue continuar positivo, deverá prosseguir-se a terapêutica durante mais quatro semanas (Neer *et al*, 2002). Na evidência de um segundo “PCR” positivo após completar um 2º ciclo de doxiciclina dever-se-á recorrer a outro princípio activo com actividade anti-ehrlichia (Neer *et al*, 2002).

Na impossibilidade da administração oral diária de doxiciclina ou se os animais apresentarem intolerância à doxiciclina recomenda-se uma aplicação de dipropionato de imidocarb na dose de 5 mg/Kg por via intra-muscular ou sub-cutânea, seguida por uma segunda aplicação duas semanas depois (Vincent-Johnson, 2004). A avaliação da eficácia clínica dos vários protocolos terapêuticos usados na prática clínica, demonstrou que a administração de dipropionato de imidocarb (uma dose de 5 mg/Kg em cada 14 dias) é tão eficaz quanto a doxiciclina na resolução dos sinais clínicos, sendo no entanto, mais lenta a resolução da trombocitopenia quando se opta pelo imidocarb (Sainz-Rodriguez, 1996). A enrofloxacina e outras quinolonas não são eficazes no tratamento de ehrlichiose monocítica canina (Neer *et al*, 2002; Vincent-Johnson, 2004).

Dependendo da gravidade e do tipo de quadros clínicos, poderá ser necessário instituir em alguns animais, terapêutica de suporte consistindo em fluidoterapia, alimentação parentérica, esteroides anabolizantes e/ou transfusão de sangue. A transfusão de sangue não aumentará de forma significativa as plaquetas e em situações de trombocitopenia, será se possível, mais aconselhável o uso de plasma rico em plaquetas (Neer, 1998). Em situações de trombocitopenia severa que ameçam a vida do animal, poderá ser necessário a utilização de corticoesteroides em doses imunossupressoras e durante um curto período de tempo (2 a 7 dias). Os corticoesteroides são úteis na resolução da trombocitopenia em infecções por *E. canis* devido à sua natureza imuno-mediada, por essa razão, aconselha-se a que se associe à terapêutica específica com doxiciclina ou dipropionato de imidocarb (Waner *et al*, 1995; Harrus *et al*, 1996; Vincent-Johnson, 2004).

Em infecções crônicas por *E. canis*, a estimulação da medula óssea com esteroides anabolizantes poderá ser útil em animais que apresentem pancitopenia com hipoplasia ou aplasia da medula óssea. Para estes casos recomenda-se a utilização de oximetolona por via oral na dose de 1 mg/Kg cada 8 horas, ou em alternativa, decanoato de nandrolona por via intra-muscular na dose de 1-1,5 mg/Kg em injeções semanais (Sainz-Rodriguez, 1996). Até ao momento não foram publicados estudos clínicos, relativamente ao uso de factores estimulantes das colónias de granulócitos – “G-CSF, granulocyte colony – stimulating factor” para o tratamento de ehrlichiose crónica grave, mas poderão ser úteis em situações de aplasia ou hipoplasia medular associadas a pancitopenias (Neer, 1998). Nas situações de anemia não-regenerativa presentes na fase crónica de ehrlichiose é aconselhável utilizar eritropoietina mas os resultados produzidos são pouco consistentes (Neer, 1998).

### 5.3 Terapêutica específica e de suporte da borreliose de Lyme.

A definição e a escolha do protocolo terapêutico mais adequado para o tratamento da borreliose de Lyme depende sobretudo do quadro clínico que o canídeo apresenta no momento do diagnóstico.

Os canídeos que apresentam clinicamente sinais de artrite de Lyme geralmente respondem a antibioterapia em 1 a 2 dias (Littman, 2003). Os testes de susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* de *B. burgdorferi s.l.* demonstraram que ceftriaxona, eritromicina, cefuroxima, amoxicilina, doxiciclina, tetraciclina e a penicilina G são antibióticos potencialmente eficazes no tratamento de borreliose de Lyme (Greene *et al*, 1998). Dos vários antibióticos empregues no tratamento de artrite de Lyme, a doxiciclina é considerada como de primeira escolha, devido à sua lipo-solubilidade e à grande capacidade de distribuição tecidual. A terapêutica com doxiciclina a 10 mg/Kg cada 24 horas ou de amoxicilina 11 mg/Kg cada 12 horas produz bons resultados clínicos (Littman, 2003).

Macrólidos como a eritromicina e a azitromicina ou as cefalosporinas de 3ª geração como a ceftriaxona tem sido administrados em casos humanos refractários aos antibióticos de 1ª escolha (Greene *et al*, 1998). A penicilina G intra-venosa em doses elevadas tem sido aconselhada para o tratamento da casos refractários em canídeos (Greene *et al*, 1998). Microrganismos do género *Borrelia* são resistentes às quinolonas e aos aminoglicosídeos (Greene *et al*, 1998).

Empiricamente, os clínicos geralmente tratam os casos agudos de artrite de Lyme durante duas semanas e as artrites crónicas com sintomatologia intermitente durante 4 semanas. Até à data ainda não foi estabelecido uma duração de tratamento consensual. A maior parte dos protocolos terapêuticos utiliza como referência uma duração mínima de 30 dias de antibioterapia (Greene *et al*, 1998). Contudo, com base em estudos experimentais, a eliminação do microrganismo em canídeos, após 30 dias de terapêutica é questionável e o recrudescimento da infecção é possível após a descontinuação da antibioterapia (Greene *et al*, 1998; Littman, 2003).

Os anti-inflamatórios não esteroides produzem alívio nos sinais clínicos como dor e claudicação, associados à artrite de Lyme. O uso prolongado de alguns destes compostos pode causar ulceração gastro-intestinal (Greene *et al*, 1998). Os glucocorticoides em dose anti-inflamatória tem sido recomendados de forma cautelosa para o controlo da dor persistente e efusão articular associadas à artrite crónica de Lyme que não pode ser completamente resolvida apenas com antibioterapia (Greene *et al*, 1998). As doses

imunossupressoras de glucocorticoides devem ser evitadas devido à imunossupressão e à consequente exacerbar da infecção (Greene *et al*, 1998).

Como tratamento complementar da antibioterapia, em canídeos que apresentem gomerulonefrite, recomenda-se o uso de um inibidor da enzima de conversão do angiotensinogénio–IECA para diminuir a proteinúria diminuindo a pressão de filtração glomerular e uma baixa dose de aspirina (0,5 mg/Kg cada 24 horas) como anti-trombótico (Littman, 2003). Os ácidos gordos omega–3 são também recomendados em associação com a medicação anterior (Littman, 2003). Nos canídeos que apresentem valores elevadores de pressão arterial, além da medicação com IECA, deve-se associar amlodipina como agente hipotensor (Littman, 2003). Em casos de glomerulonefrite com quadro clínico de vómitos, desidratação e anorexia recomenda-se o internamento e uma terapêutica de suporte mais intensa, incluindo fluidoterapia, suporte colóide, restrição de fósforo e proteína na dieta, quelantes de fósforo (Littman, 2003).

A terapêutica para cães com neuroborreliose de Lyme centra-se na resolução dos sinais clínicos. As convulsões recorrentes devem ser controladas com anti-convulsivos e a paralisia do nervo facial deve ser tratada de forma a minimizar os efeitos da ausência ou diminuição do reflexo palpebral, recorrendo-se a lágrimas artificiais para evitar a dissecação da córnea (Levy *et al*, 1993). A implantação de “Pacemaker” é a terapêutica definitiva para a resolução das bradiarritmias causadas pela cardite de Lyme simultaneamente devem ser administrados antibióticos apropriados (doxiciclina e amoxicilina são os de primeira escolha) (Levy *et al*, 1993).

## **6. Profilaxia**

Dada a inexistência de vacinas eficazes na prevenção da febre botonosa e da ehrlichiose monocítica canina, a profilaxia destas doenças baseia-se sobretudo no controlo dos ixodídeos vectores no animal assim como no meio ambiente (Sainz Rodriguez, 1996). Em relação à borreliose de Lyme, foram desenvolvidas várias vacinas para canídeos na última década do século XX (Littman, 2003).

Para a ehrlichiose monocítica canina ainda não foram desenvolvidas vacinas, já em relação à borreliose de Lyme, existem vacinas disponíveis no mercado, contudo o seu uso é controverso (Couto 2003b). Estas vacinas consistem numa bacterina e numa vacina recombinante contendo a sub-unidade OspA, atingindo-se uma protecção de 100% utilizando a vacina recombinante (Conlon *et al*, 2000). A primo-vacinação consiste em duas administrações iniciais separadas por 3 e 4 semanas, sendo a revacinação anual. Da

administração destas vacinas resultam efeitos adversos moderados, podendo por vezes ocorrer reacções anafilácticas (Littman, 2003). Mais estudos são necessários em relação a possíveis reacções a antigénios de superfície pró-inflamatórios e a sequelas imuno-mediadas a longo prazo. Todas as vacinas (bacterinas e recombinantes de sub-unidade OspA) expõem o cão à OspA levando à formação de anticorpos anti-OspA que ingeridos pelo ixodídeo durante a sua alimentação, matam as borrelíias no reservatório antes da sua transmissão ao cão. As bacterinas expõem o cão a outros antigénios, que podem induzir outros anticorpos bactericidas mas por outro lado, podem também introduzir antigénios que sejam pró-inflamatórios, anafilactoides ou que induzam sequelas imuno-mediadas.

A utilidade da vacinação contra a borreliose de Lyme tem que ser ponderada que 95% dos cães não desenvolvem doença clínica após exposição natural a *B. burgdorferi s.l.* (Littman, 2003). Deve-se ponderar as taxas de incidência da região onde vive o cão, as densidades do vector e dos hospedeiros intermediários e que a presença de uma grande heterogeneidade de genoespécies em circulação nos vários ciclos de transmissão torna difícil a produção de uma vacina realmente eficaz.

Para além de uma profilaxia química, o controlo dos ixodídeos assenta também na eliminação dos seus biótopos e na adopção de comportamentos preventivos de infestação. Assim, em relação aos ixodídeos do complexo *I. ricinus* será aconselhável a desmatagem e o corte dos estratos arbustivos e herbáceos em redor das habitações (Littman, 2003) e, em áreas onde o risco de exposição à borreliose de Lyme e aos seus vectores é elevado, será aconselhável evitar a permanência nos biótopos dos ixodídeos nas épocas de maior actividade dos mesmos (Littman, 2003). Devido à sua grande especificidade de hospedeiros, *R. sanguineus* adaptou-se perfeitamente ao meio que rodeia o cão, pelo que é frequente encontrá-lo em canis e outros lugares onde o cão dorme todo o ano (Greene *et al*, 1985). Os ixodídeos são capazes de subir pelas paredes e introduzir-se em pequenas gretas; daí que um bom método de profilaxia seja, tapar todas as gretas das paredes dos canis (Garris, 1991). A inspecção frequente dos cães para a detecção de ixodídeos é também uma técnica simples que pode reduzir a presença de futuras infestações (Cupp, 1991)

Por outro lado, foram desenvolvidos diversos princípios activos para a destruição rápida e eficaz dos ixodídeos. Existem presentemente diversos acaricidas disponíveis, que se distribuem por vários grupos químicos (Beugnet, 2003). De entre esses grupos químicos destacam-se pela sua frequência e eficácia de utilização: as formadiminas representadas pelo amitraz; as piretrinas e peritrinoides das quais se destacam os peritrinoides de segunda geração, como a deltametrina, flumetrina e a cipermetrina; os fenil-pirazois exclusivamente

representados pelo fipronil; o grupo das avermectinas/milbemicinas no qual se incluem princípios activos como a ivermectina, milbemicina oxima, selamectina e moxidectina e um grupo no qual se incluem os organofosforados, os organoclorados e os carbamatos que actuam pela inibição da acetilcolinesterase (Beugnet, 2003). Actualmente, empregam-se cada vez mais na prevenção de ixodídeos em animais de companhia os chamados inibidores de crescimento ou do desenvolvimento dos artrópodes (“insect growth regulators”) sendo o (s)-metopreno um análogo da hormona juvenil, o princípio activo com maior utilização em animais de companhia (Beugnet, 2003).

Todos estes princípios activos podem-se apresentar em diversas formas galénicas como os pós, os aérossóis, os shampoos, as coleiras, as formulações “spot on”, os “sprays” líquidos e as loções para diluição em água (Beugnet, 2003). Devido à 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 cada vez maior frequência na prevenção e no tratamento de infestações por ixodídeos (Beugnet, 2003).

Relativamente à profilaxia específica de cada uma das doenças transmitidas por carraças foram desenvolvidos estudos de eficácia clínica que permitem escolher com maior critério científico e menor empirismo. Um método excelente para o controlo de ixodídeos é a utilização da coleira de amitraz, colocada e ajustada de forma a contactar com a pele e não com o pêlo (Littman, 2003). Este princípio activo demonstrou em estudos clínico, uma protecção de 100% para *Ixodes scapularis* artificialmente infectados com *B. burgdorferi s.l.* (Elfassy *et al*, 2001). Contudo, o amitraz é solúvel em água e não deve ser usado em cães que contactam com a água frequentemente. Nestas situações, deve ser usado um produto tópico que actue por contacto (Elfassy *et al*, 2001). O fipronil e as permetrinas tem sido utilizadas com eficácia elevada (acima dos 94% no caso das permetrinas) (Endris *et al*, 2003). Estes princípios activos actuam matando os ixodídeos por contacto após estes aderirem ao cão. No entanto, apesar deste período de tempo ser inferior ao necessário para a transmissão de *B. burgdorferi s.l.*, existem outras doenças transmitidas por ixodídeos que necessitam de um menor período de tempo de alimentação para ocorrer transmissão e infecção, como no caso do *R. sanguineus* que necessita apenas de 6 a 20 horas para efectuar a transmissão de *R. conorii* (Raoult e Walker, 1990).

Em medicina humana, a aplicação de antibioterapia tem sido utilizado como método de profilaxia da borreliose de Lyme. Uma dose de doxiclina administrada até às 72 horas após a remoção de um ixodídeo ingurgitado previne a seroconversão e o aparecimento de sinais clínicos de borreliose de Lyme (Nadelman, 2001). Em relação a população canídea nunca se realizou estudo similar. Em relação à ehrlichiose monocítica canina tem sido considerado

o uso de doxiciclina oral (3mg/Kg PO cada 24h) em regiões endêmicas durante as épocas de Primavera e Verão em que há maior actividade dos ixodídeos vectores (Breitschwerdt, 1995). A opção de utilizar antibioterapia implica custos para além de riscos associados a indução de resistências (Littman, 2003).

## **II - Objectivos**

Os ixodídeos, vulgarmente designados por carraças de corpo duro, encontram-se entre os mais importantes artrópodes vectores. Com efeito, a estes ectoparasitas é atribuída a transmissão de uma grande variedade de agentes patogénicos (vírus, bactérias, protozoários e nemátodes) sendo, a seguir aos culicídeos, os mais importantes vectores de agentes de doença para o homem (Artur, 1962).

Nas duas últimas décadas, o aumento do interesse dos clínicos e investigadores pelas doenças transmitidas por ixodídeos tem levado à descrição recente de um número elevado de doenças bacterianas transmitidas por ixodídeos. Desde a identificação de *Borrelia burgdorferi s.l.* como agente da borreliose de Lyme em 1982, foram descritas na Europa, 11 espécies de bactérias transmitidas por ixodídeos (Parola e Raoult, 2001).

Os estudos desenvolvidos em Portugal nesta área, incidiram sobretudo sobre a população humana e os ixodídeos vectores. Em relação à população de canídeos, o único conhecimento das seroprevalências da febre botonosa, ehrlichiose monocítica canina e borreliose de Lyme que se tem foi baseado em rastreios serológicos de amostras direccionadas para a aptidão e origem dos animais (Silveira *et al*, 1992; Bacellar *et al*, 1995; Nuncio *et al*, 1999; Nuncio, 2001). Assim, tornava-se importante o conhecimento da seroprevalência e factores de risco associados, para a população de canídeos através de uma amostra aleatória proveniente de uma população mais diversificada numa região que estava pouco estudada mas em que estivesse documentada a presença dos ixodídeos vectores. Daí que a nossa escolha recaiu na população canina do Algarve.

Na Península Ibérica, até ao presente existiam apenas evidências serológicas que implicavam *R. conorii*, *E. canis* e *B. burgdorferi s.l.* como causa de doença em canídeos não existindo evidências directas que implicassem estes agentes em casos de doença (Font *et al*, 1992; Silveira, 1992). O presente trabalho pretende também isolar e caracterizar através de técnicas de biologia molecular os referidos agentes infecciosos como causas de doença no cão. Adicionalmente, pretende-se identificar as espécies de ixodídeos que parasitam os canídeos da população em estudo e avaliar a prevalência de infecção dos agentes, em amostra aleatória simples obtida a partir dos ixodídeos colhidos em canídeos. O trabalho laboratorial decorreu no Centro de Estudos de Vectores e Doenças infecciosas (CEVDI) do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

Os principais objectivos deste trabalho foram :

- Determinar da seroprevalência e de factores de risco associados para febre botonosa, ehrlichiose monocítica canina e borreliose de Lyme, numa amostra da população de canídeos domésticos da região do Algarve.
- Avaliar a existência de sazonalidade no surgimento de seropositivos para cada uma das três doenças.
- Identificar e caracterizar, através de técnicas de biologia molecular, os agentes infecciosos transmitidos por ixodídeos, implicados em casos de doença nos canídeos domésticos.
- Caracterizar as alterações hematológicas associadas aos casos de doença causados por *R. conorii*, *E. canis* e *B. burgdorferi s.l.*
- Determinar a presença dos agentes infecciosos em estudo, nos ixodídeos vectores colhidos nos canídeos rastreados serologicamente e presentes à consulta com sinais clínicos compatíveis com uma das três doenças em estudo.
- Isolamento de *R. conorii* por “shell vial”.



### **III - Material e métodos**

#### **1- Delimitação da área geográfica em estudo.**

A área em estudo apresentada neste trabalho corresponde ao distrito de Faro na região do Algarve. O distrito de Faro está localizado no extremo sul de Portugal continental, abrangendo 16 concelhos distribuídos por uma área de 5072 Km<sup>2</sup>. A população humana neste distrito foi, segundo os censos de 2001, estimada em 391 819 habitantes. O clima desta região é do tipo mediterrânico, e é caracterizado por uma temperatura média anual entre 15°C e 18°C sendo a precipitação média variável entre os 300 mm<sup>3</sup> nas estações da Primavera/Verão e os 1300 mm<sup>3</sup> nas estações de Outono/Inverno (iFrance, 2004).

Devido à variação de características climáticas, geológicas e de vegetação; o território desta região é sub-dividido em três sub-regiões:

- as serras, zonas montanhosas que separam o Algarve do Baixo Alentejo;
- o barrocal, zona de montes e planura calcáricas, situado entre a serra e o litoral;
- o litoral, situado na orla costeira, zona de terrenos planos e aluviais.

A existência de condições ecológicas adequadas para os vectores possam subsistir e a disponibilidade de hospedeiros são factores essenciais para a a manutenção dos ciclos naturais de qualquer doença transmitida por artrópodes. Na área geográfica em estudo existem diversos tipos de biótopos com condições ecológicas para a sobrevivência dos ixodídeos, principalmente as espécies do complexo *R. sanguineus*. Os referidos biótopos estão presentes não só em zonas rurais mas também em zonas urbanas e sub-urbanas e são tão diversos como baldios, campos cultivados, áreas de floresta Mediterrânica, jardins públicos e campos de golfe, entre outros. O desenvolvimento das espécies do complexo *Rhipicephalus sanguineus* em áreas urbanas e sub-urbanas foi demonstrado por Gilot *et al* (1990,1992). Paralelamente, a presença de *Ixodes ricinus* foi também descrita em áreas de recreio próximas das habitações humanas, nomeadamente em jardins públicos e privados onde se estabeleceram populações deste vector transportados por canídeos (Estrada-Peña, 2004b).

O forte desenvolvimento turístico desta região conduziu a um aumento de população humana, sobretudo nos meses de Verão, e conseqüentemente, a um incremento na urbanização de zonas rurais, transformando o meio ambiente e criando condições favoráveis para o contacto do homem e do cão com o biótopo dos ixodídeos vectores.

## **2. Material**

### **2.1 Ixodídeos**

Os ixodídeos estudados nesta dissertação, foram provenientes de colheitas realizadas em canídeos presentes à consulta no Hospital Veterinário do Algarve e de clínicas veterinárias associadas e em canídeos amostrados aleatoriamente para o rastreio serológico das três doenças em estudo.

### **2.2 Canídeos**

Os canídeos incluídos no rastreio serológico, são provenientes dos registos clínicos do Hospital Veterinário do Algarve e clínicas veterinárias associadas:

- Hospital Veterinário do Algarve
- Clínica Veterinária de Loulé
- Clínica Veterinária de Olhão
- Centro Veterinário Porto Seguro
- Consultório Veterinário de Luz de Tavira
- Clínica Veterinária de S. Brás de Alportel
- Clínica Veterinária Império do Animal – Portimão
- Consultório Veterinário de Silves

A partir destes registos foi constituída uma base de dados de aproximadamente 5 000 canídeos com várias aptidões, residentes em zonas rurais, urbanas e sub-urbanas dos 16 concelhos do distrito de Faro. O rastreio serológico foi executado em quatro períodos do ano, correspondentes às quatro estações. As amostras biológicas colhidas em canídeos amostrados, consistiram em:

- sangue colhido em veia periférica para posterior IFI;
- ixodídeos em fase parasitária.

No estudo clínico foram incluídos canídeos residentes no distrito de Faro, que se apresentaram à consulta nas instituições associadas, entre o período de Novembro de 2003 e Outubro de 2004, com sinais clínicos compatíveis com qualquer das três doenças em estudo.

### **3-Métodos**

#### **3.1 Colheita e identificação dos ixodídeos.**

A colheita dos ixodídeos foi realizada em canídeos presentes à consulta por motivo de doença ou em canídeos incluídos na amostra do rastreio serológico. Os canídeos foram inspeccionados para a presença de ixodídeos nos locais de parasitação habituais, tais como, pavilhão auricular, região cervical, região interdigital e escroto ou região vulvar. Após a colheita, foram colocados em tubos plásticos contendo cartão humedecido ou porções de plantas verdes, com o objectivo de manter a humidade relativa elevada para manter viáveis os ixodídeos e mantidos refrigerados a 4°C. A identificação dos ixodídeos foi realizada no Centro de Estudo de Vectores e Doenças Infecciosas (CEVDI) utilizando os critérios de Tendeiro (1962) e as chaves de identificação simplificadas de Núncio (1988a, 1988b).

#### **3.2 Teste dos hemócitos**

O teste dos hemócitos consiste na visualização das rickettsias na hemolinfa dos ixodídeos. Após a identificação, os espécimens foram passados sucessivamente por água destilada e álcool a 70° e depois secos com papel de filtro. De cada ixodídeo vivo, amputou-se a parte distal do primeiro par de patas e a gota de hemolinfa que emergiu do corte foi colocada em lâminas de vidro. O ártropode foi mantido num tubo “Eppendorff” para posterior congelação a -80°C. Depois de fixadas pelo calor, as gotas de hemolinfa foram coradas pelo método de Giménez (1964). Posteriormente, as preparações foram observadas ao microscópio óptico (Olympus CH) com objectiva de imersão (10 x 100). Por este método as rickettsias ficam coradas de vermelho enquanto que a hemolinfa e os hemócitos ficam corados de verde azulado.

#### **3.3 “PCR” para a detecção de ácidos nucleicos de *R. conorii*, *B. burgdorferi* e *E. canis* nos ixodídeos.**

##### **3.3.1 Extracção de ADN dos ixodídeos.**

Depois de descongelados, os ixodídeos foram secos com papel de filtro. Preparou-se em seguida uma solução de hidroxiamónia, em que se adicionou 10,5 ml de amónia a 25% a 9,5 ml de água destilada. Adicionou-se a cada um dos tubos “Eppendorf” com ixodídeos, 100 µl desta solução, nos casos em que o ixodídeo era bastante volumoso, adicionaram-se 200 µl da solução de hidroxiamónia de modo que este fosse imerso coberto pela solução. Os tubos foram fervidos a 100°C durante 20 minutos numa placa de III-Material e métodos

aquecimento, ao qual se seguiu um arrefecimento rápido dos tubos em gelo picado e foram separados por centrifugação a 5 000 r.p.m. durante dois minutos. Os tubos“ependorf” foram abertos e colocados na placa de aquecimento a 90°C durante 20 minutos, no interior de uma “hotte” química para evaporar a amónia (Rijpkema *et al*, 1995).

### **3.3.2 Amplificação dos segmentos de ADN de *R. conorii*, *E. canis* e *B. burgdorferi s.l.* por “PCR”.**

Para a amplificação do ADN alvo pelo método do “PCR” foi feita a mistura dos seguintes reagentes seguindo o protocolo do fabricante (“Roche Diagnostics”) :

- a) 12,5 µl de “High fidelity PCR Master” (Roche Diagnostics)
- b) 1,25 µl de cada “primer” (concentração final de 1,0 mM)
- c) 5 µl de água esterilizada.

Por cada tubo foram distribuídos 20 µl desta mistura de reagentes, ao quais se adicionou 5 µl da amostra com o ADN a testar.

A amplificação de ADN de *E. canis* foi realizada em dois passos (“Nested PCR”) como foi descrito por Dawson *et al* (1996), devido a uma maior sensibilidade desta variante de “PCR” em relação a técnica convencional na detecção de ADN. Enquanto para *R. conorii* e *B. burgdorferi s.l.* foi utilizado o “PCR” convencional. Para controlar o bom desempenho da reacção e excluir possíveis contaminações foram usados controlos negativos e positivos. Os controlos negativos obtiveram-se substituindo o volume de ADN a adicionar por um volume igual de água estéril. Como controlo positivo para cada agente pesquisado utilizaram-se cultura puras de *R. slovaca* (para *R. conorii*) e *B. burgdorferi s.l.* enquanto para *E. canis* se utilizou um controlo positivo proveniente de amostra em que previamente se amplificou e sequenciou ADN de *E. canis*

A amplificação foi realizada num termociclador (“T300 Thermocycler”, Whatman Biometra®) segundo os programas abaixo descritos.

**Tabela 3. Descrição do programa utilizado no termociclador para amplificar ADN de *R. conorii*.**

Nº de ciclos	Duração/Função		Temperatura
1	3 minutos		94°C
34	30 segundos	Desnaturação de ADN	94°C
	30 segundos	Emparelhamento de "primers"	53°C
	1 minuto e 30 segundos	Extensão do segmento de ADN pela enzima <i>taq</i> polimerase	72°C
1	7 minutos	Continuação da extensão	72°C
O tempo total da amplificação foi cerca de 4 horas.			

**Tabela 4. Descrição do programa utilizado no termociclador para amplificar ADN de *E.canis*.**

Primeiro passo			
Nº de ciclos	Duração/Função		Temperatura
1	3 minutos		94°C
39	1 minuto	Desnaturação de ADN de alvo	94°C
	2 minutos	Emparelhamento de "primers"	45°C
	30 segundos	Extensão do segmento de ADN pela enzima taq polimerase	72°C
1	5 minutos	Continuação da extensão	72°C
O tempo total da amplificação foi cerca de 4 horas.			
Segundo passo			
Nº de ciclos	Duração/Função		Temperatura
1	3 minutos		94°C
39	1 minuto	Desnaturação de ADN alvo	94°C
	2 minutos	Emparelhamento de "primers"	55°C
	15 segundos	Extensão do segmento de ADN alvo pela enzima taq polimerase	72°C
1	5 minutos	Continuação da extensão	72°C
O tempo total da amplificação foi cerca de 4 horas.			

**Tabela 5. Descrição do programa utilizado no termociclador para amplificar ADN de *B. burgdorferi s.l.***

Nº de ciclos	Duração/Função	Temperatura
1	3 minutos Desnaturação de ADN de alvo	94°C
45	1 minuto Emparelhamento de "primers"	63°C
	30 segundos Extensão do segmento de ADN pela enzima <i>taq</i> polimerase	72°C
	1 minuto Desnaturação de ADN de alvo	94°C
1	1 minuto Emparelhamento de "primers"	63°C
1	5 minutos Extensão do segmento de ADN pela enzima <i>taq</i> polimerase	72°C

Na amplificação de ADN de *R. conorii*, o par de "primers" descrito por Regnery *et al* (1991), utilizado nesta reacção deriva de duas regiões do gene que codifica a enzima citrato sintetase, sequenciado a partir de *Rickettsia prowazekii* (tabela 6). Na primeira reacção de amplificação de ADN de *E. canis* utilizaram-se os "primers" ECC e ECB (tabela 6) descritos por Dawson *et al* (1996). Para os estudos de pesquisa de ADN de *B. burgdorferi s.l.* foram utilizados os "primers" C e B (tabela 6) descritos por Postic *et al* (1994), que permitem a detecção ADN de todas as dez geno-espécies englobadas no complexo *B. burgdorferi s.l.*

**Tabela 6. Sequência das bases dos oligonucleotídeos sintéticos (“primers”) utilizados para a multiplicação do ADN de *R. conorii*, *E. canis* e *B. burgdorferi s.l.***

Primer	Espécie	Sequência nucleotídica (5'–3')	Produto (bp)
RpCS. 877p	<i>R.prowazekii</i>	GGGGCCTGCTCACGGCGCGG	381
RpCS. 1258n	<i>R.prowazekii</i>	ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA	381
ECC	<i>E. canis</i>	AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC	300
ECB	<i>E. canis</i>	CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA	300
HE3	<i>E. canis</i>	TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT	390
HCS	<i>E. canis</i>	CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA	390
C	<i>B. burgdorferi s.l.</i>	AATAGGTCTAATATTAGCCTTAATAGC	300
B	<i>B. burgdorferi s.l.</i>	AAGAAGATGGCAAACATTAGTAT	300

O “PCR nested” realizado para a amplificação de ADN de *E. canis* utilizou 3 µl do produto da 1ª amplificação e os “primers” HE3 e HCS, descritos na tabela 6. Nesta segunda amplificação foram adicionados os mesmos componentes utilizados na primeira reacção de amplificação nos seguintes volumes:

- a) 12,5 µl de “High fidelity PCR Master” (Roche Diagnostics)
- b) 1,25 µl de cada primer (concentração final de 1,0 mM)
- c) 7 µl de água esterilizada.

Por último adicionou-se 3 µl do ADN obtido a partir da primeira reacção de amplificação, obtendo-se um volume total de 25 µl da mistura dos reagentes, volume esse que foi distribuído por cada tubo. Os tubos “Eppendorf” foram colocados no aparelho termociclador onde decorreu a primeira reacção de amplificação. Esta segunda amplificação decorreu durante 40 ciclos consecutivos, segundo o perfil de termociclagem descrito na tabela 4.

Após o fim da reacção de “PCR” a existência de ADN amplificado foi verificada por electroforese, em gel agarose (1,5%, p/v), em tampão TBE pH (tris-Borato 0,045 M, EDTA 0,001 M), (Invitrogen Life Technologies), num aparelho de electroforese horizontal (Horizon 58, Life Technologies™). Os poços de aplicação da amostra foram feitos utilizando um pente. O gel foi submerso no tampão TBE contendo 50 µl/l de brometo de etídeo (10mg/ml). Os produtos de reacção de “PCR” foram revelados adicionando-se 3 µl da mistura do produto de “PCR” a 2 µl de uma substância corante com uma densidade maior do que a água (neste caso azul de bromofenol) (Sambrook *et al*, 1989). Esta mistura foi colocada no poço do gel agarose. Paralelamente reservou-se um poço para a colocação do marcador de peso molecular (DNA Molecular Weight Marker XIV-100 bp ladder, Roche Diagnostics) com graduação de 100 pares de bases . A electroforese processou-se a 100 V 400 mA durante 25 minutos, com uma fonte de alimentação EPS 600 (“Electrophoresis Power Supply“-Pharmacia). O gel foi colocado num aparelho transiluminador (“Ultraviolet transilluminator” UVP, model TM-15 E, 220- 240 V, 50 Hz, 80 Amps) e a presença de ADN foi verificada e fotografada com a máquina digital .

### **3.4 Imunofluorescência indirecta em soros de canídeos.**

O teste de imunofluorescência indirecta (IFI) foi realizado em soros de canídeos, com o objectivo de detectar e titular os anticorpos presentes contra *R. conorii*, *E. canis* e *B. burgdorferi s.l.* O soro foi separado de cada amostra de sangue por centrifugação, 2 horas após a sua colheita. Até se realizarem os ensaios serológicos, os soros foram armazenados a –80 °C. O protocolo do teste de IFI para *R. conorii* e *E. canis* é realizado tal como está indicado no manual da ESCMID (2004) e nos trabalhos de Bacellar e Filipe (2001). Os antigénios utilizados na preparação das lâminas para IFI eram provenientes de cultura de *R. conorii* estirpe *malish* isolada em Portugal enquanto o antigénio de *E. canis* utilizado foi proveniente de culturas de células infectadas com *E. canis* estirpe Oklahoma, gentilmente cedidas pelo “Center of Diseases control” na pessoa da investigadora J. Dawson. Na preparação das lâminas para IFI de *Borrelia burgdorferi* foi utilizado como antigénio diferentes estirpes das genoespécies *B. burgdorferi s.s.* e *B. garinii* cedidas ao CEVDI por laboratórios de referência internacionais.

Cada um dos soros obtido por centrifugação foi diluído com PBS pH 7,4, na razão de um para dois, e testados na diluição de 1:128 IgG para *Rickettsia conori*, (Brouqui *et al*, 2004), *Ehrlichia canis* (Davoust *et al*, 1998), *Borrelia burgdorferi s.l.* (Doby *et al*, 1985) seguindo os passos abaixo descritos.

a) Imediatamente antes da prova da IFI, as lâminas foram descongeladas e a seguir fixadas em acetona durante 15 minutos. Secaram-se em seguida e numeram-se de acordo com a seguinte frequência:

- os primeiros dois círculos foram reservados ao controlo positivo (antigénio+soro testemunha positivo), na diluição de 1:64 e ao controlo negativo (antigénio+soro testemunha negativo na diluição de 1:64.

- Os círculos seguintes foram destinados aos diversos soros a rastrear, na diluições mencionadas acima.

b) foram colocados cerca de 50 µl de soro diluído de modo que cada gota cobrisse todo o antigénio que estava no círculo, para cada soro foi destinado um círculo;

c) as lâminas foram incubadas em câmara húmida a 37°C durante 30 minutos após este período, o soro foi arrastado por lavagem com PBS pH 7,4, por duas vezes durante 10 minutos cada, com agitação magnética;

d) depois de secas ao ar, foram colocados 50 µl de conjugado fluoresceínado. O conjugado utilizado foi o “anti-dog IgG FICT” (Sigma Immunochemicals) na diluição de 1:40, com azul de Evans e PBS, sendo as lâminas novamente incubadas em câmara húmida a 37°C durante 30 minutos. A preparação do conjugado para IFI de borrelia dispensa a utilização de azul de Evans ;

e) de seguida foram lavadas como já descrito anteriormente e novamente secas, montadas com lamela e glicerina tamponada.

Em seguida as lâminas foram observadas num microscópio OLYMPUS BH-2 equipado com uma fonte de luz ultravioleta com uma ampliação de 10X40. Houve o cuidado de efectuar sempre a leitura da reacção no centro dos círculos, não considerando a fluorescência periférica ainda que esta fosse intensa. Nas lâminas utilizadas para a titulação de anticorpos para *R. conorii* e *E. canis*, os resultados positivos manifestam-se pela visualização das rickettsias e ehrlichias com fluorescência verde-maçã no interior das células de cultura aparecendo por seu lado as borrelias verdes-fluorescentes sobre um fundo escuro. Nas amostras que não apresentam anticorpos, não se forma o complexo antigénio-anticorpo, permanecendo o campo escuro para borrelias e para rickettsias e ehrlichias observam-se apenas as células utilizadas para a sua cultura coradas de vermelho. A leitura da fluorescência típica e específica de cor verde-maçã e a sua graduação estão ligadas à subjectividade do observador. A fim de não depender os resultados, somente de um único observador, sempre que possível as observações das lâminas foram feitas em simultâneo com outro técnico experiente na leitura deste teste de diagnóstico.

### 3.5 Isolamento dos agentes infecciosos em estudo.

O isolamento de agentes infecciosos restringiu-se a *R. conorii*. Optou-se por não se realizar o isolamento de *E. canis* devido a morosidade do processo (até 8 semanas) e a baixa sensibilidade desta técnica quando comparada com o “PCR”. Já em relação ao isolamento de *B. burgdorferi s.l.*, não se observou nenhum quadro clínico ou laboratorial compatível com borreliose de Lyme entre os 55 canídeos consultados, o que invalidou a tentativa de isolamento deste agente. As colheitas de sangue realizaram-se em canídeos presentes à consulta com quadro clínico compatível ao causado pela infecção por *R. conorii*. O sangue foi obtido por colheita asséptica em veia periférica para tubo com EDTA, (S-monovette®1, 2 ml, Sarstedt), mantendo-se refrigerado a 4°C durante um período máximo de 48 horas. Seguindo-se uma centrifugação a 5 000 r.p.m. durante 10 minutos (em centrífuga refrigerada) com o objectivo de separar o “buffy coat “ das restantes fracções do sangue. A abertura do tubo após centrifugação, realizou-se em câmara de fluxo laminar tipo Biohazard II, procedendo-se depois à separação das três fracções do sangue para três distintos tubos esterilizados, sendo logo de seguida congelados a –80 °C, permanecendo assim até posterior processamento.

As tentativas de isolamento foram realizadas a partir do “buffy coat” aplicando a técnica denominada de “shell vial”. Esta consiste na centrifugação da amostra sobre uma camada de células em crescimento contínuo em cultura. O fundamento da técnica consiste em obrigar pela força da centrifugação que os microrganismos (parasitas intracelulares obrigatórios) que estejam na amostra penetrem na camada celular. Os microrganismos extracelulares, bem como o material da amostra, que fiquem no sobrenadante são decantados. O procedimento utilizado foi o seguinte:

a) a metodologia aplicada implica que seja iniciado antes da inoculação, o crescimento de uma cultura de células Vero E6 no fundo plano de frascos com 3 cm<sup>3</sup> de capacidade e 1,5 cm de diâmetro, de modo que no dia do isolamento se tenha uma camada celular contínua.

b) Trabalhando numa câmara de fluxo laminar tipo Biohazard II, emulsionaram-se 200 µl de “buffy coat” com 0,5 ml de meio de cultura de células (Eagle`s minimum essential medium – MEM-Gibco) adicionado de 1% de glutamina, 8% de soro bovino e sem adição de antibióticos (este meio será referido nesta dissertação como MEM completo).

c) Esta emulsão foi depositada sobre uma camada de células Vero E6 a crescer no fundo dos frascos, que foram de imediato centrifugados a 5000 r.p.m., a 20°C durante 45 minutos.

d) O meio foi decantado e substituído por 1,5 ml de MEM completo;

e) Os frascos foram incubados, a 32 °C durante 5-6 dias;

f) Após este período de tempo, nos frascos em que ao fim de 48 horas não se observou contaminação com bactérias e/ou fungos, as células foram suspensas no meio de cultura, pela acção de esferas de vidro esterilizadas de 0,5 mm de diâmetro;

g) Esta suspensão foi transferida para um frasco de cultura de células de 25 ml de capacidade, onde foi cultivada uma camada de células Vero E6. Deixou-se adsorver, durante 30 minutos, com agitação horizontal ocasional, à temperatura ambiente;

h) Foram adicionados 5 ml de MEM completo e os frascos colocados na estufa a 32 °C, durante 5-6 dias.

Para controlo da infecção, ao fim deste período de tempo, com uma pipeta de Pasteur, raspou-se uma pequena quantidade de células as quais foram colocadas em lâminas de vidro de microscopia e fixadas pelo calor, para posterior coloração de Gimenez (Gimenez, 1964) e observação ao microscópio óptico (Olympus CH) com objectiva de imersão (10 x 100).

### **3.6 “PCR” para a detecção de ADN dos agentes infecciosos em sangue de canídeo.**

Neste trabalho utilizou-se a técnica de “PCR” para a detecção de ADN de *E. canis* e *R. conorii* em sangue de canídeos presentes à consulta apresentando sintomatologia de infecção por um destes agentes. O sangue foi colhido tal como foi descrito anteriormente no ponto 3.5. A detecção do ADN alvo dos agentes atrás referidos, realizou-se no “buffy coat” (fracção enriquecida de leucócitos do sangue total) devido ao tropismo dos microrganismos intracelulares em estudo pelos monócitos.

#### **3.6.1 Extracção de ADN em “buffy coat”**

A extracção do ADN de *R. conorii* e *E. canis* a partir do “buffy coat” realizou-se utilizando o “Flexigene ADN Kit” (Qiagen GmbH). O protocolo (anexo I) utilizado para esta técnica seguiu as instruções do fabricante para a extracção de ADN em 100 µl de “buffy coat”. Até posterior amplificação de ADN por “PCR”, os tubos contendo o ADN extraído foram conservados a –20°C.

#### **3.6.2 Amplificação dos segmentos de ADN de *R. conorii***

A partir do ADN extraído, os segmentos de ADN de *R. conorii* foram amplificados por “PCR” seguindo a metodologia já descrita no ponto 3.3.2 desta dissertação.

### 3.6.3 Amplificação dos segmentos de ADN de *E. canis*

Utilizando o ADN extraído pela metodologia descrita anteriormente, procedeu-se à tentativa de amplificação dos segmentos de ADN de *E. canis* por “PCR” seguindo o protocolo descrito no ponto 3.3.2 desta dissertação.

### 3.6.4 Purificação e sequenciação dos amplicons

A purificação dos segmentos de ADN amplificados nos pontos 3.6.2 e 3.6.3 foi realizada com o objectivo de uma posterior sequenciação para caracterizar a espécie e/ou estirpe dos microrganismos envolvidos nos quadros clínicos observados em canídeos. Este procedimento iniciou-se a partir do ADN extraído (segundo o protocolo descrito no ponto 3.6.1) e continuando pela amplificação dos segmentos de ADN seguindo o protocolo descrito anteriormente em 3.3.2 e 3.3.3. A purificação do ADN amplificado anteriormente dos restos de “primers” e *Taq* polimerase, foi realizada utilizando o kit de purificação de ADN JETquick (Genomed GmbH) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Após a purificação, executou-se uma amplificação de sequenciação utilizando os seguintes reagentes por cada amostra de ADN purificado :

- 8µl de “Big Dye™ “ terminator cycle sequencing” (PE Applied Biosystems) ;
- 1µl do “primer” RpCS. 877p para *R. conorii* e para *E. canis* o “primer” ECC;
- 3µl (sinal forte do amplicon em gel de agarose) a 5 µl (sinal fraco do amplicon em gel de agarose) por amostra de ADN positivo na primeira reacção de amplificação;
- completar com água estéril até se perfazer o volume total de 20 µl por cada amostra.

Os tubos contendo os componentes descritos anteriormente foram colocados no aparelho termociclador onde ocorreu a reacção de amplificação (“T300 Thermocycler”, Whatman Biometra®). Neste termociclador a amplificação foi realizada em programa descrito na tabela 7 com uma duração aproximada de 3 horas :

**Tabela 7 – Programa da amplificação de sequenciação**

Nº de ciclos	Duração	Temperatura
25	30 segundos	96°C
	15 segundos	96°C
	1 segundo	50°C
	4 minutos	60°C

Os segmentos de ADN amplificados nesta última reacção foram guardados a – 80°C, sendo enviados posteriormente para a Unidade laboratorial de utilização comum do Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge, onde as sequências foram determinadas no sequenciador 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Após revisão e edição, a procura da homologia das sequências foi feita pela análise BLASTN do GenBank.

### **3.7. Exames hematológicos.**

#### **3.7.1 Técnicas de concentração leucocitária e visualização de agentes infecciosos em esfregaço.**

Devido ao escasso número de mórulas de *E. canis* habitualmente presentes no sangue periférico, é importante proceder a uma concentração de leucócitos a fim de se efectuar uma melhor visualização dos monócitos e de outros leucócitos que habitualmente contém mórulas deste microrganismo. A concentração leucocitária baseou-se na técnica descrita por Davoust et al (1998) para a pesquisa de mórulas de *E. canis* e compreendeu os seguintes passos:

- 1- Recolheu-se de 2,5 ml de sangue para tubo contendo EDTA.
- 2- Centrifugação do tubo a 2000 r.p.m., durante 5 minutos.
- 3- Retirou-se o plasma.
- 4- Centrifugação a 10000 r.p.m. durante 10 minutos.
- 5- Retirou-se a camada leucocitária e efectuar esfregaços finos.
- 6- Corou-se os esfregaços com Giemsa.
- 7- Observou-se os esfregaços ao microscópio óptico (Olympus CH) com objectiva de imersão (10 x 100).

#### **3.7.2 Hemograma.**

A avaliação de alguns parâmetros hematológicos apresentam inegável interesse se tivermos em conta a importância do sistema hematopoiético como alvo preferencial de dos agentes em estudo, nomeadamente *E. canis* e *R. conorii*. Na tentativa de melhor caracterizar as alterações hematológicas causadas por estes agentes, realizaram-se hemogramas em todos os canídeos presentes à consulta com quadro clínico suspeito. O sangue foi colhido em veia periférica para tubo com EDTA e processado em contador de células automáticas (Hemavet® 850, CDC technologies, Inc.) até duas horas após a sua colheita. Os valores de referência utilizados para os diversos parâmetros hematológicos são os descritos por Brockus e Andreasen (2000). De entre os parâmetros hematológicos medidos destacam-se:

- Nº total de eritrócitos
- Nº total de leucócitos
- Valor de hematócrito
- Hemoglobina (g/dl)
- Nº total de plaquetas
- Contagens diferenciais de leucócitos
- Volume globular médio (MCV)
- Concentração da hemoglobulina globular média (MCHC)
- Hemoglobina globular média (MCH)
- Volume plaquetar médio (MPV)

### **3.8 Procedimentos especiais/rotina utilizados em situações clínicas.**

Em canídeos presentes à consulta com um quadro clínico de ehrlichiose monocítica canina, febre botonosa ou borreliose de Lyme, para além de uma avaliação dos vários parâmetros hematológicos, realizou-se também uma avaliação da função hepática e renal sempre que as condições financeiras do proprietário o permitiram. Na maior parte dos canídeos executaram-se testes de ELISA comerciais de ehrlichiose monocítica canina e borreliose de Lyme. A urinálise efectuou-se sempre que se observaram sinais urológicos. Nas situações clínicas que pela sua evolução conduziram à morte, procedeu-se à necrópsia do animal até as 12 horas *post-mortem*. Em todas as necrópsias colheram-se amostras de órgãos ricos em sistema mononuclear fagocitário como pulmão, baço, fígado e linfonodos regionais. As amostras destes órgãos foram conservadas em formol a 10% e processados para análise histopatológica pelo serviço de anatomia-patológica do Hospital Veterinário da Universidade de Évora.

### **3.9 Métodos estatísticos**

Nesta dissertação, foram rastreados serologicamente 100 canídeos amostrados de forma aleatória simples, em cada um dos 4 trimestres correspondentes às quatro estações do ano perfazendo uma amostra total de 400 animais. A dimensão mínima da amostra foi calculada em 48 canídeos, utilizando a fórmula de Cannon e Roe (1982) para um intervalo de confiança de 99%. Os valores de seroprevalência utilizados como referência para o cálculo da referida amostra, foram de 54% (Bacellar et al, 1995), 44,4 % (Silveira, 1992) e 9% (Núncio, 2001) respectivamente para febre botonosa, ehrlichiose monocítica canina e borreliose de Lyme. Tendo em conta a disparidade destes valores optou-se por utilizar o valor de 9% para este cálculo, uma vez que este produzia a amostra de maior dimensão.

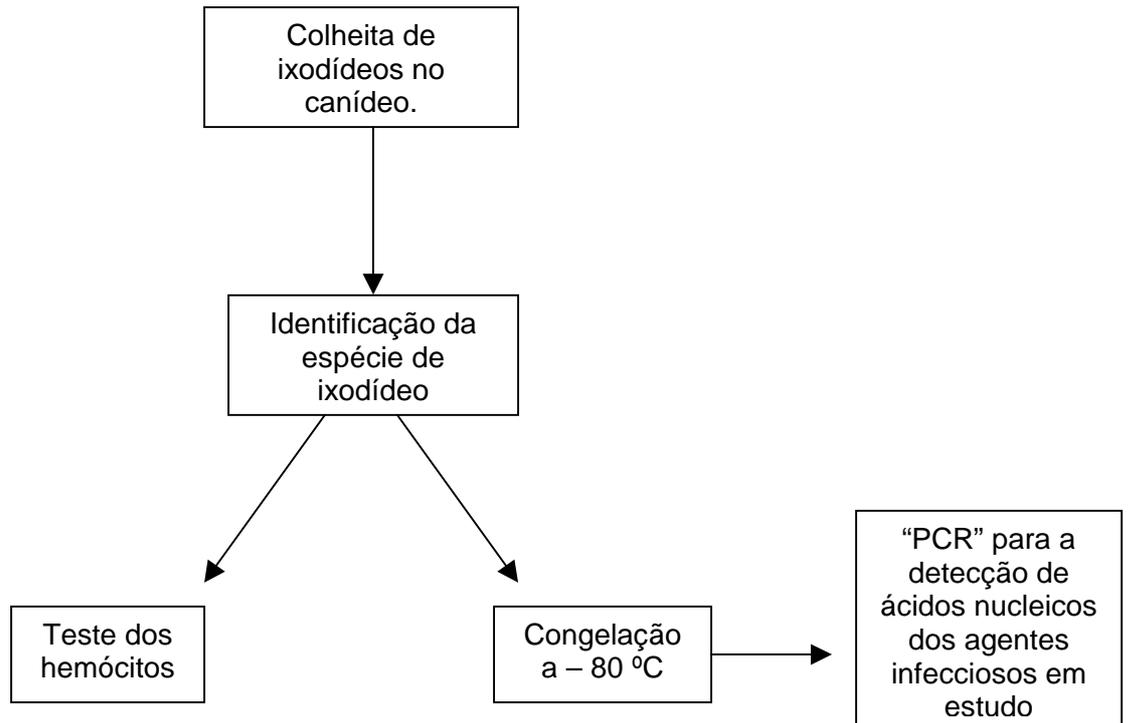
A amostra aleatória simples foi gerada pelo programa Microsoft Excel (Microsoft® corporation) através da função “Random between” que devolve uma amostra aleatória da população de aproximadamente 5000 registos clínicos fornecidos pelas instituições referidas no ponto 2.2. Os dados epidemiológicos recolhidos através de fichas individuais de inquérito epidemiológico (em anexo) e de dados provenientes das análises laboratoriais foram armazenados num base de dados construída com o programa Microsoft Access (Microsoft® corporation) e posteriormente tratados estatisticamente pelo programa SPSS 11.5 (SPSS Inc). Para determinação de factores de risco utilizou-se o teste estatístico de independência de variáveis, qui-quadrado. Naqueles factores em que se demonstrou a dependência, calculou-se o “Odds ratio” utilizando o programa Win Episcope 2.0, permitindo uma melhor caracterização dos factores de risco.

Os dados recolhidos através de fichas de inquérito (em anexo), em canídeos presentes à consulta com quadro clínico compatível com uma das doenças em estudo foram armazenados em base de dados construída pelo programa Microsoft Access (Microsoft® corporation) e tratados estatisticamente pelo programa Microsoft Excel (Microsoft® corporation). O tratamento estatístico destes dados implicou sobretudo a utilização de métodos de estatística descritiva.

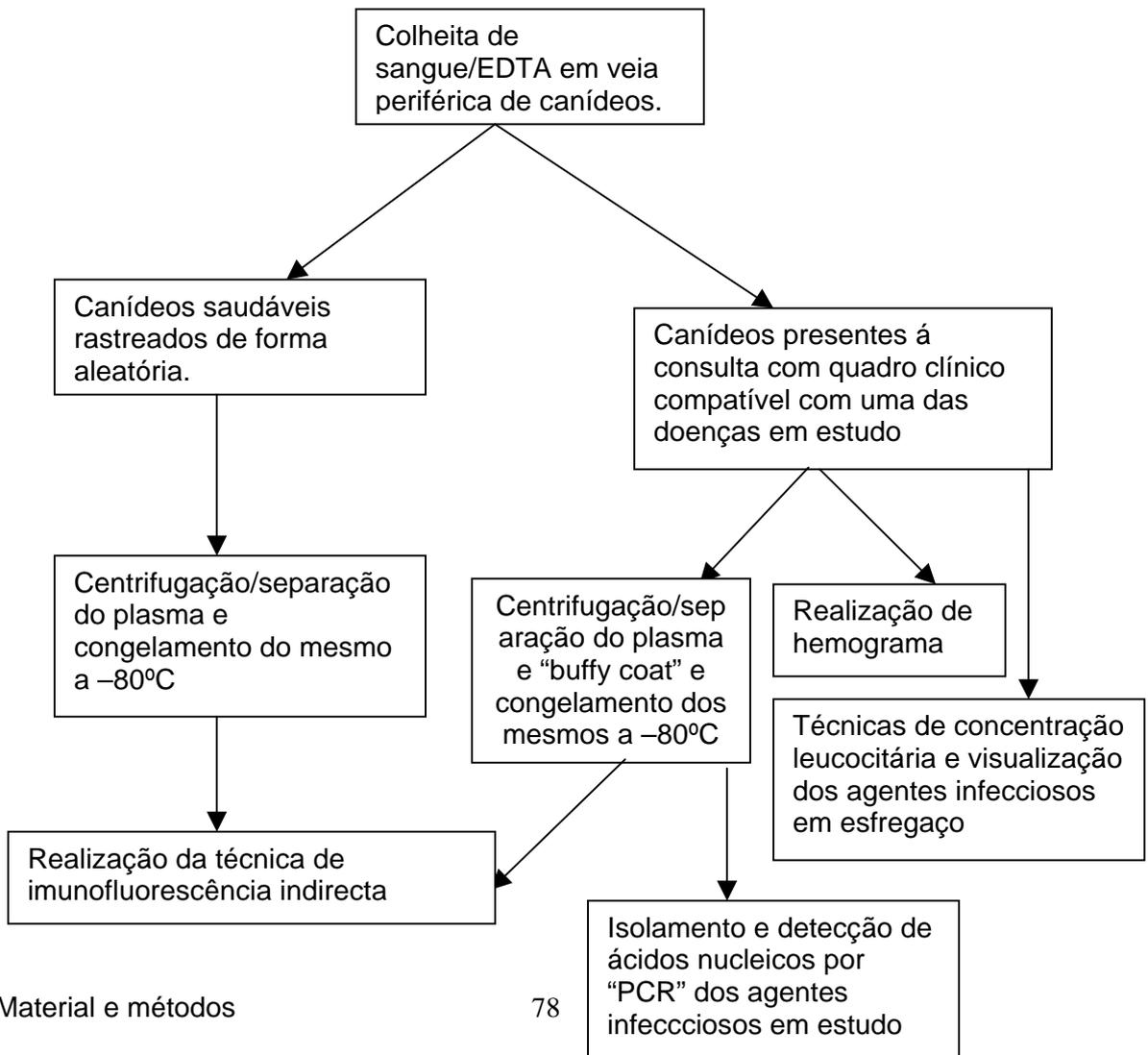
A população de ixodídeos foi colhida em canídeos presentes à consulta ou enquadrados no rastreio serológico, sendo estes numerados e identificados para posterior amostragem aleatória simples. A dimensão da amostra a estudar foi calculada em 45 ixodídeos, utilizou-se a fórmula de Cannon e Roe e um nível de confiança de 99% para chegarmos a este número. Como valores de referência para a prevalência de infecção utilizamos os valores de 24,2% (Bacellar *et al*, 1996) e 8,5% (Felek *et al*, 2003) respectivamente para *R. conorii* e *E. canis*, tendo em conta a diferença de valores optou-se por este último, por produzir uma amostra de maior dimensão. Apesar dos ixodídeos colhidos e identificados corresponderem na sua totalidade á espécie *R. sanguineus* e de até ao momento não se considerar esta espécie de ixodídeos como vector de *B. burgdorferi* s.l. tentou-se a sua amplificação de ADN nos 45 ixodídeos amostrados. A amostra aleatória foi contruída utilizando a função “random between” do programa Microsoft Excel (Microsoft® corporation).

#### 4. Diagrama de execução

##### Ixodídeos:



##### Canídeos:



## IV Resultados

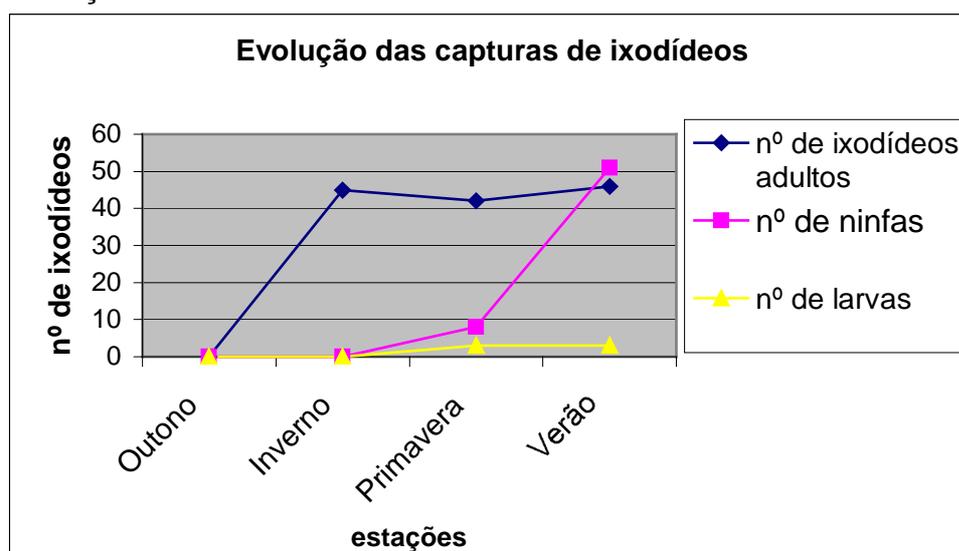
### 1. Ixodídeos

Entre o Outono de 2003 e o Verão de 2004 colheram-se 188 ixodídeos pertencentes à espécie *R. sanguineus* que se distribuíram como mostra a tabela 6.

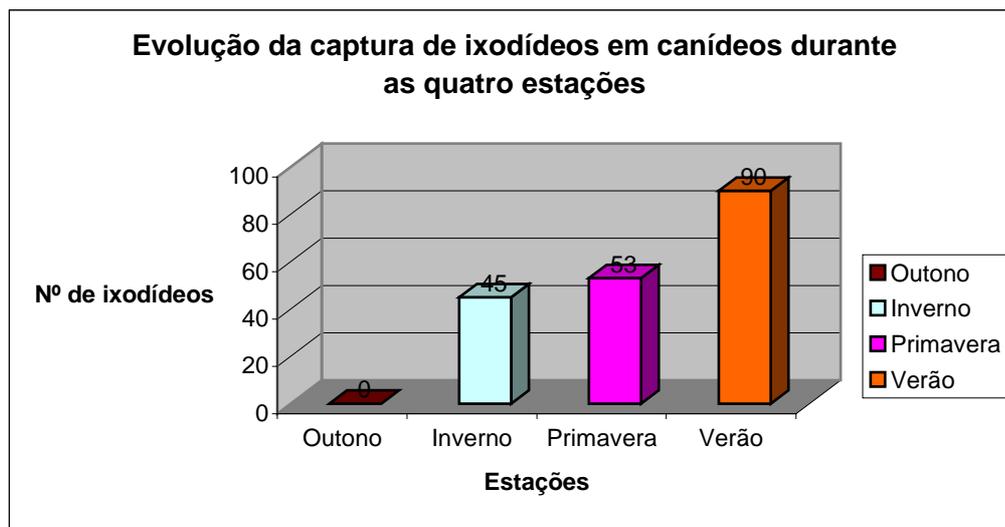
**Tabela 8 – Distribuição dos ixodídeos colhidos durante as quatro estações.**

Estação do ano	Outono		Inverno		Primavera		Verão		Total
	M	F	M	F	M	F	M	F	
Nº de ixodídeos adultos	0	0	24	21	11	31	2	44	133
Nº de ninfas	0	0	0	0	8	8	51	0	59
Nº de larvas	0	0	0	0	3	3	3	0	6
<b>Total</b>	0	0	45	21	53	19	90	0	188
%	0 %	0 %	23 %	11 %	29 %	10 %	48 %	0 %	100 %

**Figura 1 – Evolução das capturas dos diferentes estadios de ixodídeos, ao longo das quatro estações.**



**Figura 2 – Evolução da captura de ixodídeos em canídeos, durante as quatro estações.**



### 1.1 Resultados do teste dos hemócitos.

Em todos os ixodídeos vivos adultos foi realizado o teste dos hemócitos com o objectivo de se visualizarem “RLO-rickettsia like organisms”, observando-se o seguinte resultado:

**Tabela 9 – Resultados do teste dos hemócitos utilizado no estudo dos ixodídeos.**

<b>Nº de ixodídeos em que se observou “rickettsia like-organisms” na hemolinfa/ (%)</b>	1 (2,3%)
<b>Nº de ixodídeos vivos estudados</b>	43

### 1.2 Prevalências de infecção dos ixodídeos estudados por PCR.

Dos 188 ixodídeos, foram amostrados 45 ixodídeos de forma aleatória simples com o objectivo de se determinar a prevalência de infecção dos agentes infecciosos, na população de ixodídeos capturados, utilizando a técnica de “PCR” para amplificação do ADN alvo.

**Tabela 10 – Prevalências de infecção em ixodídeos estudados por “PCR”.**

<b>Agente infeccioso</b>	<b>Rickettsia conorii</b>	<b>Ehrlichia canis</b>	<b>Borrelia burgdorferi s.l.</b>	<b>Total</b>
<b>Nº de ixodídeos em que se amplificou ADN (n=45)</b>	10	1	0	11
<b>Prevalência de infecção± IC 99%</b>	22,2%± 0,832	2,2%± 0,0626	0%± 0	24,4%

## **2. Canídeos**

### **2.1 Estudo epidemiológico.**

#### **2.1.1 Resultados das seroprevalências.**

Os canídeos foram estudados em duas vertentes, epidemiológica e clínica. O estudo epidemiológico consistiu num rastreio serológico executado em quatro pontos do ano correspondentes às quatro estações do ano, nos quais se utilizou a técnica de IFI para o estudo dos referidos soros. O valor do limiar de positividade considerado para as três doenças, foi um título de anticorpos igual ou superior a 1/128. A seroprevalência foi determinada para as três doenças, pontualmente em cada uma das estações e para totalidade da população estudada, como é dado observar pela tabela 9.

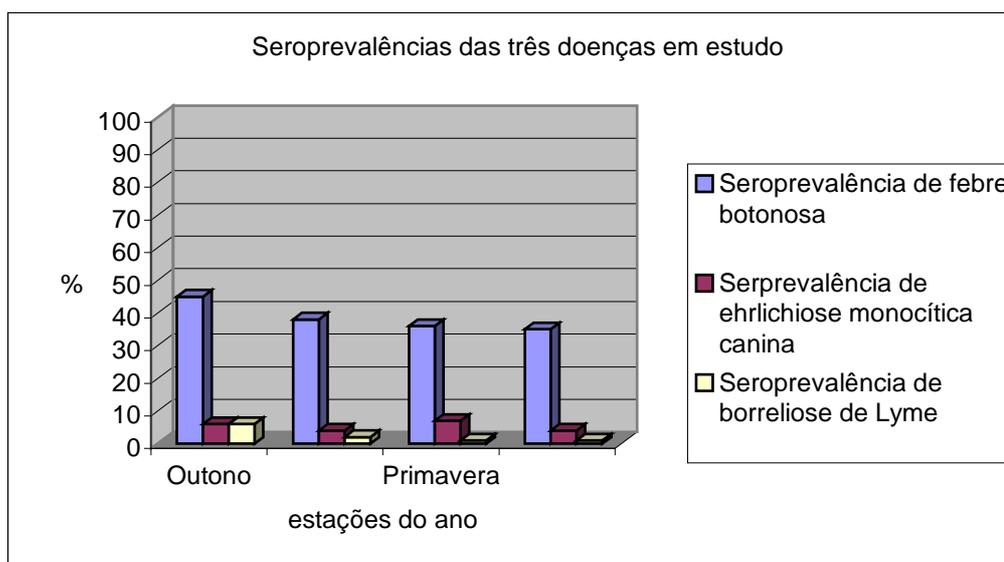
**Tabela 11 – Distribuição sazonal das seroprevalências das três doenças, durante as quatro estações.**

<b>Doença</b>	<b>febre botonosa</b>	<b>ehrlichiose monocítica canina</b>	<b>borreliose de Lyme</b>
<b>Seroprevalência Outono±IC 99%</b>	45%±0,36 (n=100)	6%±0,14 (n=100)	6%±0,14 (n=100)
<b>Seroprevalência Inverno± IC 99%</b>	38%±0,96 (n=100)	4%±0,089 (n=100)	2%±0,036 (n=100)

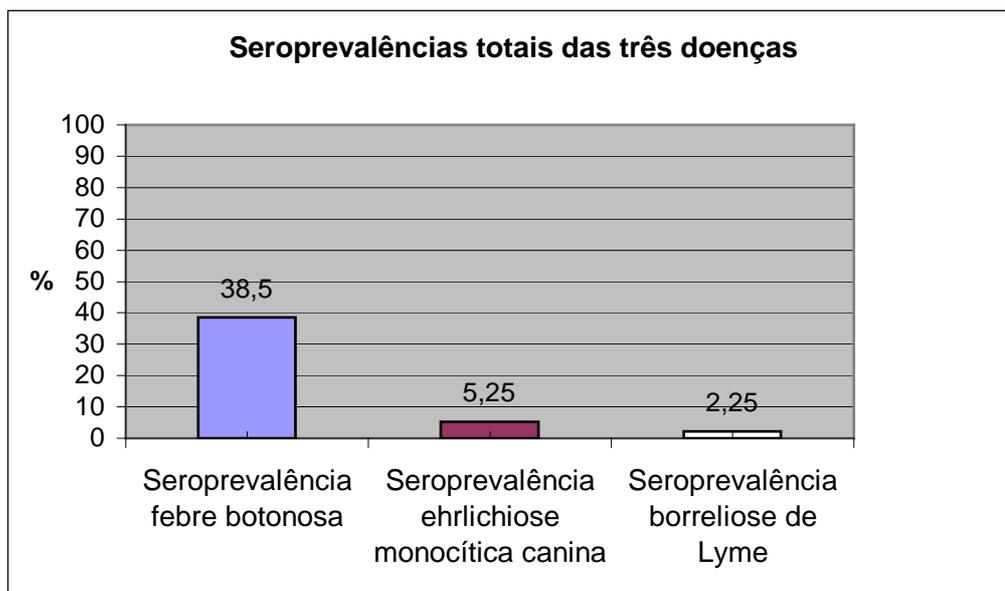
**Tabela 11 (continuação)– Distribuição sazonal das seroprevalências das três doenças, durante as quatro estações.**

<b>Doença</b>	<b>febre botonosa</b>	<b>ehrlichiose monocítica canina</b>	<b>borreliose de Lyme</b>
<b>Seroprevalência Primavera± IC 99%</b>	36%±0,91 (n=100)	7%±0,16 (n=100)	1%±0 (n=100)
<b>Seroprevalência Verão± IC 99%</b>	35%±0,88 (n=100)	4%±0,089 (n=100)	1%±0 (n=100)
<b>Seroprevalência total± IC 99%</b>	38,5%±0,48 (n=400)	5,25%±0,604 (n=400)	2,25%±0,043 (n=400)

**Figura 3 – Distribuição sazonal das seroprevalências das três doenças, durante as quatro estações do ano.**



**Figura 4 – Distribuição das seroprevalências totais para cada uma das três doenças.**



### 2.1.2 Caracterização da amostra.

Antes de qualquer análise, apresenta-se succintamente as características da amostra gerada para cada um dos trimestres.

**Tabela 12 – Caracterização da amostra do 1º trimestre.**

	<b>Aptidão</b>	<b>Sexo</b>	<b>Área de residência</b>	<b>Idade</b>	<b>Profilaxia de ixodídeos</b>
<b>Nº de canídeos rastreados</b>	84 canídeos companhia	63 machos	36 residentes em áreas rurais	83 tem mais de 2 anos	75 canídeos fazem profilaxia
<b>100 canídeos</b>	10 canídeos de guarda	37 fêmeas	39 residentes em áreas urbanas	17 tem menos de 2 anos	25 canídeos não fazem profilaxia
	4 canídeos de caça		25 residentes em áreas sub-urbanas		

**Tabela 13 – Caracterização da amostra do 2º trimestre.**

<b>Nº de canídeos rastreados</b>	<b>Aptidão</b>	<b>Sexo</b>	<b>Área de residência</b>	<b>Idade</b>	<b>Profilaxia de ixodídeos</b>
<b>100 canídeos</b>	84 canídeos de companhia	54 machos	43 residentes em áreas rurais	64 tem mais de 2 anos	67 canídeos fazem profilaxia
	12 canídeos de guarda	46 fêmeas	35 residentes em áreas urbanas	36 tem mais de 2 anos	23 canídeos não fazem profilaxia
	4 canídeos de caça		22 residentes em áreas sub-urbanas		

**Tabela 14 – Caracterização da amostra do 3º trimestre.**

<b>Nº de canídeos rastreados</b>	<b>Aptidão</b>	<b>Sexo</b>	<b>Área de residência</b>	<b>Idade</b>	<b>Profilaxia de ixodídeos</b>
<b>100 canídeos</b>	81 canídeos de companhia	69 machos	48 residentes em áreas rurais	67 tem mais de 2 anos de idade	66 canídeos fazem profilaxia de ixodídeos
	8 canídeos de guarda	31 fêmeas	34 residentes em áreas urbanas	33 tem menos de 2 anos de idade	24 canídeos fazem profilaxia de ixodídeos
	11 canídeos de caça		17 residentes em áreas sub-urbanas		

**Tabela 15– Caracterização da amostra do 4º trimestre.**

<b>Nº de canídeos rastreados</b>	<b>Aptidão</b>	<b>Sexo</b>	<b>Área de residência</b>	<b>Idade</b>	<b>Profilaxia de ixodídeos</b>
<b>100 canídeos</b>	86 canídeos de companhia	58 machos	43 canídeos residem em áreas rurais	73 tem mais de 2 anos de idade	73 canídeos fazem profilaxia de ixodídeos
	11 canídeos de guarda	42 fêmeas	31 canídeos residem em áreas rurais	27 tem menos de 2 anos de idade	17 canídeos não fazem profilaxia de ixodídeos
	3 canídeos de caça		26 canídeos residem em áreas sub-urbanas		

**2.1.2 Associações encontradas entre os animais seropositivos e as diferentes variáveis, para cada um dos trimestres e na totalidade da amostra.**

Em cada um dos trimestres, tentou-se estabelecer uma associação entre os animais seropositivos para cada um das doenças e os vários factores de risco considerados, utilizando o teste de independência de variáveis, qui-quadrado. Nos factores de risco considerados dependentes da seropositividade, foi calculado o “Odds ratio”. Os factores de risco avaliados nesta dissertação encontram-se descritos na tabela 18.

**Tabela 16 – Factores de risco testados para a dependência de variáveis.**

<b>Factores de risco:</b>		<b>Factores de risco:</b>	
Idade	>2 anos <2 anos	Animais coabitantes	Cão Gato Coelho Outros

**Tabela 16 (continuação) – Factores de risco testados para a dependência de variáveis.**

<b>Factores de risco:</b>		<b>Factores de risco:</b>	
sexo	Macho Fêmea	Frequência de contacto com o exterior	Diário Ocasional Nunca
Aptidão	Companhia Caça Guarda	Local de contacto com o exterior	Baldios Jardim público Praia outros
Raça	Definida Indefinida	Presença de ixodídeos no momento do rastreio	Sim Não
Profilaxia	Coleiras Pipetas “Sprays” Banhos	Frequência de parasitação por ixodídeos	Uma ocasião Duas ou mais ocasiões
Área de residência	Rural Urbana Sub-urbana	Cargas de parasitação por ixodídeos	Uma localização Duas localizações Generalizada
Concelho de residência	16 concelhos do distrito de Faro	Presença de doenças imunossupressoras	Sim Não
Tipo de Pelagem	Curta Longa Médio	Portador de Leishamnirose	Sim Não

Foi possível nesta dissertação estabelecer dependência entre os factores acima descritos e a seropositividade para os agentes infecciosos estudados neste trabalho, mediante o teste de qui-quadrado, demonstrando assim a existência de relações estatisticamente significativas para algumas delas, considerando um nível de significância de 5%, como se reconhece pelas seguintes tabelas.

**Tabela 17 – Demonstração de dependência de factores e a seropositividade para os agentes infecciosos no 1º trimestre.**

<b>Factores de risco</b>	<b>Seropositividade para febre botonosa</b>	<b>Seropositividade para ehrlichiose monocítica canina</b>	<b>Seropositividade para borreliose de Lyme</b>
Idade	Sim $p=0,026<0,05$	Não $p=0,359>0,05$	Não $p=0,568>0,05$
Sexo	Sim $p=0,03<0,05$	Não $p=0,365>0,05$	Não $p=0,653>0,05$
Aptidão	Não $p=0,177>0,05$	Não $p=0,679>0,05$	Não $p=0,321>0,05$
Raça	Não $p=0,120>0,05$	Não $p=0,464>0,05$	Não $p=0,506>0,05$
Profilaxia	Não $p=0,327>0,05$	Não $p=0,144>0,05$	Não $p=0,319>0,05$
Área de residência	Não $p<0,1$ $p=0,072>0,05$	Não $p=0,178>0,05$	Não $p=0,239>0,05$
Concelho de residência	Não $p=0,466>0,05$	Não $p=0,365>0,05$	Não $p=0,054>0,05$ $p>0,1$
Mudanças de residência	Não $p=0,92>0,05$	Não $p=0,146>0,05$	Não $p=0,377>0,05$
Tipo de Pelagem	Sim $p=0,037<0,05$	Não $p=0,0492>0,05$	Não $p=0,277>0,05$
Animais coabitantes	Não $p=0,391>0,05$	Não $p=0,373>0,05$	Não $p=0,250>0,05$
Frequência de contacto com o exterior	Não $p=0,463>0,05$	Não $p=0,367>0,05$	Não $p=0,633>0,05$
Local de contacto com o exterior	Não $P=0,138>0,05$	Não $p=0,238>0,05$	Não $p=0,377>0,05$
Presença de ixodídeos	Não $p>0,05$	Não $p>0,05$	Não $p>0,05$

**Tabela 17 (continuação) – Demonstração de dependência de factores e a seropositividade para os agentes infecciosos no 1º trimestre.**

<b>Factores de risco</b>	<b>Seropositividade para febre botonosa</b>	<b>Seropositividade para ehrlichiose monocítica canina</b>	<b>Seropositividade para borreliose de Lyme</b>
Frequência de parasitação por ixodídeos	Não $p=0,325>0,05$	Não $p=0,632>0,05$	Não $p=0,632>0,05$
Cargas de parasitação por ixodídeos	Não $p=0,378>0,05$	Não $p=0,568>0,05$	Não $p=0,568>0,05$
Portador de doenças imunossupressoras	Valor de teste não válido.	Valor de teste não válido.	Valor de teste não válido.
Portador de Leishmaniose.	Não $p=0,465>0,05$	Não $p=0,677>0,05$	Não $p=0,323>0,05$

**Tabela 18 – Demonstração de dependência de factores e a seropositividade para os agentes infecciosos no 2º trimestre.**

<b>Factores de risco</b>	<b>Seropositividade para febre botonosa</b>	<b>Seropositividade para ehrlichiose monocítica canina</b>	<b>Seropositividade para borreliose de Lyme</b>
Idade	Não $p<0,1$ $p=0,085>0,05$	Não $p=0,545>0,05$	Não $p=0,593>0,05$
Sexo	Não $p=0,343>0,05$	Não $p=0,372>0,05$	Não $p=0,298>0,05$
Aptidão	Não $p=0,39>0,05$	Sim $p=0,013<0,05$	Não $p<0,1$ $p=0,092>0,05$
Raça	Não $p=0,453>0,05$	Não $p=0,365>0,05$	Não $p=0,526>0,05$
Profilaxia	Não $p=0,219>0,05$	Não $p=0,55>0,05$	Não $p=0,463>0,05$

**Tabela 18 (continuação) – Demonstração de dependência de factores e a seropositividade para os agentes infecciosos no 2º trimestre.**

<b>Factores de risco</b>	<b>Seropositividade para febre botonosa</b>	<b>Seropositividade para ehrlichiose monocítica canina</b>	<b>Seropositividade para borreliose de Lyme</b>
Área de residência	Não $p=0,117>0,05$	Não $p=0,597>0,05$	Não $p=0,486>0,05$
Concelho de residência	Não $p=0,247>0,05$	Não $p=0,240>0,05$	Não $p<0,1$ $p=0,058>0,05$
Tipo de Pelagem	Não $p=0,270>0,05$	Não $p=0,383>0,05$	Não $p=0,695>0,05$
Animais coabitantes	Não $p=0,220>0,05$	Não $p=0,614>0,05$	Não $p=0,167>0,05$
Frequência de contacto com o exterior	Não $p=0,123>0,05$	Não $p=0,745>0,05$	Não $p=0,618>0,05$
Local de contacto com o exterior	Não $p=0,121>0,05$	Não $p=0,682>0,05$	Não $p=0,173>0,05$
Presença de ixodídeos	Não $p=0,567>0,05$	Não $p=0,554>0,05$	Não $p=0,671>0,05$
Frequência de parasitação por ixodídeos	Não $p=0,197>0,05$	Não $p=0,267>0,05$	Não $p=0,618>0,05$
Cargas de parasitação por ixodídeos	Não $p=0,19>0,05$	Não $p=0,256>0,05$	Não $p<0,1$ $p=0,55>0,05$
Presença de doenças imunossupressoras	Valor de teste não válido.	Valor de teste não válido.	Valor de teste não válido.
Portador de Leishmaniose.	Não $p=0,618>0,05$	Não $p=0,778>0,05$	Não $p=0,883>0,05$

**Tabela 19 – Demonstração de dependência de factores e a seropositividade para os agentes infecciosos no 3º trimestre.**

<b>Factores de risco</b>	<b>Seropositividade para febre botonosa</b>	<b>Seropositividade para ehrlichiose monocítica canina</b>	<b>Seropositividade para borreliose de Lyme</b>
Idade	Sim $p=0,024<0,05$	Não $p<0,1$ $p=0,054>0,05$	Não $p=0,670>0,05$
Sexo	Não $p=0,564>0,05$	Não $p<0,1$ $p=0,067>0,05$	Não $p=0,690>0,05$
Aptidão	Não $p=0,123>0,05$	Sim $p=0,003<0,05$	Não $p=0,110>0,05$
Raça	Não $p=0,327>0,05$	Não $p<0,1$ $p=0,061>0,05$	Não $p=0,680>0,05$
Profilaxia	Não $p=0,330>0,05$	Não $p=0,367>0,05$	Não $p=0,510>0,05$
Área de residência	Não $p=0,185>0,05$	Sim $p=0,033<0,05$	Não $p=0,485>0,05$
Concelho de residência	Não $p=0,361>0,05$	Sim $p=0,008<0,05$	Não $p<0,1$ $p=0,090>0,05$
Tipo de Pelagem	Não $p=0,374>0,05$	Não $p=0,248>0,05$	Não $p=0,586>0,05$
Animais coabitantes	Não $p=0,339>0,05$	Não $p=0,133>0,05$	Não $p=0,758>0,05$
Frequência de contacto com o exterior	Não $p=0,401>0,05$	Não $p=0,189>0,05$	Não $p=0,70>0,05$
Local de contacto com o exterior	Não $p=0,138>0,05$	Sim $p=0,041<0,05$	Não $p=0,44>0,05$
Presença de ixodídeos	Não $p=0,384>0,05$	Não $p=0,336>0,05$	Não $p=0,860>0,05$

**Tabela 19 (continuação) – Demonstração de dependência de factores e a seropositividade para os agentes infecciosos no 3º trimestre.**

<b>Factores de risco</b>	<b>Seropositividade para febre botonosa</b>	<b>Seropositividade para ehrlichiose monocítica canina</b>	<b>Seropositividade para borreliose de Lyme</b>
Frequência de parasitação por ixodídeos	Não $p=0,119>0,05$	Não $p=0,160>0,05$	Não $p=0,160>0,05$
Cargas de parasitação por ixodídeos	Não $p=0,269>0,05$	Não $p=0,271>0,05$	Não $p=0,190>0,05$
Presença de doenças imunossupressoras	Não $p=0,9>0,05$	Não $p=0,87>0,05$	Não $p=0,89>0,05$
Portador de Leishmaniose.	Não $p=0,359>0,05$	Não $p=0,397>0,05$	Não $p=0,880>0,05$

**Tabela 20 – Demonstração de dependência de factores e a seropositividade para os agentes infecciosos no 4º trimestre.**

<b>Factores de risco</b>	<b>Seropositividade para febre botonosa</b>	<b>Seropositividade para ehrlichiose monocítica canina</b>	<b>Seropositividade para borreliose de Lyme</b>
Idade	Sim $p=0,008<0,05$	Não $p=0,278>0,05$	Não $p>0,05$
Sexo	Não $p=0,175>0,05$	Não $p=0,439>0,05$	Não $p>0,05$
Aptidão	Não $p=0,430>0,05$	Não $p=0,458>0,05$	Não $p=0,140>0,05$
Raça	Não $p=0,290>0,05$	Não $p=0,563>0,05$	Não $p=0,650>0,05$
Profilaxia	Não $p=0,287>0,05$	Não $p=0,104>0,05$	Não $P=0,170>0,05$
Área de residência	Não $p=0,127>0,05$	Não $p=0,318>0,05$	Não $p=0,430>0,05$

**Tabela 20 (continuação) – Demonstração de dependência de factores e a seropositividade para os agentes infecciosos no 4º trimestre.**

<b>Factores de risco</b>	<b>Seropositividade para febre botonosa</b>	<b>Seropositividade para ehrlichiose monocítica canina</b>	<b>Seropositividade para borreliose de Lyme</b>
Concelho de residência	Sim $p=0,039<0,05$	Sim $p=0,029<0,05$	Não $p=0,610>0,05$
Mudança de residência	Não $p=0,489>0,05$	Não $p=0,265>0,05$	Não $p=0,820>0,05$
Tipo de Pelagem	Não $p=0,287>0,05$	Não $p=0,234>0,05$	Não $p=0,50>0,05$
Animais coabitantes	Não $p=0,306>0,05$	Não $p=0,414>0,05$	Não $p=0,570>0,05$
Frequência de contacto com o exterior	Não $p=0,247>0,05$	Não $p=0,812>0,05$	Não $p=0,457>0,05$
Local de contacto com o exterior	Não $p=0,249>0,05$	Não $p=0,334>0,05$	Valor de teste não válido.
Presença de ixodídeos	Não $p<0,1$ $p=0,084>0,05$	Sim $p=0,049<0,05$	Não $p=0,960>0,05$
Frequência de parasitação por ixodídeos	Não $p=0,498>0,05$	Não $p=0,595>0,05$	Não $p=0,820>0,05$
Cargas de parasitação por ixodídeos	Não $p<0,1$ $p=0,087>0,05$	Não $p=0,434>0,05$	Não $p=0,150>0,05$
Presença de doenças imunossupressoras	Valor de teste não válido.	Valor de teste não válido.	Valor de teste não válido.
Portador de Leishmaniose.	Não $p=0,587>0,05$	Não $p=0,579>0,05$	Não $p=0,880>0,05$

**Tabela 21 - Demonstração de dependência de factores e a seropositividade para os agentes infecciosos para a totalidade da amostra.**

<b>Factores de risco</b>	<b>Seropositividade para febre botonosa</b>	<b>Seropositividade para ehrlichiose monocítica canina</b>	<b>Seropositividade para borreliose de Lyme</b>
Idade	Sim $p=0,0008<0,05$	Sim $p=0,007<0,05$	Não $p=0,429>0,05$
Sexo	Não $P=0,482>0,05$	Não $p=0,115>0,05$	Não $p=0,419>0,05$
Aptidão	Não $P=0,108>0,05$	Sim $p=0,001<0,05$	Sim $p=0,013<0,05$
Raça	Não $P=0,347>0,05$	Não $p=0,165>0,05$	Não $p=0,623>0,05$
Profilaxia	Não $P=0,380>0,05$	Não $p=0,280>0,05$	Não $p=0,227>0,05$
Área de residência	Não $P=0,143>0,05$	Sim $p=0,018<0,05$	Não $p=0,556>0,05$
Concelho de residência	Não $P=0,183>0,05$	Não $p=0,132>0,05$	Não $p=0,134>0,05$
Mudanças de residência	Não $P=0,492>0,05$	Não $p=0,278>0,05$	Não $p=0,629>0,05$
Tipo de Pelagem	Não $P=0,308>0,05$	Não $p=0,135>0,05$	Não $p=0,306>0,05$
Animais coabitantes	Não $P=0,473>0,05$	Não $p=0,058>0,05$ $p<0,1$	Não $p=0,254>0,05$
Frequência de contacto com o exterior	Não $P=0,528>0,05$	Não $p=0,509>0,05$	Não $p=0,214>0,05$
Local de contacto com o exterior	Não $P=0,120>0,05$	Não, $p=0,075>0,05$ $p<0,1$	Não $p=0,451>0,05$
Presença de ixodídeos	Não $P=0,216>0,05$	Não $p=0,382>0,05$	Não $p=0,325>0,05$

**Tabela 21 (continuação)-Demonstração de dependência de factores e a seropositividade para os agentes infecciosos para a totalidade da amostra.**

Frequência de parasitação ixodídeos	de por	Não $P=0,453>0,05$	Não $p=0,224>0,05$	Não $p=0,214>0,05$
Cargas de parasitação ixodídeos	de por	Não $p=0,10>0,05$	Não $p=0,299>0,05$	Não $p=0,108>0,05$
Portador de Leishmaniose.	de	Não $p=0,290>0,05$	Não $p=0,091>0,05$ $p<0,1$	Não $p=0,577>0,05$

#### 2.1.4. Resultados do “Odds ratio”.

Na tentativa de melhor caracterizar os factores de risco, procederam-se aos cálculos do “Odds ratio” para os factores de risco para os quais se provou existir uma associação estatística com a seropositividade para uma das doenças.

**Tabela 22–Resultados do “Odds ratio” para os factores de risco para a febre botonosa.**

Factor de risco	1º trimestre	2º trimestre	3º trimestre	4º trimestre	Estatísticas globais
Idade	OR=4,780 Canídeos com idade superior a 2 anos tem mais 4,780 probabilidades de ser seropositivo.	-	OR=2,835 Canídeos com idade superior a 2 anos tem mais 2,835 probabilidades de ser seropositivo.	OR=4,244 Canídeos com idade superior a 2 anos tem mais 4,244 probabilidades de ser seropositivo.	OR=3,071 Canídeos com idade superior a 2 anos tem mais 3,071 probabilidades de ser seropositivo.

**Tabela 22 (continuação)–Resultados do “Odds ratio” para os factores de risco para a febre botonosa.**

<b>Factor de risco</b>	<b>1º trimestre</b>	<b>2º trimestre</b>	<b>3º trimestre</b>	<b>4º trimestre</b>	<b>Estatísticas globais</b>
Sexo	OR=2,127 Canídeos de sexo feminino tem mais 2,127 probabilidades de ser seropositivo.	-	-	-	-
Pelagem	OR=2,563 Canídeos com pelagem curta tem mais 2,563 probabilidades de ser seropositivo.	-	-	-	-

**Tabela 23–Resultados do “Odds ratio” para os factores de risco para a ehrlichiose monocítica canina.**

<b>Factor de risco</b>	<b>1º trimestre</b>	<b>2º trimestre</b>	<b>3º trimestre</b>	<b>4º trimestre</b>	<b>Estatísticas globais</b>
Aptidão	-	OR=41,00 Canídeos de caça tem mais 41,00 probabilidades de ser seropositivo.	OR=6,933 Canídeos de caça tem mais 6,933 probabilidades de ser seropositivo.	-	OR=3,625 Canídeos de caça tem mais 3,625 probabilidades de ser seropositivo.

**Tabela 23 (continuação) – Resultados do “Odds ratio” para os factores de risco para a ehrlichiose monocítica canina.**

<b>Factor de risco</b>	<b>1º trimestre</b>	<b>2º trimestre</b>	<b>3º trimestre</b>	<b>4º trimestre</b>	<b>Estatísticas globais</b>
Área de residência	-	-	OR=8,333 Canídeos de áreas rurais tem mais 8,333 probabilidades de ser seropositivo.	-	OR=2,797 Canídeos de áreas rurais tem mais 2,797 probabilidades de ser seropositivo.
Local de contacto com o exterior	-	-	OR=3,462 Canídeos que passeiam em áreas de baldios tem mais 3,462 de ser seropositivo	-	-
Presença de ixodídeos	-	-	-	OR=11,00 Canídeos parasitados por ixodídeos tem 11,00 mais probabilidades de ser seropositivo.	-

**Tabela 23 (continuação) – Resultados do “Odds ratio” para os factores de risco para a ehrlichiose monocítica canina.**

<b>Factor de risco</b>	<b>1º trimestre</b>	<b>2º trimestre</b>	<b>3º trimestre</b>	<b>4º trimestre</b>	<b>Estatísticas globais</b>
Idade	-	-	-	-	OR=8,390 Canídeos com idade superior a 2 anos tem 8,390 mais probabilidades de ser seropositivo.

**Tabela 24–Resultados do “Odds ratio” para os factores de risco para a borreliose de Lyme.**

<b>Factor de risco</b>	<b>1º trimestre</b>	<b>2º trimestre</b>	<b>3º trimestre</b>	<b>4º trimestre</b>	<b>Estatísticas globais</b>
Aptidão	-	-	-	-	OR=8,368 Canídeos de caça tem mais 6,933 probabilidades de ser seropositivo

#### **2.1.5. Demonstração de sazonalidade na variação de seroprevalências.**

Em relação à febre botonosa e a ehrlichiose monocítica canina demonstrou-se a não existência de uma relação estatisticamente significativa entre as variações da seroprevalência e a estação do ano, podendo-se afirmar que as diferenças existentes são devidas ao acaso e não ao factor estação do ano. Já em relação à borreliose de Lyme, o valor de teste estatístico foi considerado não válido devido ao baixo número de positivos registados que conduziram a que o número de valores esperados fosse inferior a 5 em todas as células, condição obrigatória verificar para validar este teste.

**Tabela 25 – Valores do teste estatístico qui-quadrado para a sazonalidade.**

Doença	febre botonosa	ehrlichiose monocítica canina	borreliose de Lyme
Sazonalidade na seroprevalência	$p = 1,584 > 0,05$	$p = 1,286 > 0,05$	Valor de $p$ não válido.

## 2.2 Estudo clínico

Paralelamente ao estudo epidemiológico, realizou-se um estudo clínico que consistiu na caracterização clínica de 55 canídeos presentes à consulta com um quadro sintomatológico compatível com o das doenças em estudo. Em todos eles realizaram-se exames hematológicos, tentativa de isolamento de *Rickettsia conorii* em “shell vial”, estudos serológicos por IFI, PCR a partir de “buffy coat” e sequenciação dos respectivos produtos amplificados.

### 2.2.1 Caracterização dos canídeos incluídos no estudo clínico.

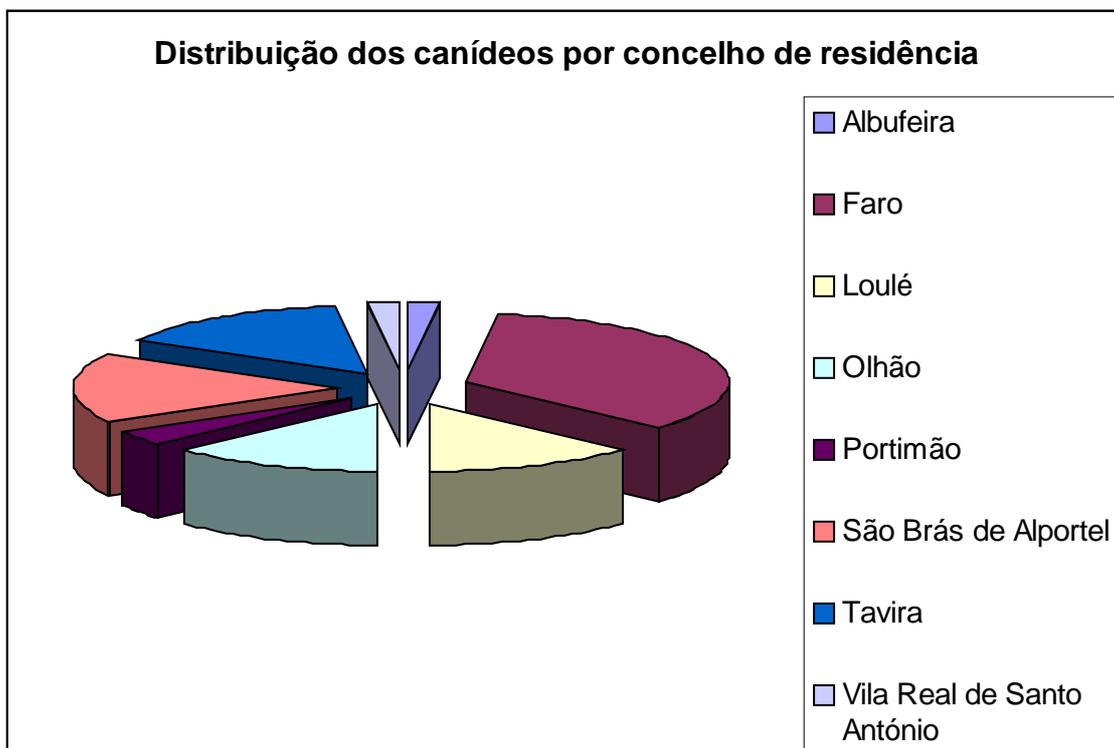
**Tabela 26 - Caracterização dos canídeos incluídos no estudo clínico.**

<b>Idade, n/ %</b>	23 canídeos tinham menos de 2 anos de idade/42%	32 canídeos tinham mais de 2 anos de idade/58%	
<b>Sexo, n/ %</b>	29 fêmeas/53%		26 machos/47%
<b>Raça, n/ %</b>	14 canídeos de raça indeterminada/25%		41 canídeos de raça definida/75%
<b>Aptidão, n/ %</b>	6 canídeos de caça/11%	43 canídeos de companhia/78%	6 canídeos de guarda/11%
<b>Área de residência, n/ %</b>	36 canídeos residiam em área rural/65%	11 canídeos residiam em área urbana/24%	6 canídeos residiam em área sub-urbana/11%

**Tabela 26 - Distribuição dos canídeos incluídos no estudo clínico por concelho de residência.**

Concelho de residência	n/%
Albufeira	1/2%
Faro	19/35%
Loulé	7/13%
Olhão	7/13%
Portimão	2/4%
São Brás de Alportel	9/16%
Tavira	8/15%
Vila Real de Santo António	1/2%
<b>Total</b>	<b>55/100%</b>

**Figura 5 – Distribuição dos canídeos incluídos no estudo clínico por concelho de residência.**



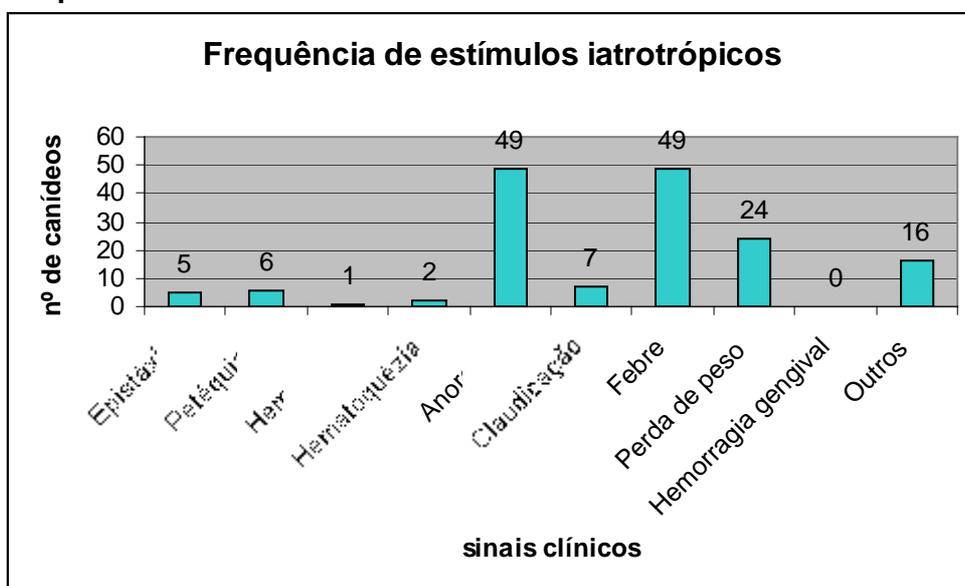
## 2.2.2 Quadros clínicos observados

Os canídeos presentes à consulta apresentando sinais clínicos sugestivos das três doenças abordadas nesta tese, foram sujeitos a exame clínico com o objectivo de se colherem todos os achados clínicos e apresentá-los de forma a conhecerem-se os quadros clínicos mais frequentemente associados aos agentes *E. canis*, *R. conorii* e *B. burgdorferi* s.l. Os sinais clínicos foram colhidos e registados em ficha de exame clínico em anexo.

**Tabela 28 – Distribuição dos diferentes sinais clínicos enquanto estímulos iatrotrópicos.**

Estímulo iatrotrópico	n/%
Anorexia	49/89%
Claudicação	7/13%
Febre	49/89%
Epistáxis	5/9%
Hematoquúzia	2/4%
Hematúria	1/2%
Hemorragia gengival	0/0%
Petéquias	6/11%
Perda de peso	24/44%
Outros	16/30%

**Figura 6 – Distribuição dos diferentes sinais clínicos enquanto estímulos iatrotrópicos.**



**Tabela 29-Distribuição da informação recolhida na história pregressa.**

<b>n=55</b>	<b>Sim (n/%)</b>	<b>Não (n/%)</b>
<b>Canídeos portadores de doença imunossupressora</b>	6/11%	49/89%
<b>Canídeos que faziam profilaxia de ixodídeos</b>	24/23,6%	31/77,4%
<b>Canídeos que apresentavam ixodídeos no momento do exame clínico</b>	23/42%	32/58%
<b>Canídeos, aos quais já tinham sido diagnosticados previamente uma das três doenças em estudo</b>	1/2%	54/98%
<b>Canídeos vacinados para borreliose de Lyme</b>	0/0%	55/100%

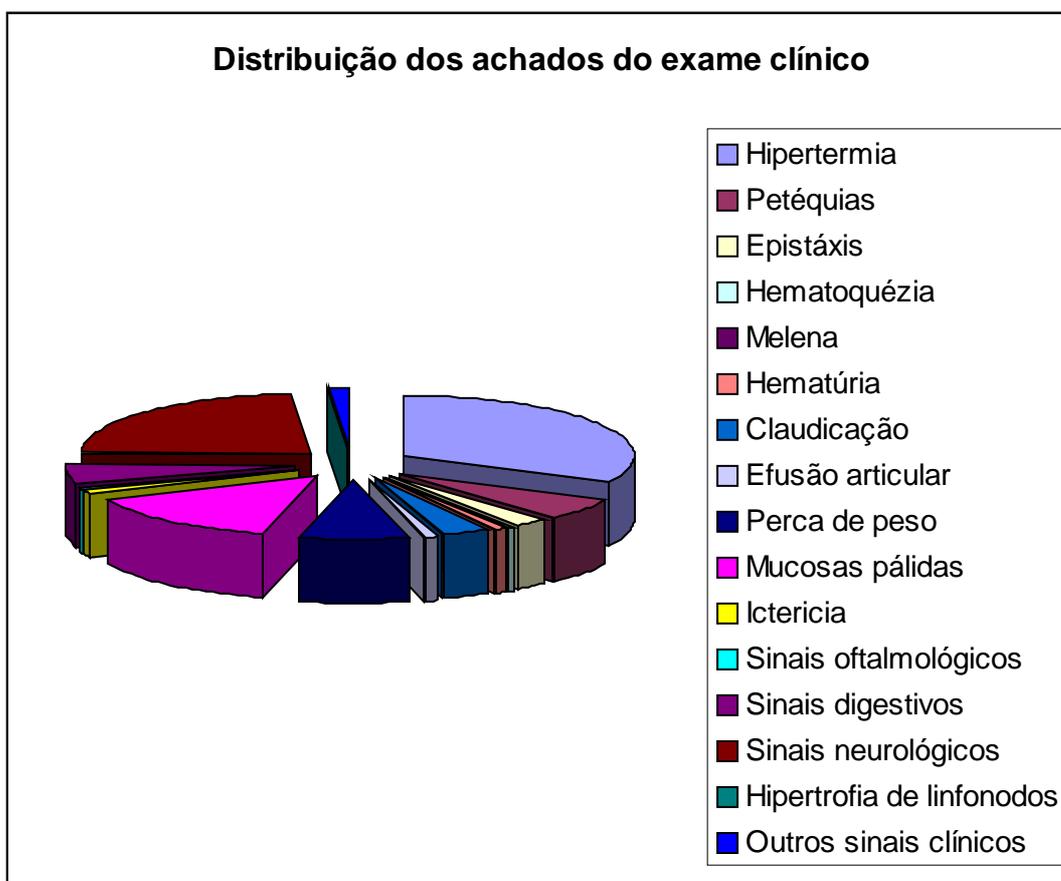
**Tabela 30 - Distribuição dos achados do exame clínico.**

<b>Sinais clínicos:</b>	<b>n/%</b>
<b>Hipertermia</b>	46/84%
<b>Petéquias</b>	8/15%
<b>Epistáxis</b>	3/5%
<b>Hematoquémia</b>	1/2%
<b>Melena</b>	0/0%
<b>Hematúria</b>	1/2%
<b>Claudicação</b>	5/9%
<b>Efusão articular</b>	1/2%
<b>Perda de peso</b>	11/20%
<b>Mucosas pálidas</b>	20/36%
<b>Icterícia</b>	2/4%
<b>Sinais oftalmológicos</b>	1/2%
<b>Sinais digestivos</b>	7/13%

**Tabela 30 (continuação)- Distribuição dos achados do exame clínico.**

Sinais clínicos:	n/%
Sinais neurológicos	0/0%
Hipertrofia de linfonodos	33/60%
Outros sinais clínicos	2/4%

**Figura 7 - Distribuição dos achados do exame clínico.**



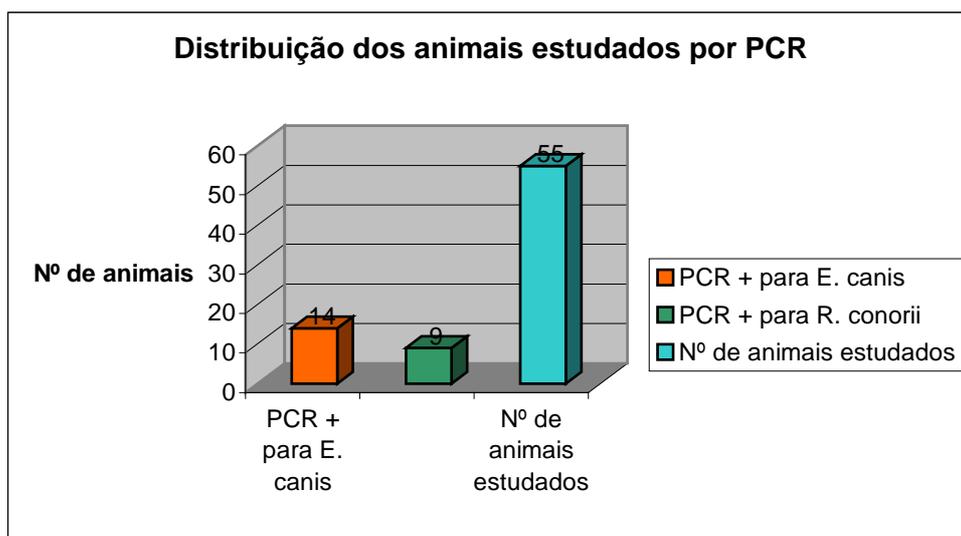
### 2.2.3 PCR.

Todos os 55 cães incluídos no estudo clínico foram estudados por PCR, tentando-se amplificar ADN de *R. conorii* e *E. canis*.

**Tabela 31 – Distribuição dos animais estudados por PCR.**

Agente infeccioso	<i>R. conorii</i>	<i>E. canis</i>	Total
Nº de animais positivos (n=55)	9 (16,3%)	14 (25,4%)	23(42%)

**Figura 8 – Distribuição dos animais estudados por PCR.**



#### 2.2.4 Comparação dos resultados de PCR com IFI.

Os resultados obtidos na investigação dos casos clínicos por PCR foram comparados com os resultados obtidos por IFI na tentativa de demonstrar a técnica de PCR enquanto meio de diagnóstico precoce.

**Tabela 32 – Comparação dos resultados obtidos por PCR com os obtidos por IFI.**

<b>Nº de animais positivos por PCR para <i>E. canis</i> (n=55)</b>	14	<b>Nº de animais positivos por PCR para <i>R. conorii</i> (n=55)</b>	9
<b>Nº de positivos por PCR seronegativos por IFI (%), (n=55)</b>	6 (48%)	<b>Nº de positivos por PCR seronegativos por IFI (%), (n=55)</b>	2 (22,2%)

#### 2.2.5 Sequenciação dos produtos de “PCR”.

Os segmentos de ADN amplificadas por “PCR” utilizando os primers acima descritos para *R. conorii* e *E. canis* foram sequenciados de modo a que a sequência de nucleótidos produzida, foi introduzida na base de dados Genbank obtendo-se os seguintes resultados:

**Tabela 33 - Resultados da sequenciação dos amplicons de ADN, utilizando os “primers” descritos.**

n	Espécie sequenciada
9	<i>Rickettsia spp.</i>
10	<i>Ehrlichia canis</i>

### 2.2.6 Isolamento de agentes infecciosos

O isolamento de *R. conorii* foi tentado sem sucesso, em 55 animais.

### 2.2.7 Hemograma

Através do hemograma foi possível medir vários parâmetros hematológicos referidos em 3.2. Os dados provenientes de 55 hemogramas realizados em igual número de canídeos, foram tratados estatisticamente através de medidas de localização e dispersão, de forma a resumir o grande volume de dados produzidos.

**Tabela 34- Estatística descritiva dos vários parâmetros de hemograma estudados.**

Parâmetro estudado	Media	Desvio padrão	Valor mínimo	Valor máximo	n	Mediana	Moda
Nº total de eritrócitos (x10 <sup>6</sup> /µl)	4,31	1,59	0,81	7,37	55	4,8	4,01
Nº total de leucócitos (x10 <sup>3</sup> /µl)	8,49	6,73	0,28	44,02	55	6,1	6,1
Valor de hematócrito (%)	30,27	11,19	7,4	54,5	55	30,7	30
Hemoglobina (g/dl)	10,45	3,98	1,7	17,3	55	10,8	7
Nº total de plaquetas (x10 <sup>3</sup> /µl)	90,83	47,77	29	221	55	78	102
Volume globular médio – MCV (fl)	71,20	7,64	60,5	107,2	55	69,65	74
Concentração da hemoglobulina globular média – MCHC (g/dl)	33,59	3,72	23	42,4	55	33,5	36,1

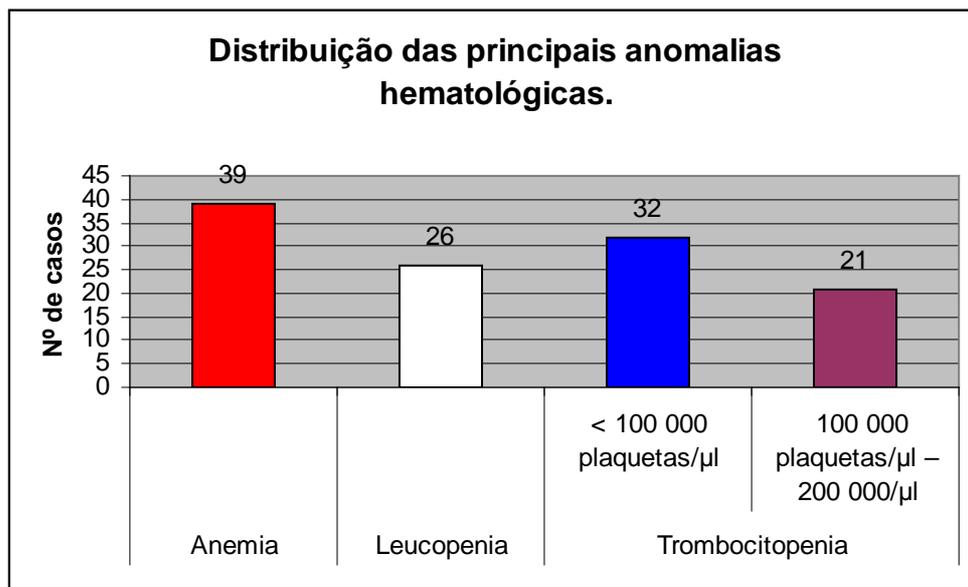
**Tabela 34 (continuação) - Estatística descritiva dos vários parâmetros de hemograma estudados.**

<b>Hemoglobina globular média - MCH (pg)</b>	24,12	3,04	19,4	35,5	55	23,85	21,9
<b>Volume plaquetar médio - MPV (fl)</b>	11,47	1,68	6,9	15	55	11,4	12
<b>Contagem de neutrófilos (<math>\times 10^3/\mu\text{l}</math>)</b>	4,61	3,59	0,05	19,26	55	3,95	8,88
<b>Contagem de linfócitos (<math>\times 10^3/\mu\text{l}</math>)</b>	2,57	3,71	0,08	21,34	55	1,22	0,22
<b>Contagem de monócitos (<math>\times 10^3/\mu\text{l}</math>)</b>	1,47	2,27	0,00	14,27	55	0,9	0,9
<b>Contagem de eosinófilos (<math>\times 10^3/\mu\text{l}</math>)</b>	0,12	0,12	0,00	0,46	55	0,09	0,01
<b>Contagem de basófilos (<math>\times 10^3/\mu\text{l}</math>)</b>	0,01	0,015	0,00	0,05	55	0,00	0,00

**Tabela 35 - Distribuição das principais anomalias hematológicas reveladas por hemograma.**

<b>N=55</b>	<b>Anemia (<math>&lt; 5,5 \times 10^6</math> eritrócitos/<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>Leucopenia (<math>&lt; 6\ 000</math> leucócitos/<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>Trombocitopenia (<math>&lt; 200\ 000</math> plaquetas/<math>\mu\text{l}</math>)</b>	
			<b><math>&lt; 100\ 000</math> plaquetas/<math>\mu\text{l}</math></b>	<b><math>100\ 000</math> plaquetas/<math>\mu\text{l}</math> - <math>200\ 000/\mu\text{l}</math></b>
<b>n/ %</b>	39/71%	26 /47%	32/58%	21/38%
			53/96%	

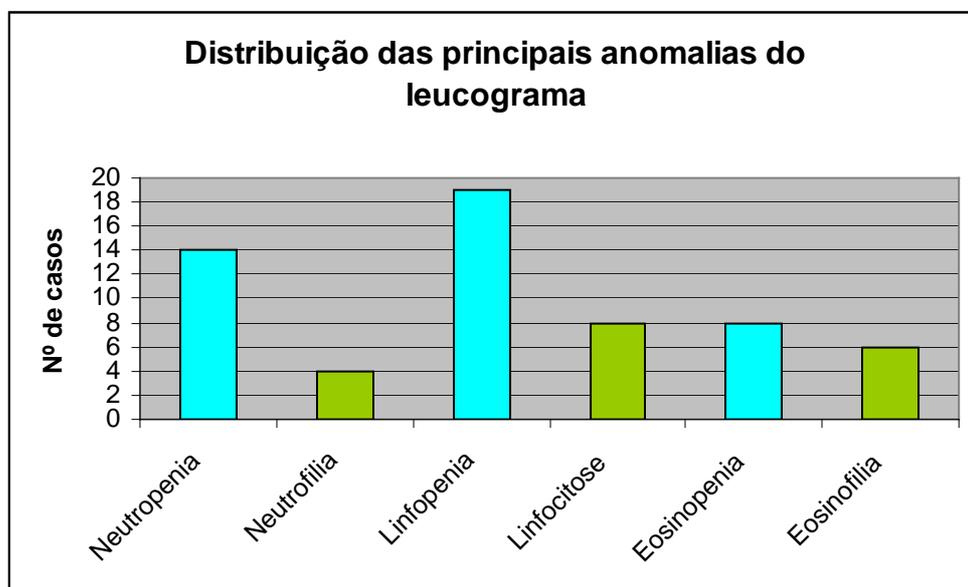
**Figura 9 – Distribuição das principais anomalias hematológicas.**



**Tabela 36– Distribuição das principais anomalias do leucograma.**

n=55	Neutropenia	Neutrofilia	Linfopenia	Linfocitose	Eosinopenia	Eosinofilia
n/ %	14/25%	4/7%	19/35%	8/15%	8/15%	6/11%

**Figura 10 – Distribuição das principais anomalias do leucograma.**



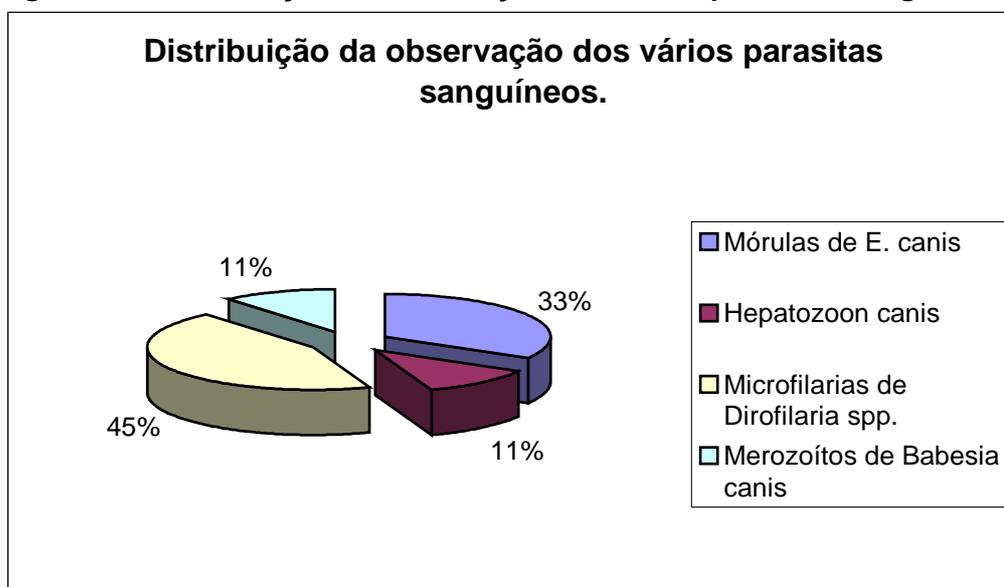
### 2.2.8 Visualização de agentes infecciosos em esfregaço sanguíneo.

Em todos os canídeos incluídos neste estudo clínico realizaram-se esfregaços sanguíneos, verificando-se os seguintes resultados.

Tabela 37 – Distribuição da observação dos vários parasitas sanguíneos.

Agente infeccioso	Mórulas de <i>E. canis</i>	<i>Hepatozoon canis</i>	Microfíliarias de <i>Dirofilaria spp.</i>	Merozoítos de <i>Babesia canis</i>	Total
Nº de esfregaços em que se observou agentes infecciosos/ % (n=55)	3/ 5,4%	1/ 1,8%	4/ 7,27%	1/1,8%	9/ 16,3%

Figura 11 – Distribuição da observação dos vários parasitas sanguíneos.



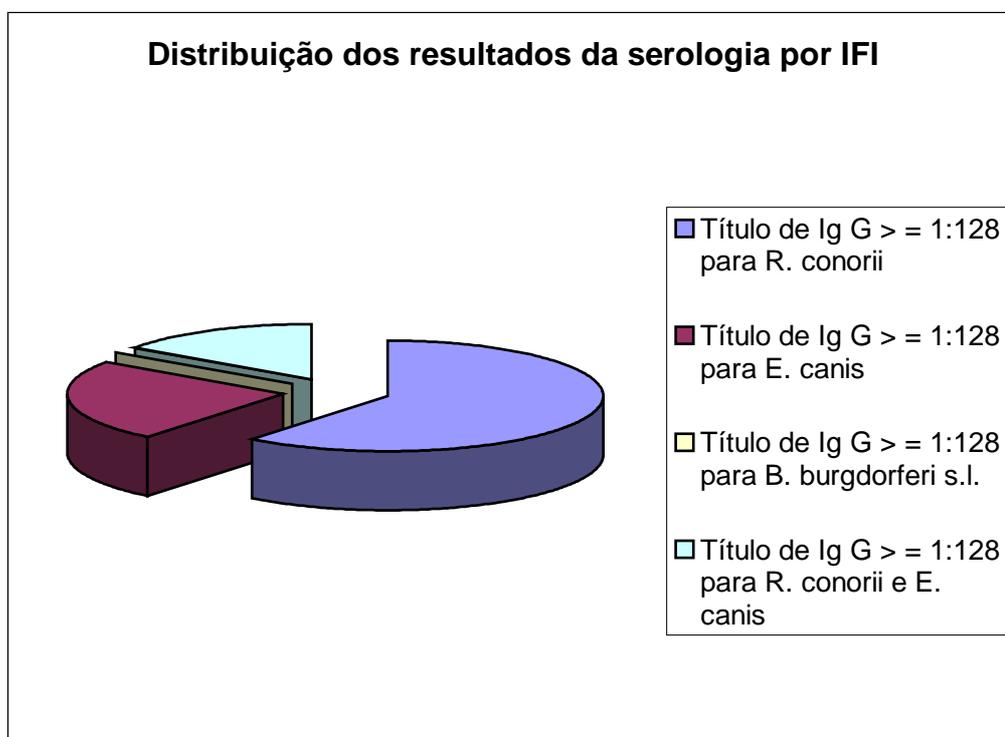
## 2.2.9 Imunofluorescência indirecta (IFI)

A todos canídeos incluídos neste estudo clínico foram realizados exames serológicos por IFI, com o objectivo de se determinar a seropositividade para os agentes em estudo. Os resultados por IFI foram os seguintes:

**Tabela 38 – Distribuição dos resultados por IFI.**

n=55	Título de Ig G $\geq 1:128$ para <i>R. conorii</i>	Título de Ig G $\geq 1:128$ para <i>E. canis</i>	Título de Ig G $\geq 1:128$ para <i>B. burgdorferi s.l.</i>	Título de Ig G $\geq 1:128$ para <i>R. conorii</i> e <i>E. canis</i>
N/ %	28/51%	11/20%	0/0%	7/13%

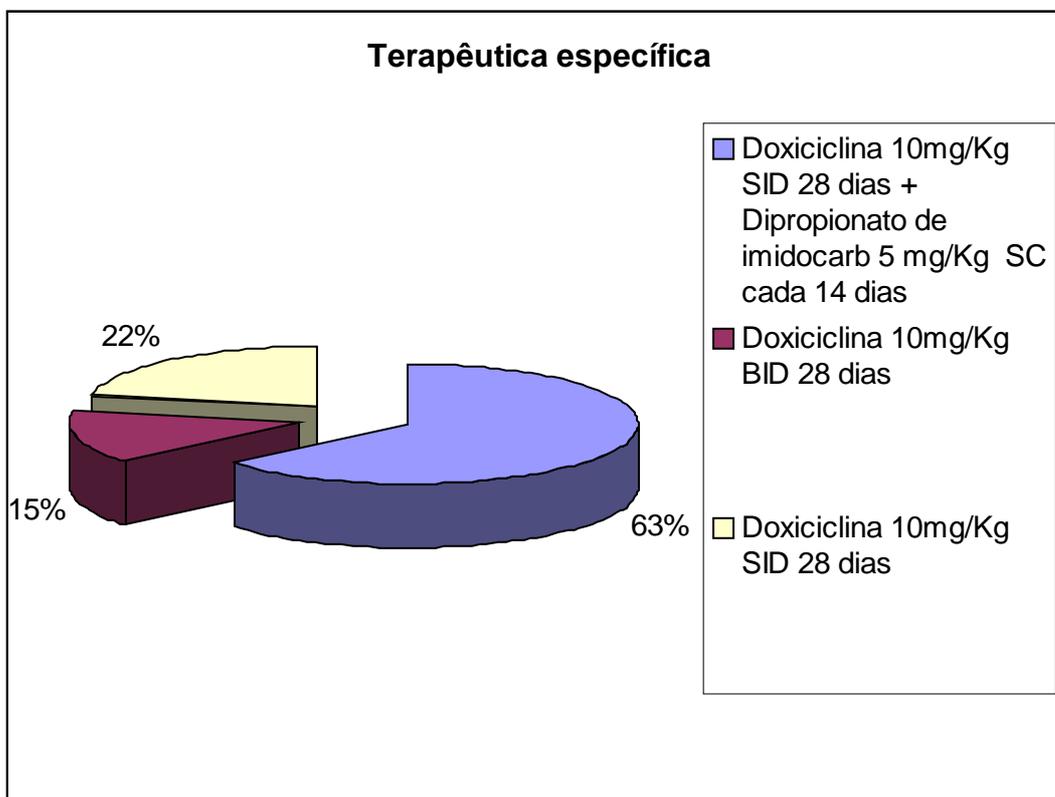
**Figura 12 – Distribuição dos resultados de serologia por IFI em animais presentes à consulta.**



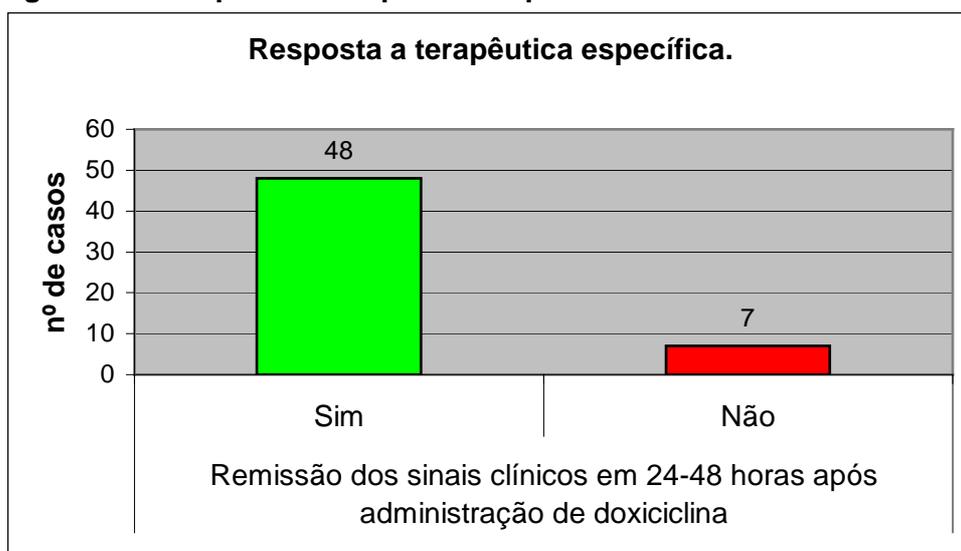
### 2.2.10 Terapêutica específica.

Em todos os canídeos incluídos no estudo clínico, foi instituída terapêutica segundo diferentes protocolos, observando-se as seguintes frequências.

**Figura 13 – Distribuição dos vários protocolos terapêuticos utilizados no estudo clínico.**



**Figura 14 – Resposta a terapêutica específica.**



## 2.2.11 Outros procedimentos

Em alguns dos canídeos, foi possível realizar um perfil bioquímico de modo a avaliar as funções renais e hepáticas, assessoriamente executaram-se medições da albumina, globulinas e proteínas totais. Nos canídeos incluídos neste estudo, que morreram no decurso do mesmo foram sujeitos necrópsia registando-se as alterações a nível histológico.

**Tabela 39-Distribuição das alterações de perfil bioquímico**

Nº de perfis bioquímicos realizados.	n=19	%
Elevação de BUN (27,0mg/dl) e Creatinina (>1,80mg/dl)	1	5%
Elevação de ALT (>100U/L)	4	21%
Elevação de ALKP (>212U/L)	1	5%
Hipoalbuminémia (<2,70 g/dl)	13	68%
Hiperproteínémia (>8,20g/dl)	3	16%
Hiperglobulinémia (>4,50g/dl)	11	58%

Durante o estudo clínico realizaram-se três necrópsias, onde foram colhidos pedaços de fígado, baço, pulmão e linfonodo para exame histopatológico. Entre as alterações histológicas observadas registaram-se as seguintes:

**Tabela 40-Alterações histológicas dos órgão colhidos em necrópsia.**

Orgão	Canídeo 1 – “PCR” positivo para <i>E. canis</i> e negativo para <i>R. conorii</i> .	Canídeo 2- “PCR” negativo para <i>R. conorii</i> e <i>E. canis</i>	Canídeo 3-“PCR” negativo para <i>R. conorii</i> e <i>E. canis</i>
Baço	Hiperplasia inflamatória linfoplasmocitária	Hiperplasia inflamatória linfoplasmocitária.	Imagens de eritrofagocitose. Hipoplasia da polpa branca.
Fígado	Congestão. Degenerescência vacuolar dos hepatócitos.	Lesões de hepatite focal necrótica.	Congestão. Degenerescência vacuolar dos hepatócitos

**Tabela 40 (continuação)-Alterações histológicas dos órgão colhidos em necrópsia.**

<b>Orgão</b>	<b>Canídeo 1 – “PCR” positivo para <i>E. canis</i> e negativo para <i>R. conorii</i>.</b>	<b>Canídeo 2- “PCR” negativo para <i>R. conorii</i> e <i>E. canis</i></b>	<b>Canídeo 3-“PCR” negativo para <i>R. conorii</i> e <i>E. canis</i></b>
Pulmão	Congestão e hemorragia. Proliferação de células mononucleadas nos septos interalveolares.	Congestão e hemorragia.	Congestão e edema alveolar.
Linfonodo	Congestão e hemorragia. Imagens de eritrofagocitose. Ligeira hiperplasia linfocitária.	hiperplasia folicular linfocitária inflamatória.	Congestão e hemorragia.

## **V–Discussão de resultados.**

Antes da descrição do trabalho realizado, foi considerado de interesse que na presente dissertação constasse um enquadramento teórico ao tema abordado. Assim, apresentou-se uma revisão bibliográfica no âmbito das três doenças estudadas abordando aspectos como o diagnóstico laboratorial, epidemiologia, quadro clínico e terapêutica específica. A bibliografia citada constou de documentos clássicos e de alguns trabalhos mais recentes, que contêm contribuições significativas ao tema.

### **Ixodídeos**

Durante o período em que decorreu a fase experimental desta dissertação, todos os ixodídeos colhidos foram identificados como *Rhipicephalus sanguineus*, facto esperado se tivermos em conta que todos as colheitas foram executadas em canídeos do Sul do país. Existem vários estudos que vão de encontro aos resultados apresentados nesta dissertação. Papazahariadou et al (2003) demonstraram que 90,3% dos ixodídeos colhidos em canídeos pertenciam a espécie *R. sanguineus*. Bacellar et al (1991) demonstraram que de todos os ixodídeos colhidos no sul do país em mamíferos domésticos, 60% pertenciam a espécie *R. sanguineus*. Outro facto que suporta a existência desta espécie no Algarve, relaciona-se com as condições climáticas presentes nesta região que se aproximam das ideais para esta espécie de ixodídeos, nomeadamente uma temperatura média anual que oscila entre os 15°C e os 18°C (iFrance, 2004), valores compreendidos entre a temperaturas médias mínimas e máximas consideradas ideais para *R. sanguineus* (Caeiro, 1992).

O número e os diferentes estádios desta espécie colhidos ao longo das quatro estações permitiu evidenciar uma evolução compatível com o que seria de esperar para a dinâmica de populações observada e descrita para *R. sanguineus* na área do Mediterrâneo. A ausência de colheita de ixodídeos no Outono prende-se com o facto de as colheitas se terem realizado no final de Novembro e Dezembro, meses onde as temperaturas induzem a diapausa nesta espécie de ixodídeo. Durante o Inverno foi possível colher *R. sanguineus*; esta colheita deu-se nos meses de Fevereiro e Março, período onde no Algarve se regista uma temperatura adequada à actividade dos adultos, suportando os resultados obtidos por Gilot et al (1990) que indicam a existência de condições climáticas na bacia do Mediterrâneo, para a actividade de *R. sanguineus* entre os meses de Fevereiro e Novembro. Durante os meses de Primavera e Verão, como seria de esperar, foram colhidos a maioria dos ixodídeos, respectivamente 29% e 48% do total dos ixodídeos. A presença de ninfas e larvas, foi notada apenas na Primavera e Verão, contribuindo as ninfas para 57% dos ixodídeos colhidos neste último período, facto já demonstrado por Gilot et al (1990) que localizaram o pico de actividade dos estádios imaturos (larvas e ninfas) nos meses

compreendidos entre Julho e Setembro, enquanto os adultos desta espécie são mais activos e numerosos nos meses de Primavera.

Em relação ao teste de hemócitos, observaram-se “rickettsia like organisms-RLO” em 2,3% dos ixodídeos estudados, valor ligeiramente mais elevado do registado por Bacellar et al (2003) que em 3000 ixodídeos do complexo *R. sanguineus* colhidos em Portugal, apenas 1,6% destes ixodídeos apresentavam um teste de hemócitos considerado positivo.

Para rickettsias do grupo das febres exantemáticas foi possível determinar a sua prevalência de infecção utilizando o par de “primers” RpCs877p e RpCS1258n amplificados por PCR. Nos ixodídeos estudados determinou-se uma prevalência de infecção de 22,2% para as rickettsias do grupo referido anteriormente, valor acima do esperado para a região do Mediterrâneo se comparado com o rastreio efectuado por Psaroulaki et al (2003) em ixodídeos do complexo *R. sanguineus* capturados na província de Fokida-Grécia em que a prevalência de infecção calculada foi de 1,6% em 439 ixodídeos. A prevalência de infecção por *E. canis* na amostra de ixodídeos estudada por PCR, foi calculada em 2,2%, valor inferior ao registado (8,5%) por Felek et al (2003) em *R. sanguineus* colhidos de canídeos do estado de Oklahoma-EUA, desconhecendo-se porém se estes valores estão acima ou abaixo do esperado para a região Mediterrânica, uma vez que não existem estudos publicados visando a prevalência de infecção de *R. sanguineus* por *E. canis*. Nos ixodídeos estudados por “PCR”, não se amplificou ADN de *Borrelia burgdorferi s.l.* Este facto já era esperado, uma vez que só foram colhidos ixodídeos da espécie *R. sanguineus*, espécie nunca incluída até ao momento no conjunto de vectores desta espiroqueta. Estrada-Peña et al (1995), estudaram por IFI a hemolinfa de diversas espécies de ixodídeos nas quais se incluíam 835 *R. sanguineus* e concluiu pelos mesmos valores de prevalência para *B. burgdorferi s.l.* demonstrados nesta dissertação. Em Portugal, Núncio (2001), tentou isolar e cultivar *B. burgdorferi s.l.* sem sucesso a partir 221 *R. sanguineus* capturados em canídeos. Na tentativa de melhor caracterizar os segmentos de ADN amplificados por “PCR”, estes deveriam ter sido sequenciados com objectivo de identificar espécies envolvidas, sendo sobretudo importante para diferenciar as várias espécies de rickettsias patogénicas das não patogénicas. A presença de rickettsias não patogénicas, como *R. massilae* e Bar 29 em *R. sanguineus*, tem sido documentada por vários autores (Bacellar et al, 1995; Bacellar, 1996; Psaroulaki, 2003), o que nos leva a supor que a prevalência de infecção para *R. conorii* em ixodídeos poderá estar sobrestimada devido à possibilidade de amplificação de ADN de rickettsias não-patogénicas pelo par “primers”.

## Estudo epidemiológico

As seroprevalências para cada uma das doenças foram estimadas globalmente e trimestralmente, tentando-se estabelecer adicionalmente um padrão de sazonalidade para estes últimos valores.

Os valores estimados de seroprevalência para a febre botonosa calculados na totalidade e trimestralmente ficaram abaixo do valor de 84,6% encontrado por Bacellar et al (1995) numa população de canídeos do canil de Setúbal. Existem vários factores que podem explicar esta diferença, entre eles o limiar de positividade (1/128-IgG) para IFI que nesta dissertação foi superior ao utilizado pelos referidos autores (1/64). O valor de 1/128 é aconselhado pela ESCMID (Brouqui *et al*, 2004), na tentativa de a este título se diminuir as reacções cruzadas entre as várias espécies de rickettsias não patogénicas e *R. conorii*. Os canídeos incluídos na amostra estudada são provenientes de uma população medicalizada onde uma grande maioria (82,8% dos 400 canídeos) faz profilaxia de ixodídeos sob diversas formas, em oposição aos canídeos estudados por Bacellar et al (1995) que são provenientes de uma população de canídeos errantes, mais expostos a ixodídeos e não medicalizados, explicando-se deste modo as diferenças existentes ao nível da seroprevalência.

A existência de factores de risco para a seropositividade foi testada utilizando o teste de qui-quadrado, sendo possível determinar estatisticamente uma dependência de variáveis entre o sexo, a idade, a pelagem e a seropositividade para febre botonosa, no primeiro trimestre. Em relação ao terceiro e quarto trimestre estabeleceu-se uma dependência de variáveis entre o factor idade e a seropositividade para febre botonosa o mesmo acontecendo para a totalidade dos animais rastreados. No quarto trimestre foi ainda possível estabelecer uma associação entre a variável concelho de residência e a seropositividade para febre botonosa.

O estabelecimento de uma associação entre o factor sexo e a seroprevalência da febre botonosa foi apenas estabelecida no primeiro trimestre, não tendo sido descrito como um factor de risco para a febre botonosa nos dados publicados até ao momento, devemos porém interpretar esta associação com alguma reserva devido a assimetria existente na amostra estudada para os dois sexos (65 machos e 35 fêmeas).

A existência de uma associação entre o tipo de pelagem e o estado serológico do canídeo não tinha sido estabelecida nos rastreios serológicos realizados anteriormente em populações de canídeos. A análise estatística demonstrou a existência de uma seroprevalência superior nos animais de pelo curto e médio, que teremos que interpretar com cautela devido ao baixo número de animais de pêlo longo (apenas 12) incluídos na amostra quando comparados com os canídeos de pêlo curto e médio (respectivamente 52 e 34). Esta associação foi apenas demonstrada num trimestre, não se repetindo nos restantes trimestres e na análise global de dados. Contudo é possível que os ixodídeos tenham mais dificuldades em fixar-se em canídeos de pêlo longo, devido a preferência deste artrópodes por se fixarem em zonas glabras e é provável por essa razão que as cargas parasitárias de ixodídeos sejam mais elevadas em canídeos de pêlo curto explicando-se desta forma os valores mais elevados de seroprevalência neste grupo de canídeos.

A associação entre o factor idade e seropositividade demonstrada pela análise estatística, permitiram concluir que a frequência de seropositivos nos canídeos com idade superior a dois anos é estatisticamente superior aos de idade inferior a dois anos sendo considerado por isso um factor de risco (OR=4,780, OR=4,244, OR=3,071, OR=2,835), relação já anteriormente demonstrada em rastreios anteriormente realizados em outros países (Delgado e Carmenes, 1992; Melgrati *et al*, 2000). Pensamos que a existência desta dependência de variáveis está relacionada com um maior número de oportunidades de exposição ao agente, pela razão que à medida que a idade do canídeo aumenta, os períodos de exposição ao vector serão na sua totalidade cada vez maiores e as oportunidades de exposição ao agente serão igualmente superiores, explicando-se assim uma maior seroprevalência nos canídeos com idade superior a dois anos.

No quarto trimestre estabeleceu-se uma associação estatística entre o factor concelho de residência e o estado serológico dos canídeos para febre botonosa, que se interpreta com reserva pela razão de que 75% dos canídeos incluídos nesta amostra pertencem a quatro concelhos (Faro, Loulé, Olhão e Tavira), facto que retrata com fidelidade o que se passa na população em estudo, onde a grande maioria dos canídeos residem nos concelhos do sotavento algarvio, não sendo por isso de atribuir grande relevo e daí tirar conclusões que se direccionam para uma maior de seroprevalência nestes quatro concelhos em relação aos restantes.

A inexistência de uma associação entre factores como a aptidão (nomeadamente a aptidão de trabalho), área residência (rural, urbana, sub-urbana) e valores de seroprevalência não foi demonstrada neste estudo ao contrário de outros autores (Delgado e Carmenes, 1992; Melgrati *et al*, 2000) em cujos estudos se determinaram valores de

seroprevalência para febre botonosa estatisticamente superiores e dependentes das variáveis aptidão trabalho e residência em áreas rurais. Contudo Estrada-Peña (2004), nos seus estudos sobre distribuição e biótopos preferidos de *R. sanguineus*, refere a existência de condições ecológicas para o desenvolvimento desta espécie não só em áreas rurais mas também em áreas urbanas, nomeadamente em locais que são comuns no interior das cidades tais como jardins (públicos ou privados) e parques, suportando os nossos resultados em que é possível o contacto entre canídeos de companhia de áreas urbanas e *R. conorii* e a posterior seroconversão, conduzindo a valores de seroprevalência nestas populações que se aproximam dos encontrados em populações rurais ou sub-urbanas. A nossa experiência pessoal e conhecimento que temos das cidades desta região, comprovam a existência de áreas de baldios (onde predominam os estratos arbustivos e herbáceos) no interior das mesmas, adequadas ao desenvolvimento e contacto com populações de *R. sanguineus* sendo por isso possível aos canídeos de origem urbana seroconverterem para *R. conorii*.

Ao longo dos quatro trimestres as diferenças existentes nas seroprevalências de febre botonosa não foram consideradas estatisticamente significativas para um nível de significância 5%, ( $p=1,584>0,05$ ), concluindo-se pela inexistência de sazonalidade na seroprevalência de febre botonosa. Tesouro et al (1998), demonstraram que nos canídeos, após contacto com *R. conorii*, os títulos de anticorpos podem persistir até 750 dias anulando não só a seronegativação que se daria nos meses de menor exposição a *R. sanguineus* (compreendidos entre Fevereiro e Novembro) mas também as diferenças na seroprevalência existentes entre as diferenças estações do ano (Gilot et al, 1990).

As seroprevalências trimestrais e total de ehrlichiose monocítica canina, situaram-se abaixo dos valores registados para outras populações de canídeos da área do Mediterrâneo. Em Portugal, os rastreios realizados previamente nos anos 90 por Silveira (1992) e Bacell ar (1995), documentaram níveis de seroprevalência de respectivamente 44,4% e 54,5%. As diferenças registadas entre estes valores e os apresentados nesta dissertação derivam sobretudo destes autores incluírem na amostra rastreada canídeos errantes provenientes de canis municipais que não realizavam profilaxia de ixodídeos e que apresentavam um contacto com os biótopos dos vectores mais intenso, enquanto a amostra sujeita a rastreio nesta dissertação é proveniente de uma população medicalizada, heterogénea nas suas aptidões e constituída por animais residentes em zonas urbanas, sub-urbanas e rurais que realizavam profilaxia de ixodídeos em 82,6% dos casos no momento do rastreio. É um facto conhecido que populações medicalizadas apresentam níveis de seroprevalência inferiores aqueles registados para populações em risco, como são os cães de caça e os cães errantes. Tomando como exemplo vários estudos: Sainz et al (1995) registaram

seroprevalências de 2,29% numa população de cães polícias que fazia profilaxia de parasitas externos com regularidade, enquanto a seroprevalência em 2077 cães do Exército Americano foi de 11% (Harrus *et al*, 1997a), o que nos leva a concluir que as populações de canídeos que cumprem programas de saúde preventiva apresentam valores de seroprevalência mais baixas do que a população em geral. Como limiar de positividade utilizou-se o título de 1/128 (considerado por Davoust *et al* como um título moderadamente positivo) em oposição aos títulos de 1/40 e 1/64 utilizados pelos rastreios referidos anteriormente, factor que contribui obviamente para as diferenças observadas.

A análise estatística dos dados permitiu estabelecer várias associações estatísticas entre os factores testados e a seropositividade para *E. canis*. A dependência entre seropositividade para *E. canis* e o factor de risco aptidão do animal (OR=6,933, OR=3,625,) foi demonstrada na análise dos dados epidemiológicos colhidos no terceiro trimestre e adicionalmente na análise global de dados. Nos períodos referidos anteriormente os canídeos pertencentes à aptidão caça evidenciaram uma seroprevalência estatisticamente superior às demais aptidões (companhia e guarda), tal como já tinha sido demonstrado por Sainz *et al* (1996) em estudo semelhante, facto provavelmente relacionado com um maior risco de contacto com os vectores e seus biótopos. No terceiro trimestre e na análise global de dados, observaram-se seroprevalências mais elevadas nos canídeos que residiam em áreas rurais relativamente aos que residiam em áreas urbanas e sub-urbanas, provavelmente devido ao maior risco de exposição a ixodídeos que se observa nas áreas rurais. O concelho de residência foi também incluída entre as variáveis que influenciavam o estado serológico dos canídeos no terceiro e quarto trimestre, tal como em outras associações estatísticas feitas anteriormente para os mesmos factores temos que manter a mesma reserva, pela razão de que as seroprevalências mais elevadas registam-se em apenas quatro concelhos (Faro, Loulé, São Brás de Alportel e Tavira) que constituem 82% dos canídeos da amostra. Esta situação verifica-se porque a maioria das clínicas que forneceram os registos clínicos, tem como área de influência os concelhos referidos anteriormente. Factores como o local de contacto com o exterior (OR=3,462), idade (OR=8,390) e a presença de ixodídeos (OR=11,00), foram também classificados como factores de risco no terceiro trimestre, quarto trimestre e na análise global dos dados. No primeiro caso verificou-se uma maior seroprevalência nos animais que passeavam regularmente em baldios (12,8%) em oposição aos que passeavam no jardim público (8%) o que está provavelmente relacionado com um maior risco de exposição ao vector no biótopo baldio. Em relação ao factor idade observou-se uma maior seroprevalência em canídeos com idade superior a dois anos de idade, o que estará relacionado, tal como se reconhece para a febre botonosa, com uma maior número de oportunidades de exposição ao vector *R. sanguineus*. A associação do factor presença de ixodídeos a uma maior seroprevalência

para *E. canis*, demonstrada por esta dissertação, não tem grande relevância uma vez que os rastreios são estudos epidemiológicos transversais, em que a observação de determinadas características se restringe a um ponto no tempo ou seja através desta evidência não se invalida o contacto anterior com ixodídeos. Contudo o parasitismo por *R. sanguineus* foi reconhecido como factor de risco apenas em populações hospitalares (Trapp *et al*, 2002).

Apesar de o vector *R. sanguineus* ser comum aos agentes *R. conorii* e *E. canis*, a análise estatística produziu diferenças sobretudo ao nível dos factores de risco relacionados directamente ou indirectamente com a exposição ao vector. Assim para a febre botonosa não se verificou uma associação estatística entre a aptidão caça, a residência em áreas rurais e a seroprevalência para esta doença. Pelo contrário, para ehrlichiose monocítica canina verificou-se uma associação estatística para aqueles factores de risco anteriormente referidos o que nos leva a supôr a possibilidade de existência de diferenças de prevalência de infecção por *E. canis* entre as populações de ixodídeos de áreas urbanas e áreas rurais.

Neste estudo não se verificaram diferenças significativas na seroprevalência para o factor raça, apesar de existirem referências bibliográficas que relacionam os canídeos de raça Pastor Alemão com uma maior frequência e um quadro clínico mais severo nas formas crónicas de ehrlichiose monocítica (Nyindo *et al*, 1980), em geral a raça não é considerada um factor risco para esta doença (Kuehn e Gaunt, 1985).

Em relação à ehrlichiose monocítica canina demonstrou-se a inexistência de um padrão de sazonalidade para a seroprevalência ( $p=1,286>0,05$ ), o que poderá ser explicado pela persistência de anticorpos que se mantém até 12 meses após contacto com *E. canis* (Weisiger *et al*, 1975), estando também descritos casos clínicos em que o títulos de anticorpos se mantem elevados até 31 meses depois do inicio da terapêutica (Perille e Matus, 1991), evidência que poderá resultar na ausência de seronegativação que se daria nos períodos de menor contacto com o vector *R. sanguineus*.

Para a borreliose de Lyme os valores de seroprevalência registados nesta dissertação são nitidamente inferiores aos registados na Península Ibérica, respectivamente 9% (Núncio, 2001), 11,6% (Delgado *et al*, 1995) e 21% (Merino *et al*). Entre as várias razões que podem implicar estas diferenças, destacam-se as baixas taxas de parasitação do cão por *I. ricinus* em Portugal em especial no sul do país (Núncio, 2001). No Algarve, tal como em outras regiões Mediterrânicas, a humidade relativa situa-se abaixo dos 85% e a temperatura média anual acima dos 12°C serão os principais factores que limitaram a sobrevivência das populações de *I. ricinus* (Estrada-Peña, 2004b) e conseqüentemente a

dispersão da borreliose de Lyme nesta região. Manelli et al (1999), realizaram rastreio serológico numa população de canídeos da Itália central, determinando uma seroprevalência de borreliose de Lyme de 0%, confirmando que na bacia do Mediterrâneo os canídeos apresentam seroprevalências muito inferiores aos dos países do norte e centro da Europa onde existem condições climáticas que permitem a sobrevivência de populações de *I. ricinus*. Outro aspecto a ter em atenção na interpretação destes resultados de seroprevalência, prende-se com o valor predictivo dos testes em áreas não-endémicas, nomeadamente testes serológicos como IFI que permitem reacções cruzadas com espiroquetas orais presentes sobretudo em canídeos com doença periodontal. O resultado da seroprevalência global (2,25%) registado nesta dissertação aproxima-se da seroprevalência registada na população humana saudável do nosso país que se situa nos 3,7% (Núncio, 2001), comprovando que a exposição a este agente não apresenta relevância nas doenças transmitidas por ixodídeos. Para a borreliose de Lyme, registou-se apenas uma associação de variáveis, nomeadamente entre a aptidão e o estado serológico do animal ou seja demonstrou-se que existia uma maior seroprevalência para os canídeos de aptidão caça quando se procedeu a análise global dos dados. Apesar de já ter sido demonstrado por diversos autores (Goossens et al, 2001) que a aptidão caça é um factor de risco para a borreliose de Lyme temos que interpretar esta associação com reserva devido ao baixo valor predictivo dos resultados de IFI em zonas não-endémicas como o Algarve, devido a possíveis reacções cruzadas.

Não foi possível demonstrar um padrão de sazonalidade para borreliose de Lyme, devido ao baixo número de animais positivos registados em cada trimestre o que invalidou a realização do teste estatístico de qui-quadrado.

### **Estudo clínico**

No estudo clínico apresentando nesta dissertação, incluíram-se canídeos presentes à consulta com um quadro clínico e achados laboratoriais compatíveis com febre botonosa, ehrlichiose monocítica canina e borreliose de Lyme. A informação recolhida na história pregressa e exame clínico permitiu caracterizar os quadros clínicos observados. Entre os casos incluídos nesta dissertação, registaram-se apenas casos de ehrlichiose monocítica canina e febre botonosa.

Entre outras informações colhidas na história pregressa verificou-se que os canídeos incluídos neste estudo clínico pertenciam na sua maioria a 5 concelhos (Faro, S. Brás de Alportel, Tavira, Olhão e Loulé) o que se relaciona com o facto, das instituições que forneceram as amostras biológicas para estudo clínico terem como área de influência os

concelhos acima referidos. Os casos clínicos observaram-se quer em canídeos de trabalho quer em canídeos de companhia, no entanto a maioria dos 55 canídeos (65%) residiam áreas rurais o que estará relacionado com uma maior exposição ao biótopo do vector, A maior frequência de canídeos de raça definida entre os 55 canídeos provavelmente estará relacionada com a população medicalizada de onde são provenientes os canídeos estudados, na qual os canídeos de raça definida são mais abundantes do que os de raça indeterminada. No entanto a raça não é considerada um factor de risco para doenças transmitidas por ixodídeos em particular para ehrlichiose monocítica canina (Kuehn e Gaunt, 1985). No momento do diagnóstico apenas 23,6% dos canídeos, faziam algum tipo de profilaxia para ixodídeos o que se compatibiliza com a elevada frequência de parasitação (42%) por ixodídeos dos canídeos presentes à consulta. Destaque para a ausência de cães vacinados para a borreliose de Lyme entre os 55 canídeos doentes, o que vem ao encontro do risco negligenciável de exposição a *B. burgdorferi s.l.* demonstrado pelas baixas seroprevalências encontradas por este trabalho.

A hipertermia, perda de peso, hipertrofia dos linfonodos, mucosas pálidas e petéquias foram os sinais clínicos observados com maior frequência, respectivamente 84%, 60%, 20%, 36% e 15% respectivamente. A presença de ixodídeos foi observada em 42% dos canídeos. Todos estes sinais contituem quadros clínicos bastante inespecíficos mas que na generalidade são compatíveis com febre botonosa (Font *et al*, 1992) e ehrlichiose monocítica canina (Harrus *et al*, 1997) em fase aguda. A observação de mucosas pálidas em 36% dos casos, apesar de se considerar um sinal subjectivo acompanha a alta frequência de anemia que se verificou nesta dissertação. A presença de sinais que indicam tendências hemorrágicas em particular petéquias e epistáxis foi registado em 15% e 5% dos casos estudados, valores que ficaram aquém do observado por Woody e Hoskins (1991) que observaram epistáxis em 46% dos canídeos com ehrlichiose monocítica canina. Nem sempre as hemorragias são um factor de risco para ehrlichiose monocítica ou febre botonosa (Trapp *et al*, 2002). Apesar dos sinais hemorrágicos ocorrerem com maior frequência a contagens de plaquetas inferiores a 40 000/ul (Codner *et al*, 1986), tanto *E. canis* como microrganismos do género *Rickettsia spp.* não causam obrigatoriamente trombocitopenia em todos os casos clínicos (Bulla *et al*, 2004), além disso temos de considerar a existência de diferenças na patogenicidade entre as várias estirpes que se podem reflectir por diferenças na magnitude da trombocitopenia e por consequência na prevalência de sinais hemorrágicos.

As técnicas de biologia molecular, são cada vez mais utilizadas no diagnóstico de doenças transmitidas por ixodídeos, em particular nesta dissertação utilizou-se PCR para amplificar segmentos de ADN de *E. canis* e *Rickettsia spp.* o que foi conseguido em 25,4%

e 15%, respectivamente. A prevalência de *E. canis* por PCR demonstrada nesta dissertação é próxima do reportado por outros autores porém existem referências que indicam o PCR como técnica que subestima a prevalência (Bohai *et al*, 1997). Na Tailândia, em 49 cães, apresentando anemia, trombocitopenia e febre, conseguiu-se a amplificação de ADN de *E. canis* em 10 cães (20%), (Suksawat *et al*, 2002). No Brasil, o ADN de *E. canis* foi amplificado em 20% dos canídeos com febre, anemia, trombocitopenia e ixodídeos (Dagnone *et al*, 2003).

Até ao momento, nunca foi documentada a amplificação de ADN de microrganismos do género *Rickettsia spp.* a partir de canídeos infectados naturalmente ou experimentalmente, existindo apenas referências a isolamentos de *R. conorii* a partir de canídeos infectados experimentalmente (Kelly *et al*, 1992). Nesta dissertação conseguiu-se pela primeira vez a amplificação de ADN de microrganismos *Rickettsia spp.* a partir do “buffy coat” obtido de cães infectados naturalmente, utilizando o par de “primers” descritos por Regnery *et al* (1991). A sequenciação dos produtos obtidos por PCR, permitiu identificar os microrganismos envolvidos em casos de doença como pertencentes ao género *Rickettsia spp.* Dos canídeos em que se amplificou ADN alvo de microrganismos do género rickettsia, em nenhum deles se amplificou ADN de *E. canis* o que implicaria este microrganismo como causa de doença no cão.

A amplificação de segmentos de ADN de *E. canis* por PCR foi conseguida pela primeira vez em Portugal e na Península Ibérica. A sequenciação dos produtos de PCR permitiu identificar os microrganismos como pertencentes à espécie *Ehrlichia canis*. A técnica de PCR provou ser um meio de diagnóstico precoce, registando-se 43% de casos positivos por esta técnica que não apresentavam IgG por IFI, comprovando as observações de Matthew *et al* (2000) que conseguiram amplificar ADN de *E. canis* aos 7 dias pós-infecção antes de detectar IgM e IgG por IFI.

O isolamento de *R. conorii* foi tentado sem sucesso em 55 canídeos, evidência que se afasta dos resultados obtidos por Bacellar *et al* (2003) que conseguiram isolamentos em 4,8% das amostras de 228 pacientes humanos com quadro clínico de febre botonosa remetidas. Entre as possíveis razões que possam estar na origem destas diferenças destacam-se dificuldades logísticas em realizar o isolamento no próprio dia da colheita, o que segundo La Scola e Raoult (1997) pode inviabilizar o sucesso no isolamento de *R. conorii*.

A trombocitopenia foi a anomalia hematológica mais frequente entre os canídeos incluídos neste estudo, registando-se em 96% dos casos, destacando-se destes 58% com contagens inferiores a 100 000 plaquetas/ul. Nos EUA, a trombocitopenia é um achado comum em cães nos quais se diagnosticou ehrlichiose monocítica canina (Neer *et al*, 2002). Em vários estudos retrospectivos realizados neste país, registaram-se trombocitopenia em 77% dos casos (Frank e Breitschwerdt, 1999) e em 86% dos casos (Woody e Hoskins, 1991) de ehrlichiose monocítica canina, valores que suportam os registados nesta dissertação. Contudo temos que ter em atenção que neste estudo clínico registaram-se casos de ehrlichiose monocítica e alguns casos de rickettsioses em canídeos, que contribuíram obviamente para um aumento da frequência da trombocitopenia. As alterações do leucograma registadas tenderam marcadamente para a leucopenia, que se observou em 47% dos casos em oposição à leucocitose que se verificou em apenas 4% dos casos, resultados que são compatíveis com os registados por Kanayama *et al* (2003) que reportaram 29,17% e 12,50% de leucopenia e leucocitose respectivamente em canídeos afectados por formas agudas de ehrlichiose. Apesar de não existirem casos documentados de febre botonosa canina, os casos humanos de febre botonosa são também acompanhados de leucopenia ou de leucocitose (Poças *et al*, 2002).

A anemia foi observada em 73% dos casos. A prevalência de anemia registada até hoje em estudos semelhantes é bastante variável; Frank e Breitschwerdt (1999) registaram-na em 43% dos casos e Baneth *et al* (1996) em 41% dos casos. As diferenças registadas podem dever-se sobretudo a diferenças na patogenicidade das estirpes implicadas ou na definição de critérios laboratoriais de anemia. Temos que considerar também infecções mistas por outros microrganismos como *Babesia canis* que podem conduzir a frequências mais elevadas de anemia, para além de que nos 55 casos clínicos incluem-se também casos de infecção por outros microrganismos do género *Rickettsia spp.* cuja a influência na indução de anemia é ainda desconhecida, sabendo-se apenas que *Rickettsia rickettsii* agente da febre das montanhas rochosas em canídeos pode causar anemia por perda de sangue (Couto, 2003a).

A observação de agentes infecciosos em esfregaço de “buffy coat” após leucoconcentração foi outro dos aspectos abordado durante a investigação dos 55 casos clínicos. Observaram-se mórulas de *E. canis*, em 5,4% dos esfregaços observados, valor próximo do observado por Elias (1991) que observou mórulas em apenas 4% dos esfregaços pertencentes a 221 canídeos infectados naturalmente por *E. canis*. A detecção de mórulas em monócitos pela observação em microscópio é um achado ocasional não tendo grande relevância no diagnóstico laboratorial de ehrlichiose. Contudo a presença de mórulas tem valor de diagnóstico definitivo sendo porém mais frequente na fase aguda da

doença (Harrus *et al*, 1997a). A presença de outros microrganismos transmitidos por *R. sanguineus* foi também observada em esfregaço sanguíneo, nomeadamente *Hepatozoon canis* e *Babesia canis* em 1,8% dos casos.

A seroprevalência de ehrlichiose monocítica canina e febre botonosa nos 55 canídeos estudados, foi respectivamente de 20% e 51%. No primeiro caso, a seroprevalência é semelhante a valores registados por Dagnone *et al* (2003), que determinaram uma seroprevalência de 21,7% de ehrlichiose monocítica canina, em 129 canídeos suspeitos de doença transmitida por ixodídeos. Apesar das semelhanças nas prevalências, a IFI não diferencia entre canídeos com infecção activa e os previamente expostos ao microrganismo (Waner *et al*, 2001), sobrestimando o número de canídeos com ehrlichiose. Os valores da seroprevalência de ehrlichiose monocítica canina e febre botonosa que resultaram do estudo destes 55 canídeos, são nitidamente superiores aos registados para a população de canídeos em geral tal como o observado por Dagnone *et al* (2003) que observaram igualmente valores superiores na população hospitalar.

A resposta à terapêutica poderá ser um bom indicador de prognóstico em doenças transmitidas por carraças (Greene *et al*, 1998), manifestando-se esta resposta pela remissão dos principais sinais clínicos como febre, recuperação de apetite e vitalidade. Na presente dissertação, dos 55 canídeos estudados, 48 responderam à terapêutica específica instituída; dos 7 que não responderam, 3 acabaram por morrer. O protocolo instituído com mais frequência constou da administração de dipropionato de imidocarb e doxiciclina, apesar de um estudos clínico (Sainz-Rodriguez, 1996) referir que a associação destes dois princípios activos não apresenta vantagem sobre a administração individual de cada um deles, acreditámos porém que na prática clínica a administração destes dois princípios activos em conjunto é vantajosa devido à possibilidade de infecções mistas que incluem para além de *E. canis* e *Rickettsia spp.*, protozoários como *Babesia canis* que são apenas sensíveis ao dipropionato de imidocarb.

Entre as alterações do perfil bioquímico, as anomalias registadas com maior frequência foram a hipoalbuminemia e a hiperglobulinemia, respectivamente observadas em 68% e 58% dos casos. Estes valores apesar de se aproximarem dos valores registados por Woody e Hoskins (1991) para hipoalbuminemia (43%) e hiperglobulinemia (39%) em cães infectados naturalmente por *E. canis* e de estas alterações serem comuns em doentes com febre botonosa (Poças *et al*, 2002), devemos ter em atenção que o perfil bioquímico realizou-se em apenas 19 canídeos por razões financeiras, podendo estes valores estarem enviesados pelo que referimos anteriormente. Adicionalmente verificaram-se elevações das enzimas hepáticas em 26% dos casos estudados. O aumento dos níveis de enzimas

hepáticas é uma anomalia laboratorial reportada em infecções por *E. canis*, Woody e Hoskins (1991) observaram a elevação de enzimas hepáticas em 35% dos canídeos com ehrlichiose. Em relação ao agente da febre botonosa, apesar de se referir o aumento de enzimas hepáticas em pacientes humanos nos canídeos não se registou esta alteração bioquímica (Kelly *et al*, 1992).

A análise histopatológica dos tecidos ricos em sistema mononuclear fagocitário, permitiu observar algumas alterações que serão relacionáveis com as anomalias hematológicas e a fisiopatogenia das infecções por *E. canis* e *Rickettsia spp*. A hemorragia e a congestão ao nível dos alvéolos pulmonares poderá ser explicada pela trombocitopenia e vasculite associadas a infecções pelos microrganismos referidos anteriormente. As alterações de hiperplasia linfoplasmocitária observadas no baço estarão relacionadas com o tipo de resposta imunitária celular associada a infecções por *E. canis* e *R. conorii* sendo o baço um órgão central neste tipo de resposta como foi comprovado por Harrus *et al* (1998). A elevação das enzimas hepáticas observada nestas doenças tem correspondência a nível histopatológico, como se verificou pela presença da degerescência vacuolar dos hepatócitos, lesão que poderá advir da hipóxia associada a anemia verificada nas infecções por *E. canis* ou *Rickettsia spp* ou até pelo efeito citopático resultante da libertação de radicais livres de oxigénio descritos em infecções por rickettsias (Walker *et al*, 2003). Em nenhum dos cortes histológicos se observou mórulas de *E.canis* apesar da riqueza dos órgãos em células do sistema mononuclear fagocitário.



## VI-Conclusões

O cão enquanto animal doméstico cada vez mais numeroso e frequente nas nossas casas, desempenha um papel fundamental como espécie sentinela de zoonoses. A partilha do espaço doméstico e de actividades de exterior com este animal transformam este animal num veículo ideal para o transporte de ixodídeos e dos agentes infecciosos que estes transmitem para o contacto com o homem. As alterações climáticas verificadas actualmente criaram condições para o proliferar de ixodídeos nomeadamente do complexo *R. sanguineus* e das doenças transmitidas por estes o que associado a o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular aplicadas ao diagnóstico laboratorial permitiram implicar novas espécies de microrganismos como agentes de doença em Medicina e Medicina Veterinária.

Os resultados desta dissertação demonstraram que uma população de canídeos do Algarve foi exposta a febre botonosa, ehrlichiose monocítica canina, borreliose de Lyme e poderá ser utilizada no futuro como bioindicador de febre botonosa e borreliose de Lyme para a população humana, provou-se também a inexistência de um padrão de sazonalidade nos resultados serológicos de febre botonosa, ehrlichiose monocítica canina e borreliose de Lyme. Tal como em outros rastreios executados no sul de Portugal, concluiu-se neste trabalho que a espécie *R. sanguineus* é o principal ixodídeo a parasitar a população de canídeos do Algarve, depreendo-se por isso que existe a possibilidade de transmissão de determinados agentes infecciosos (ex: *R. conorii*, *E. canis*, *Hepatozoon canis* e *Babesia canis*) em detrimento de outros microrganismos (ex: *Borrelia burgdorferi s.l.* e *Anaplasma phagocytophilum*) não associados a esta espécie de vector.

Através de técnicas de biologia molecular foi possível também implicar pela primeira vez microrganismos do género *Rickettsia spp.* como agentes de doença no cão bem como a existência de *Ehrlichia canis* em circulação na população de canídeos do sul de Portugal. Estas evidências são sem dúvida a principal inovação desta dissertação devendo a infecção por microrganismos do género *Rickettsia spp.* ser considerada entre os diagnósticos diferenciais de quadros sintomatológicos que incluam febre, anorexia e petéquias associados a anomalias laboratoriais como trombocitopenia, leucopenia e anemia. Adicionalmente podemos também concluir que o risco de contacto da população de canídeos com *Borrelia burgdorferi s.l.* nesta região é negligenciável.

Todos estes resultados levantaram várias questões que deverão ser em nossa opinião objecto de futuros estudos:

- Quais serão as espécies de microrganismos (para além daqueles estudados neste trabalho) transmitidos por ixodídeos que terão importância enquanto agentes de doença no cão e em saúde pública veterinária em Portugal?
- Qual seria a importância da construção de uma rede de clínicos veterinários sentinela para as doenças transmitidas por ixodídeos?
- Qual será a importância do cão enquanto hospedeiro reservatório de microrganismos do género *Ehrlichia spp* enquanto agentes de doença no homem?

## **VII-Bibliografia**

Almeida, V., 1996. Ixodídeos da zona planáltica do Paul da Serra. Contribuição ao estudo da sua ecologia. *O Médico Veterinário*. 46:5-22.

Aguero-Rosenfeld, M.E., 2003. Laboratory Aspects of Tick-Borne Diseases: Lyme, Human Granulocytic Ehrlichiosis and Babesiosis. *The Mount Sinai Journal of Medicine*. 70(3):197-204.

Appel, M.J.G., 2002. Lyme disease in dogs. *Emerging Vector-Borne and Zoonotic diseases- A supplement to Compendium*. 24(1):19-23.

Artur, D.R., 1962. Ticks and Disease, International Series of Monographs on Pure and Applied Biology, G. Kerkut (ed.), Pergamon Press, Vol IX, pp 445.

Azevedo, A., 1937. A febre botonosa de Conor e Bruch (febre escaro nodular de Ricardo Jorge) em Coimbra. *Coimbra Medica*. 4:571-614.

Azuma, Y., Kawamura, K., Isogai, H., Isogai E., 1993. Neurologic abnormalities in two dogs suspected Lyme disease. *Microbiology and Immunology*. 37(4):325-9.

Bacellar, F., Núncio, M.S., Reháček, J., Filipe, A.R., 1991. *Rickettsiae* and Rickettsioses in Portugal. *European Journal of Epidemiology*. 5:291-293.

Bacellar, F., Regnery, R.L., Nuncio, S., Filipe, A.R., 1995a. Genotypic evaluation of Rickettsial isolates recovered from various species of ticks in Portugal.

Bacellar, F., Dawson, J.E., Silveira, C.A. Filipe, A.R., 1995b. Antibodies against Rickettsiaceae in Dogs of Setúbal, Portugal. *Central European Journal public Health*. 2:100-102

Bacellar, F., 1996. Rickettsias isoladas em Portugal – contribuição para a identificação e classificação de estirpes. Tese de Doutoramento, Universidade de Évora, Évora.

Bacellar, F., Beati, L., França, A., Poças J., Regnery, R., Filipe, A.R., 1999. Israeli spotted fever rickettsia (*Rickettsia conorii* Complex) associated with human disease in Portugal. *Emerging infectious Diseases*. 5(6): 835-836.

Bacellar, F.C., Filipe, A.R., 2001. Actuais metodologias aplicadas no diagnóstico laboratorial de rickettsioses. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*. 24(1-4): 34-38.

Bacellar, F., Santos, A., Sousa, R., Santos-Silva, M., Courelas, C., Núncio, S., 2002. Domestic dogs, *Rhipicephalus sanguineus*-group ticks, and pathogenic and non-pathogenic rickettsiae. Comunicação pessoal.

Bacellar, F., Sousa, R., Santos A., Santos-Silva, M., Parola, P., 2003. Boutonneuse fever in Portugal:1995-2000. Data of a state laboratory. *European Journal of Epidemiology*.18: 275-277.

Baneth, G., Waner, T., Koplak, A., Weinstein, S., Keysary, A., 1995. Survey of *Ehrlichia canis* antibodies amongst dogs in Israel. *Veterinary Record*. 138:257-259.

Baranton, G., Postic, D., Saint Girons, I. *et al*, 1992. Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp.nov. and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 42: 378-383.

- Barbour, A.G., 1992. Antigenic variations in Borrelial Diseases of humans. In: David Walker (Ed.) Global Infectious Diseases. 205-219.
- Barthold, S.W., 1991. Infectivity of *Borrelia burgdorferi* relative to route of infection and genotype in laboratory mice. *Journal of Infectious Diseases*. 163: 419-420.
- Beati, L., Roux, V., Ortuno, A., Castella, J., Segura-Porta, F., Raoult, D., 1996. Phenotypic and genotypic characterization of spotted fever group rickettsiae isolated from catalan *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Journal of Clinical Microbiology*. 34: 2688-2694.
- Beugnet, F. 2004. Antiparasitaires externes chez les carnivores domestiques. *EMC-Vétérinaire*. 1:138–153.
- Bhide, M, Travnicek, M, Curlik, J, Stefancikova, A, 2004. The importance of dogs in eco-epidemiology of Lyme borreliosis: a review. *Veterinary Medicine*. – Czech. 49 (4): 135–142..
- Breitschwerdt, E.D., Woody, B.J., Zerbe, C.A., Buyscher, E.V.D., Barta, O., Buisscher, E.V., 1987. Monoclonal gammopathy associated with naturally occurring canine ehrlichiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 1:2-9.
- Breitschwerdt, E.D., 1995. The rickettsioses. In: Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the dog and cat. Ettinger SJ, Feldman EC (ed.) W.B. Saunders. Philadelphia. pp 376-383.
- Breitschwerdt, E.D., Abrams-Ogg, A.C.G., Lappin, M.R., 2002. Molecular evidence supporting *Ehrlichia canis*-like infection in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 16:642-649.
- Brouqui, P., Bacellar, F., Baranton, G., *et al*, 2004. ESCMID Study Group Report–Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*. 10(12): 1108-1132.
- Botros, B.A.M, Elmolla, M.S., Salib, A.W., Calamaio, C.A., Dasch, G.A., Arthur, R.R., 1995. Canine ehrlichiosis in Egypt: sero-epidemiological survey. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 62: 41-43
- Brockus, C.W., Andreasen, C.B. *Erythrocytes*. In: Latimer KS, Mahaffey EA, Prasse KW, editors. *Clinical pathology*. Duncan and Prasse Veterinary laboratory medicine; 2000.
- Bulla, C., Kiomi Takahira, R., Pessoa Araújo, J., Trinca, L.A., Souza Lopes, R., Wiedmeyer, C.E., 2004. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. *Veterinary Research*. 35:141–146
- Burgess, E.C., 1986a. Experimental inoculation of dogs with *Borrelia burgdorferi*. *Zentralbl Bakteriol Microbiol Hyg(A)*. 263: 49-54.
- Burgess, E.C., 1986b. Natural exposure of Wisconsin dogs to the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*). *Laboratory Animal Science*. 36, 288–290.
- Caeiro, V., 1992. As carraças em Portugal: seus hospedeiros domésticos e silvestres. Ciclos vitais e preferências de vegetação e clima. *O Médico Veterinário*. 28:7-25.

Cannon, R., Roe, R. T., 1982. *Livestock Disease Surveys: a field manual for veterinarians*. Canberra: Australian bureau of animal health.

Cerundolo, R., 2004. Generalized *Microsporum canis* dermatophytosis in six Yorkshire terrier dogs. *Veterinary Dermatology*.15(3):181-187.

Cohn, L.A., 2003. Ehrlichiosis and related infections. *Veterinary Clinics of North America - Small Animals*. 33:863–884

Codner, E.C., Roberts, R.E., Ainsworth, G., 1985. Atypical findings in 16 cases of canine ehrlichiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 186: 166-169.

Codner E. C., Farris-Smith L., 1986. Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 189: 47-50.

Conlon, J.A.R. *et al.* 2000. Efficacy of a nonadjuvanted, outer surface protein A, recombinant vaccine in dogs after challenge by ticks naturally infected with *Borrelia*

Couto, G.C., 2003a. Polysystemic Rickettsial Diseases. In: *Small Animal Internal Medicine*, Nelson RW, Couto CG (ed.) Mosby. St.Louis. pp 1265-1272.

Couto, G.C., 2003b Immune-Mediated Diseases: Overview and Diagnosis. In: *Small Animal Internal Medicine*, Nelson RW, Couto CG (ed.) Mosby. St.Louis. pp 1212-1215.

Cupp, E.W., 1991. Biology of ticks. *Veterinary Clinics of North America-Small animals*, 21:1-26.

Dawson, J. E., Biggie, K. L, Warner, C. K., Cookson, K. S., Jenkins, J. F., Levine, and Olson, J. G., 1996. Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, an etiologic agent of human ehrlichiosis, in dogs from southern Virginia. *American Journal of Veterinary Research*. 57:1175–1179.

David de Morais, J.A., Filipe A.R., Nuncio M.S., 1989. Doença de Lyme em Portugal. Caso clínico. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*.12(4): 261-276.

Davoust, B., Boni, M., Parzy, D., 1999. Apport du laboratoire au diagnostic de l'ehrlichiose monocyttaire canine. *Revue française des laboratoires*. 310: 25-32.

Delgado, S., Carmenes, P., 1995. Canine seroprevalence of *Rickettsia conorii* infection (Mediterranean spotted fever) in Castilla y Leon (northwest Spain). *European Journal of Epidemiology*. 11: 597-600.

Dagnone, S.A., Autran de Morais, H.S., Vidotto, M.C., Jojima, F.S., Vidotto, O., 2003. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. *Veterinary Parasitology*. 117:285-290.

Drancourt M., Georges F., Brouqui P., Sampil J., Raoult D., 1992. Diagnosis of Mediterranean spotted fever by indirect immunofluorescence of *Rickettsia conorii* in circulating endothelial cells isolated with monoclonal antibody-coated immunomagnetic beads. *Journal of Infectious Diseases*. 166:660-663.

Donatien, A., Lestoquard, A., 1935. Existence en Algerie d'une rickettsia du chien. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*. 28:418-419.

Dupont, H.T., Raoult, D., 1993. Épidémiologie de la Fièvre Boutonneuse Méditerranéenne en France. *Med Mal Infect*. 23: 485-490.

Doby, J.M., Chewier, S., Couatarmanac'h, A., 1985. La spirochétose à tiques par *Borrelia burgdorferi* chez les chiens dans l'ouest de la France, Examens sorologiques systématiques de 806 chiens de meute et 88 chiens militaires de 14 départements, *Rec. Méd. Vét*. 164 (5): 367-374.

Elfassy, O.J., Goodman, F.W., Levy, S.A., Carter, L.L., 2001. Efficacy of an amitraz-impregnated collar in preventing transmission of *Borrelia burgdorferi* by adult ixodes scapularis to dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Vol 219 (2): 185-188.

Elias, E., Homans, P.A., 1988. *Hepatozoon canis* infection in dogs: clinical and hematological findings; treatment. *Journal of Small Animal Practice*. 29: 55-62.

Elias, E., 1991. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*. *Journal of Small Animal Practice*. 33: 540-553

Endris, R.G., Hair, J.A., Katz, T.L., Zobre, E., Pennington, R.G., Meyer, J.A., 2002. Efficacy of three dose volumes of topically applied 65% permethrin against *Ctenocephalides felis* and *Rhipicephalus sanguineus* on dogs weighing 30 kg or more. *Veterinary Therapeutics*. 3(4):435-40.

Ewing, S.A., Buckner, R.G., 1965. Observations on the incubation period and persistence of *Ehrlichia* sp. In experimentally infected dogs. *Veterinary Medicine*. 60:152-155.

Estrada-Peña, A., 1994. Las garrapatas en Españã: introducción. *Consejería de Sanidad y Bienestar Social. Junta de Castilla y León (ed.)*. Valladolid.

Estrada-Peña, A., Oteo, J.A., Estrada-Peña, R., Gortázar, C., Osácar, J.J., Moreno, J.A., Castellá, J., 1995. *Borrelia burgdorferi* s.l. in ticks (Acari:Ixodidae) from two different foci in Spain. *Experimental & Applied Acarology*.19:173-190.

Estrada-Peña, A., 2004a. As carraças do cão na Península Ibérica: espécies, distribuição, ecologia e controlo. In: *As carraças do cão e as doenças transmitidas na Península Ibérica: uma panorâmica com aspectos zoonóticos (ed.) Virbac Saúde animal*. Lisboa. pp 7-19.

Estrada-Peña, A., 2004b. Borreliose de Lyme no cão. In: *As carraças do cão e as doenças transmitidas na Península Ibérica: uma panorâmica com aspectos zoonóticos (ed.) Virbac Saúde animal*. Lisboa. pp 58-61.

Espejo-Arenas, E., Font-Creus, B., Bella-Cueto, F.B., Segura-Porta F.S., 1986. Climate factors in resurgence of Mediterranean Spotted Fever. *The Lancet*. I:1333-1336.

Falco, R.C., Smith, H.A., Fish, D., 1993. The distribution of canine exposure to *Borrelia burgdorferi* in a Lyme disease endemic area. *American Journal of Public Health*. 83:1305–1310.

Felek, S., Greene, R., Rikihisa, Y., 2003. Transcriptional Analysis of *p30* Major Outer Membrane Protein Genes of *Ehrlichia canis* in Naturally Infected Ticks and Sequence Analysis of *p30-10* of *E. canis* from Diverse Geographic Regions. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(2):886–888.

Ferreira, B.R., Silva, J.S., 1999. Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. *Immunology*. 96:434-439.

Font, A., Closa, J.M., Mascort, J. 1992. Tick – transmitted diseases: a comparative study of Lyme disease, canine ehrlichiosis and rickettsiosis in the dog. *Veterinary International*.3:3-13.

Frank, J.R., Breitschwerdt, E.B., 1999. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 13: 194-201.

Fritz, C.L., Kjemtrup, A.M., 2003. Lyme borreliosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 223(9): 1261-1270.

Garris, G.I., 1991. Control of ticks. *Veterinary Clinics of North America-Small animals*. 21: 173-183.

Gern, L., Estrada-Pena, A., Frandsen, J., Gray, T., Jaenson, F., Jongejan, O., Khal, E., Korenberg, R., Mehl, R., Nuall, P. 1998. European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Zentbl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektkrankh. Hyg. Abt. 1 Orig.* 287:196–204.

Gilot, B., Marjolet, M., 1982. Contribution à l'étude du parasitisme humain par les tiques (*Ixodidae* et *Argasidae*) , plus particulièrement dans le Sud-Est de la France. *Med Mal Infect.* 12:340-351.

Gilot, B., Laforge, M.L., Pichot, J., Raoult, D., 1990. Relationships between the *Rhipicephalus sanguineus* Complex ecology and Mediterranean Spotted Fever epidemiology in France. *European Journal of Epidemiology*. 6(4):357-362.

Gilot, B., Laforge, M. L., Pellegrino, E., 1991. Les chiens dans l'agglomération marseillaise: quantification, repartition, caractéristiques écologiques, sociales, épidémiologiques des logements qui en sont nantis. *Sci. Vét. Méd. Comp.*, 93, n°1/2, 47-72.

Grauer, G.F., Burgess, E.C., Cooley, A.J., 1988. Renal lesions associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 193: 237-239.

Gimenez, D.F., 1964. Staining rickettsiae in youlk-sac cultures. *Stain Technology*. 39: 135-149

Gothe, R., 1999. *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodidae): frequency of infestation and ehrlichial infestations transmitted by this tick in dogs in Germany; an epidemiological study and consideration. *Wiener Tierarztliche Monatsschrift*. 86:49-56

Gray, J.S., Kahl, O., Janetzki, C., Stein, J., 1992. Studies on the ecology of Lyme disease in a deer forest in County Galway, Ireland *Journal of Medical Entomology*. 29(6):915-920.

Greene, C.E., Burgdorfer, W., Cavagnolo, R., Philip, R.N., Peacock, M.G., 1985. Rocky Mountain spotted fever in dogs and its diferentiation from canine ehrlichiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 186: 465-472.

Greene, C.G., Breitschwerdt, E.B. : Rocky Mountain Spotted Fever, Q Fever, and Typhus. In: Greene CE (ed): *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 2<sup>nd</sup> ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1998, pp.155-165.

Greene, C.G., Appel, M.J.G., Straubinger:Lyme borreliosis. In: Greene CE (ed): *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 2<sup>nd</sup> ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1998, pp. 282-293.

Groves, M.G., Dennis, G.L., Amyx, H.L., Huxsoll, D.L., 1975. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *American Journal of Veterinary Research*. 36. 937-940

Goossens, H., Bogaard, A., Nohlmans, M., 2001. Dogs as sentinels for human Lyme borreliosis in the Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology*.39:844–848.

Guerra, M.A., Walker, E.D., Kitron, U., 2000. Quantitative approach for the serodiagnosis of canine Lyme disease by the immunoblot procedure. *Journal of Clinical Microbiolog*. 38:2628.

Harrus, S., Waner, T., Avidar, Y., Bogin, E., Peh, H., Bark, H., 1996a. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. *Veterinary Parasitology*. 66: 241-249.

Harrus S., Waner T., Keysary A., Aroch I.,Voet H., Bark H.,1996b. Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 51: 13-20

Harrus, S., Bark, H., 1997a. Waner., T. Canine monocytic ehrlichiosis: An update. *Compendium of Continuing Education for the Veterinary Practitioner*.19 (4) :431-444.

Harrus, S., Aroch., I., Levy., E., Bark, H., 1997b. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. *Veterinary Record*.141(10):247-50.

Harrus S., Waner T., Keysary A., Aroch I.,Voet H., Bark H.,1998. Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 62: 15–27.

Harrus S., Waner T., Bark H., Jongejan F., Cornelissen A., 1999. Minireview - Recent Advances in Determining the Pathogenesis of Canine Monocytic Ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(9) : 2745–2749.

Harrus S., Day M.J., Waner T., Bark H., 2001. Presence of immune-complexes, and absence of antinuclear antibodies, in sera of dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Microbiology*. 83: 343-349.

Hibler S.C., Hoskins J.D., Greene C.E., 1986. Rickettsial infections in Dogs: Part II. Ehrlichiosis and infectious cyclic thrombocytopenia. *Compendium of Continuing Education for the Veterinary Practitioner*. 8:106-114.

Hinrichsen, V.L., Whitworth, U.G., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Mather, T.N., 2001. Assessing the association between the geographic distribution of deer ticks and seropositivity rates to various tick-transmitted disease organisms in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 218:1092–1097.

Hoskins, J.D., 1991. The brown dog tick. *Veterinary Clinics of North America-Small animals*. 21:99-101.

Hovius, J.W.R., Hovius, K.E., Oei, A., Houwers, D.J., van Dam, A.P., 2000. Antibodies against specific proteins of and immobilizing activity against three strains of *Borrelia burgdorferi* sensu lato can be found in symptomatic but not in infected asymptomatic dogs. *Journal of Clinical Microbiology*. 38:2611–2621.

Huxsoll, D.L., Hildebrandt, PK, Nims, RM, Ferguson, JA, Walker, JS, 1969. Ehrlichia canis – the causative of a hemorrhagic disease of dogs? *Veterinary Record*, 85:587.

Huxsoll, D.L., Hildebrandt, PK, Nims, RM, Walker, JS, 1970. Tropical canine pancytopenia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 157 (11): 1627-1632.

Huxsoll, D.L., 1990. The historical background and global importance of ehrlichiosis. In: Ehrlichiosis. A vector-borne disease of animals and man. Williams J C, Kakoma I (ed). Kluwer Academic Publishers. pp 1-8.

Ifrance home page, 2004. <http://www.ifrance.com/sitalgarve/algarveport.htm>.

Irwin, P.J., 2001. The first report of canine ehrlichiosis in Australia. *Australian Veterinary Journal*. 79(8):552-553.

IVIS home page, 2004. Lyme Borreliosis In Dogs. <http://www.ivis.org>

Johnson, E.M., Ewing, S.A., Barker, R.W., Fox, J.C., Crow, D.W., Kocan, K.M., 1998. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*. 74: 277-288.

Kanayama, M. S., Cabral, D. D. Mundi, A. V., 2003. Achados Hematológicos e Bioquímicos em cães com Erliquiose canina atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia – MG. [www.propp.ufu.br/revistaeletronica/E/ACHADOS%20.PDF](http://www.propp.ufu.br/revistaeletronica/E/ACHADOS%20.PDF)

Keefe, T., Holland, C., Salyer, P.E., Ristic, M., 1982. Distribution of *Ehrlichia canis* among military working dogs in the world and selected civilian dogs in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 181: 236-238

Kelly, P.J., Matthewman, L.A., Mason, P.R., Courtney, P.R., Katsande, C., Rukwava, J., 1992. Experimental infection of dogs with Zimbabwean strain of *Rickettsia conorii*. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 95: 322-326.

Kelly, P.J., 2000. Canine Ehrlichiosis: an update. *Journal of the South African Veterinary Association*. 71(2):77-86.

Keysary, A., Torton, D.N., Gross, E.M., Torton, M., 1988. Prevalence of antibodies to *R. conorii* in dogs in Israel and its relation to outbreaks in Man. *Israeli Journal of Veterinary Medicine*. 44 (2):68-71.

Keysary, A., Waner, T., Rosner, M., 1996. The first isolation, in vitro propagation, and genetic characterization of *Ehrlichia canis* in Israel. *Veterinary Parasitology*. 62: 331-340.

Kuehn, N.F., Gaunt, S.D., 1985. Clinical and hematological findings in canine ehrlichiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 186: 355-358.

Kurtenbach, K., Sewell, H.S., Ogden, N.H., Randolph, S.E., Nu.all P.A. (1998): Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology. *Infection and Immunology*. 66: 1248–1251.

La Scola, B., Raoult, D., 1997. Diagnosis of rickettsial diseases: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *Journal of Clinical Microbiology*. 35: 2715-2727.

Liang, F.T., Jacobson, R.H., Straubinger RK, Grooters, A., Phillip, M., 2000. Characterization of *Borrelia burgdorferi* VlsE invariable region useful in canine Lyme disease serodiagnosis by Enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 38 :4160-4166.

Littman, M.P., 2003. Canine borreliosis. *Veterinary Clinics of North America Small Animal*. 33: 827–862.

Littman, M.P., 2004. Lyme disease in dogs. *Standards of care—Emergency and critical care medicine*. 6.5 1-6.

Levy, S.A., Dury P.H., 1988. Complete heart block in a dog seropositive for *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2:138–144.

Levy, S.A., 1993. Dombach DM, Barthold SW, Wasmoen TL. 1993. Canine Lyme borreliosis. *Compendium on Continuing Education for the practicing veterinarian*. 15(6):433-466.

Levy, S.A., 2001. Lyme disease. *Standards of care—Emergency and critical care*. 3(9):1-6.

Maeda, K., Markowitz, N., Hawley, R.C., Ristic, M., Cox, D., McDade, J.E., 1987. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. *New England Journal of Medicine*. 316:853-856.

- Magnarelli, L.A., Anderson, J.F., Johnson, R.C., 1987. Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections. *Journal of Infections diseases*. 156: 183–188.
- Magnarelli, L.A., Flavell, R.A., Padula, S.J., Anderson, J.F., Fikrig, E., 1997. Serologic diagnosis of canine and equine Borreliosis: Use of recombinant antigen in enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 35:169–173.
- Mannelli, A., Cerri, D., Buffrini, L., Rossi, S., Rosati, S., Arata, T., Innocenti, M., Grignolo, M.C., Bianchi, G., Iori, A., Tolari, F., 1999. Low risk of Lyme borreliosis in a protected area on the Tyrrhenian coast, in central Italy. *European Journal of Epidemiology*. 15: 371–377.
- 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.
- Marrero, M., Raoult, D., 1989. Centrifugation-shell vial technique for rapid detection of Mediterranean spotted fever rickettsia in blood culture. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 40: 197-199.
- Mather, T.N., Fish, D., Coughlin, R.T., 1994. Competence of dogs as reservoirs for Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 205(2):186-8.
- Mathew, J.S., Ewing, S.A., Malayer, J.R., Fox, J.C., Kocan, K.M., 2000. Efficacy of a modified polymerase chain reaction assay for detection of Ehrlichia canis infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 12(5):456-459.
- Matthewman, L.A., Kelly P.J., Mahan, S.M., Semu, D., Tagwira, M., Bobade, P.A., Brouqui, P., Mason, P.R., Raoult, D., 1993. Western blot and indirect fluorescent antibody testing for antibodies reactive with *Ehrlichia canis* in sera from apparently healthy dogs in Zimbabwe. *Journal of the South African Veterinary Association*. 64: 111-115.
- Matthewman, L.A., Kelly, P.J., Mahan S.M., Semu S.M., Mason P.R., Bruce D., Brouqui P., Raoult D., 1994. Reactivity of sera from dogs in Mutare, Zimbabwe, to antigens of *Ehrlichia canis* and *Cowdria ruminantium*. *Veterinary record*. 134: 498-499.
- McBride, J.W., Corstvet, R.E., Breitschwerdt, E.B., Walker, D.H., 2001. Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection with recombinant proteins. *Journal of Clinical Microbiology*. 39:315-322.
- Merino, F.J., Serrano, J.L., Saz, J.V., Nebreda, T., Gegundez, M., Beltran, M., 2000. Epidemiological characteristics of dogs with Lyme borreliosis in the province of Soria (Spain). *European Journal of Epidemiology*. 16(2):97-100.
- Melgrati, E., Pilla, M., Casa, R., Borroni, G., Tiraboschi, M., Basano, F., Traldi, G., Genchi, C., 1999. Sieroprevalenza di *Rickettsia Conorii* In Una Popolazione canina residente nel nord-ovest della provincia di Milano (EX U.S.S.L 34) a seguito di alcuni casi auctotoni di infezione umana. [www.veterinarilombardia.it/federazione/corsi/028/genchi%2007.PDF](http://www.veterinarilombardia.it/federazione/corsi/028/genchi%2007.PDF)

Mylonakis, M.E., Koutinas, A.F., Billinis, C., Leontides, L.S., Kontos, V., Papadopoulos, O., Rallis, T., Fytianou, A., 2003. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. *Veterinary Microbiology*. 91:197–204.

Mylonakis, M.E., Koutinas, A.F., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Billinis, C.D., Leontides, L.S., Kontos, V.S., 2004. Chronic Canine Ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A Retrospective Study of 19 Natural Cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 40(3):174-177.

Moody, K.D., Barthold, S.W., 1991. Relative infectivity of *Borrelia burgdorferi* in Lewis rats by various routes of inoculation. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 44: 135-139.

Nadelman, R.B., Nowakowski, J., Fish, D., Falco, R.C., Freeman, K., McKenna, D., Welch, P., Marcus, R., Aguero-Rosenfeld, M.E., Dennis, D.T., Wormser, G.P., 2001. Prophylaxis with single-dose doxycycline for the prevention of Lyme disease after an *Ixodes scapularis* tick bite. *New England Journal of Medicine*. 345(2):79-84.

Neer, T.M., : Canine monocytic and granulocytic ehrlichiosis. In: Greene CE (ed): *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 2<sup>nd</sup> ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1998, pp.139-147.

Neer, T.M., Breitschwerdt, E.B., Greene, R.T., Lappin, M.R., 2002. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the Infectious Disease Study Group of the ACVIM. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 16:309-315.

Nyindo, M., Huxsoll, D.L., Ristic, M., Kakoma, I., Brown, J.L., Carson, C.A. and Stephenson, E.H., 1980. Cell-mediated and humoral immune responses of German Shepherd dogs and Beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. *American Journal of Veterinary Research*, 41: 250-254.

Norment B.R., Burgdorfer W., 1984. Susceptibility and reservoir potential of the dog to spotted fever-group rickettsiae. *American Journal of Veterinary Research*. 45: 1706-1710.

Núncio, M.S., 1988a. “Relatório do Estágio realizado no Centro de Zoologia do Instituto de Investigação Científica Tropical” (não publicado).

Núncio, M.S., 1988b. “Relatório do Estágio realizado na Universidade de Évora (Núcleo da Mitra)” (não publicado).

Núncio M.S., Bacellar F., Filipe A.R., 1999. Antibodies against *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia conorii* in dogs from Portugal. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 289: 711-716.

Núncio, M.S., 2001. Contribuição para o estudo de borrelíias e borreliose de Lyme em Portugal. Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências/Universidade de Lisboa, Lisboa.

Papazahariadou, M.G., Saridomichelakis, M.N., Koutinas, A.F., Papadopoulos, E.G., Leontides, L., 2003. Tick infestation of dogs in Thessaloniki, northern Greece. *Medical Veterinary Entomology*. 17(1):110-3.

Parola P., Raoult D., 1999. Rickettsioses. Pakos-Encyc Prat Med.

Parola, P., Raoult, D., 2001. Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*. 7:80-83.

Perille, A.L., Matus, R.E., 1991. Canine ehrlichiosis in six dogs with persistently increased antibody titers. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 5: 195-198.

Perez, M., Rikihisa, Y., Wen, B., 1996. Ehrlichia canis-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *Journal of Clinical Microbiology*. 34: 2133-2139.

Poças, J., Bacellar, F., Filipe, A., 2002. Clínica e Diagnóstico laboratorial da Febre Escarotodular. *Medicina Interna*. 9 (1): 52-56.

Postic, D.; Assous, M.; Grimont, P.A.D. & Baraton, G. 1994. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidence by Restriction Fragment Length Polymorphism of rrf (5S) – rrl (23S) intergenic spacer amplicons. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44: 743-752.

Psaroulaki, A., Spyridaki, I., Ioannidis, A., Babalis, T., Gikas, A., Tselentis, Y., 2003. First Isolation and Identification of *Rickettsia conorii* from Ticks Collected in the Region of Fokida in Central Greece. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(7):3317–3319.

Raoult, D., Rousseau, S., Toga, B., Tamalet, C., Gallais, H., Micco, P., Casanova, P., 1984. Diagnostic serologique de la Fievre Boutonneuse Mediterranee. *Pathology Biologique*. 32:791-794.

Raoult D., Rousselier P., Tamalet J., 1988. In vitro evaluation of Josamycin, Spiramycin and Erythromycin against *Rickettsia rickettsii* and *R. conorii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 32 (2): 255-256.

Raoult, D., Walker, D.H., 1990. *Rickettsia rickettsii* and other spotted fever group rickettsiae (Rocky Mountain Spotted Fever and other spotted fevers) in :G.L. Mandell, R.G. Douglas, J.E. Bennett. *Principles and Practice of infectious disease* (3<sup>rd</sup> edition). Churchill Livingstone. New York. 1465-1470.

Raoult, D., Drancourt, M., 1991. Antimicrobial therapy of rickettsial diseases. *Antimicrobials Agents Chemotherapy*. 35: 2457-2459.

Raoult, D., 1992. Relatório. Unité des Rickettsies-OMS Marseille.

Raoult, D., Roux, V., 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clinical Microbiology*. 10: 694-719.

Regev-Yochay G., Segal E., Rubinstein E., 2000. Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Deficiency: Possible Determinant for a Fulminant Course of Israeli Spotted Fever. *IMAJ* 2000; 2: 781-782.

Regnery, R.L., Spruill, C.L., Plikaytis, B.D., 1991. Genotypic identification of *Rickettsiae* and estimation of interspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *Journal of Bacteriology*. 173:1576-89.

Rehacek, J., Tarasevich, I.V., 1988. *Acari-Borne Rickettsiae & Rickettsioses in Euroasia*. Veda Publishing House Bratislava. 1:1-343.

Rehacek, J., 1989. Ecological relationships between Ticks and Rickettsiae. *European Journal of Epidemiology*. 5(4):407-413.

Rijkema, S. G., M. J. Molkenboer, L. M. Schouls, F. Jongejan, J. F. Schellekens. 1995. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *Journal of Clinical Microbiology*. 33:3091–3095.

Rikihisa, Y., 1991. The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 4, 3:286-308.

Ristic, M., Holland, C.J., 1993. Canine Ehrlichiosis In: *Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals*, Woldehiwett Z., Ristic M., (eds). New York. Pergamon Press. 169-196.

Rojo Vazquez, J., 1997. Seroprevalence of the infection caused by *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia conorii* in human and canine populations in the Basic Health Area of San Andres del Rabanero (Leon, Spain). *Revista Española de Salud Publica*. 71: 173-180.

Roux, V., Raoult, D., 1995. Phylogenetic analysis of the genus *Rickettsiae* by 16S rADN sequencing. *Res Microbiol*. 146: 385-396.

Ruys T.A., Schrijver M., Ligthelm R., Van Wout J.W., 1994. Boutonneuse fever caught in The Netherlands: a traveling dog as source of *Rickettsia conorii*. *Ned Tijdschr Geneesk*. 138(52):2592-2594.

Unver, A., Perez, M., Orellana, N., Huang, H., Rikihisa, Y., 2001. Molecular and Antigenic Comparison of *Ehrlichia canis* Isolates from Dogs, Ticks, and a Human in Venezuela. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(8): 2788–2793.

Uspensky, I., Loffe-Uspensky, I., 2002. The dog factor in brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) infestations in and near human dwellings. *International Journal of Medical Microbiology*. 291 Suppl 33:156-63.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular Cloning – A laboratory Manual – 2<sup>nd</sup> Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.

Sainz, A., Tesouro, M.A., Rodríguez, F., Mayoral, I., Mazzuchelli, F., 1995. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* infections in police dogs in Spain. *Preventive Veterinary Medicine*. 23:357-358.

Sainz-Rodriguez, A. 1996. Aspectos clínicos y epizootiologicos de la ehrlichiosis canina. Estudio comparado de la eficacia terapeutica de la doxiclina y el dipropionato de imidocarb. Tese de doutoramento, Universidade complutense de Madrid, Madrid.

Sainz A., Delgado S., Amusatogui I., Tesouro, M.A., Cármenes P., 1996. Seroprevalence of canine ehrlichiosis in Castilla-León (north-west Spain). Preventive Veterinary Medicine. 29:1-7.

Satoh H., Motoi Y., Camer G.A., Inokuma, Izawa M., Kiyuuna T., Kumazawa N., Muramatsu Y., Ueno H., Morita C., 2002. Characterization of the Spotted Fever Group Rickettsiae detected in dogs and ticks in Okinawa, Japan. Microbiology and Immunology. 46(4) 257-263.

Schillhorn van Veen, T., Murphy, A., Colmeri, B., 1993. False positive *Borrelia burgdorferi* antibody titers associated with periodontal disease in dogs. Veterinary Record. 132: 512.

Shaw, E.S., Day, M.J., Birtles, R.J., Breitschwerdt E.B., 2001. Tick-borne infectious diseases of dogs. Trends in Parasitology. 17(2):74-80.

Silveira, C.A., 1992. Ehrlichiose canina. Estudo clínico de uma população animal, na região urbana e rural de setúbal – Implicações em Saúde Pública e Saúde Pública Veterinária. Tese de Mestrado em Saúde Pública Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

Skotarczack, B., 2002. Canine borreliosis-Epidemiology and Diagnostics. Ann Agric Environ Med. 9: 137–140

Skotarczack, B., Wodecka, B., 2003. Molecular Evidence of the Presence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in blood samples taken from dogs in Poland. Ann Agric Environ Med. 10:113–115.

Sood, S., Salzman, M.B., Johnson, B.J.B., 1997. Duration of tick attachment as a predictor of the risk of Lyme disease in an area in which Lyme disease is endemic. Journal of Infectious Diseases. 175:996-999.

Sousa, R., 2001. Sobre a realidade epidemiológica da febre Escaro-Nodular em Portugal-Identificação de factores de risco de morrer em doentes do distrito de Beja. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências Médicas-Universidade Nova de Lisboa .

Sousa, R., Nóbrega, S.D., Bacellar, F., Torgal, J., 2003. Acta Médica Portuguesa. 16:429-436.

Stefancikova, A., Tresova, G., Petko, B., Skardova, I., Sesztakova, E., 1998. ELISA comparison of three whole cell antigens of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in serological study of dogs from area of Kosice, Eastern Slovakia. Ann. Agric. Environ. Med. 5:25–30.

Straubinger, R.K., et al 1997a. *Borrelia burgdorferi* migrates into joint capsules and causes up-regulation on interleukin-8 in synovial membranes of dogs experimentally infected with ticks . Infection and Immunology. 65: 1273-1278.

Straubinger, R.K., Straubinger, A.F., Härter, L., Jacobson, R.H., Chang, Y.F., Summers, B.A., Erb, H.N., Appel, M.J.G., 1997b. *Borrelia burgdorferi* migrates into joint capsules and causes an up-regulation of interleukin-8 in synovial membranes of dogs experimentally infected with ticks. Infection and Immunology. 65:1273-1285.

Straubinger, R.K., Straubinger, A.F., Summers, B.A., Erb, H.N., Appel M.J.G., 1998. *Borrelia burgdorferi* induces the production and release of proinflammatory cytokines in canine synovial explant cultures. *Infection and Immunology*. 66:247-258.

Suksawat, J., Xuejie, Y., Hancock, S.I., Hegarty, B.C., Nilkumhang, P., Breitschwerdt, E.B., 2001. Serologic and Molecular Evidence of Coinfection with Multiple Vector-Borne Pathogens in Dogs from Thailand. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 15:453-462.

Tavares, L., Botas, J., Antunes, F., Araújo, F.C., 1985. A febre escaro-nodular em Portugal. I. Análise estatístico-epidemiológica dos últimos 30 anos (1955-1984). *O Médico*.113 (1769):838-846.

Tendeiro, J., 1962. Revisão Sistemática dos Ixodídeos Portugueses. *Boletim Pecuário*. 30(2):5-138.

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.

Trapp, S.M., Dagnone, A.S., Vidotto, O., Freire, R.L., de Moraes, H.S.A., 2002. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population in south Brazil. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 16: 365.

Travassos Santos Dias, J.A., Nuncio, M.S., Castelo-Branco Gonçalves, A.,1994. Contribuição para a elaboração de um inventário da fauna ixodoideológica (Acarina-Ixodoidea) de Portugal. *Garcia de Orta*. 20(1-2): 49-68.

Troy, G.C., Forrester, S.D., 1990. *Ehrlichia canis*, *E. equi* and *E. risticii* infections. In: *Infectious diseases of the dog and cat*. C.E. Greene (ed.) W.B. Saunders. Philadelphia 404-414.

Trotz-Williams, L., Trees, A.J., 2002. Distribution, Prevalence and Incidence of Vector-borne Parasitic Infections in Europe: Report to the Pet Plan Charitable Trust. *Veterinary Parasitology*, Liverpool School of Tropical Medicine. 20-23.

Van Heerden, J., Goosen, J., 1981. Attempted transmission of canine ehrlichiosis to vervet monkey . *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 48:127-128.

Vicent-Johnson, N.A., 2004. Canine and Feline ehrlichiosis. *Standards of care—Emergency and critical care*. 6:7-12.

Walker, D. H., Valbuena, G. A., Olano, J. P., 2003. Pathogenic mechanisms of diseases caused by *Rickettsia*. *Annals of New York Academy of sciences*. 990:1-1.

Waner, T., Harrus, S., Baneth, G., Weiss, D., Bark, H., Keysarya, A., 1995. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 48 :177-182.

Waner, T., Harrus, S., Bark, H., Bogin, E., Avidar, Y., Keysary, A., 1997. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. *Veterinary Parasitology*. 69 :307-317.

Waner, T., Baneth, G., Strengera, C., Keysary, A., King, R., Harrus, S., 1999. Antibodies reactive with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia phagocytophila* genogroup antigens and the spotted fever group rickettsial antigens, in free-ranging jackals (*Canis aureus syriacus*) from Israel. *Veterinary Parasitology*. 82,121-128.

Waner, T., Harrus, S., Jongejan, F., Bark, H., Keysary, A., Cornelissen, A.W., 2001. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. *Veterinary Parasitology*. 95:1-15.

Weisiger, R.M., Ristic M., Huxsoll D.L., 1975. Kinetics of antibody response to *E. canis* assayed by the indirect fluorescent antibody method. *American Journal of Veterinary Research*. 36:689-694.

Weiser, M.G., Thrall, M.A., Fulton, R., Beck, E.R., Wise, L.A., Van Steenhouse, J.L., 1991. Granular lymphocytosis and hyperproteinemia in dogs with chronic ehrlichiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 27: 84-88.

Wen, B., Rikihisa, Y., Mott, J.M., Greene, R., Kim, H.Y., Zhi, N., Couto, C.G., Unver, A., Barstch R., 1997. Comparasion of nested-PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *Journal of Clinical Microbiology*. 35:1852-1855.

Wilskle, B., Preac-Mursic, V., Schierzz, G., 1988. Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. *Annals of New York Academy of sciences*. 539:126-143.

Woody, B.J., Hoskins, J.D., 1991. Ehrlichial diseases of dogs. *Veterinary Clinics of North America-Small animals*. 21, 1: 75-98.

Zajadacz, B., Juskiewicz, A., 2002: Gonarthrits in the course of Lyme disease in a one and a half year old child. *Wiad. Lek.*, 55: 243–246.

## **VIII-Anexos**